

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

HENRIQUE RIBEIRO MÜLLER

Efeitos da terapia de choque térmico na manutenção da Resposta de Choque Térmico (*Heat Shock Response*, HSR) de camundongos fêmeos adultos *jovens e envelhecidos*

Porto Alegre

2022

HENRIQUE RIBEIRO MÜLLER

Efeitos da terapia de choque térmico na manutenção na *Heat Shock Response* (HSR) de camundongos fêmeas adultos *jovens e envelhecidos*

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

Orientador (a): Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior.

Porto Alegre

2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em especial, a todos funcionários do ICBS por terem me proporcionado usufruir de sua estrutura e recursos para que este estudo pudesse vir a ser desenvolvido. Reforçando o papel da Universidade Federal em promover o acesso universal a uma educação de qualidade, para todos os seus alunos. Democratizando as oportunidades de estudo, bem como o desenvolvimento de novos conhecimentos que venham a ser relevantes para o futuro de nossa sociedade.

Estendo este agradecimento ao PPG Fisiologia UFRGS. É com muito orgulho que posso dizer que faço parte deste Programa de Pós-Graduação, como aluno. Certamente, o curso foi um grande divisor de águas em minha formação. Junto disso, agradeço aos membros da banca avaliadora pela disponibilidade e contribuições.

Como agradecimento também, gostaria de exaltar os meus brilhantes professores, que vêm me orientando ao longo dessa jornada científica!

Primeiramente, Professor Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior, muito obrigado por abrir as portas de seu laboratório, e ter confiado em um jovem, que certamente naquele momento, podia não ter a vivência e a experiência necessária, mas que tinha o sonho de poder fazer e aprender ciência em um grande centro. És um exemplo para mim, como pessoa, professor e pesquisador! Um cientista brilhante, em que um simples diálogo já se torna o suficiente para aprender algo novo. Fico muito honrado em ser seu aluno e espero que desta parceria nasçam muitos frutos e se estenda por muitos anos ainda!

Em segundo, e não menos importante, muito pelo contrário, Professor Dr. Antônio Azambuja Miragem, muitíssimo obrigado por todos os seus ensinamentos, não só no âmbito profissional, mas como para a vida! Bem como todos os conselhos e incentivos durante este período pandêmico que foi extremamente difícil para todos nós. Sendo quase que muitas vezes, um segundo pai para mim. Eu não estaria onde cheguei se não fosse por você, ainda lá atrás, bem no início da graduação, me proporcionar fazer iniciação científica, ingressando ao Grupo de Pesquisa de Resposta Celular ao Estresse (GPreCE). Grupo onde pude conhecer pessoas

incríveis, que hoje, não são apenas colegas de curso/trabalho, mas sim, grandes amigos! Geovane, Diovana, Jaíne, Edivânia, Airton. Muito obrigado por terem compartilhado esses momentos que foram tão importantes em minha constituição enquanto cientista. E que juntos do professor, mostramos às pessoas que é possível, sim, fazer ciência com um simples pote de sorvete, terra e minhocas!

Meus cumprimentos também a todos os membros do Laboratório em Fisiologia Celular (FisCel), que me receberam muito bem e me ajudaram incessantemente ao longo do desenvolvimento desta pesquisa. “Dona” Inês, Carlos, Marcela e principalmente, a minha “sensei” dentro do laboratório, Helena. Obrigado por estar sempre comigo na bancada me auxiliando e principalmente ENSINANDO, com muita clareza, seriedade e paciência. Não foi fácil, devido a todo o cenário que tivemos que enfrentar, mas conseguimos superar isso. Muito disso, em função de ser sem sombra de dúvidas, uma exímia profissional, um verdadeiro exemplo a ser seguido. Tem minha profunda admiração e gratidão, pois sem teu suporte, nada disso seria possível!

Aos meus familiares, principalmente aos meus pais, Marcelo e Claudia, simplesmente não tenho palavras para agradecer o que fizeram e fazem por mim. Meu muito obrigado, por me mostrarem a importância dos estudos. Por sempre terem me incentivado a ir cada vez mais longe, não hesitando em nenhum momento para eu alcançar meus objetivos. Isso tudo é para vocês! Ao meu tio, Airton, fica aqui o meu muito obrigado também, pois além de ser meu porto seguro aqui pelas bandas da capital, assim como meus pais, sempre está me apoiando.

E por fim, a todos os meus amigos, o meu muitíssimo obrigado! A pandemia por um tempo, fez com que não pudéssemos nos ver, bem como a distância em função de minha mudança. Mas isso jamais nos impediu de continuarmos juntos todos os dias, rindo de nossas piadas e memes; sofrendo, reclamando e zoando nossos times de futebol, mas também, principalmente, apoiando e dando força uns aos outros quando preciso. Obrigado a todos que me ajudaram de certa forma, a encurtar esse distanciamento físico, seja por uma simples mensagem, ou por nossas videochamadas. Espero muito em breve estarmos todos reunidos para comemorarmos essa conquista do jeito que sempre fizemos, com muita fartura e alegria.

FINANCIAMENTO: Este estudo foi financiado com recursos públicos provenientes do CNPq.

Este trabalho foi submetido à revista *Molecular and Cellular Biochemistry* e se encontra em fase de revisão, bem como na forma de *preprint* em DOI:

<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1714008/v1>

Resumo

A menopausa é um evento decorrente do envelhecimento natural do organismo feminino, em que há a falência ovariana, que, por consequência leva ao hipoestrogenismo. Com a redução gradual das concentrações de estrogênio (E2), a mulher torna-se mais suscetível a desenvolver um quadro de inflamação crônica de baixo grau. Os baixos níveis de E2 reduzem a expressão de genes que afetam o balanço entre o gasto e consumo energético, além de afetar negativamente o metabolismo de carboidratos e lipídeos. Por outro lado, o E2 possui a capacidade de induzir a expressão da proteína HSP72, um dos membros da família de proteínas de choque térmico de 70 kDa, as quais são anti-inflamatórias e citoprotetoras. Possuem a expressão modulada por diferentes tipos de situações fisiologicamente estressoras, incluindo o estresse por calor. Portanto, durante a perimenopausa, várias funções homeostáticas baseadas na expressão de HSP70 dependente de E2 podem entrar em colapso. Neste estudo, investigamos os efeitos do envelhecimento em camundongos fêmeos, sob a ótica da Resposta de Choque Térmico (*Heat Shock Response*, HSR) via eixo óxido nítrico (NO)-proteínas de choque térmico de 72 kDa, mediada por E2. Utilizamos camundongos fêmeos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6J: adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses), sendo submetidos aos seguintes tratamentos: HS (choque térmico por 2 meses 1 x por semana = 8 sessões com anestesia) ou SHAM (animais controles anestesiados, a 37 °C ou mantidos em sala com ar condicionado desligado e luz de tungstênio para manter a temperatura). Observamos que, o conteúdo de HSP72 (HSPA1A) muscular do gastrocnêmio apresentou um aumento de 59 % no grupo HS quando comparado ao grupo SHAM nas fêmeas adultas e um aumento de 77 % no grupo HS comparado ao grupo SHAM ($p=0,0341$). Ainda com relação à HSP72, houve diferença ($p=0,0047$) entre as idades dos animais que receberam o HS, indicando um aumento mais acentuado nas concentrações musculares desta proteína nas fêmeas envelhecidas. Como efeito do HS também observamos um aumento nas concentrações de 17 β -Estradiol comparado ao grupo SHAM ($p=0,0467$), sendo de 83 % no grupo HS (4 meses) e de 80 % do grupo HS (16 meses). Nossos resultados sugerem o potencial uso do HS como alternativa à terapia de reposição hormonal (TRH) especialmente no que tange sua segurança em longo prazo. Assim, percebemos possíveis efeitos protetores sendo restabelecidos pela via da HSR, até então suprimida em decorrência dos efeitos do envelhecimento/menopausa natural do metabolismo feminino. A redução da capacidade metabólica, dentre outros efeitos, está relacionada à manutenção do *status* hormonal necessário aos níveis citoprotetores conhecidos.

PALAVRAS-CHAVES: HSP70; Estrogênio; Choque térmico; Envelhecimento; Menopausa.

Abstract

Menopause is an event resulting from the natural aging of the female organism, in which there is ovarian failure, which consequently leads to hypoestrogenism. With the gradual reduction of estrogen (E2) concentrations, the woman becomes more susceptible to developing low-grade chronic inflammation. Low levels of E2 reduce the expression of genes that affect the balance between energy expenditure and consumption, in addition to negatively affecting carbohydrate and lipid metabolism. On the other hand, E2 induces the expression of the HSP72 protein, one of the members of the 70 kDa heat shock protein family, which is anti-inflammatory and cytoprotective. Their expression is modulated by different types of physiologically stressful situations, including heat stress. Therefore, during perimenopause, various homeostatic functions based on the E2-dependent expression of HSP70 may collapse. In this study, we investigated the effects of aging in female mice, from the perspective of the Heat Shock Response (HSR) via the E2-mediated nitric oxide (NO)-72 kDa heat shock protein axis. We used female mice (*Mus musculus*) of the C57BL/6J strain: young adults (4 months) and aged (16 months), undergoing the following treatments: HS (heat shock for 2 months once a week = 8 sessions with anesthesia) or SHAM (control animals anesthetized, at 37 °C or kept in a room with air conditioning turned off and tungsten light to maintain temperature). We observed that the gastrocnemius muscle content of HSP72 (HSPA1A) showed a 59 % increase in the HS group when compared to the SHAM group in adult females and a 77 % increase in the HS group compared to the SHAM group ($p=0.0341$). Still, concerning HSP72, there was a difference ($p=0.0047$) between the ages of the animals that received the HS, indicating a more accentuated increase in the muscular concentrations of this protein in the aged females. As an effect of HS, we also observed an increase in 17β -Estradiol concentrations compared to the SHAM group ($p=0.0467$), being 83% in the HS group (4 months) and 80% in the HS group (16 months). Our results suggest the potential use of HS as an alternative to hormone replacement therapy (HRT), especially regarding its long-term safety. Thus, we believe in possible protective effects being re-established by the HSR pathway, hitherto suppressed as a result of the effects of natural aging/menopause on female metabolism. The reduction in metabolic capacity, among other effects, is related to the maintenance of the hormonal status necessary for known cytoprotective levels.

KEYWORDS: HSP70; estrogen; Heat shock; Aging; Menopause.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho experimental.....	25
Figura 2: Avaliação citológica de esfregaços vaginais.....	32
Figura 3: Conteúdo proteico de HSP70 no músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeos adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM).....	34
Figura 4: Concentrações de Estradiol de camundongos fêmeos adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM).....	34
Figura 5: Correlações de Pearson entre as concentrações de Estrogênio e HSP70.....	35
Figura 6: Concentrações de iNOS no músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeos adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM).....	36
Figura 7: Dados de massa do músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeos adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM).....	37
Figura 8: Dados de massa do músculo sóleo de camundongos fêmeos adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM).....	37
Figura 9: Dados de massa do tecido adiposo visceral de camundongos fêmeos adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM).....	38
Figura 10: Dados de massa do tecido hepático de camundongos fêmeos adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM).....	38
Figura 11: Índices de Lee em camundongos fêmeos adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque térmico (HS) ou sem (SHAM).....	39

Figura 12: Glicemia de jejum (12 h) de camundongos fêmeos adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM).....	40
Figura 13: Curva de tolerância oral à glicose (OGTT) realizada em camundongos fêmeos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM).....	41
Figura 14: Área incremental sob a curva do OGTT de camundongos fêmeos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM).....	41
Figura 15: Correlação de Pearson entre os valores da Área incremental sob a curva e as concentrações de Estradiol.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

E₂ – Estrogênio

eNOS – Oxido nítrico sintase endotelial

HS – Choque térmico

HSF1 – Fator de transcrição de proteínas de choque térmico 1

HSP – Proteína de choque térmico

HSP70 – Proteína de choque térmico de 70 kDa

HSR – Resposta de choque térmico

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

iNOS – Oxido nítrico sintase induzível

NAFLD – Doença hepática gordurosa não alcoólica

NFκB – Fator de transcrição nuclear kappa B

NO – Óxido Nítrico

nNOS – Oxido nítrico sintase neural

PCR – Proteína C reativa

PCOS – Síndrome dos ovários policísticos

OGTT – Teste Oral de Tolerância a Glicose

SASP – Fenótipo de secreção associado à senescência

TNFα – Fator de necrose tumoral alfa

TRH – Terapia de reposição hormonal

VEGF-α – Fator de crescimento vascular endotelial α

VMS – Sintomas Vasomotores

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Envelhecimento, menopausa e fogachos	12
1.2 Estrogênio e o papel da Heat Shock Response, para resolução da inflamação .	17
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.1 Objetivos específicos	22
3. MÉTODOS	23
3.1 Local de Realização	23
3.2 Considerações Éticas	23
3.3 Estatística e Tamanho Amostral.....	23
3.4 Animais utilizados.....	24
3.5 Modelo de envelhecimento.....	24
3.6 Desenho Experimental	24
3.7 Protocolo de Choque Térmico.....	25
3.8 Teste Oral de Tolerância a Glicose (oGTT).....	25
3.9 Índice de Lee.....	26
3.10 Checagem do Ciclo Estral	26
3.11 Morte dos Animais.....	27
3.12 Medidas Morfométricas	27
3.13 Dosagens Bioquímicas de Glicose de Jejum	27
3.14 Detecção de Conteúdo Proteico.....	28
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSSÃO	43
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
7. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento, menopausa e fogachos

Ao longo das últimas décadas a população mundial tem envelhecido de forma pronunciada (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2020). O aumento da expectativa de vida humana, passando de 48 anos na década de 1950, para uma projeção de 76 anos em 2050 (Bloom *et al.*, 2011), tem se dado em função de importantes avanços dentro dos âmbitos científicos, tais como o desenvolvimento tecnológico. Assim, o aprimoramento dos meios de produção, aumentando a disponibilidade de recursos, alimentos e medicamentos fez com que a longevidade e a expansão populacional, se tornassem uma realidade. Com isso, o declínio na taxa de fertilidade, atrelado ao envelhecimento feminino expandiu drasticamente.

Atualmente o cenário mundial gera um sinal de alerta. Segundo as projeções da própria OMS (2020), a população está envelhecendo em um ritmo cada vez mais acelerado, o que fará com que em um futuro muito breve, grande parte da população seja, de fato, idosa. Até 2019, a quantidade de pessoas com 60 anos ou mais era de 1 bilhão, número que crescerá principalmente em países em desenvolvimento, atingindo a marca de 1,4 bilhão em 2030 e 2,1 bilhões em 2050 (Newgard & Sharpless, 2013; Kanasi, Ayilavarapu & Jones, 2016).

Essa alteração significativa no perfil do quadro populacional mundial, nos alerta para a necessidade da realização de importantes adaptações em setores estruturais de nossa sociedade. Um dos principais impactos gerados por tal aumento, afeta diretamente sistemas de saúde e economias nacionais, sendo que muitas destas já se encontram em decréscimo, e em severa pressão (Newgard & Sharpless, 2013). Assim, a busca de alternativas geradoras de promoção do bem-estar social é fundamental para suavizar alguns impactos fisiológicos naturais destas alterações demográficas, uma vez que o aumento da expectativa de vida é muitas vezes acompanhado de desconfortos, como os sintomas da menopausa nas mulheres (Greco, Pietschmann, & Migliaccio, 2019).

Em biologia, temos o conceito de envelhecimento como: um “declínio funcional dependente do tempo que afeta a maioria dos organismos vivos” (Lopez *et al.*, 2013). Este processo natural dos seres vivos acaba desencadeando uma série de desbalanços no organismo, induzindo a perda de capacidades fisiológicas,

tornando o indivíduo suscetível ao desenvolvimento de doenças, incluindo doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e distúrbios neurológicos (Lopez *et al.*, 2013; Kanasi, Ayilavarapu & Jones, 2016).

Neste sentido, o processo de senescência celular é um foco importante de investigação, pois durante o envelhecimento natural, o processo de replicação celular acaba sendo interrompido, fazendo com que células tronco, por exemplo, entrem em um estado permanente de interrupção do crescimento, assim, havendo o acúmulo de células senescentes. A indução da senescência pode estar relacionada, dentre outros, com o dano ao DNA, telômeros curtos, estresse oxidativo e/ou mudanças na arquitetura da cromatina. Em todas as situações, há o comprometimento de funções fisiológicas que requerem replicação celular homeostática (Newgard & Sharpless, 2013). Por exemplo, quando ocorre o desbalanço do *status redox* pró oxidantes, levando ao estado de estresse oxidativo, células endoteliais humanas senescentes apresentam comprometimento da proteostase, acúmulo de agregados proteicos, risco ao metabolismo basal celular, levando assim ao prejuízo da função vascular pelo envelhecimento, predispondo os indivíduos a doenças cardiovasculares (Hwang *et al.*, 2019).

Somado ao comprometimento homeostático tecidual, células senescentes detêm a capacidade de produzir uma série de potentes citocinas pleiotrópicas envolvidas com o fenótipo secretor associado à senescência (SASP), tais como: IL-6, IL-8, TNF- α e VEGF- α . Estas substâncias interferem diretamente nos mecanismos de **resolução da inflamação** (local), angiogênese, fibrose e cicatrização. Portanto, o envelhecimento além de estar associado à senescência celular, também está associado à produção de fatores pró-inflamatórios. A disfunção tecidual cria um ambiente favorável para o aumento do quadro inflamatório, e esta potencializa as vias ligadas ao SASP (Newgard & Sharpless, 2013), promovendo uma série de fenótipos relacionados ao envelhecimento, marcando o declínio da função do sistema imunológico (Rodriguez, Maoz & Dorshkind, 2013), e a diminuição da regeneração de células β em ilhotas pancreáticas (Kushner, 2013). Estes fenótipos de envelhecimento são intitulados de “*inflammaging*” (Kanasi, Ayilavarapu & Jones, 2016), e são produto de alterações na capacidade autofágica que afeta negativamente a manutenção das células, resultando em agregação de proteínas, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, e quando associados a inflamação

sistêmica, causa aterosclerose, aumento da secreção de cortisol (resultando em resistência à insulina nos músculos) e reabsorção óssea (Salminen, Kaarniranta & Kauppinen, 2012).

Neste contexto de envelhecimento, ao observarmos o metabolismo feminino, um evento característico que acompanha este processo é a menopausa. Caracterizada pela ausência folicular em função da falência ovariana, é um processo natural do organismo, e se apresenta como indicador da saúde e capacidade reprodutiva da mulher na vida adulta (McCarthy & Raval, 2020). Assim, a menopausa leva ao declínio da produção hormonal de estrogênio e progesterona ovarianos (Modi & Dhillon, 2019), desencadeando uma série de alterações no *status* hormonal. Esta redução abala fortemente a manutenção da citoproteção conferida por tais vias endócrinas, bem como a redução de sua capacidade metabólica. Estas alterações acabam por influenciar negativamente o organismo da mulher, pois potencializa um estado pró-inflamatório, predispondo-as a distúrbios imunológicos (Sharma *et al.*, 2018; Benedusi *et al.*, 2012; Kireev *et al.*, 2014). Este quadro é reforçado pela tendência de aumento nas citocinas pró-inflamatórias circulantes (IL-6 e TNF- α) na menopausa, tanto natural, quanto induzida cirurgicamente (Girasole *et al.*, 1999; Pfeilschifter *et al.*, 2002).

Uma das maiores dificuldades para a mulher durante o período da menopausa, é enfrentar frequência e intensidade dos sintomas vasomotores (VMS, do inglês: **VasoMotor Symptoms**), como a sudorese e os calorões, estes também denominados fogachos, eventos classicamente descritos como altamente desconfortáveis, que têm sua percepção acentuada com o passar dos anos, dentro do climatério (Prague *et al.*, 2018). Na pós-menopausa, cerca de 70 % das mulheres apresentam VMS, sendo, destes, o fogacho o mais comum. Já se sabe que os fogachos, em especial, apresentam associação muito forte a distúrbios em nível hipotalâmico ligados as funções de termorregulação (Rance *et al.*, 2013).

Os fogachos, em humanos, são caracterizados por breves episódios de um súbito aumento na sensação de calor corporal (Prague & Dhillon, 2017), podendo durar de alguns segundos, até mesmo superar 10 minutos de duração (Freedman, 1998). De forma concomitante, ocorre a ativação de mecanismos responsáveis pela dissipação do calor, atreladas a mudanças comportamentais, para uma tentativa de

restabelecimento da sensação de temperatura corporal “normal” (Rance *et al.*, 2013). Assim, é notório que os fogachos afetam diretamente a qualidade de vida da mulher, causando desconforto, e assim, estes acabam sendo a principal razão pela qual mulheres buscam intervenção médica durante o climatério (Hess *et al.*, 2012; Padilla, 2018).

