RENATA DOS SANTOS SILVA

Insulina e captação de glicose em corpo lúteo canino

São Paulo
2012

RENATA DOS SANTOS SILVA

Insulina e captação de glicose em corpo lúteo canino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa

São Paulo
2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2590
FMVZ

Silva, Renata dos Santos
Insulina e captação de glicose no corpo lúteo canino / Renata dos Santos Silva. -- 2012.
105 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa.

1. Cadelas. 2. Diestro. 3. Corpo lúteo. 4. Insulina. 5. Captação de glicose. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Insulina e captação de glicose em corpo lúteo canino", protocolado sob o nº 2080/2010, utilizando 24 (vinte e quatro) cães, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Insulin and glucose uptake in canine corpus luteum", protocol number 2080/2010, utilizing 24 (twenty four) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 10 de maio de 2012.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Renata dos Santos

Título: Insulina e captação de glicose em corpo lúteo canino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ___ / ___ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

“Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. Você pode apenas ir em frente. O rio precisa se arriscar e entrar no oceano. E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece. Porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas torna-se oceano.”

Osho

Dedicatória

À minha irmã **Adriana dos Santos Silva**, que sempre esteve ao meu lado em todas as etapas desta trajetória, me incentivando e apoiando em todos os momentos da minha vida. Obrigada pelo exemplo de honestidade, paciência, carinho e amor incondicional. Sem você nada disso teria sido possível. Palavras são pouco para agradecer.

Amo você. Obrigada por tudo.

Agradecimento especial

À minha orientadora, **Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa** que me mostrou um novo caminho na vida científica, me guiando nesta nova etapa cheia de obstáculos, com competência e dedicação. Agradeço por me receber em seu laboratório com carinho e atenção e por me proporcionar grande enriquecimento profissional e pessoal. Obrigada pelos ensinamentos, conhecimentos, orientação, dedicação, confiança e paciência a mim dispensados. Agradeço ainda, pelo exemplo de profissionalismo demostrado a cada dia. Palavras são pouco para agradecer minha profunda admiração, gratidão e respeito.

Muito obrigada

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por proporcionar infraestrutura de qualidade para um desenvolvimento científico e profissional adequado.

Aos professores, Dra. Maria Angélica Miglino, Dr. José Roberto Kfoury Jr, Dr. Francisco Javier Hernandez-Blazquez, por terem disponibilizado seus laboratórios imprescindíveis para a execução dos experimentos.

À Luciana Alves de Fátima e Liza Margareth M. C. Sousa, que sempre estiveram dispostas a me auxiliar na aprendizagem de novas técnicas. Agradeço a paciência durante todas as fases deste trabalho.

À Vanessa Uemura da Fonseca, muitíssimo obrigada, não apenas pela fundamental ajuda em todas as etapas desse trabalho, mas acima de tudo, pela companhia, pela paciência, pelos momentos agradáveis de convivência e amizade.

Ao amigo Valdir Pavanelo Jr., pela ajuda em vários momentos desta jornada. Aos colegas Giuliano Gustavo Lesnau, Nathia Rigoglio, Juliana Ferrão e Antenor Bonfim, que fizeram e fazem parte desta conquista direta ou indiretamente.

À Sonia Elisabete Will, pela indicação e estímulo para integrar a pós-graduação no setor de Anatomia e pela amizade.

Aos alunos de Iniciação Científica do LEME, Garros Fontinhas, Felipe Juscele e Jaqueline Yaeko, pela convivência durante este período.

Ao Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado, pela colaboração, permitindo a realização do experimento em seu laboratório, levando para outros rumos este trabalho.

À Ana Bárbara T. Alves-Wagner, pelo auxílio, desenvolvimento e paciência no experimento de captação de glicose.

À Profa. Dra. Danila Barreiro Campos, pelos conselhos e dicas para um melhor andamento desta pesquisa.