Um dos fenômenos que está, cada vez mais, se tornando comum, em função do envelhecimento populacional, é o aumento da participação da força de trabalho entre mulheres de 45 a 64 anos nos países da OCDE (Tilly, O’Leary & Russell, 2013; OCDE, 2021). Isso faz com que um crescente número de mulheres esteja passando pela transição da menopausa enquanto ainda estão no período mais economicamente produtivo, e exercem seus empregos (Riach & Jack, 2021). Logo, o momento em que estará ocorrendo essa transição é quando a mulher passa por desafios-chave de sua carreira, assumindo posições de liderança em suas equipes ou áreas (Nordling, 2022). Esta visão socioantropológica é de extrema importância se considerarmos que quase um quinto das mulheres economicamente ativas, inseridas no mercado de trabalho relataram a ausência, ou até mesmo desistência de seus empregos em função dos desconfortos gerados pela menopausa (Nordling, 2022). Esse processo de desistência causa impacto direto nos setores da economia. Estima-se que em torno de 750.000 mulheres trabalhadoras sofrem com os efeitos negativos da menopausa em seu ambiente de trabalho, acarretando a uma perda estimada em ¥420 bilhões (US\$3,2 bilhões) na economia (Nordling, 2022). Isso demonstra que se faz necessário um olhar mais atencioso por parte das organizações governamentais e não governamentais responsáveis pela saúde. Isto posto, deve-se atentar ao fato de que o apoio à mulher no trabalho pode facilmente migrar para uma abordagem de “gerenciamento” da menopausa (Riach & Jack, 2021).

É de suma importância salientar que aspectos como a gravidade e duração dos sintomas ocasionados pela menopausa, estão diretamente relacionados com fatores de estilo e qualidade de vida da mulher. Fatores como a obesidade e suas etapas antecedentes (sobrepeso), tabagismo e álcool, desempenham um papel determinante na saúde da mulher a curto e longo prazo. Por isso, a promoção de hábitos saudáveis, como manutenção de uma dieta equilibrada, prática de exercícios

regulares, não fumar e ingestão de álcool moderada podem ser fundamentais para saúde e bem-estar (Currie, Abernethy & Hamoda, 2021).

Dentre as alternativas disponíveis para amenizar os desconfortos decorrentes da menopausa, a terapia de reposição hormonal (TRH) é uma das práticas clínicas mais comuns. Porém, esta possui eficácia variável, além de efeitos adversos conhecidos (Prague *et al.*, 2018). Das terapêuticas que buscam cessar os desconfortos gerados pelos fogachos, a mais popular é a reposição hormonal, em especial, de E₂. Além de sua eficácia no controle dos fogachos, a TRH pode também, auxiliar a saúde óssea, reduzindo o risco de osteoporose e fraturas na vida adulta (Currie, Abernethy & Hamoda, 2021). Entretanto, terapias baseadas na reposição de E₂ tem sua segurança questionada, principalmente a longo prazo (Rossouw *et al.*, 2013). Problemas relacionados aos riscos associados ao tratamento, incluindo doenças cardíacas, acidentes vasculares, coágulos sanguíneos e câncer de mama já foram comprovados em alguns casos, o que preclui sua utilização nesses grupos de mulheres. Além disso, a TRH não pode ser iniciada para prevenir doenças em mulheres na pós-menopausa (McCarthy & Raval, 2020). A oferta e recomendação devem ser muito bem avaliadas, pois seus benefícios, em detrimento dos riscos e efeitos colaterais, são altamente variáveis para cada mulher. Por isso, fazer, ou não, o uso da TRH deve ser uma escolha individualizada (Currie, Abernethy & Hamoda, 2021).

Dentre os problemas associados ao tratamento da TRH, citados anteriormente, o que mais tem sido discutido e amplamente documentado, é o risco aumentado de câncer de mama TRH dependente (Currie, Abernethy & Hamoda, 2021). A duração do tratamento aumenta as chances de desenvolvimento deste tipo de câncer, as quais, aparentemente, diminuem após a interrupção da terapia (NICE, 2015). Contextualizando, o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres, acometendo aproximadamente 2,3% (23/1.000) mulheres na população geral de 50 a 59 anos. Ainda, o desenvolvimento de câncer de mama pode ocorrer em um período de 7,5 anos (Currie, Abernethy & Hamoda, 2021). Junto disso, para mulheres que fazem uso de TRH (para E₂ e progesterona), ocorre cinco casos extras de câncer de mama no mesmo período, ou seja, elevando a incidência para 2,8% (NICE, 2015). Isso faz com que muitas mulheres tenham realizado a TRH, em função do desenvolvimento destes possíveis desfechos relacionados ao câncer.

Como possível solução para este problema, as diretrizes do National Institute for Health and Care Excellence (NICE) de 2015, sobre o diagnóstico e manejo da menopausa, concluiu que a otimização do perfil de risco-benefício da TRH, pode reduzir potencialmente a morbidade e a mortalidade por câncer de mama em mulheres que necessitam de reposição devido aos sintomas contínuos da menopausa.

Assim, uma vez que a TRH tem como objetivo principal restabelecer as concentrações de E₂, e estas estão suprimidas em função da menopausa, resta uma necessidade de enfrentar tal redução hormonal. Já que o estrogênio promove a proteção natural e necessária contra doenças cerebrovasculares, além dos seus efeitos citoprotetores em diferentes sistemas, como o cardiovascular, ósseo e o cérebro (McCarthy & Raval, 2020), o declínio nos níveis circulantes em função da menopausa está diretamente relacionado a um aumento no risco de prejuízo orgânico (Stampfer & Colditz, 1991; Caldwell, Yao & Brinton, 2015; Dalal & Agarwal, 2015).

1.2 Estrogênio e o papel da *Heat Shock Response*, para resolução da inflamação

É consenso na literatura que o E₂ tem propriedades citoprotetoras importantes para o organismo. Coincidentemente, este hormônio também é um poderoso indutor fisiológico da resposta de choque térmico (do inglês, *Heat Shock Response*, HSR). A HSR é compreendida como uma via bioquímica anti-inflamatória que culmina na ativação de fatores de transcrição do choque térmico (HSFs), especialmente o subtipo 1 (HSF1) (Knowlton & Sun, 2001; van Why *et al.*, 1999). O HSF1 regula a expressão da maioria das proteínas de choque térmico da família de 70 kDa (Stice *et al.*, 2011). Extremamente conservadas ao longo da evolução, as proteínas de choque térmico são as proteínas mais abundantes no meio intracelular. Em situações de estresse podem compor cerca de 5 % de toda a proteína celular.

A HSR é, por natureza, anti-inflamatória. Participa de uma série de processos envolvendo o monitoramento constante das cadeias polipeptídicas, transporte de proteínas por membranas, enovelamento, agregação e desenovelamento proteico, atuando como proteínas reguladoras (Bukao *et al.*, 2006). Uma vez que a HSP70 bloqueia a ativação dos fatores de transcrição nuclear da família κB (NF-κB), o HSF1

per se restringe a transcrição de genes inflamatórios dependentes de NF- κ B (Newsholme & Homem de Bittencourt, 2014). Estes processos estão presentes desde a síntese no ribossomo, até a formação da estrutura espacial final da proteína. Portanto, costuma-se dizer que a HSP70 desempenha um papel chave de controle e regulação da maquinaria proteica celular, chamado de função chaperona (do inglês, *chaperone* = acompanhante).

A proteostase (homeostase das proteínas) promovida por estas chaperonas dá-se por meio da soma de suas especificidades moleculares, sendo que nem todas as HSPs respondem a estresses específicos da mesma forma (Hwang *et al.*, 2019). Parte do efeito protetor dos indutores de HSR reside em sua capacidade de elevar a produção de óxido nítrico (NO), que por sua vez é um poderoso ativador do HSF1 e, conseqüentemente, da HSR centrada na HSP72. Por outro lado, doenças degenerativas crônicas de natureza inflamatória (por exemplo, obesidade, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas) compartilham em comum a supressão progressiva da HSR (Rodrigues-Krause *et al.*, 2012; Di Naso *et al.*, 2015).

Embora estados deficientes em E₂ estejam associados a doenças inflamatórias crônicas, pouquíssimos estudos têm analisado a provável relação dos efeitos do envelhecimento natural com a HSR de mulheres *peri* e pós-menopausa, e sua influência sobre doenças inflamatórias crônicas, bem como possíveis efeitos não conhecidos ou alterações metabólicas subclínicas que possam estar relacionadas ao declínio do E₂, incluindo fogachos. O 17- β -estradiol liga-se aos receptores nucleares para o E₂, tanto α , quanto β , e também a receptores não clássicos de E₂ na membrana (mER), através dos quais o E₂ reverte o perfil inflamatório associado à senescência (Hwang *et al.*, 2019; Stout *et al.*, 2017). Neste sentido, indutores fisiológicos, tais como, exercício e tratamento térmico, indutores farmacológicos (*e.g.*, prostaglandinas ciclopentenônicas) e co-indutores (*e.g.*, BGP-15, bimoclomol), e a indução transgênica de HSR provaram bloquear poderosamente os estados inflamatórios crônicos *in vivo* (Hargitai *et al.*, 2003; Ianaro *et al.*, 2003; Homem de Bittencourt *et al.*, 2007; Kokura *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2008; Gupte *et al.*, 2009; Bathaie *et al.*, 2010; Gupte *et al.*, 2011; Sapra *et al.*, 2014; Karpe & Tikoo, 2014). Além disso, usando um modelo de aterosclerose em ratos, submetidos ao choque térmico (41,5 ° C por 15 min, uma vez por semana, durante 8

semanas) observou-se uma interrupção significativa na taxa de mortalidade de animais, junto de uma redução impressionante da doença vascular, aumento do fluxo sanguíneo e da elasticidade aórtica (principal ponto aterogênico em roedores) e reversão da supressão da HSR (Bruxel *et al.*, 2019).

Conforme proposto por Miragem e Homem de Bittencourt (2017), o E₂ possui a capacidade de induzir a expressão de HSP72 (Stice *et al.*, 2011), um dos membros da família de 70 kDa das proteínas de choque térmico, que são anti-inflamatórias e citoprotetoras (e.g., cardioprotetoras, vasculoprotetoras, acompanhantes de proteínas, neuroprotetoras, antiateroscleróticas, antidiabéticas) cuja expressão é modulada por diferentes tipos de situações fisiologicamente estressoras, muitas vezes centrada na senescência celular, a qual abala a capacidade da HSR (Newsholme & Homem de Bittencourt, 2014). Portanto, não é surpreendente que, durante a perimenopausa (climatério), várias funções homeostáticas baseadas na expressão de HSP70 dependente de E₂ comecem a entrar em colapso.

Destaca-se que apenas pouquíssimos estudos no campo da HSR tenham se voltado para a menopausa e outras situações restritivas ao E₂, considerando que a produção reduzida de HSP70, que leva ao prejuízo da eficiência da HSR é um cenário propício para o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas. Deste modo, a supressão da HSR está associada à resistência à insulina (Kurucz *et al.*, 2002), ao agravamento do diabetes em pacientes obesos (Rodrigues-Krause *et al.*, 2012), com a gravidade da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) em humanos (Di Naso *et al.*, 2015) e com a disseminação da inflamação por todo o corpo (Newsholme & Homem de Bittencourt, 2014; Leite *et al.*, 2016; Bruxel *et al.*, 2019; Bittencourt *et al.*, 2019).

Além disso, a baixa expressão de HSP70, secundária à deficiência de E₂ está associada ao aumento da vulnerabilidade dos indivíduos a doenças cardiovasculares (Tytell & Hooper, 2001). Entretanto, o envelhecimento por si só pode levar à redução da expressão de HSP70 (Stice *et al.*, 2009; Leite *et al.*, 2016).

Neste sentido, muitas (senão todas) doenças degenerativas crônicas de natureza inflamatória de baixo grau, possuem em suas bases uma capacidade defeituosa de desencadeamento de uma HSR adequada nos tecidos. Isso leva a um

estado de inflamação contínuo não resolvido que se espalha por todos os tecidos, promovendo um status de senescência proliferativa que retroalimenta positivamente a inflamação através da indução de citocinas pró-inflamatórias e a potencialização do estresse oxidativo (Tchkonia *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; Tchkonia *et al.*, 2013; Newsholme & Homem de Bittencourt, 2014; Palmer *et al.*, 2015; Schafer *et al.*, 2017). Ainda, a droga antidiabética metformina inibe os padrões de senescência em modelos celulares (Moiseeva *et al.*, 2013) e alivia a retinopatia isquêmica *in vivo* (Oubaha *et al.*, 2016), bloqueando as vias a jusante do NF- κ B (Moiseeva *et al.*, 2013; Saengboonmee *et al.*, 2017). Portanto, parte dos efeitos benéficos da metformina no diabetes pode ser explicado pela sua capacidade de bloquear a senescência celular, liberando assim a resposta celular protetiva (HSR) para começar a trabalhar novamente.

Por outro lado, o E₂ aumenta a reendotelização e a recupera a função endotelial, após a lesão vascular. Ainda, retarda a senescência nas células progenitoras endoteliais em ratos espontaneamente hipertensos (Imanishi *et al.*, 2005). No entanto, os efeitos vasoprotetores e anti-inflamatórios dependentes de E₂ nos vasos de ratos ovariectomizados são eficazes apenas em animais jovens (Miller *et al.*, 2007). Da mesma forma, a eficácia através do aumento da HSR induzida por E₂ nos cardiomiócitos de rato é percebida apenas em jovens, mas não em animais ovariectomizados idosos (Stice *et al.*, 2011).

Além disso, os efeitos neuroprotetores da TRH baseada em E₂ contra o comprometimento cognitivo são observados apenas em mulheres de meia idade, mas não se a terapia for iniciada no final da vida (Whitmer *et al.*, 2011). Isso pode explicar por que, em ensaios clínicos de coorte, os benefícios ou riscos relativos à reposição são estritamente dependentes da idade das mulheres (Rossouw *et al.*, 2002; Hodis *et al.*, 2016).

Infelizmente, ainda não há um estudo publicado que tenha sido direcionado aos efeitos do envelhecimento na HSR de mulheres na menopausa e sua possível influência sobre doenças inflamatórias crônicas, bem como possíveis alterações metabólicas desconhecidas ou subclínicas que possam estar conectadas a várias manifestações clínicas, incluindo fogachos. Isso é possível porque as áreas hipotalâmicas envolvidas na termorregulação (núcleo infundibular em humanos e núcleo arqueado em outros mamíferos) são as mesmas cujos neurônios são

conhecidos por terem sua função alterada após a carência de E₂ no longo prazo, particularmente os neurônios kisspeptina-neurocinina B-dinorfina (KNDy) (Nakamura & Morrison, 2010; Nakamura, 2011; Rance *et al.*, 2013). Curiosamente, os neurônios KNDy (pronuncia-se *kændy*) também direcionam a expressão neuroprotetora da HSP70 (Chilumuri & Milton, 2013) e, em muitos casos, via NO, mesmo na ausência de E₂, como discutido abaixo.

Além de atuar sobre neurônios do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) para controlar os padrões de secreção do hormônio luteinizante (LH) (Rance *et al.*, 2013; Skorupskaite *et al.*, 2014), os neurônios KNDy transmitem informações e recebem projeções de múltiplos nutrientes/metabólicos que sinalizam núcleos hipotalâmicos específicos para dispararem respostas autonômicas apropriadas. Isso pode explicar muitas disfunções metabólicas relacionadas aos hormônios sexuais, como o hipogonadismo hipogonadotrófico observado na obesidade e no diabetes, em que a disfunção dos neurônios KNDy é observada, como também na síndrome dos ovários policísticos (do inglês, *Polycystic ovary syndrome* – PCOS), na qual a atividade dos neurônios KNDy encontra-se exacerbada, (Skorupskaite *et al.*, 2014). De fato, a coincidência de obesidade e a ocorrência e gravidade dos sintomas vasomotores assemelha-se muito ao que se observa em pacientes com PCOS, que desenvolvem obesidade e resistência à insulina (Dupont & Scaramuzzi, 2016), características intrínsecas da síndrome e não apenas sua consequência (Stepito *et al.*, 2013). Ainda de acordo com o envolvimento do NO nessas disfunções, os níveis de insulina e a avaliação por modelo homeostático (HOMA) de pacientes com PCOS correlacionam-se negativamente com a produção de NO (Nácul *et al.*, 2007).

Considerando os achados acima, investigamos os efeitos do envelhecimento em camundongos fêmeos adultos *jovens* e *envelhecidos*, centrados na HSR induzida pela produção de NO mediada por E₂ no metabolismo tecidual no fígado, músculo e tecido adiposo dos animais.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos do envelhecimento em camundongos fêmeos, centrado na HSR induzida pela secreção de óxido nítrico (NO) mediado por E₂.

2.2 Específicos

Em camundongos fêmeos adultos jovens de 4 meses e envelhecidos de 16 meses, submetidos a tratamento térmico (ou não), foram analisados:

- a) Parâmetros metabólicos: índice de Lee;
- b) Medidas bioquímicas: glicemia, teste de tolerância oral à glicose (oGTT); níveis musculares de iNOS;
- c) Medidas morfométricas: pesagens teciduais (gastrocnêmio, sóleo, tecido adiposo branco e fígado);
- d) Conteúdo proteico muscular: HSP72 (HSPA1A);
- e) Níveis hormonais plasmáticos: 17 β -estradiol.

3. MÉTODOS

3.1 Local de Realização

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

3.2 Considerações Éticas

Este estudo segue todas as regras éticas estabelecidas pela Lei de Arouca (Lei Federal Brasileira nº 11794/2008) e a 8ª Edição do Guia para Cuidado e Uso de Animais Experimentais publicada na edição de 2011 do Conselho Nacional de Pesquisa das Academias Nacionais dos Estados Unidos, de acordo com as diretrizes da ARRIVE (Kilkenny *et al*, 2010; disponível em: <https://www.nc3rs.org.uk/arriveguidelines>). Todos os estudos foram previamente revisados e aprovados pela CEUA-UFRGS (projeto nº 19874).

3.3 Estatística e Tamanho Amostral

O tamanho amostral foi calculado para detectar a menor diferença esperada entre os grupos (20 ± 10 ng/mL para a principal variável crítica do estudo, a expressão de HSP70) (Chung *et al.*, 2008). Utilizou-se para o cálculo um poder estatístico de 80% para um nível de significância de $p < 0,05$ e o software de Dimensionamento Amostral DIMAM 1.0 para Windows da Editora Guanabara Koogan. O número de animais utilizados para a execução do projeto foi o mínimo indispensável para produzir resultados conclusivos, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento, perfazendo um total de seis animais por grupo. O programa estatístico utilizado para as análises foi GraphPad Prism 8. Os dados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk.

Quando paramétricos, realizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias com análise de medidas repetidas e teste *post hoc* de Tukey. Se considerados não paramétricos os dados foram tratados, realizando transformação para logaritmo em base dez, para apresentarem distribuição normal e receberem as mesmas análises citadas acima.

3.4 Animais utilizados

Neste estudo, foram utilizados 34 camundongos (*Mus musculus*) fêmeos da linhagem C57BL/6J com a idade de 2 meses, além de 16 fêmeos envelhecidos de 14 meses obtidos do Biotério Setorial de Camundongos do Departamento de Fisiologia, ICBS – UFRGS, mantido pelo Laboratório de Fisiologia Celular – FisCel. Os animais permaneceram no mesmo biotério, em caixas de polipropileno (300 x 200 x 130 mm, totalizando uma área interna de 416 cm²). O biotério possuía um ciclo de claro (iluminação artificial) /escuro de 12 h, temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa do ar entre 50 e 60 %. Os animais receberam água e ração *ad libitum* durante todo período. Nessas condições, a temperatura dentro de seus respectivos ninhos (ca. 28 °C) foi mantida próxima da termoneutralidade para camundongos (Maloney *et al.*, 2014).

3.5 Modelo de envelhecimento

Optamos por adotar o modelo de envelhecimento tendo em vista que há poucos estudos na literatura que mimetizem estas condições, normalmente tendo como modelo mais utilizado a ovariectomia bilateral.

Camundongos fêmeos da linhagem C57BL6 apresentam ciclos estrais prolongados com o avançar da idade, sendo irregulares até que cessam por completo (Collins, Laakkonen & Lowe, 2019). Chamamos isto de senescência reprodutiva (*simili* ao climatério em humanas), a qual difere da menopausa em que as desregulações decorrentes deste processo são mediadas centralmente por alterações na função hipotalâmica (Schmidt, 2018). Porém, em termos de modelagem, o declínio natural da produção hormonal ovariana no organismo induzido pela idade é mais semelhante à menopausa em mulheres do que a cirurgia de ovariectomia (Collins, Laakkonen & Lowe, 2019).

3.6 Desenho Experimental

Camundongos fêmeos jovens de 2 meses e envelhecidos de 14 meses, iniciaram um tratamento crônico de choque térmico, caracterizado por banho a 41 °C durante 15 min por um período de 8 semanas, sendo uma sessão de choque por semana. Todos os animais foram anestesiados com tiopental sódico, antes das

respectivas sessões, ao passo em que os pertencentes ao grupo SHAM, ao invés de irem ao banho, eram mantidos repousando dentro das caixas a uma temperatura de 37 °C, ou em uma sala com ar condicionado desligado e luz de tungstênio para manutenção da temperatura corpórea. Estes animais concluíram o experimento com as seguintes idades: 4 meses para as jovens/adultas e 16 meses para as envelhecidas. Após 48 h da última sessão de choque, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose via oral (oGTT). Somando-se mais 48 h após este teste, os animais foram sacrificados para coleta das amostras teciduais e de sangue. As fêmeas jovens, antes de serem sacrificadas, foram submetidas ao procedimento de checagem do ciclo estral, via esfregaço vaginal. Os animais foram alocados nos seguintes grupos de acordo com o tratamento (n=17 para jovens/adultas SHAM e HS; n= 7 envelhecidas de SHAM; n= 9 envelhecidas HS):

G1:SHAM (4 MESES);

G2:HS (4 MESES);

G3:SHAM (16 MESES);

G4:HS (16 MESES).

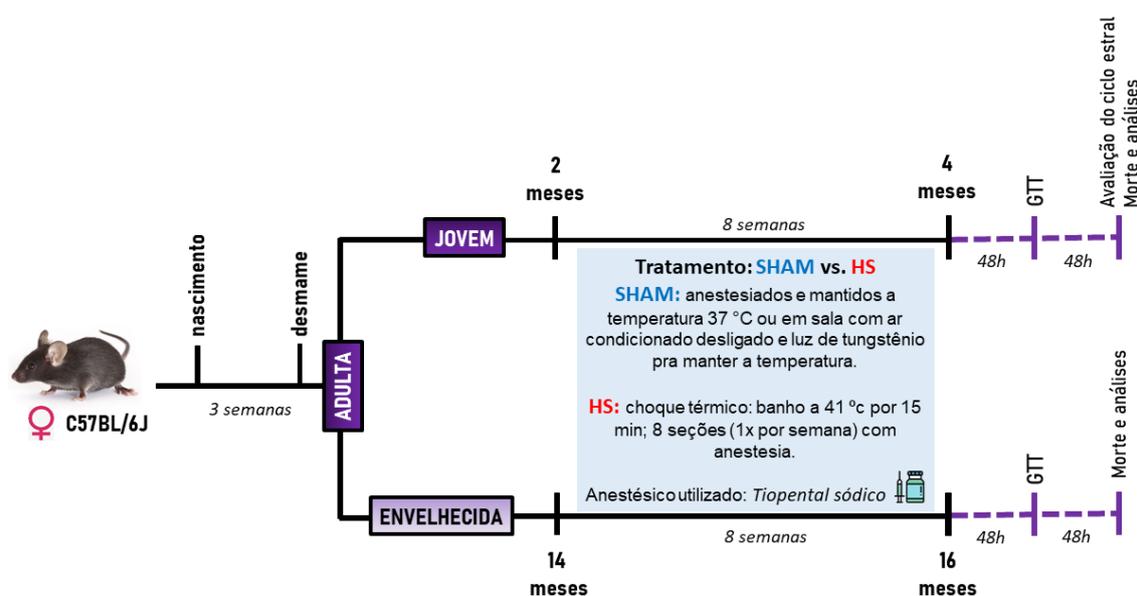


Figura 1 - Desenho experimental.

3.7 Protocolo de Choque Térmico

Para o procedimento de choque térmico (ofurô ou *hot tub*), os animais foram anestesiados com tiopental sódico 2 % (m/v) i.p. (5 mg para 100 g de camundongo; 2,5 μ L/g de peso corpóreo, o que representa cerca de 60-80 μ L por animal) com antecedência de dez minutos ao procedimento. A escolha do anestésico se baseia no fato do mesmo não causar alterações glicêmicas característicos da maior parte dos anestésicos em uso. A temperatura da sala para a realização do experimento foi monitorada e mantida a aproximadamente 25 °C.

O controle da temperatura dos animais foi monitorada com termômetro retal (Minipa, São Paulo, SP; dimensões do eletrodo, 8 x 2 mm, em comprimento e diâmetro respectivamente), durante todo o período em que os animais foram mantidos no banho térmico com água a 40 °C. Após alcançar a temperatura retal de 41 °C, os animais permaneceram no banho, com monitoramento contínuo da temperatura (41-41,7 °C), durante 15 min. Durante o choque térmico os animais ficaram com as patas traseiras e cauda imersas na água, uma vez que especialmente a cauda determina a regulação da temperatura perdendo calor na troca de temperatura com o ambiente. O procedimento utilizado é um modelo adaptado e padronizado em nosso laboratório (Bruxel *et al.*, 2019), similar a (Chung *et al.*, 2008).

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

3.8 Teste Oral de Tolerância a Glicose (OGTT)

O teste oral de tolerância à glicose (OGTT) foi realizado 48 h antes da data da morte dos animais de cada grupo. Ficando os animais em jejum, no período diurno, 6 h antes de cada teste. As medições de glicemia foram realizadas por punção caudal, utilizando 1 μ L (um microlitro) de sangue para verificação no glicosímetro Accu-Chek (Roche).

Para a realização do teste de OGTT foi preparada uma solução de glicose 50 % (m/v) em água potável, administrada na dose de 1 g/kg de peso corpóreo, por gavagem. Para a obtenção da curva glicêmica, o valor da glicemia em jejum (6 h) foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 min (tempo zero) e nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 min após a administração de glicose. Para o cálculo da área incremental sob a curva (iAUC), usada para avaliar a resposta glicêmica à administração de glicose, possibilitando a comparação entre os grupos, utilizou-se o método de quadratura do trapézio (Wolever, 2006). Assim a área sob a curva foi calculada pela lei de formação da integral de uma função no plano cartesiano, excluindo-se do cálculo as áreas abaixo da linha de jejum, inclusive quando qualquer ponto for menor que a glicemia inicial, usa-se a semelhança de triângulos.

3.9 Índice de Lee

O índice de Lee, também conhecido como razão nutritiva, é uma medida de obesidade em roedores e leva em conta a capacidade do animal de converter nutrientes da dieta em massa gorda. É dado pelo quociente entre a raiz cúbica do peso (em gramas) e o comprimento nasoanal (em centímetros) ou pelo quociente entre a raiz cúbica do peso do animal (em gramas) e o comprimento nasoanal (em milímetros) multiplicado por 10 (Lee, 1929).

3.10 Determinação do ciclo estral

No último dia do protocolo experimental, antes da morte dos animais, foram coletados esfregaços vaginais para identificação da fase do ciclo estral das fêmeas jovens participantes de ambos os tratamentos (SHAM e HS), segundo a técnica citológica do lavado vaginal (MCLEAN et al., 2012). Os lavados foram colhidos utilizando-se uma micropipeta e 100 µL de água bidestilada estéril. Foi expelido ¼ do volume dessa solução na abertura do canal vaginal, repetido de 4-5 vezes o procedimento para obter um número de células suficiente. O lavado extraído foi colocado em uma lâmina de vidro e o esfregaço foi seco naturalmente à temperatura ambiente. Após a secagem, os esfregaços foram corados com solução aquosa do corante violeta cristal (violeta genciana) a 0,1 % (m/v). As lâminas contendo os esfregaços corados foram imediatamente analisadas em Microscópio Invertido Olympus IX81 sob o aumento de 400X e microfotografias foram tiradas no momento

da análise para documentar a citologia observada com o uso de câmera Samsung SM-N770F: F1,7; 1/250s; 4,32mm; ISO 50.

3.11 Morte dos Animais

Os animais foram mortos após 12 h de jejum por decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos tecidos, para posterior realização das análises. O método escolhido para eutanásia baseia-se no fato de este ser um método eficaz, que produz mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos. Além disso e, em particular, porque temos a necessidade de realização de análises celulares e bioquímicas ligadas à expressão de HSP70, nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais por ocasião da decapitação, pois os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais experimentais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores (Brown *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2005), sendo que, alterações glicêmicas interferem no principal parâmetro medido, a HSP70, cujas concentrações plasmáticas são dramaticamente reduzidas pelo aumento da glicemia (Chung *et al.*, 2008).

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

3.12 Medidas Morfométricas

Foram realizadas as pesagens das seguintes estruturas internas: coração, fígado, músculo gastrocnêmio e tecido adiposo branco visceral e seus dados foram expressos em mg/g massa total do animal.

3.13 Dosagens Bioquímicas de Glicose de Jejum

As análises bioquímicas de glicemia de jejum foram realizadas nas amostras de sangue coletadas na ocasião da eutanásia dos animais em tubos heparinizados.

O plasma foi obtido após a centrifugação do sangue total por 15 min a 3.500 x g sob refrigeração (4 °C). Em seguida, as amostras foram avaliadas por testes colorimétricos em leitora de ELISA, segundo protocolos e recomendações dos fabricantes. As medidas de glicose plasmática de jejum foram realizadas a partir de teste colorimétrico da marca LabTest (número de catálogo: 133) e as de estrogênio por kit específico da marca Cayman (número de catálogo 501890).

3.14 Imunodeteção de Conteúdo Proteico

Para determinação da expressão de proteínas por Western Blotting, os tecidos foram extraídos e coletados em tubo de ensaio contendo solução de dodecil-sulfato de sódio (SDS) a 0,1 % (m/v) e um coquetel de inibidores de protease [(fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 100 µM em isopropanol, N-tosil-L-lisina clorometil-cetona (TLCK) 20 µM, aprotinina 2 µg/mL e leupeptina 2 µg/mL] e fosfatase (ortovanadato de sódio 1mM, molibdato de sódio 1 mM, β-glicerofosfato 1 mM) para serem homogeneizados à razão de 5 mL/g de tecido em homogeneizador de facas Ultra 80. No caso de precipitados celulares do sangue total, o tampão de lise escolhido foi o RIPA Buffer (Sigma-Aldrich, R0278) e a homogeneização deu-se em banho de gelo em processador ultrassônico modelo UIS250V (Hielscher Ultrasonics GmbH, Alemanha) equipado com sonotrodo LS24d3 operando a 24 kHz e 75 % da potência máxima (= 9 W de potência final nos tubos), por 30 s em pulsos de 0,5 s cada.

Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 16.000 x g por 1 min à temperatura ambiente e o sobrenadante coletado. A concentração de proteína determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), sendo as amostras 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 minutos para desnaturação completa. Quantidades iguais de proteína (~40 µg por poço) foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 10% ou 15 % para separação durante 2 horas utilizando corrente elétrica constante a 100 V. O sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean TetraCell (BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA USA) foi preenchido com tampão de corrida contendo Tris a 25 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3. Como marcador de peso molecular foram utilizados 5 µL de mistura 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 100 V constantes por 2 h. A confirmação do sucesso dos procedimentos descritos acima teve confirmação pela coloração das membranas de nitrocelulose com Vermelho Ponceau S (Red Ponceau S, sal de sódio 0,3 %, Sigma, em solução de ácido tricloroacético a 3 %), sendo em seguida descoradas com solução TEN (Tris-EDTA-NaCl a respectivamente 50, 5 e 150 mM)-Tween 0,1 % (v/v).

Para determinar a expressão de HSP72 e HSP73 foi utilizado anticorpo monoclonal anti-HSP70 (Sigma H5147) que reconhece tanto a forma induzível de 72 kDa quanto à forma constitutiva de 73 kDa; a análise do conteúdo celular de GAPDH foi utilizada como normalizador, obtido por incubação com anticorpo anti-GAPDH conjugada contendo peroxidase (Sigma G9295) em diluições de 1:1000.

A imunodeteção foi realizada por quimiluminescência com uso de luminol, ácido *p*-coumárico e H₂O₂, sendo a quimiluminescência fotodocumentada (60 fotos, 1 foto/10 s) e as imagens quantificadas com auxílio do sistema automático ImageQuant 350 (GE Health Care).

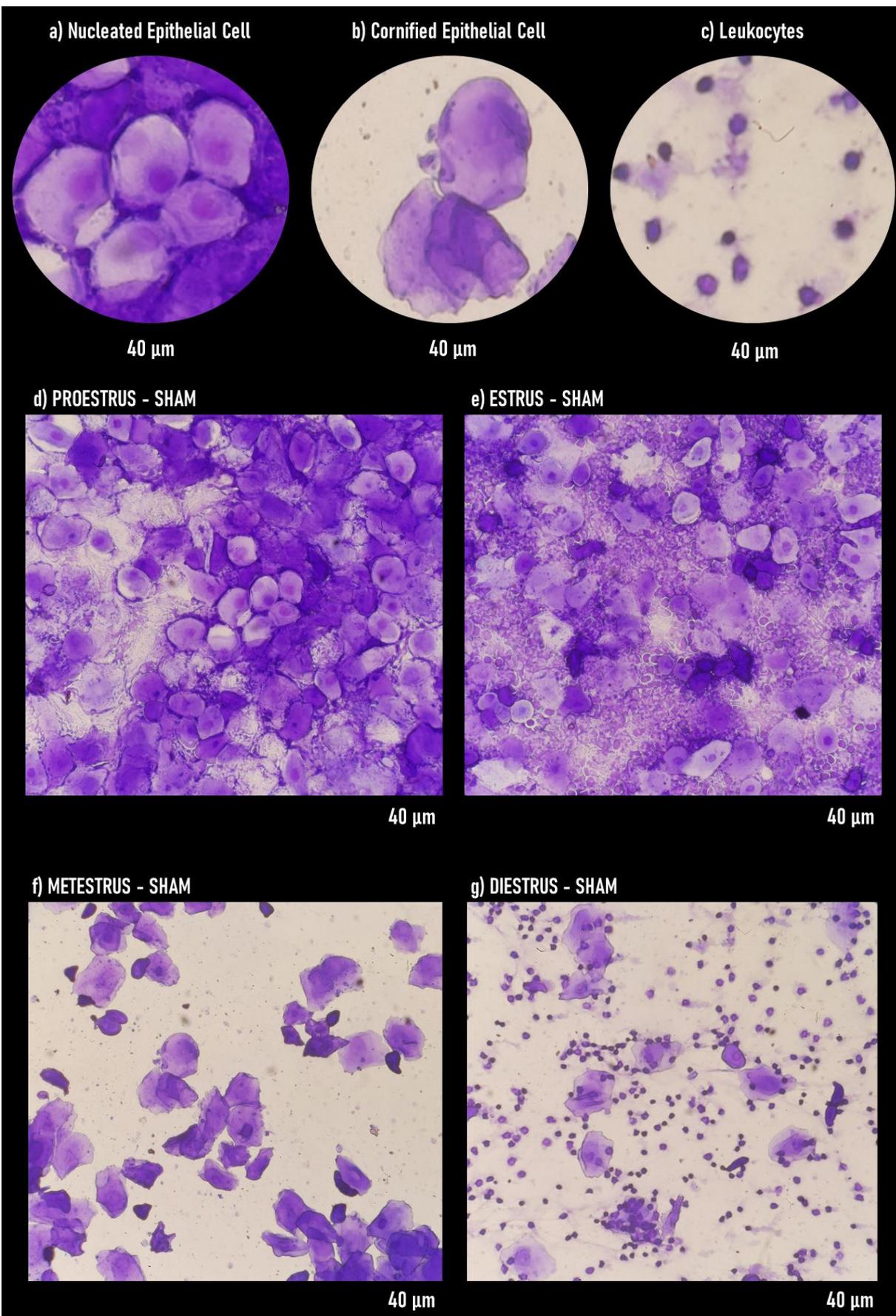
4. RESULTADOS

Sabe-se que a duração do ciclo estral de camundongos tende a ser irregular. Ao invés de um ciclo de 4 dias ser sucedido novamente por um de 4 dias, há chances de ocorrer um de 5 dias (Schimidt, 2018). Junto disto, estudos têm demonstrado que fêmeas que são alojadas em colônias exclusivamente femininas, tendem a apresentar uma tendência de cessação do ciclo, dando prolongamento ao estado de diestro (Whitten, 1959; Van Der Lee & Boot, 1955; Van Der Lee & Boot, 1956).

Com o intuito de averiguar a possível ocorrência destas flutuações, e um possível impacto em análises posteriores, como, por exemplo, a verificação dos níveis de E₂, optou-se por realizar o protocolo de checagem do ciclo estral, via esfregaço vaginal em camundongos fêmeos adultos jovens, assim, podendo estabelecer o estágio do ciclo estral nos animais sem se alterar o *status* reprodutivo destes (McLean, *et al.*, 2012).

Ao verificarmos as lâminas, detectamos que os animais do grupo SHAM, estavam em sua maioria (82 %) em fase de estro (41 %) ou metaestro (41 %), enquanto que, no grupo que recebeu tratamento térmico, 85 % dos animais estavam em estro (62 %) ou metaestro (23 %). Durante a fase de estro, os níveis de E₂ diminuem e os níveis de prolactina aumentam (Walmer *et al.*, 1992; Parkening, Collins, & Smith, 1982). Já a entrada no período de metaestro coincide com um aumento contínuo nos níveis do hormônio progesterona (Walmer *et al.*, 1992) e corresponde ao início da fase lútea humana (Mihm, Gangooly & Muttukrishna, 2011). À medida que os níveis de progesterona começam a elevar-se, há um pequeno aumento nos níveis de 17- β -estradiol em resposta à ativação do corpo lúteo (Walmer, *et al.*, 1992; Appelgren, 1969; Sander, *et al.*, 2009). Estes resultados nos dão um importante norte a respeito do perfil hormonal de momento destes animais, auxiliando no entendimento de análises posteriores.

Na figura abaixo estão imagens representativas de cada fase do ciclo encontrada nos animais experimentais, a partir das lâminas histológicas, indicando os tipos celulares predominantes de cada fase, bem como, as diferentes fases do ciclo estral em camundongos adultos jovens, para ambos os grupos: tratados ou não com choque térmico.



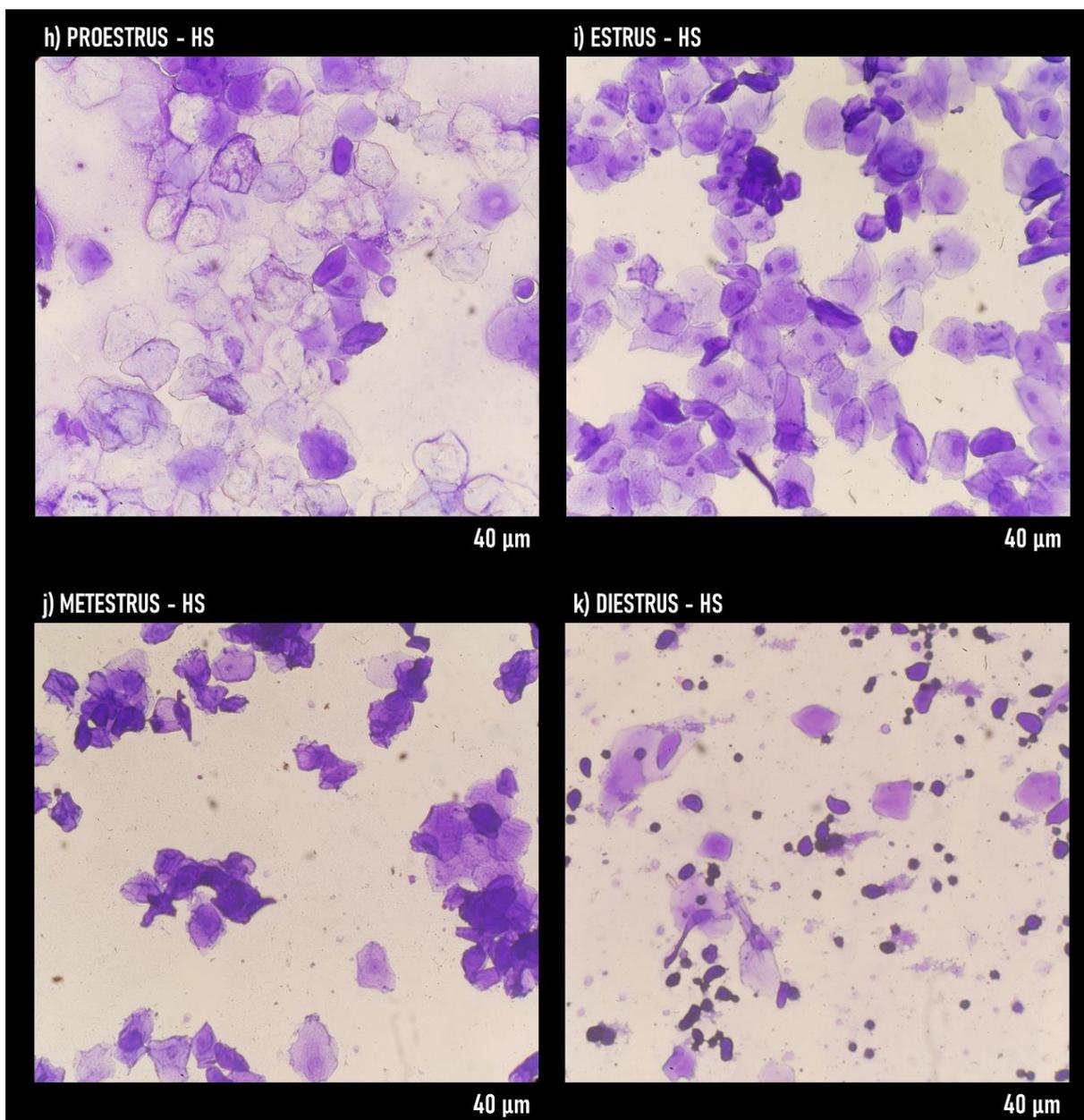


Figura 2 – Avaliação citológica de esfregaços vaginais, tendo três tipos principais de células detectados na vagina: (A) células epiteliais nucleadas, (B) células epiteliais escamosas cornificadas e (C) leucócitos. Diferentes etapas do ciclo estral de camundongos fêmeas jovens, tratados com choque (HS) ou sem (SHAM): (D) Proestro – SHAM; (E) Estro – SHAM; (F) Metaestro – SHAM; (G) Diestro – SHAM; (H) Proestro – HS; (I) Estro – HS; (J) Metaestro – HS; (K) Diestro – HS. Imagens capturadas por câmera Samsung SM-N770F: F1,7; 1/250s; 4,32mm; ISO 50.

Em relação ao conteúdo muscular de HSP72 (HSPA1A), verificamos um aumento de 59 % no grupo HS quando comparado ao grupo SHAM nas fêmeas adultas (4 meses), enquanto no grupo das fêmeas envelhecidas (16 meses), houve um aumento de 77 % do grupo HS comparado ao grupo SHAM ($p=0,0341$). Ainda com relação a HSP, verificamos diferença ($p=0,0047$) entre as diferentes idades dos animais que receberam choque térmico, indicando um aumento mais acentuado nas concentrações musculares desta proteína nas fêmeas envelhecidas.

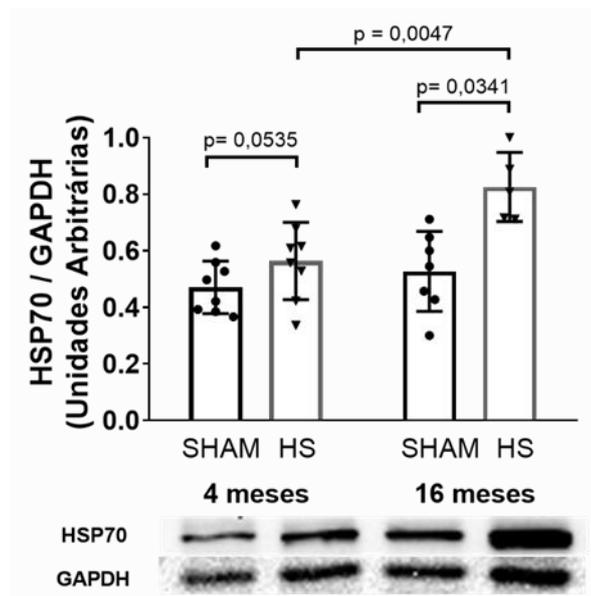


Figura 3 – Conteúdo proteico de HSP70 no músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeas adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM); Normalização realizada pelo GAPDH. Em detalhe a imagem representativa dos respectivos géis. Dados expressos em média \pm DPM. ANOVA de 2 vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. SHAM 4 meses: N = 8; SHAM 16 meses: N = 7; HS 4 meses: N = 8; HS 16 meses: N = 5.

Como efeito do tratamento térmico, também observamos um aumento nas concentrações de 17- β -estradiol nos grupos HS comparados ao grupo SHAM ($p=0,0467$), sendo de 83% no grupo HS (4 meses) e de 80% do grupo HS (16 meses).

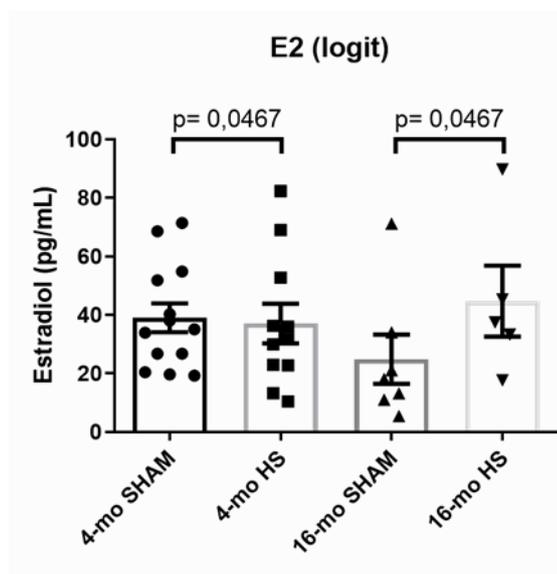


Figura 4 – Concentrações de Estradiol de camundongos fêmeas adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM); Dados expressos em média \pm DPM. ANOVA de 2 vias com *post hoc* Tukey. SHAM 4 meses: N = 13; SHAM 16 meses: N = 7; HS 4 meses: N = 11; HS 16 meses: N = 5.

Considerando que o 17- β -estradiol é conhecido como potente indutor da expressão de HSP70 nas fêmeas, logo, correlacionamos estes dois marcadores na busca de perceber associações durante a resposta ao tratamento. Do ponto de vista da correlação de Pearson não verificamos diferença, apesar de se ter a impressão de um comportamento (tendência) nos animais SHAM, com a queda da expressão da HSP72, enquanto que, nos grupos submetidos ao HS, ela aumenta. Este comportamento fica mais evidente nos adultos jovens. Deste modo, esta tendência deve ser considerada como base para próximas inferências e novas rodadas experimentais, pois indica um padrão interessante à ser observado.

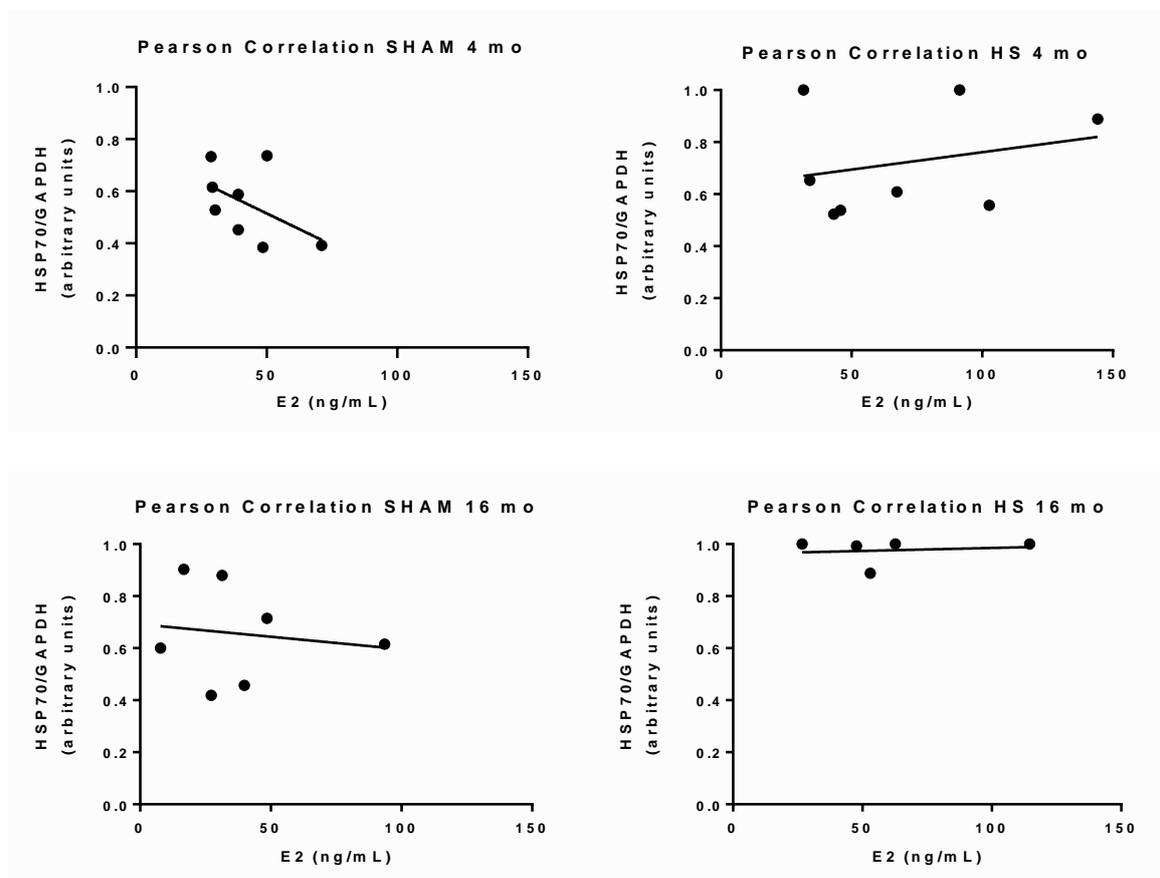


Figura 5 – Correlação de Pearson entre as concentrações de Estradiol e HSP70. A – Correlação entre os animais adultos jovens do grupo SHAM ($R = 0,2485$). B - Correlação entre os animais adultos jovens do grupo HS ($R = 0,065$). C - Correlação entre os animais adultos envelhecidos do grupo SHAM ($R = 0,020$). D - Correlação entre os animais adultos envelhecidos do grupo HS ($R = 0,023$).

Ao medirmos os níveis de iNOS no músculo gastrocnêmio, verificamos que não houve diferença em nenhum dos comparativos, tanto para os grupos tratados ($p=0,2886$), quanto em relação as idades ($p=0,6826$). Como será discutido adiante, não se pode descartar a possibilidade, no entanto, de que os incrementos na expressão de HSP70 induzida por NO estejam ligados à produção de NO mediada

por outras enzimas NOS, como a endotelial e a neuronal. Uma vez que, há conhecimento sobre a presença dos subtipos concomitantemente no tecido muscular.

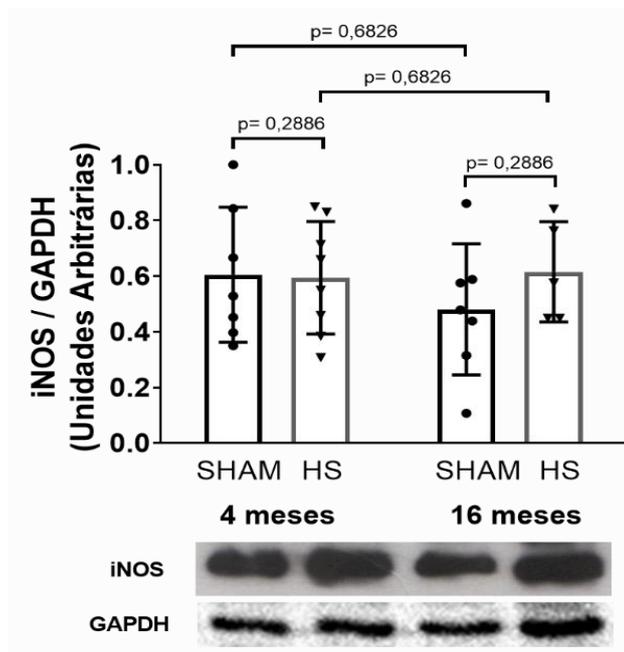


Figura 6 – Concentrações de iNOS no músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeos adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM); Normalização realizada pelo GAPDH. Em detalhe a imagem representativa dos respectivos géis. Dados expressos em média \pm DPM. ANOVA de 2 vias com *post hoc* Tukey. SHAM 4 meses: N = 8; SHAM 16 meses: N = 7; HS 4 meses: N = 8; HS 16 meses: N = 5.

Neste ponto serão apresentados os resultados das pesagens dos seguintes tecidos: gastrocnêmio (figura 7), sóleo (figura 8), tecido adiposo visceral (figura 9) e fígado (figura 10) dos animais de cada grupo de tratamento em cada idade. Observamos que, as massas médias dos músculos gastrocnêmio e sóleo coletadas em fêmeas envelhecidas apresentaram maiores pesos quando comparadas às adultas jovens ($p=0,004$ no gastrocnêmio e $p=0,0013$ no sóleo), em função dos maiores pesos corporais destes animais comparados aos mais jovens, devido ao tempo de vida natural dos animais estudados.

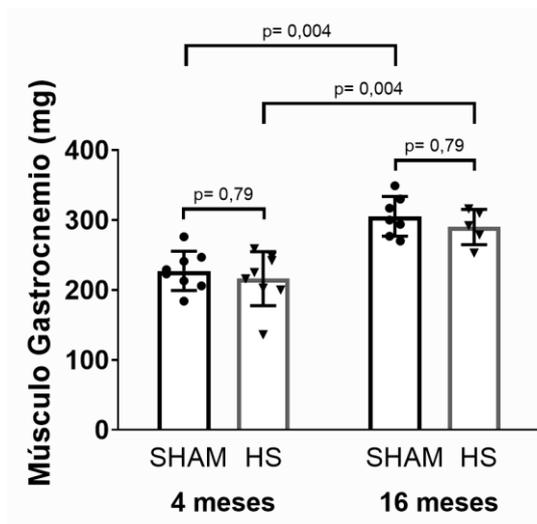


Figura 7 - Dados de massa do músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeas adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM) – Dados brutos em miligramas; Dados expressos em média \pm DPM. ANOVA de 2-vias com *post hoc* Tukey. SHAM 4 meses: N = 8; SHAM 16 meses: N = 7; HS 4 meses: N = 8; HS 16 meses: N = 5.

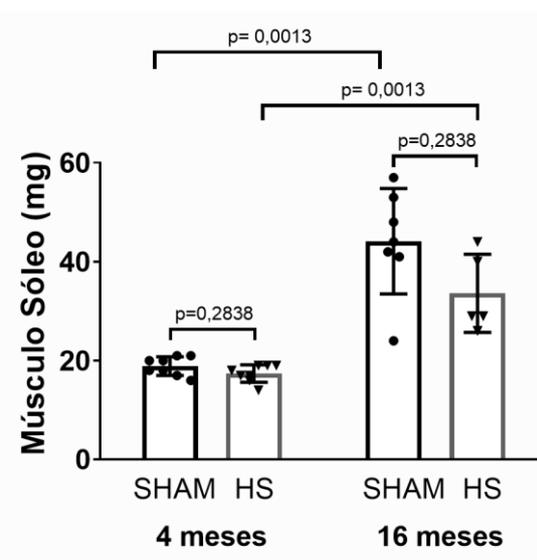


Figura 8 - Dados de massa do músculo sóleo de camundongos fêmeas adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM). – Dados brutos em miligramas; Dados expressos em média \pm DPM. ANOVA de 2-vias com *post hoc* Tukey. SHAM 4 meses: N = 8; SHAM 16 meses: N = 7; HS 4 meses: N = 8; HS 16 meses: N = 5.

Ao analisarmos o tecido adiposo, com relação ao tratamento (SHAM vs HS), não houve diferença ($p=0,9999$) entre os grupos. Já quando comparada as idades, verificamos diferença ($p=0,0001$) em ambos os grupos, tanto entre jovens e envelhecidas do grupo SHAM quanto do grupo HS. Tais achados indicando um maior acúmulo de tecido adiposo conforme a progressão da idade do animal. Ainda sobre o tecido adiposo, porém agora corrigido pelo peso do animal, verificamos

diferença ($p=0,0001$) entre as idades, reforçando o que foi apresentado no resultado anterior. Em relação aos tratamentos (SHAM vs HS), não houve diferença ($p=0,2693$).

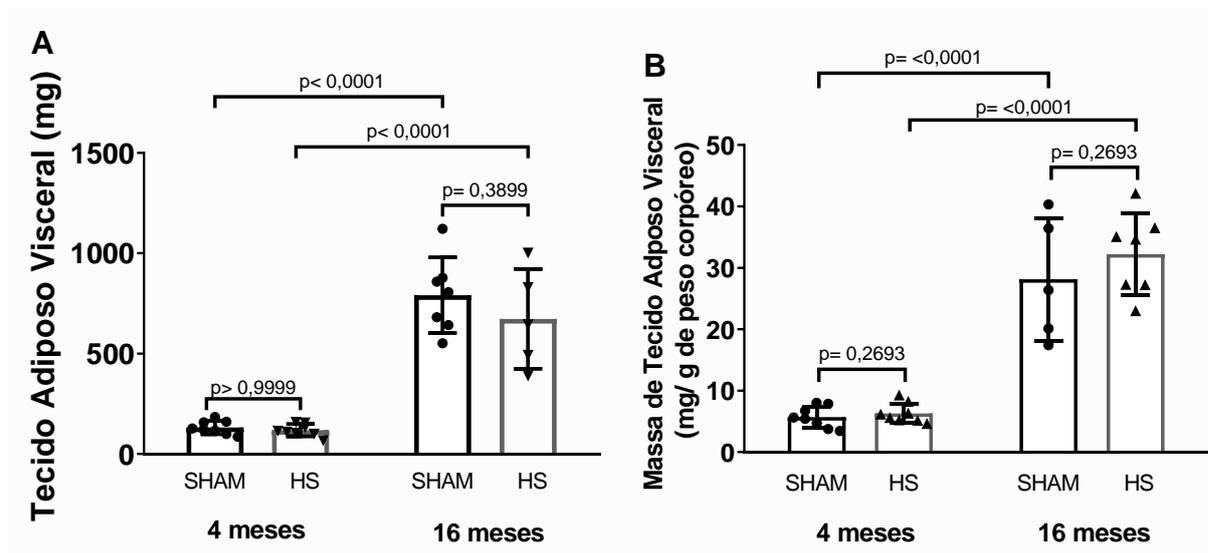


Figura 9 - Dados de massa do tecido adiposo visceral de camundongos fêmeas adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM). A – Dados brutos em miligramas; B – Normalização do tecido extraído pela massa total dos animais. Dados expressos em média \pm DPM. ANOVA de 2-vias com *post hoc* Tukey. * Diferenças mostradas no gráfico. SHAM 4 meses: N = 8; SHAM 16 meses: N = 7; HS 4 meses: N = 8; HS 16 meses: N = 5.

Ao verificarmos a massa hepática destes animais, observamos que os animais envelhecidos apresentaram maiores pesos quando comparados aos mais jovens ($p=0,0001$).

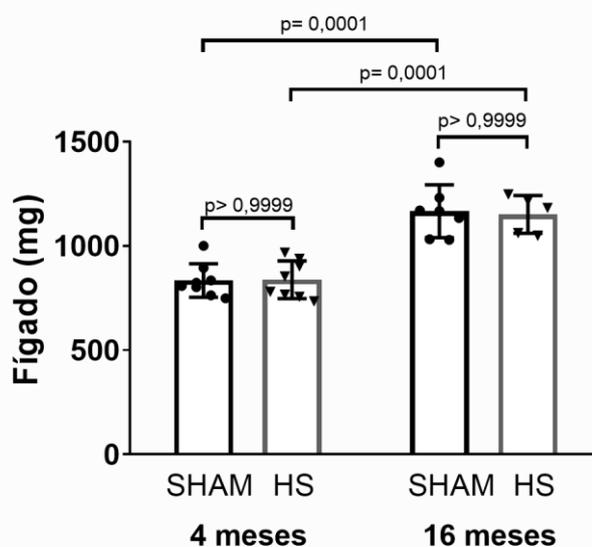


Figura 10 - Dados de massa do tecido hepático de camundongos fêmeas adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM) – Dados brutos em miligramas;

Dados expressos em média \pm DPM. ANOVA de 2-vias com *post hoc* Tukey. *Diferenças mostradas no gráfico. SHAM 4 meses: N = 8; SHAM 16 meses: N = 7; HS 4 meses: N = 8; HS 16 meses: N = 5.

Aplicando as relações determinadas pelo Índice de Lee, não encontramos diferença entre os animais dos diferentes grupos ao quando comparados aos valores apresentados no início do tratamento (esperado), nem ao final do experimento. Porém, foi verificada diferença quando os animais do mesmo grupo HS ($p=0,0003$) ou SHAM ($p=0,0001$) tiveram seus índices comparados do início ao final do tratamento. Estes resultados nos indicam que a terapia térmica não provocou efeitos sobre estes parâmetros, uma vez que animais pertencentes aos diferentes grupos apresentaram a mesma resposta.

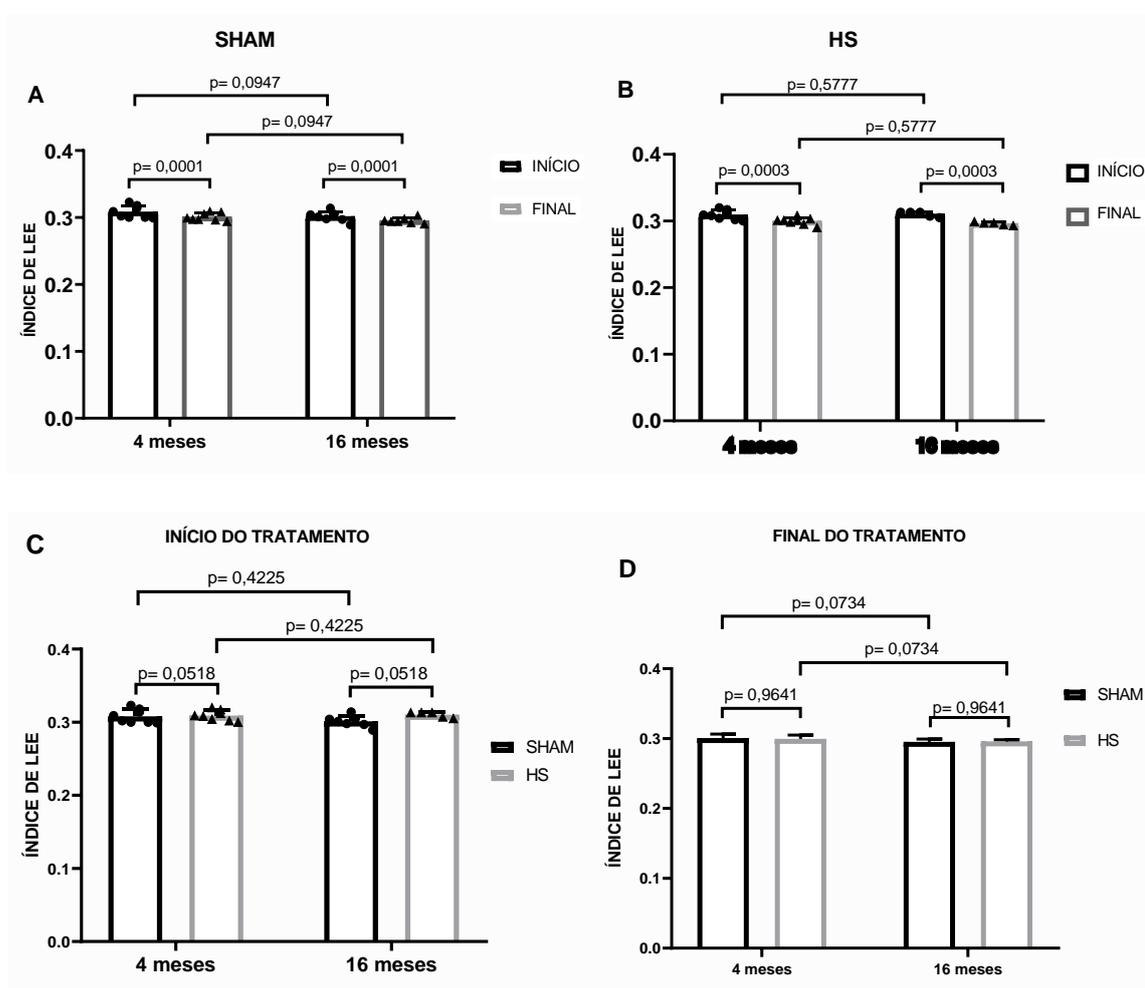


Figura 11 - Índices de Lee em camundongos fêmeas adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque térmico (HS) ou sem (SHAM) - Dados expressos em média \pm DPM. ANOVA de 2-vias com *post hoc* Tukey. SHAM 4 meses: N = 8; SHAM 16 meses: N = 7; HS 4 meses: N = 8; HS 16 meses: N = 5.

Analisando os valores encontrados para a glicemia de jejum dos animais, não verificamos diferença entre os grupos ($p=0,9221$), nem quando comparadas as diferentes idades ($p=0,997$).

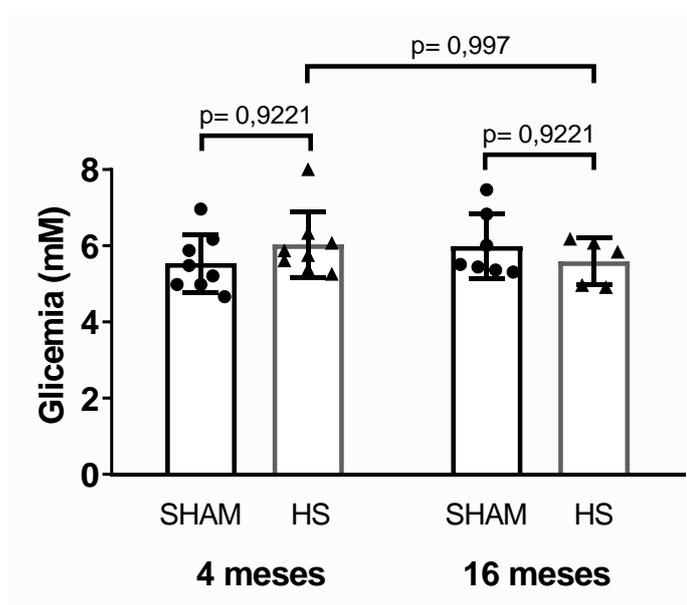


Figura 12 - Glicemia de jejum (12 h) de camundongos fêmeos adultos jovens (4 meses) e envelhecidos (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM). Dados expressos em média \pm DPM. ANOVA de 2-vias com *post hoc* Tukey. SHAM 4 meses: N = 8; SHAM 16 meses: N = 7; HS 4 meses: N = 8; HS 16 meses: N = 5.

Sobre o teste de tolerância oral à glicose, não foram observadas diferenças nas áreas sob as curvas entre os animais SHAM e HS ($p=0,4528$) (figura 13), tanto nas jovens quanto nas das envelhecidas. As glicemias basais foram *relativamente* altas, tanto nos SHAM quanto nos tratados ($\sim 8-9$ mM, quando o esperado seria por volta de 4,5-5,5 mM). Entretanto, verificamos que todos os animais apresentaram o mesmo padrão, ou muito similar de valores, o que nos permitiu padronizar a interferência neste marcador.

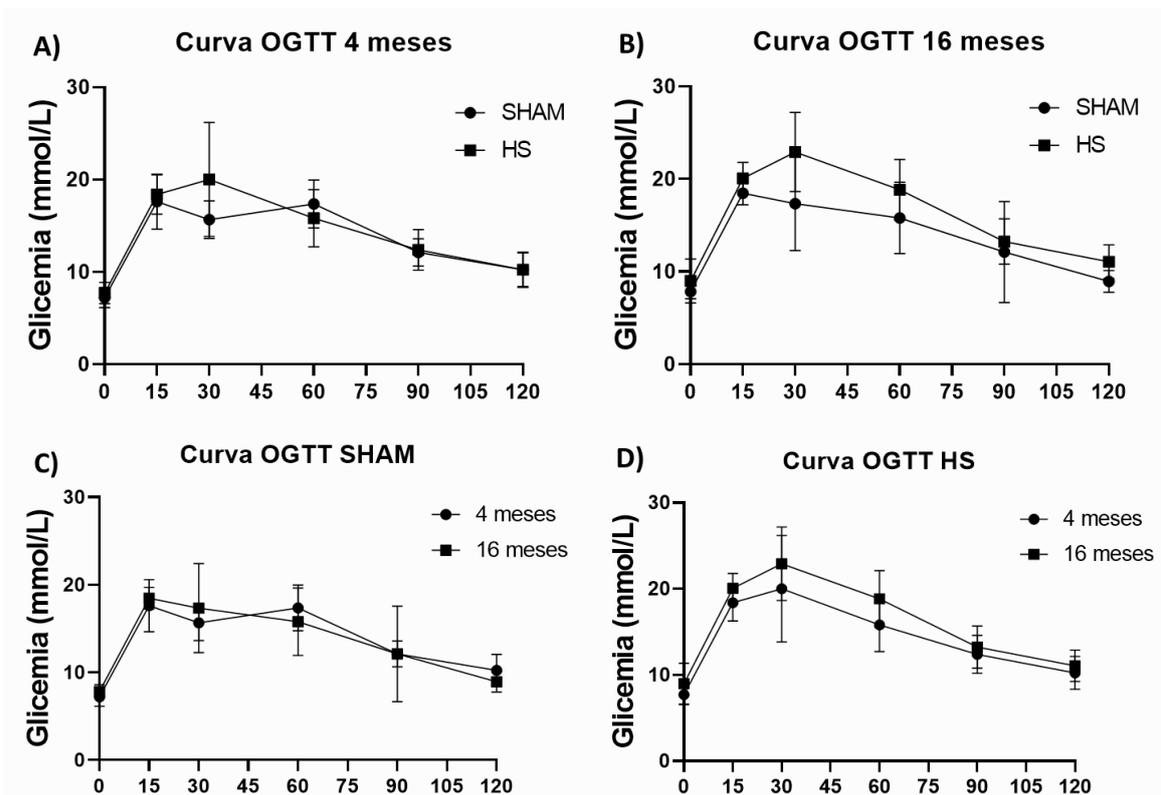


Figura 13 - Curva de tolerância oral à glicose realizada em camundongos fêmeas jovens (4 meses) e envelhecidas (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM) - Dados expressos em média \pm DPM. ANOVA de 2-vias com *post hoc* Tukey. SHAM 4 meses: N = 8; SHAM 16 meses: N = 7; HS 4 meses: N = 8; HS 16 meses: N = 5.

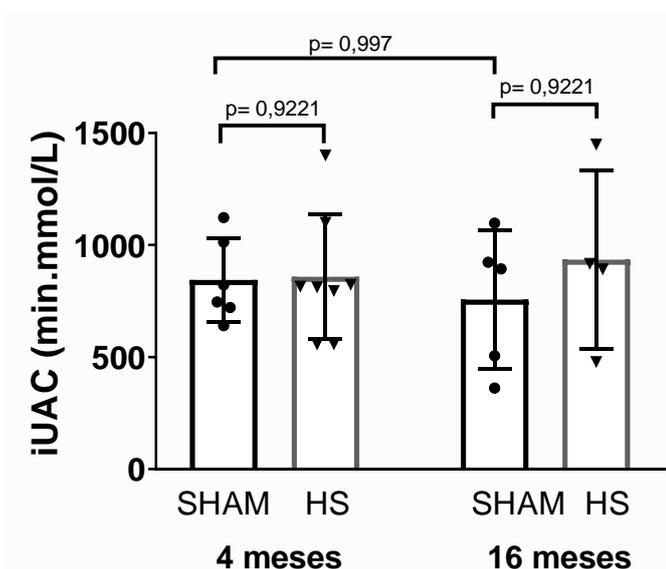


Figura 14 - Área incremental sob a curva do OGTT de camundongos fêmeas jovens (4 meses) e envelhecidas (16 meses) tratados com choque (HS) ou sem (SHAM) - Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com *post hoc* Tukey. SHAM 4 meses: N = 6; SHAM 16 meses: N = 5; HS 4 meses: N = 8; HS 16 meses: N = 4.

De forma muito interessante, quando correlacionamos os valores correspondentes às áreas incrementais sob as curvas glicêmicas e as

concentrações de estradiol, verificamos que as envelhecidas do grupo SHAM, quando comparadas às jovens, tendem a demonstrar um comportamento de declínio da função metabólica atrelado aos baixos níveis de estrogênio. Surpreendentemente, ao voltarmos nosso olhar ao grupo de envelhecidas que realizou o choque térmico (16 meses + HS), há uma padronização de curva. Desta forma, a resposta nos permite perceber que o comportamento da curva se aproxima aos demais valores dos animais jovens. Isso nos sugere um possível fator de recuperação da função metabólica em função do tratamento térmico, reforçando a proposta desta intervenção como terapia crônica.

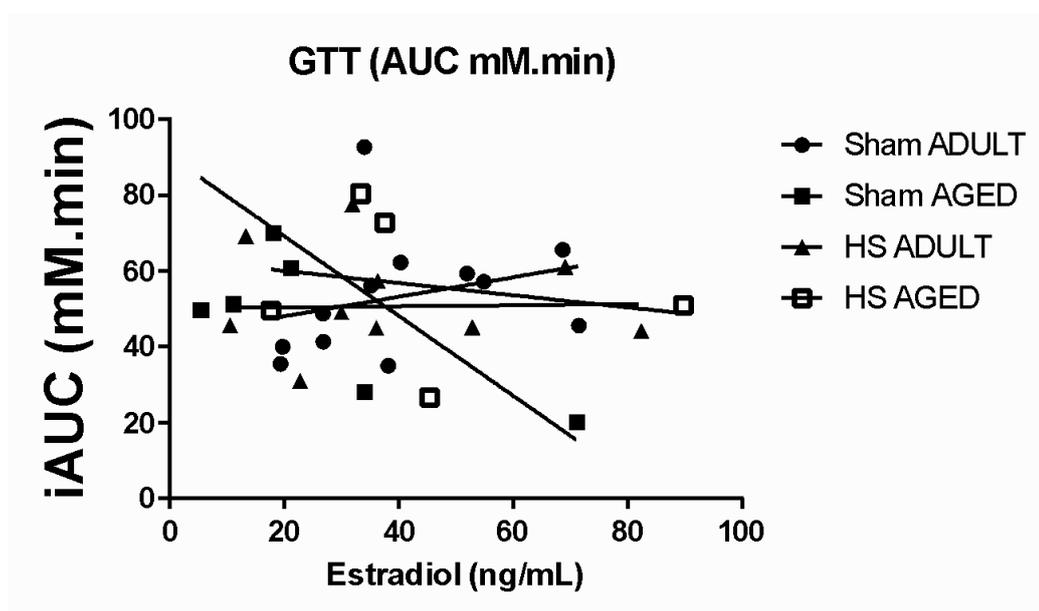


Figura 15 – Correlação de Pearson entre os valores da Área incremental sob a curva e as concentrações de 17- β -estradiol.

5. DISCUSSÃO

A remoção cirúrgica bilateral dos ovários, ovariectomia (OVX), é o método mais comum de indução a deficiência ovariana, sendo referida como um modelo de menopausa (Koebele & Bimonte-Nelson, 2016). Entretanto, estudos têm apontado que a ovariectomia reduz a proteção em ratas, uma vez que nas fêmeas OVX, os níveis de HSP72 são maiores do que nos machos, porém realizando a ovariectomia, os níveis da proteína acabam se tornando semelhantes entre os sexos, destacando o possível efeito do E₂ (Hosszu *et al.*, 2018). O mesmo estudo, sob a ótica das células tubulares proximais, ainda relata que foi encontrado um aumento nos níveis de proteína HSF-1, reguladora da síntese de HSP72, em ratas fêmeas, apresentando uma diferença considerável quando da comparação entre machos e fêmeas OVX. Isso sugere que a ausência de E₂ prejudica a resposta do HSF-1 tanto em situações fisiológicas, bem como em quadros patológicos (Hosszu *et al.*, 2018). Em nosso estudo, para avaliação dos efeitos do choque térmico, optamos por utilizar camundongos fêmeos envelhecidos, simulando a condição de envelhecimento, climatério e menopausal natural da fisiologia feminina. Isto posto, há também a redução a capacidade metabólica, e os desafios para a manutenção do *status* hormonal necessário enquanto níveis citoprotetores conhecidos.

Como já discutido inicialmente, a menopausa é um dos fatores responsáveis pelo declínio do E₂, logo, sendo indutor da via de choque térmico (HSR), espera-se que as concentrações de HSP70 estejam suprimidas. Anteriormente, diversos estudos já relataram que na condição de envelhecimento, há uma diminuição da HSR, acompanhada por alterações na proteostase, observada em diversos tecidos e células: como o fígado, linfócitos, coração e em artérias de ratos (Anckar & Sistonen, 2011; Faassen *et al.*, 1989; Gutschmann-Conrad *et al.*, 1998; Söti & Csermely, 2002; Stice *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2006). Por outro lado, sabe-se que a prejuízo decorrente do envelhecimento é menos pronunciado no cérebro e no músculo esquelético (Carnemolla *et al.*, 2014; Locke, 2000). Já estudos mais recentes em roedores mostraram que a perda de E₂ em ratos fêmeos diminuiu os níveis basais de HSP70, HSP27 e HSP90 no músculo esquelético (Wang *et al.*, 2016). Sob estas condições de hipoestrogenismo, buscamos verificar, um possível restabelecimento das concentrações de HSP70 intramuscular por meio do tratamento térmico, sinalizando uma possível recuperação da via da HSR.

Em nossos resultados, verificamos um aumento da HSP70 nos grupos submetidos ao HS, quando comparados aos SHAM ($p= 0,0341$) nos animais envelhecidos (Figura 3). Aspecto este, que se reforça ao passo que verificamos também, diferença quando comparadas as idades entre os animais que fizeram o choque, nos indicando que o tratamento aumenta as concentrações da HSP no músculo esquelético, tanto para as adultas jovens, quanto para as envelhecidas. Porém, o aumento das concentrações musculares desta proteína acaba sendo mais pronunciado nas fêmeas envelhecidas, nos sugerindo uma recuperação da via de choque térmico, até então suprimida em função do hipoestrogenismo. Isto resta muito interessante, pois, tendo em vista que em estudos anteriores, utilizando o modelo de ovariectomia, a indução da HSR via E_2 em cardiomiócitos de rato foi observada apenas em animais jovens e não nos ovariectomizados idosos (Stice *et al.*, 2011). Junto disso, recentemente também foi observado este aumento nas concentrações plasmáticas de HSP70, sendo independente do estado ovariectomizado, porém, ocorrendo no tecido adiposo branco e não no músculo esquelético. (Lissarassa *et al.*, 2020).

Além do aumento dos níveis de HSP, o aumento nas concentrações de E_2 também merece destaque como um efeito do choque térmico, como pode ser verificado em nosso estudo (Figura 4). O que acaba sendo intrigante, uma vez que até então, estudos que avaliaram os efeitos do tratamento hormonal com E_2 em roedores, tanto em machos, quanto em fêmeas ovariectomizadas, verificaram que o hormônio atenua a resposta HSP70 e HSP72 induzida pelo exercício e não tem efeito sobre HSP27 nos músculos dos membros posteriores (Paroo, Dipchand & Noble, 2002; Paroo, Tiidus & Noble, 1999; Bombardier, *et al.*, 2009). Além disso, evidências têm apontado que o tratamento com E_2 em concentrações fisiológicas, não melhorou o *status* proteostático celular (Hwang *et al.*, 2019). Esse aumento duplo nas concentrações de ambos, hormônio e proteína, nos faz concluir que o E_2 induz a expressão de HSP70 nas fêmeas, necessariamente. Por isso, correlacionamos estes dois marcadores (Figura 5). Do ponto de vista da correlação de Pearson, não foi verificada diferença. Porém, é notável o comportamento que os animais SHAM apresentaram expressão da proteína diminuída, enquanto que nos animais HS, a proteína aumenta. Este efeito é mais visível nas adultas jovens. Logo podemos afirmar que o tratamento térmico, por meio da recuperação das

concentrações de E₂, aumentaria a sensibilidade da via de choque térmico ao próprio estradiol, desenvolvendo citoproteção, e evitando o desenvolvimento de um possível quadro de pró-inflamatório. Isto posto, há a evidência de um quadro preventivo para o organismo da mulher, pois temos o aumento da suscetibilidade conhecida para o desenvolvimento de doenças crônicas de inflamação de baixo grau. Assim, a indicação para tratamento térmico como uma forte alternativa à terapia de reposição hormonal, uma vez que esta já teve sua segurança à longo prazo questionada (Rossouw *et al.*, 2013), é algo relevante.

Como já relatado neste estudo, parte do efeito protetor dos indutores de HSR reside em sua capacidade de elevar a produção do óxido nítrico (NO), que por sua vez, é um poderoso ativador do HSF-1 e potencializa a HSR. Por isso, avaliamos o conteúdo de iNOS no gastrocnêmio, onde não foi verificada diferença, tanto quando comparados os tratamentos bem como as idades. O que em um primeiro momento, acaba sendo curioso, tendo em vista os aumentos encontrados nas concentrações de E₂ e de HSP72. Porém, estudos recentes em células da glia demonstraram que com a indução de estímulos inflamatórios, há o aumento dos níveis da iNOS. Entretanto, este efeito foi reduzido com o choque térmico (Clarke *et al.*, 2019), sugerindo que isso seja decorrente da indução de HSP70, que limita a ativação do NF-κB (Chen *et al.* 2006), do qual a expressão de iNOS é dependente.

Além disso, não se pode descartar a possibilidade de que os incrementos na expressão de HSP70 induzida por NO, podem ser em decorrência da presença das outras enzimas NOS carregadoras deste processo (Yuste *et al.* 2015). Porém, também se atenta à possibilidade da avaliação deste mesmo marcador em outro tecido, na aorta, uma vez que as concentrações de óxido nítrico estão diretamente relacionadas com as propriedades de vasoconstrição/dilatação. Além disso, estudos anteriores em nosso grupo (Miragem *et al.*, 2015) já demonstraram o aumento da HSP72, em ratas OVX no tecido aórtico com o tratamento agudo de HS (sessão única de choque térmico). Ainda, esta relação (ou eixo), NO-HSP70, está correlacionado diretamente com a termogênese e sintomas vasomotores característicos da menopausa, tais como a sudorese e os fogachos (Miragem & Homem de Bittencourt Jr, 2017). Junto disso, atenta-se a uma possível formação da placa aterosclerótica, uma vez que, mulheres podem vir a desenvolver a aceleração do processo aterosclerótico, devido à perda excessiva de E₂ (Knowlton *et al.*, 2001),

somado ao fato de termos verificado o aumento dos depósitos de gordura e massa hepática no animal (discutido adiante).

Evidências anteriores apontam para o papel modulador do E₂ na manutenção da massa muscular (Taaffe, *et al.*, 2005; Ronkainen, *et al.*, 2009). Isso se deve ao fato de que o músculo esquelético possui receptores (tipo β) de E₂ na membrana celular, no citoplasma e na membrana nuclear (Jubrias *et al.*, 1997). Sabe-se que a atrofia muscular proveniente do aumento da apoptose, está associada com o envelhecimento biológico. Mulheres que desenvolveram uma capacidade protetiva antioxidante, em um quadro de hipoestrogenismo, ficam sujeitas ao declínio da proteção após transição menopáusica (Knowlton & Korzick, 2014). Isto acarreta na perda de massa e geração de força do músculo esquelético, cada vez mais frequente nesta idade em mulheres, chegando entre 1 a 2% ao ano (Aloia *et al.*, 1991; Meeuwssen, Samson & Verhaar, 2000; Rolland *et al.*, 2007; Bondarev, *et al.*, 2018; Ferrucci *et al.*, 1997). O nome dado a este processo de diminuição da massa muscular é sarcopenia. Esta, decorrente da acelerada queda nas concentrações de E₂, que também acaba prejudicando a saúde dos ossos, ligamentos, colágeno, cartilagem, membrana sinovial e cápsula articular (Khadilkar, 2019). Além das alterações no *status* hormonal decorrente do envelhecimento natural, as possíveis causas que podem vir a originar sarcopenia incluem: baixos níveis de atividade física, redução da ingestão de proteínas e aumento do estresse oxidativo (Messier *et al.*, 2011). Sua caracterização dá-se pela atrofia das fibras do tipo II, diminuição no número de unidades motoras e pelo acúmulo de gordura no interior do músculo, atrelado a resistência à insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina I (Khadilkar, 2019).

O que nos chama atenção para esta condição, é o acúmulo de gordura intramuscular, pois em nossos resultados nas variáveis teciduais, camundongos fêmeos envelhecidos de 16 meses apresentaram maiores massas nos músculos gastrocnêmio (Figura 7) e sóleo (Figura 8), quando comparadas às adultas de 4 meses. Estudos histológicos (já programados) poderão ajudar a aceitar ou refutar esta possibilidade. Sabe-se que a sarcopenia pode progredir para o estado de obesidade sarcopênica, em que além da diminuição da massa magra, há o aumento da massa gorda (Khadilkar, 2019). Em humanos, a sarcopenia pode acabar colocando mulheres em risco, pois é comumente exacerbada em indivíduos com

sobrepeso e obesos, acarretando em morbidade, devido ao aumento da incidência de doenças relacionadas ao estilo de vida, tais como o diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão e síndrome metabólica (Zacker, 2006; Manini & Clark, 2012), bem como aumento da mortalidade (Khadilkar, 2019). Essa hipótese ganha força ao passo que estudos já constataram que, em mulheres pós-menopáusicas, quando comparadas às mais jovens, é encontrada uma grande quantidade de tecido muscular não contrátil, como gordura intramuscular (Jubrias *et al.*, 1997). Deste modo, acreditamos que o aumento encontrado nas massas musculares das fêmeas envelhecidas em nosso estudo possa ser decorrente de obesidade sarcopênica, porém, ensaios histológicos futuros são necessários para comprovação.

A capacidade do músculo esquelético de gerar força, é considerada como um indicativo de *recuperação* de lesão (Warren, Lowe & Armstrong, 1999). Estudos que têm avaliado a recuperação da lesão muscular induzida por contração em camundongos fêmeos jovens ovariectomizados tem demonstrado a recuperação incompleta da força (Kosir *et al.*, 2014), já em tratamentos com estradiol, houve uma melhora na recuperação da força após uma lesão traumática por congelamento (Le, *et al.*, 2018). Além da recuperação incompleta no músculo esquelético e perda da citoproteção, sob um estado de hipoestrogenismo, também estão associados à dislipidemia (Spangenburg & Jackson, 2013), o estresse oxidativo (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012) e o comprometimento da HSR (Stice *et al.*, 2011; Miragem & Homem de Bittencourt Jr, 2017). Proteínas de choque térmico (HSPs) junto às mitocôndrias conferem proteção ao músculo esquelético contra o processo apoptótico, numa via dependente de E₂ (Collins, Laakkonen & Lowe, 2019). Logo, ao terem sua expressão reduzida, acabam tendo sua função comprometida e, assim, fazem com que o meio celular se torne menos capaz de gerar a resposta adequada para o reparo da lesão no músculo esquelético.

Além de efeitos na musculatura esquelética, o E₂ contribui para a manutenção do balanço energético e metabolismo da glicose. Com o seu declínio em função da menopausa, o metabolismo de lipídios e carboidratos acaba sendo afetado negativamente (Kamada *et al.* 2011; Min *et al.* 2018; Lovejoy, 2003; Lizcano & Guzmán 2014). Isto certamente predispõe as fêmeas, incluindo humanas, a doenças metabólicas. Em modelos de ovariectomia, observou-se que a redução hormonal levou ao declínio da expressão dos genes necessários para eficiência do gasto

energético. Genes estes relacionados ao metabolismo dos ácidos graxos, bem como genes do tecido adiposo e do músculo esquelético (Kamei *et al.* 2005). Isto acarreta disfunções inflamatórias relacionadas à obesidade, como o aumento do perfil oxidativo (Lizcano & Guzmán 2014; Fernández-Sánchez *et al.* 2011), o ganho de peso (Spangenburg & Jackson 2013; Sibonga *et al.* 2003) em função da diminuição da taxa de metabolismo basal e gasto energético (Heine *et al.* 2000; Camporez *et al.* 2013). Além disso, a perda de massa magra, somado a um maior sedentarismo e oxidação de gordura, associada à tratamentos mais frequentes com fármacos, como esteroides e insulina (Lovejoy *et al.*, 2008; Kalyani *et al.*, 2009), tem sua gênese ou desfecho em uma HSR suprimida em tecidos metabólicos (Newsholme & Homem de Bittencourt Jr 2014).

Relacionando estes apontamentos da literatura com o nosso modelo experimental, podemos inferir que estamos simulando a condição de um animal doente, pois além dos efeitos decorrentes da menopausa/envelhecimento, há a influência, também, do sedentarismo destes animais em função do confinamento em espaço restrito, bem como a livre oferta de alimento (mesmo a dieta não sendo hiperlipídica) ao longo de sua vida.

O hipoestrogenismo decorrente da menopausa pode levar a um aumento da adiposidade visceral (Messier *et al.*, 2011). Evidências apontam que, o risco de desenvolver obesidade (sempre associada à resistência à insulina em algum momento) está atrelado a demais doenças cardiovasculares, com o aumento de 86 % no risco das mulheres após atingirem os 40 anos, 65 % de risco em mulheres entre 40 e 59 anos de idade, e 74 % de risco naquelas acima de 60 anos (Schmidt, 2018). Logo, a redução de E₂ poderia ser um fator importante para o desenvolvimento da resistência à insulina (Kennedy *et al.*, 1997).

Em um estudo em que se avaliou os efeitos do choque térmico em ratas ovariectomizadas, observou-se o aumento dos níveis séricos de HDL, porém, sem modificar os níveis de LDL (Lissarassa *et al.* 2020). Estudos *in vitro* mostraram que o choque térmico aumentou a expressão de genes relacionados à captação de ácidos graxos e síntese de triacilgliceróis em adipócitos (Qu, Donkin & Ajuwon 2015), bem como a demanda de glicerol como fonte energética (Qu & Ajuwon 2018). Em nossos resultados, verificamos que, em relação ao tecido adiposo (Figura 9), principal fonte de armazenamento de triacilgliceróis, houve um aumento nas massas das fêmeas

envelhecidas, quando comparadas às adultas. O que acaba sendo intrigante, pois estudos anteriores de nosso grupo em camundongos machos *knockout* para o receptor LDL, verificamos que o choque térmico reduziu o ganho de peso corporal, o índice de Lee, e a obesidade visceral (Bruxel *et al.*, 2018). Em nossos resultados, não foi verificada possíveis efeitos do choque térmico na resposta da composição corporal dos animais a partir do parâmetro, Índice de Lee, uma vez que o grupo SHAM demonstrou a mesma tendência apresentada pelo grupo HS. Em contrapartida, um estudo que investigou os efeitos do envelhecimento em camundongos fêmeos, também verificou um aumento similar da gordura visceral. Sendo em função da redistribuição dos depósitos de gordura (Schmidt, 2018), processo que é caracterizado pela hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos associadas a alterações na função metabólica (Graja & Schulz, 2015), como o desbalanceamento entre o consumo energético e o seu gasto.

O envelhecimento está atrelado a falhas no processo de armazenamento de lipídios do tecido adiposo, contribuindo para esta redistribuição dos depósitos (Cartwright, Tchkonja & Kirkland 2007). Estes problemas no armazenamento de lipídios também podem ser vistos nível extra-hepático, influenciando na sensibilidade à insulina no músculo esquelético (Schmidt, 2018), tendo em vista que a mulher possa estar desenvolvendo um quadro de inflamação de baixo grau decorrente da secreção de citocinas pró-inflamatórias, porém, estas citocinas não foram mensuradas em nosso estudo.

Quando avaliamos a massa hepática das fêmeas (Figura 10), verificamos um aumento acentuado nas envelhecidas comparadas às adultas. Este processo de aumento do peso do fígado, também foi verificado em demais estudos com camundongos fêmeos (Schmidt, 2018). A possível justificativa para este ganho, pode estar na relação com a gordura visceral, que em indivíduos saudáveis, é um fator determinante para o depósito de gordura do fígado (Filho *et al.*, 2006).

Sob uma perspectiva metabólica, mesmo havendo alterações significativas em variáveis teciduais importantes, isto nos sugere um possível desenvolvimento de quadro inflamatório. Ao avaliarmos a glicemia dos animais (Figura 12), verificamos que não houve diferença na resposta glicêmica entre os grupos experimentais. Isto acaba sendo curioso, pois, uma vez que este processo aparentemente não se correlaciona com o aumento dos depósitos de gordura, hipertrofia dos adipócitos ou

até mesmo um aumento no peso hepático nos animais envelhecidos. Sendo que em situações semelhantes há manutenção dos níveis de glicose e triglicerídeos dentro do padrão fisiológico esperado (Schmidt, 2018). Além disso, ao realizarmos o teste de tolerância à glicose (Figura 13), não foram observadas diferenças nas áreas sob as curvas entre os animais SHAM e HS, tanto das jovens quanto das envelhecidas (Figura 14). Isso pode ter acontecido devido às fêmeas terem ficado enclausuradas, elevando as glicemias basais, tanto nos controles quanto dos tratados (~8-9 mm, quando o esperado seria por volta de 4,5-5,5 mm). Estudos anteriores de nosso grupo, ao avaliar os efeitos do choque térmico em modelos de ovariectomia, também não verificaram alterações, tanto em testes de tolerância a glicose, quanto de insulina, nos levando a inferir que, enquanto a supressão da HSR estiver alocada apenas no tecido adiposo e não no músculo esquelético, as disfunções glicêmicas não serão percebidas. Assim, gerando a hipótese de que o hipoestrogenismo por si só, acaba não sendo suficiente para gerar um estado de resistência à insulina associado ao baixo teor de HSP70 intramuscular (Lissarassa *et al.* 2020). Novos estudos de captação de glicose na presença de insulina em incubações de tecido muscular poderão trazer uma luz a esses achados.

Deste modo, um dos efeitos do tratamento térmico, mais instigante que encontramos em nosso estudo deu-se por meio da correlação entre os valores correspondentes às áreas incrementais sob as curvas glicêmicas e as concentrações de estradiol (Figura 15), em que os animais envelhecidos que não fizeram o tratamento apresentaram uma tendência de queda da função metabólica atrelada ao baixo nível de E₂. Surpreendentemente, houve paralelismo da curva protagonizada pelos animais envelhecidos que receberam o choque térmico. Isso nos sugere uma recuperação da função metabólica desses animais, igualando-se aos padrões apresentados pelas jovens. Análises posteriores ainda se fazem necessárias para auxiliar na compreensão deste processo, uma vez que ainda *navegamos em um mar* de incertezas e possibilidades relacionadas à mecanística destas interações metabólicas. Entretanto, isso nos sugere um possível fator de recuperação da função metabólica em função do tratamento térmico, que pode reverter o estado de hipoestrogenismo decorrente da menopausa, aumentando a sensibilidade da via da HSR ao E₂, fazendo com que se reforce a proposta do tratamento térmico como terapia.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabe-se que a redução da capacidade metabólica está atrelada ao envelhecimento e à menopausa. Em nossas análises, verificamos que, com relação às massas teciduais, mais especificamente nos músculos, houve diferenças apenas nas comparações entre as idades dos animais e não ao tratamento térmico. Isto sugere o possível desenvolvimento de uma obesidade sarcopênica. Quando voltamos nosso olhar para o tecido adiposo, verificamos um aumento significativo na massa tecidual das fêmeas envelhecidas, em função da redistribuição dos depósitos de gordura, o que pode indicar possíveis disfunções metabólicas relacionadas ao armazenamento de lipídios, bem como a resistência à insulina. Ao encontro deste resultado, soma-se também o aumento verificado na massa hepática das fêmeas envelhecidas, a qual está diretamente correlacionada com os índices de gordura visceral, fator determinante do depósito de gordura do fígado. Ou seja, estas modificações decorrentes do envelhecimento e do hipoestrogenismo, tornam a fêmea (e, possivelmente, a mulher) mais suscetível a desenvolver um quadro de inflamação de baixo grau.

Porém, nosso estudo verificou que a realização do tratamento térmico em camundongos fêmeos pode ter promovido o restabelecimento da via da HSR, uma vez que verificamos o aumento nos níveis de HSP72 intramuscular. Aumento este em função da surpreendente recuperação das concentrações de E2 circulante, que até então se encontravam suprimidas em função do hipoestrogenismo decorrente do envelhecimento/menopausa natural. O E₂, enquanto indutor da HSR atua via sua relação E₂ x HSP72. Uma vez que houve uma queda da expressão proteica em função das baixas concentrações hormonais nos animais do grupo SHAM, enquanto que nos tratados, o comportamento observado foi o de aumento, tais resultados nos levam a pensar que o tratamento térmico possa ser fator chave no aumento da sensibilidade da HSR via E₂. Além disso, também verificamos que o choque térmico desencadeou uma recuperação da função metabólica nos animais tratados. Reforçando a proposta da terapia térmica como uma forte alternativa à terapia de reposição hormonal que tem sua segurança no longo prazo questionável.

8. REFERÊNCIAS

A.A. Knowlton, D.H. Korzick, **Estrogen and the female heart**, *Mol. Cell. Endocrinol.* 389 (1 –2) (2014) 31 –39.

A.M. Kosir, et al., **Influence of ovarian hormones on strength loss in healthy and dystrophic female mice**, *Med. Sci. Sports Exerc.* 47 (2014) 1177 –1187.

Abildgaard J, Tingstedt J, Zhao Y, Hartling HJ, Pedersen AT, Lindegaard B, et al. (2020) **Increased systemic inflammation and altered distribution of T-cell subsets in postmenopausal women**. *PLoS ONE* 15(6): e0235174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235174>

Albakova, Z., Armeev, G. A., Kanevskiy, L. M., Kovalenko, E. I., & Sapozhnikov, A. M. (2020). **HSP70 multi-functionality in cancer**. *Cells*, 9(3), 587.

Aloia JF, McGowan DM, Vaswani AN, Ross P, Cohn SH. **Relationship of menopause to skeletal and muscle mass**. *Am J Clin Nutr* 1991; 53 (6):1378–83.

Anckar J, Sistonen L. **Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease**. *Annu Rev Biochem* 80: 1089–1115, 2011. doi: 10.1146/annurev-biochem-060809-095203. Carnemolla A, Labbadia JP, Lazell H, Neueder A, Moussaoui S, Bates

Anderson, R. A., Skorupskaitė, K., & Sassarini, J. (2019). **The neurokinin B pathway in the treatment of menopausal hot flashes**. *Climacteric*, 22(1), 51-54.

Appelgren, L.E. **Histochemical demonstration of drug interference with progesterone synthesis**. *Journal of reproduction and fertility*. 19, 185-186 (1969).

Bansal, R., & Aggarwal, N. (2019). **Menopausal hot flashes: a concise review**. *Journal of Mid-life Health*, 10(1), 6.

Bathaie SZ, Jafarnejad A, Hosseinkhani S, Nakhjavani M. **The effect of hot-tub therapy on serum Hsp70 level and its benefit on diabetic rats: a preliminary report**. *Int J Hyperthermia* 2010; 26: 577-585. <https://doi.org/10.3109/02656736.2010.485594>

Benedusi V, et al. **A lack of ovarian function increases neuroinflammation in aged mice**. *Endocrinology*. 2012; 153(6):2777–88.

Biglia, N., Cagnacci, A., Gambacciani, M., Lello, S., Maffei, S., & Nappi, R. E. (2017). **Vasomotor symptoms in menopause: a biomarker of cardiovascular disease risk and other chronic diseases?**. *Climacteric*, 20(4), 306-312.

Bittencourt A, Schroeder HT, Rosa Porto R, Lemos Muller CH, Krause M, Homem de Bittencourt PI Jr. **Heat shock response to exercise in pancreatic islets of obese mice**. *Biochimie*. 2019;167: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.10.015>

Bloom, D. E., Boersch-Supan, A., McGee, P., & Seike, A. (2011). **Population aging: facts, challenges, and responses.** *Benefits and compensation International*, 41(1), 22.

Bochaton, T., Paccalet, A., Jeantet, P., Crola Da Silva, C., Cartier, R., Prieur, C., ... & Ovize, M. (2020). **Heat shock protein 70 as a biomarker of clinical outcomes after STEMI.** *Journal of the American College of Cardiology*, 75(1), 122-124.

Bonaccorsi, G., Piva, I., Greco, P., & Cervellati, C. (2018). **Oxidative stress as a possible pathogenic cofactor of post-menopausal osteoporosis: Existing evidence in support of the axis oestrogen deficiency-redox imbalance-bone loss.** *The Indian journal of medical research*, 147(4), 341.

Bondarev, D., Laakkonen, E. K., Finni, T., Kokko, K., Kujala, U. M., Aukee, P., ... & Sipilä, S. (2018). **Physical performance in relation to menopause status and physical activity.** *Menopause*, 25(12), 1432-1441.

Bradford, M. M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Brown, E. T., Umino, Y., Loi, T., Solessio, E., & Barlow, R. (2005). **Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice.** *Visual neuroscience*, 22(5), 615-618.

Bruxel MA, Tavares AMV, Zavarize Neto LD, de Souza Borges V, Schroeder HT, Bock PM, Rodrigues MIL, Belló-Klein A, Homem de Bittencourt PI Jr. **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*. 2019 Jan; 156: 33 - 46. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.09.011>

Bukau B, Weissman J, Horwich A (2006) **Molecular chaperones and protein quality control.** *Cell* 125(3): 443 – 451

Burger HG, et al. **Cycle and hormone changes during perimenopause: the key role of ovarian function.** *Menopause*. 2008; 15 (4 Pt 1):603 – 12.

Caldwell CC, Yao J, Brinton RD. **Targeting the prodromal stage of Alzheimer's disease: bioenergetic and mitochondrial opportunities.** *Neurotherapeutics*. 2015; 12 (1):66– 80.

Camporez, J. P. G., Jornayvaz, F. R., Lee, H. Y., Kanda, S., Guigni, B. A., Kahn, M., ... & Shulman, G. I. (2013). **Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance.** *Endocrinology*, 154 (3), 1021-1028.

Cartwright, M. J., Tchkonja, T., & Kirkland, J. L. (2007). **Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms.** *Experimental gerontology*, 42(6), 463-471.

Chen HQ, Wu YF, Zhang YQ, Jin LN, Luo L, Xue B, Lu C, Zhang XR, Yin ZM (2006) **Hsp70 inhibits lipopolysaccharide-induced NF-kappa B Activation Interacting with TRAF6 and inhibiting its ubiquitination.** *FEBS Lett* 580:3145–3152

Chilumuri A, Milton NG. **The Role of Neurotransmitters in Protection against Amyloid- β Toxicity by KiSS-1 Overexpression in SH-SY5Y Neurons.** *ISRN Neurosci* 2013; 2013: 253210. <https://doi.org/10.1155/2013/253210>

Choi M, Salanova B, Rolle S, Wellner M, Schneider W, Luft FC, Kettritz R. **Short-term heat exposure inhibits inflammation by abrogating recruitment of and nuclear factor B activation in neutrophils exposed to chemotactic cytokines.** *Am J Pathol* 2008; 172: 367-777. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070532>

Chung, J., Nguyen, A. K., Henstridge, D. C., Holmes, A. G., Chan, M. H., Mesa, J. L., Lancaster, G. I., Southgate, R. J., Bruce, C. R., Duffy, S. J. et al. (2008) **HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1739–1744 CrossRef PubMed.

Clark, M. S., Suckling, C. C., Cavallo, A., Mackenzie, C. L., Thorne, M. A., Davies, A. J., & Peck, L. S. (2019). **Molecular mechanisms underpinning transgenerational plasticity in the green sea urchin *Psammechinus miliaris*.** *Scientific reports*, 9(1), 1-12.

Clarke, B. E., Gil, R. S., Yip, J., Kalmar, B., & Greensmith, L. (2019). **Regional differences in the inflammatory and heat shock response in glia: implications for ALS.** *Cell Stress and Chaperones*, 24(5), 857-870.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2019). **Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence.** *The Lancet*, 394(10204), 1159-1168.

Collins, B. C., Laakkonen, E. K., & Lowe, D. A. (2019). **Aging of the musculoskeletal system: How the loss of estrogen impacts muscle strength.** *Bone*, 123, 137-144.

Currie, H., Abernethy, K., & Hamoda, H. (2021). **Vision for menopause care in the UK.** *Post Reproductive Health*, 27(1), 10-18.

D.R. Taaffe, et al., **Estrogen replacement, muscle composition, and physical function: the health ABC study,** *Med. Sci. Sports Exerc.* 37 (10) (2005) 1741 – 1747.

Dalal PK, Agarwal M. **Postmenopausal syndrome.** *Indian J Psychiatry.* 2015; 57(Suppl 2): S222– 32.

de Git, K. C., den Outer, J. A., Wolterink-Donselaar, I. G., Luijendijk, M. C., Schéle, E., Dickson, S. L., & Adan, R. A. (2019). **Rats that are predisposed to excessive obesity show reduced (leptin-induced) thermoregulation even in the preobese state.** *Physiological reports*, 7(14), e14102.

De Oliveira, A. A., Priviero, F., Webb, R. C., & Nunes, K. P. (2021). **Impaired HSP70 expression in the aorta of female rats: a novel insight into sex-specific differences in vascular function.** *Frontiers in Physiology*, 12, 517.

Dhillon, M. M. W. S. (2018). **Neurokinin 3 Receptor Antagonism: A Novel Treatment for Menopausal Hot Flashes.**

Di Naso FC, Porto RR, Fillmann HS, Maggioni L, Padoin AV, Ramos RJ, Mottin CC, Bittencourt A, Marroni NA, Homem de Bittencourt PI Jr. **Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway, contributing to NAFLD progression.** *Obesity* 2015;23:120-129. <https://doi.org/10.1002/oby.20919>

Dupont J, Scaramuzzi RJ. **Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle.** *Biochem J* 2016;473:1483-1501. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160124>

E. Bombardier, et al., **Effects of ovarian sex hormones and downhill running on fiber-type-specific HSP70 expression in rat soleus,** *J Appl Physiol* (1985) 106 (6) (2009) 2009–2015.

El Khoudary, S. R., Aggarwal, B., Beckie, T. M., Hodis, H. N., Johnson, A. E., Langer, R. D., ... & American Heart Association Prevention Science Committee of the Council on Epidemiology and Prevention; and Council on Cardiovascular and Stroke Nursing. (2020). **Menopause transition and cardiovascular disease risk: implications for timing of early prevention: a scientific statement from the American Heart Association.** *Circulation*, 142(25), e506-e532.

Eleazu, I. C., Jones-O'Connor, M., & Honigberg, M. C. (2020). **The Impact of Premature Menopause on Future Risk of Cardiovascular Disease.** *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, 22(12), 1-11.

Elmallah, M. I., Cordonnier, M., Vautrot, V., Chanteloup, G., Garrido, C., & Gobbo, J. (2020). **Membrane-anchored heat-shock protein 70 (Hsp70) in cancer.** *Cancer Letters*, 469, 134-141.

Faassen AE, O'Leary JJ, Rodysill KJ, Bergh N, Hallgren HM. **Diminished heat-shock protein synthesis following mitogen stimulation of lymphocytes from aged donors.** *Exp Cell Res* 183: 326–334, 1989. doi:10.1016/0014-4827(89)90393-5.

Fernandes, R. D., Hall, A., Ferguson, M., Lorenzen-Schmidt, I., Balasubramaniam, V., & Pyle, W. G. (2019). **Cardiac changes during the peri-menopausal period in a VCD-induced murine model of ovarian failure.** *Acta Physiologica*, 227(1), e13290.

Fernández-Sánchez, A., Madrigal-Santillán, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-González, Á., Esquivel-Chirino, C., ... & Morales-González, J. A. (2011). **Inflammation, oxidative stress, and obesity.** *International journal of molecular sciences*, 12(5), 3117-3132.

Ferrucci L, Guralnik JM, Buchner D, et al. **Departures from linearity in the relationship between measures of muscular strength and physical performance of the lower extremities: the Women's Health and Aging Study.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1997;52:M275–85.

Freedman, R. R. (1998). **Biochemical, metabolic, and vascular mechanisms in menopausal hot flashes.** *Fertility and sterility*, 70(2), 332-337.

G. Le, et al., **A moderate oestradiol level enhances neutrophil number and activity in muscle after traumatic injury but strength recovery is accelerated,** *J. Physiol.* 596 (19) (2018) 4665 –4680.

G.L. Warren, D.A. Lowe, R.B. Armstrong, **Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury,** *Sports Med.* 27 (1) (1999) 43 –59.

Girasole G, et al. **Oestrogens prevent the increase of human serum soluble interleukin-6 receptor induced by ovariectomy in vivo and decrease its release in human osteoblastic cells in vitro.** *Clin Endocrinol.* 1999;51(6):801 –7.

Gliemann, L., & Hellsten, Y. (2019). **The exercise timing hypothesis: can exercise training compensate for the reduction in blood vessel function after menopause if timed right?** *The Journal of Physiology*, 597(19), 4915-4925.

Gowda, R., Jaffa, M., & Badjatia, N. (2018). **Thermoregulation in brain injury.** *Handbook of Clinical Neurology*, 157, 789-797.

GP. **Contesting the dogma of an age-related heat shock response impairment: implications for cardiac-specific age-related disorders.** *Hum Mol Genet* 23: 3641–3656, 2014. doi:10.1093/hmg/ddu073.

Graja, A., & Schulz, T. J. (2015). **Mechanisms of aging-related impairment of brown adipocyte development and function.** *Gerontology*, 61(3), 211-217.

Greco, E. A., Pietschmann, P., & Migliaccio, S. (2019). **Osteoporosis and sarcopenia increase frailty syndrome in the elderly.** *Frontiers in endocrinology*, 10, 255.

Gupte AA, Bomhoff GL, Swerdlow RH, Geiger PC. **Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet.** *Diabetes* 2009;58:567-578. <https://doi.org/10.2337/db08-1070>

Gupte AA, Bomhoff GL, Touchberry CD, Geiger PC. **Acute heat treatment improves insulin-stimulated glucose uptake in aged skeletal muscle.** *J Appl Physiol* 2011;110:451-457. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00849.2010>

Gutsmann-Conrad A, Heydari AR, You S, Richardson A. **The expression of heat shock protein 70 decreases with cellular senescence in vitro and in cells derived from young and old human subjects.** *Exp Cell Res* 241: 404–413, 1998. doi:10.1006/excr.1998.4069. H421-H429.

Hargitai J, Lewis H, Boros I, Rácz T, Fiser A, Kurucz I, Benjamin I, Víggh L, Péntzes Z, Csermely P et al. **Bimoclolmol, a heat shock protein co-inducer, acts by the prolonged activation of heat shock factor-1.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003;307:689-695.

Hayflick L, Moorhead PS. **The serial cultivation of human diploid cell strains.** *Exp Cell Res.*1961;25:585–621.

Heine, P. A., Taylor, J. A., Iwamoto, G. A., Lubahn, D. B., & Cooke, P. S. (2000). **Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(23), 12729-12734.

Hellsten, Y. (2019). **Oestrogen, exercise and vascular function.** *The Journal of physiology*, 597(19), 4871-4871.

Hess, R., Thurston, R.C., Hays, R.D., Chang, C.-C., Dillon, S.N., Ness, R.B., Bryce, C.L., Kapoor, W.N., and Matthews, K.A. (2012). **The impact of menopause on health-related quality of life: results from the STRIDE longitudinal study.** *Qual. Life Res.* 21, 535–544.

Hodis HN, Mack WJ, Henderson VW, Shoupe D, Budoff MJ, Hwang-Levine J, Li Y, Feng M, Dustin L, Kono N et al. **Vascular Effects of Early versus Late Postmenopausal Treatment with Estradiol.** *N Engl J Med* 2016;374:1221-1231. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1505241>

Hosszu, A., Antal, Z., Veres-Szekely, A., Lenart, L., Balogh, D. B. Szkibinszkij, E., ... & Fekete, A. (2018). **The role of Sigma-1 receptor in sex-specific heat shock response in an experimental rat model of renal ischaemia/reperfusion injury.** *Transplant International*, 31(11), 1268-1278.

Hwang, H. V., Lin, Y., Rebuffatti, M. N., Tran, D. T., Lee, L., Gomes, A. V., ... & Knowlton, A. A. (2019). **Impaired proteostasis in senescent vascular endothelial cells: a perspective on estrogen and oxidative stress in the aging vasculature.** *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 316(2),

I.B. Meeuwsen, M.M. Samson, H.J. Verhaar, **Evaluation of the applicability of HRT as a preservative of muscle strength in women,** *Maturitas* 36 (1) (2000) 49 –61.

Ianaro A, Maffia P, Cuzzocrea S, Mazzon E, Santoro MG, Di Rosa M, Ialenti A. **2-Cyclopenten-1-one and prostaglandin J2 reduce restenosis after balloon angioplasty in rats: role of NF- κ B.** *FEBS Lett* 2003;553:21-27.

Imanishi T, Kobayashi K, Hano T, Nishio I. **Effect of estrogen on differentiation and senescence in endothelial progenitor cells derived from bone marrow in spontaneously hypertensive rats.** *Hypertens Res* 2005;28:763-772.

Jolly C, Morimoto RI. **Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death.** *J Natl Cancer Inst* 92: 1564–1572, 2000. doi:10.1093/jnci/92.19.1564.

Jones, H., Bailey, T. G., Barr, D. A., France, M., Lucas, R. A., Crandall, C. G., & Low, D. A. (2019). **Is core temperature the trigger of a menopausal hot flush?** *Menopause*, 26(9), 1016-1023.

Jubrias SA, Odderson IR, Esselman PC, Conley KE. **Decline in isokinetic force with age: muscle cross-sectional area and specific force.** *Pflugers Arch* 1997;434(3):246–53.

Kalyani, R. R., Franco, M., Dobs, A. S., Ouyang, P., Vaidya, D., Bertoni, A., ... & Golden, S. H. (2009). **The association of endogenous sex hormones, adiposity, and insulin resistance with incident diabetes in postmenopausal women.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(11), 4127-4135.

Kamada, Y., Kiso, S., Yoshida, Y., Chatani, N., Kizu, T., Hamano, M., ... & Takehara, T. (2011). **Estrogen deficiency worsens steatohepatitis in mice fed high-fat and high-cholesterol diet.** *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 301(6), G1031-G1043.

Kamei, Y., Suzuki, M., Miyazaki, H., Tsuboyama-Kasaoka, N., Wu, J., Ishimi, Y., & Ezaki, O. (2005). **Ovariectomy in mice decreases lipid metabolism-related gene expression in adipose tissue and skeletal muscle with increased body fat.** *Journal of nutritional science and vitaminology*, 51(2), 110-117.

Kanasi, E., Ayilavarapu, S., & Jones, J. (2016). **The aging population: demographics and the biology of aging.** *Periodontology 2000*, 72(1), 13-18.

Karpe PA, Tikoo K. **Heat shock prevents insulin resistance-induced vascular complications by augmenting angiotensin-(1-7) signaling.** *Diabetes* 2014; 63:1124-1139. <https://doi.org/10.2337/db13-1267>

Kaszubowska, L., Foerster, J., Kaczor, J. J., Schetz, D., Ślebioda, T. J., & Kmieć, Z. (2017). **Expression of cellular protective proteins SIRT1, HSP70 and SOD2 correlates with age and is significantly higher in NK cells of the oldest seniors.** *Immunity & Ageing*, 14(1), 1-13.

Kennedy, A., Gettys, T. W., Watson, P., Wallace, P., Ganaway, E., Pan, Q. I. N., & Garvey, W. T. (1997). **The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity, and energy expenditure.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(4), 1293-1300.

Kenny, G. P., Notley, S. R., & Gagnon, D. (2017). **Direct calorimetry: a brief historical review of its use in the study of human metabolism and thermoregulation.** *European journal of applied physiology*, 117(9), 1765-1785.

Khadiolkar, S. S. (2019). **Musculoskeletal disorders and menopause.** *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, 69(2), 99-103.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) **Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research.** PLoS Biol 8(6): e1000412. doi: 10.1371/ journal.pbio.1000412

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;11:617-627. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00827.x>

Kireev RA, et al. **Melatonin and oestrogen treatments were able to improve neuroinflammation and apoptotic processes in dentate gyrus of old ovariectomized female rats.** Age (Dordr). 2014;36(5):9707.

Knowlton AA, Sun L. **Heat-shock factor-1, steroid hormones, and regulation of heat-shock protein expression in the heart.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 280: H455.

Kokura S, Adachi S, Manabe E, Mizushima K, Hattori T, Okuda T, Nakabe N, Handa O, Takagi T, Naito Y, Yoshida N, Yoshikawa T. **Whole body hyperthermia improves obesity-induced insulin resistance in diabetic mice.** Int J Hyperthermia 2007;23:259-265.

Kostycki IM, Wildner G, Donato YH, Dos Santos AB, Beber LCC, Frizzo MN, Ludwig MS, Keane KN, Cruzat V, Rhoden CR, Heck TG. **Effects of High-Fat Diet on eHSP72 and Extra-to-Intracellular HSP70 Levels in Mice Submitted to Exercise under Exposure to Fine Particulate Matter.** J Diabetes Res. 2019 Jan 6;2019:4858740. <https://doi.org/10.1155/2019/4858740>

Krajewski-Hall, S. J., Blackmore, E. M., McMinn, J. R., & Rance, N. E. (2018). **Estradiol alters body temperature regulation in the female mouse.** *Temperature*, 5(1), 56-69.

Krüger, K., Reichel, T., & Zeilinger, C. (2019). **Role of heat shock proteins 70/90 in exercise physiology and exercise immunology and their diagnostic potential in sports.** *Journal of Applied Physiology*, 126(4), 916-927.

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; 51:1102-1109.

Kushner JA. **The role of aging upon β cell turnover.** J Clin Invest. 2013; 123 (3):990–995.

Le, G., Novotny, S. A., Mader, T. L., Greising, S. M., Chan, S. S., Kyba, M., ... & Warren, G. L. (2018). **A moderate oestradiol level enhances neutrophil number and activity in muscle after traumatic injury but strength recovery is accelerated.** *The Journal of physiology*, 596(19), 4665-4680.

Lee, M. O. **Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results.** *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 89, n. 1, p. 24-33, 1929.

Leite JSM, Cruzat VF, Krause MS, Homem de Bittencourt PI Jr. **Physiological regulation of the heat shock response by glutamine: implications for chronic low-grade inflammatory diseases in age-related conditions.** *Nutrire* 2016; 41:17. <https://doi.org/10.1186/s41110-016-0021-y>

Lissarassa, Y.P.S., Vincensi, C.F., Costa-Beber, L.C. *et al.* **Chronic heat treatment positively impacts metabolic profile of ovariectomized rats: association with heat shock response pathways.** *Cell Stress and Chaperones* 25, 467–479 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01087-z>

Lizcano, F., & Guzmán, G. (2014). **Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause.** *BioMed research international*, 2014.

Locke M. **Heat shock transcription factor activation and hsp72 accumulation in aged skeletal muscle.** *Cell Stress Chaperones* 5: 45–51, 2000. doi: 10.1379/1466-1268(2000)0050045:HSTFAA2.0.CO;2.

Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. **The hallmarks of aging.** *Cell* 2013; 153: 1194–1217.

Lovejoy, J. C. (2003). **The menopause and obesity.** *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 30(2), 317-325.

Lovejoy, J. C., Champagne, C. M., De Jonge, L., Xie, H., & Smith, S. R. (2008). **Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition.** *International journal of obesity*, 32(6), 949-958.

Lyon, M. S., & Milligan, C. (2019). **Extracellular heat shock proteins in neurodegenerative diseases: new perspectives.** *Neuroscience Letters*, 711, 134462.

Magni, S., Succurro, A., Skupin, A., & Ebenhöf, O. (2018). **Data-driven dynamical model indicates that the heat shock response in *Chlamydomonas reinhardtii* is tailored to handle natural temperature variation.** *Journal of the Royal Society Interface*, 15 (142), 20170965.

Malyshev, I. (2013). **The functions of HSP70 in normal cells.** In *Immunity, tumors and aging: The role of HSP70* (pp. 15-29). Springer, Dordrecht.

Maloney, S. K., Fuller, A., Mitchell, D., Gordon, C., & Overton, J. M. (2014). **Translating animal model research: does it matter that our rodents are cold?** *Physiology*, 29(6), 413-420.

Manini T, Clark B. **Dynapenia and Aging: an Update.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012; 67A (1):28–40.

Marui, S., Masuda, Y., Kato, I., & Nagashima, K. (2020). **Influence of exogenous and endogenous estrogen on thermoregulatory responses to mild heat and the interaction with light and dark phases.** *The Journal of Physiological Sciences*, 70 (1), 1-13.

McCarthy, M., & Raval, A. P. (2020). **The peri-menopause in a woman's life: a systemic inflammatory phase that enables later neurodegenerative disease.** *Journal of neuroinflammation*, 17(1), 1-14.

McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., & Bennett, S. A. (2012). **Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification.** *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (67), e4389.

Mehta, J. M., Chester, R. C., & Kling, J. M. (2019). **The timing hypothesis: hormone therapy for treating symptomatic women during menopause and its relationship to cardiovascular disease.** *Journal of Women's Health*, 28 (5), 705-711.

Messier, V., Rabasa-Lhoret, R., Barbat-Artigas, S., Elisha, B., Karelis, A. D., & Aubertin-Leheudre, M. (2011). **Menopause and sarcopenia: a potential role for sex hormones.** *Maturitas*, 68(4), 331-336.

Mihm, M., Gangooly, S., & Muttukrishna, S. **The normal menstrual cycle in women.** *Animal reproduction science*. 124, 229-236 (2011).

Miller AP, Xing D, Feng W, Fintel M, Chen YF, Oparil S. **Aged rats lose vasoprotective and anti-inflammatory actions of estrogen in injured arteries.** *Menopause* 2007; 14:251-260.

Min, Q. Q., Qin, L. Q., Sun, Z. Z., Zuo, W. T., Zhao, L., & Xu, J. Y. (2018). **Effects of metformin combined with lactoferrin on lipid accumulation and metabolism in mice fed with high-fat diet.** *Nutrients*, 10(11), 1628.

Miragem, A. A., Ludwig, M. S., Heck, T. G., Baldissera, F. G., Dos Santos, A. B., Frizzo, M. N., & Homem de Bittencourt, P. I. (2015). **Estrogen deprivation does not affect vascular heat shock response in female rats: a comparison with oxidative stress markers.** *Molecular and cellular biochemistry*, 407(1), 239-249.

Miragem AA, Homem de Bittencourt PI Jr. **Nitric oxide-heat shock protein axis in menopausal hot flushes: neglected metabolic issues of chronic inflammatory diseases associated with deranged heat shock response.** *Hum Reprod Update*. 2017 Sep 1; 23(5):600-628. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx020>

Modi, M., & Dhillon, W. S. (2019). **Neurokinin 3 receptor antagonism: a novel treatment for menopausal hot flushes.** *Neuroendocrinology*, 109 (3), 242-248.

Modi, M., & Dhillon, W. S. (2019, May). **Neurokinin B and neurokinin-3 receptor signaling: promising developments in the management of menopausal hot**

flushes. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 37, No. 03, pp. 125-130). Thieme Medical Publishers.

Moiseeva O, Deschênes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, Bourdeau V, Pollak MN, Ferbeyre G. **Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation.** *Aging Cell* 2013;12:489-498. <https://doi.org/10.1111/accel.12075>

Montecino-Rodriguez E, Berent-Maoz B, Dorshkind K. **Causes, consequences, and reversal of immune system aging.** *J Clin Invest.* 2013; 123(3):958–965.

Monteleone, P., Mascagni, G., Giannini, A., Genazzani, A. R., & Simoncini, T. (2018). **Symptoms of menopause—global prevalence, physiology and implications.** *Nature Reviews Endocrinology*, 14(4), 199-215.

Moore AM, Prescott M, Campbell RE. **Estradiol negative and positive feedback in a prenatal androgen-induced mouse model of polycystic ovarian syndrome.** *Endocrinology* 2013; 154(2):796–806. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1954>

Moore, A. M., Coolen, L. M., & Lehman, M. N. (2019). **Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin (KNDy) cells as integrators of diverse internal and external cues: evidence from viral-based monosynaptic tract-tracing in mice.** *Scientific reports*, 9(1), 1-15.

Morano KA, Thiele DJ. **Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals.** *Gene Expr* 1999; 7: 271

Morrison, S. F., & Nakamura, K. (2019). **Central mechanisms for thermoregulation.** *Annual review of physiology*, 81, 285-308.

Mulyani, W. R. W., Sanjiwani, M. I. D., Sandra, I., Lestari, A. A. W., Wihandani, D. M., Suastika, K., ... & Manuaba, I. B. A. P. (2020). **Chaperone-based therapeutic target innovation: Heat shock protein 70 (HSP70) for Type 2 diabetes mellitus.** *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 13, 559.

Nakamura K, Morrison SF. **A thermosensory pathway mediating heat-defence responses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 8848-8853. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913358107>

Nakamura K. **Central circuitries for body temperature regulation and fever.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;301:R1207-R1228. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00109.2011>

Nácul, A. P., Andrade, C. D., Schwarz, P., de Bittencourt Jr, P. H., & Spritzer, P. M. (2007). **Nitric oxide and fibrinogen in polycystic ovary syndrome: associations with insulin resistance and obesity.** *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 133(2), 191-196.

Newgard, C. B., & Sharpless, N. E. (2013). **Coming of age: molecular drivers of aging and therapeutic opportunities.** *The Journal of clinical investigation*, 123(3), 946-950.

Newsholme P and Homem de Bittencourt PI Jr. **Gut associated bacteria are critical to metabolism, inflammation and health.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2016;19:245-249. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000293>

Newsholme, P. and de Bittencourt, Jr, P. I. (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 CrossRef PubMed.

Newsholme, P. and Krause, M. (2014) **Diet, obesity, and reactive oxygen species – implications for diabetes and aging.** *Systems Biol. Free Radicals Antioxid.* 1, 13.

NICE guideline (NG23) 2015. **Menopause: diagnosis and management.** (www.nice.org.uk/guidance/NG23)

Nordling, L. (2022). **Why menopause matters in the academic workplace.** *Nature*, 605(7909), 381-384.

Novella, S., Pérez-Cremades, D., Mompeón, A., & Hermenegildo, C. (2019). **Mechanisms underlying the influence of oestrogen on cardiovascular physiology in women.** *The Journal of physiology*, 597(19), 4873-4886.

OECD. **OECD Employment Outlook 2021: Navigating the COVID-19 Crisis and Recovery**; OECD Publishing: Paris, France, 2021. [CrossRef]

Oliveira, M. A., Lima, W. G., Schettini, D. A., Tilelli, C. Q., & Chaves, V. E. (2019). **Is calcitonin gene-related peptide a modulator of menopausal vasomotor symptoms?** *Endocrine*, 63(2), 193-203.

Oubaha, M., Miloudi, K., Dejda, A., Guber, V., Mawambo, G., Germain, M. A., ... & Sapiéha, P. (2016). **Senescence-associated secretory phenotype contributes to pathological angiogenesis in retinopathy.** *Science translational medicine*, 8(362), 362ra144-362ra144.

P.H. Ronkainen, et al., **Postmenopausal hormone replacement therapy modifies skeletal muscle composition and function: a study with monozygotic twin pairs,** *J Appl Physiol (1985)* 107 (1) (2009) 25 –33.

Padilla, S. L., Johnson, C. W., Barker, F. D., Patterson, M. A., & Palmiter, R. D. (2018). **A neural circuit underlying the generation of hot flashes.** *Cell reports*, 24(2), 271-277.

Palmer AK, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Chini EN, Xu M, Kirkland JL. **Cellular Senescence in Type 2 Diabetes: A Therapeutic Opportunity.** *Diabetes* 2015;64:2289-2298. <https://doi.org/10.2337/db14-1820>

Parkening, T.A., Collins, T.J., & Smith, E.R. **Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle.** *Neurobiology of aging*, **3**, 31-35 (1982).

Pfeilschifter J, et al. **Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause.** *Endocr Rev*. 2002;23(1):90–119.

Prague, J. K., & Dhillon, W. S. (2017). **Neurokinin 3 receptor antagonism—the magic bullet for hot flushes?.** *Climacteric*, **20**(6), 505-509.

Prague, J. K., Roberts, R. E., Comninou, A. N., Clarke, S., Jayasena, C. N., Mohideen, P., ... & Dhillon, W. S. (2018). **Neurokinin 3 receptor antagonism rapidly improves vasomotor symptoms with sustained duration of action.** *Menopause (New York, NY)*, **25**(8), 862.

Prague, J. K., Roberts, R. E., Comninou, A. N., Clarke, S., Jayasena, C. N., Nash, Z., ... & Dhillon, W. S. (2017). **Neurokinin 3 receptor antagonism as a novel treatment for menopausal hot flushes: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial.** *The Lancet*, **389**(10081), 1809-1820.

Prague, J. K., Voliotis, M., Clarke, S., Comninou, A. N., Abbara, A., Jayasena, C. N., ... & Dhillon, W. S. (2019). **Determining the relationship between hot flushes and LH Pulses in menopausal women using mathematical modeling.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **104**(9), 3628-3636.

Qu, H., Donkin, S. S., & Ajuwon, K. M. (2015). **Heat stress enhances adipogenic differentiation of subcutaneous fat depot-derived porcine stromovascular cells.** *Journal of animal science*, **93**(8), 3832-3842.

Qu, H., & Ajuwon, K. M. (2018). **Metabolomics of heat stress response in pig adipose tissue reveals alteration of phospholipid and fatty acid composition during heat stress.** *Journal of animal science*, **96**(8), 3184-3195.

Rance NE, Dacks PA, Mittelman-Smith MA, Romanovsky AA, Krajewski-Hall SJ. **Modulation of body temperature and LH secretion by hypothalamic KNDy kisspeptin, neurokinin B and dynorphin) neurons: a novel hypothesis on the mechanism of hot flushes.** *Front Neuroendocrinol* 2013;34;211-227. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.07.003>

Rannevik G, et al. **A longitudinal study of the perimenopausal transition: altered profiles of steroid and pituitary hormones, SHBG and bone mineral density.** *Maturitas*. 1995;21(2):103– 13.

Riach, K., & Jack, G. (2021). **Women's health in/and work: menopause as an intersectional experience.** *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **18**(20), 10793.

Ribeiro Filho, F. F., Mariosa, L. S., Ferreira, S. R., & Zanella, M. T. (2006). **Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação.** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, **50**, 230-238.

Rodrigues-Krause JC, Krause M, O'Hagan C, De Vito G, Boreham C, Murphy C, Newsholme P, Colleran G. **Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter?** *Cell Stress Chaperones* 2012;17;293-302. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0319-x>

Roland AV, Moenter SM. **Prenatal androgenization of female mice programs an increase in firing activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons that is reversed by metformin treatment in adulthood.** *Endocrinology* 2011;152(2):618–28. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0823>

Roland AV, Nunemaker CS, Keller SR, Moenter SM. **Prenatal androgen exposure programs metabolic dysfunction in female mice.** *J Endocrinol* 2010;207(2): 213–23. <https://doi.org/10.1677/JOE-10-0217>

Rolland YM, Perry 3rd HM, Patrick P, Banks WA, Morley JE. **Loss of appendicular muscle mass and loss of muscle strength in young postmenopausal women.** *J Gerontol A: Biol Sci Med Sci* 2007;62(3):330–5.

Romanovsky, A. A. (2018). **The thermoregulation system and how it works.** *Handbook of clinical neurology*, 156, 3-43.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, et al. **Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial.** *JAMA* 2002;288;321-333.

Rossouw, J. E., Manson, J. E., Kaunitz, A. M., & Anderson, G. L. (2013). **Lessons learned from the Women's Health Initiative trials of menopausal hormone therapy.** *Obstetrics and gynecology*, 121(1), 172.

S.V. Koebele, H.A. Bimonte-Nelson, **Modeling menopause: the utility of rodents in translational behavioral endocrinology research,** *Maturitas* 87 (2016) 5 –17.

Sabbah, N. A., Rezk, N. A., & Saad, M. S. (2019). **Relationship between heat shock protein expression and obesity with and without metabolic syndrome.** *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 23(10), 737-743.

Saengboonmee C, Seubwai W, Cha'on U, Sawanyawisuth K, Wongkham S, Wongkham C. **Metformin Exerts Antiproliferative and Anti-metastatic Effects Against Cholangiocarcinoma Cells by Targeting STAT3 and NF-κB.** *Anticancer Res* 2017;37;115-123.

Saha, J. K., Xia, J., Grondin, J. M., Engle, S. K., & Jakubowski, J. A. (2005). **Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models.** *Experimental Biology and Medicine*, 230(10), 777-784.

Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. **Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes.** *Aging (Albany NY)* 2012; 4: 166–175.

Sánchez-Rodríguez, M. A., Zacarías-Flores, M., Arronte-Rosales, A., Correa-Muñoz, E., & Mendoza-Núñez, V. M. (2012). **Menopause as risk factor for oxidative stress.** *Menopause*, 19(3), 361-367.

Sander, V.A., Facorro, G.B., Piehl, L., Rubin de Celis, E., & Motta, A.B. **Effect of DHEA and metformin on corpus luteum in mice.** *Reproduction*. **138**, 571-579 (2009).

Sapra G, Tham YK, Cemerlang N, Matsumoto A, Kiriazis H, Bernardo BC, Henstridge DC, Ooi JY, Pretorius L, Boey EJ et al. **The small-molecule BGP-15 protects against heart failure and atrial fibrillation in mice.** *Nat Commun* 2014;5; 5705. <https://doi.org/10.1038/ncomms6705>

Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, Oberg AL, Birch J, Salmonowicz H, Zhu Y, et al. **Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease.** *Nat Commun* 2017;8; 14532. <https://doi.org/10.1038/ncomms14532>

Schimidt, T. C. G. **Envelhecimento do Sistema Reprodutor: Morfologia Tecidual e Citológica em Camundongos C57BL/6 Fêmeas.**

Sharma N, et al. **Association of periodontal inflammation, systemic inflammation, and duration of menopausal years in postmenopausal women.** *Quintessence Int.* 2018; 49(2):123–31.

Sibonga, J. D., Lotinun, S., Evans, G. L., Pribluda, V. S., Green, S. J., & Turner, R. T. (2003). **Dose-response effects of 2-methoxyestradiol on estrogen target tissues in the ovariectomized rat.** *Endocrinology*, 144(3), 785-792.

Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Luger TA, Jäättelä M, Schwarz T. **Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release.** *J Clin Invest* 95: 926–933, 1995. doi: 10.1172/JCI117800.

Skorupskaite K, George JT, Anderson RA. **The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease.** *Hum Reprod Update* 2014;20; 485-500. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu009>

Skorupskaite, K., George, J. T., Veldhuis, J. D., Millar, R. P., & Anderson, R. A. (2018). **Neurokinin 3 receptor antagonism reveals roles for neurokinin B in the regulation of gonadotropin secretion and hot flashes in postmenopausal women.** *Neuroendocrinology*, 106(2), 148-157.

Somani, Y. B., Pawelczyk, J. A., De Souza, M. J., Kris-Etherton, P. M., & Proctor, D. N. (2019). **Aging women and their endothelium: probing the relative role of estrogen on vasodilator function.** *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 317(2), H395-H404.

Söti C, Csermely P. **Chaperones come of age.** *Cell Stress Chaperones* 7: 186–190, 2002.

Spangenburg, E. E., & Jackson, K. C. (2013). **The contribution of ovarian hormones to the cellular regulation of lipid metabolism.** In *Integrative Biology of Women's Health* (pp. 53-66). Springer, New York, NY.

Stampfer MJ, Colditz GA. **Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence.** *Prev Med* 20: 47–63, 1991. doi:10.1016/0091-7435(91)90006-P.

Stefano, G. B., Esch, T., & Kream, R. M. (2019). **Behaviorally-mediated entrainment of whole-body metabolic processes: Conservation and evolutionary development of mitochondrial respiratory complexes.** *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 25, 9306.

Stepito NK, Cassar S, Joham AE, Hutchison SK, Harrison CL, Goldstein RF, Teede HJ. **Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulaemic clamp.** *Hum Reprod* 2013;28;777-784. <https://doi.org/10.1093/humrep/des463>

Stice JP, Chen L, Kim SC, Jung JS, Tran AL, Liu TT, Knowlton AA. **17 β -Estradiol, aging, inflammation, and the stress response in the female heart.** *Endocrinology* 2011;152;1589-1598. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0627>

Stice JP, Lee JS, Pechenino AS, Knowlton AA. **Estrogen, aging and the cardiovascular system.** *Future Cardiol* 2009;5;93-103. <https://doi.org/10.2217/14796678.5.1.93>

Stout MB, Steyn FJ, Jurczak MJ, Camporez JG, Zhu Y, Hawse JR, Jurk D, Palmer AK, Xu M, Pirtskhalava T, et al. **17 α -Estradiol Alleviates Age-related Metabolic and Inflammatory Dysfunction in Male Mice Without Inducing Feminization.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2017;72;3-15.

Sturdee, D. W., Hunter, M. S., Maki, P. M., Gupta, P., Sassarini, J., Stevenson, J. C., & Lumsden, M. A. (2017). **The menopausal hot flush: a review.** *Climacteric*, 20(4), 296-305.

Sullivan SD, Moenter SM. **Prenatal androgens alter GABAergic drive to gonadotropin-releasing hormone neurons: implications for a common fertility disorder.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(18):7129–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308058101>

Sun, F., Zuo, Y. Z., Ge, J., Xia, J., Li, X. N., Lin, J., ... & Li, J. L. (2018). **Transport stress induces heart damage in newly hatched chicks via blocking the**

cytoprotective heat shock response and augmenting nitric oxide production. *Poultry science*, 97(8), 2638-2646.

Szeliga, A., Czyzyk, A., Podfigurna, A., Genazzani, A. R., Genazzani, A. D., & Meczekalski, B. (2018). **The role of kisspeptin/neurokinin B/dynorphin neurons in pathomechanism of vasomotor symptoms in postmenopausal women: from physiology to potential therapeutic applications.** *Gynecological Endocrinology*, 34(11), 913-919.

Takii, R., Fujimoto, M., Matsuura, Y., Wu, F., Oshibe, N., Takaki, E., ... & Nakai, A. (2017). **HSF1 and HSF3 cooperatively regulate the heat shock response in lizards.** *PLoS One*, 12(7), e0180776.

Tan, C. L., & Knight, Z. A. (2018). **Regulation of body temperature by the nervous system.** *Neuron*, 98(1), 31-48.

Tchkonia T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scrable H, Khosla S, Jensen MD, Kirkland JL. **Fat tissue, aging, and cellular senescence.** *Aging Cell* 2010;9:667-684. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00608.x>

Tchkonia T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. **Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities.** *J Clin Invest* 2013;123:966-972. <https://doi.org/0.1172/JCI64098>

Tilly, J.; O'Leary, J.; Russell, G. **Older Women Matter: Harnessing the Talents of Australia's Older Female Workforce**; Diversity Council Australia: Sydney, Australia, 2013.

Tytell M, Hooper PL. **Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies.** *Expert Opin Ther Targets* 2001;5:267-287.

Van Der Lee, S. & Boot, L.M. **Spontaneous pseudopregnancy in mice.** *Acta physiologica et pharmacologica Neerlandica*. 4, 442-444 (1955)

Van Der Lee, S. & Boot, L.M. **Spontaneous pseudopregnancy in mice. II.** *Acta physiologica et pharmacologica Neerlandica*. 5, 213-215 (1956).

van Why SK, Kim S, Geibel J, Seebach FA, Kashgarian M, Siegel NJ. **Thresholds for cellular disruption and activation of the stress response in renal epithelia.** *Am J Physiol* 1999; 277: F227.

Walmer, D. K., Wrona, M. A., Hughes, C. L., & Nelson, K. G. (1992). **Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone.** *Endocrinology*, 131(3), 1458-1466.

Wang J, He H, Yu L, Xia HH, Lin MCM, Gu Q, Li M, Zou B, An X, Jiang B, Kung H-F, Wong BCY. **HSF1 down-regulates XAF1 through transcriptional regulation.** *J Biol Chem* 281: 2451–2459, 2006. doi:10. 1074/jbc.M505890200.

Wang, H., Alencar, A., Lin, M., Sun, X., Sudo, R. T., Zapata-Sudo, G., ... & Groban, L. (2016). **Activation of GPR30 improves exercise capacity and skeletal muscle strength in senescent female Fischer344x Brown Norway rats.** *Biochemical and biophysical research communications*, 475(1), 81-86.

Wang, T. A., Teo, C. F., Åkerblom, M., Chen, C., Tynan-La Fontaine, M., Greiner, V. J., ... & Jan, L. Y. (2019). **Thermoregulation via temperature-dependent PGD2 production in mouse preoptic area.** *Neuron*, 103(2), 309-322.

Whitehouse, L. M., McDougall, C. S., Stefanovic, D. I., Boreham, D. R., Somers, C. M., Wilson, J. Y., & Manzon, R. G. (2017). **Development of the embryonic heat shock response and the impact of repeated thermal stress in early stage lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) embryos.** *Journal of Thermal Biology*, 69, 294-301.

Whitmer RA, Quesenberry CP, Zhou J, Yaffe K. **Timing of hormone therapy and dementia: the critical window theory revisited.** *Ann Neurol* 2011;69;163-169. <https://doi.org/10.1002/ana.22239>

Whitten, W.K. **Occurrence of anoestrus in mice caged in groups.** *The Journal of endocrinology*. 18, 102-107 (1959).

Wilhelms DB, Dock H, Brito HO, Pettersson E, Stojakovic A, Zajdel J, Engblom D, Theodorsson E, Hammar ML and Spetz Holm A-CE (2019) **CGRP Is Critical for Hot Flushes in Ovariectomized Mice.** *Front. Pharmacol.* 9:1452. doi: 10.3389/fphar.2018.01452

Wolever, T. M. **The glycaemic index: a physiological classification of dietary carbohydrate.** Cabi, 2006. 1845930517.

World Health Organization. (2020). **Decade of healthy ageing: baseline report.** World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/338677>. Licença: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>

Yang, W. Z., Du, X., Zhang, W., Gao, C., Xie, H., Xiao, Y., ... & Shen, W. L. (2020). **Parabrachial neuron types categorically encode thermoregulation variables during heat defense.** *Science advances*, 6 (36), eabb9414.

Yuste JE, Tarragon E, Campuzano CM, Ros-Bernal F (2015) **Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases.** *Front Cell Neurosci* 9:322

Z. Paroo, E.S. Dipchand, E.G. Noble, **Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle,** *Am J Physiol Cell Physiol* 282 (2) (2002) C245 – C251.

Z. Paroo, P.M. Tiidus, E.G. Noble, **Estrogen attenuates HSP 72 expression in acutely exercised male rodents,** *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 80 (3) (1999) 180 –184.

Zacker RJ. **Health-related implications and management of sarcopenia.** *JAAPA.* 2006;19(10):24–9.

Zhang, S., Osumi, H., Uchizawa, A., Hamada, H., Park, I., Suzuki, Y., ... & Tokuyama, K. (2020). **Changes in sleeping energy metabolism and thermoregulation during menstrual cycle.** *Physiological reports*, 8(2), e14353.

Zilberman, J. M. (2018). **Menopausia: Hipertension arterial y enfermedad vascular.** *Hipertensión y riesgo vascular*, 35(2), 77-83.

Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R. **Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1.** *Cell* 94: 471–480, 1998. doi:10.1016/S0092-8674(00)81588-3.