Aos funcionários do Setor de Anatomia, Jaqueline Santana e Maicon Barbosa, pela simpatia e auxílio durante todo este período.

Aos técnicos, Ronaldo Agostinho, Edinaldo Farias (Índio) e Diogo Palermo, pela disponibilidade durante a realização dos experimentos, me auxiliando quando necessário.

Aos meus professores de Graduação do Centro Universitário FIEO, pelos ensinamentos e momentos importantes para o início de minha formação Universitária.

Aos amigos do Instituto Butantan que fizeram parte desta história, obrigada pela amizade, paciência, dicas e conselhos durante todo este tempo.

À Dra. Ivana Carvalho por permitir nossa entrada em seus mutirões de castração, e a todos os proprietários das cadelas que disponibilizaram o material para nossos experimentos.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, com os quais compartilhei novas experiências e conhecimentos.

A todos vocês, muito obrigada!

RESUMO

SILVA, R.S. **Insulina e captação de glicose em corpo lúteo canino**. [Insulin and glucose uptake in canine corpus luteum]. 2012. 105 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O diestro é a fase luteínica na cadela caracterizada pelo aumento de progesterona (P4) sérica na primeira metade e por flutuações de 17β-estradiol (E2) na segunda metade. O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina temporária, que passa por um processo de desenvolvimento, manutenção e regressão, atingindo atividade secretória plena quando sua formação está completa. A insulina é o hormônio anabólico essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular, sendo secretado pelas células β pancreáticas. A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor de membrana específico, o que desencadeia uma série de ações metabólicas. Sabe-se que uma das consequências desta ligação é a translocação de transportadores de glicose 4 (GLUT4; gene *SLC2A4*) para que ocorra a captação de glicose. Nosso grupo demonstrou a expressão de GLUT4 no corpo lúteo de cadelas, expressão esta regulada diferencialmente ao longo do diestro. A presença deste transportador levou-nos a hipotetizar que a insulina seja importante para regulação da função luteínica. Para testar tal hipótese, utilizamos imuno-histoquímica para localizar o receptor de insulina (RI) e outros fatores regulatórios (NFKB e IL6) de GLUT4 no CL canino durante o diestro (dias 10 a >70 pós-ovulação, po) e western blotting para quantificar estas proteínas; investigamos a expressão gênica dos fatores acima mencionados por PCR em tempo real; e por fim, analisamos os efeitos da insulina sobre a expressão gênica de *RI* e *SLC2A4* em células luteínicas nos dias 20 e 40 po e também sobre a captação de glicose destas células. No presente estudo, observou-se que o corpo lúteo canino expressa as proteínas do RI, NFKB e IL6 de maneira distinta ao longo do diestro. A expressão do RNAm do *RI* apresentou maior expressão nos dias 20 e 70, e diminuição no dia 40. O *NFKB* apresentou maior expressão no dia 40, enquanto o *IL6* apresentou maior expressão do dia 10 ao 40. Observou-se correlação negativa entre o gene *RI* e os níveis de insulina (r = -0,69; P = 0,006) e positiva com *SLC2A4* (r = 0,89; P = 0,01) em todo o diestro, enquanto o *IL6* correlacionou-se de maneira positiva com o *RI* apenas na primeira metade (r = 0,96; P <0,0001) e o *NFKB*, negativamente com o *RI* nos dias 30, 40 e 50 (r = -0,57 P <0,05). Após a adição de insulina no meio de cultivo, observou-se que as expressões gênicas de *RI* e *SLC2A4* se comportaram de maneira oposta de acordo com a fase do diestro estudada: células do dia 20 po apresentaram um aumento desta expressão e do dia 40 um declínio. Por fim, através da

captação de glicose, observou-se que as células luteínicas caninas são capazes de responder à insulina, aumentando a captação na ordem de 4 vezes (basal: 2,05 ± 0,8; insulina: 5,73 ± 0,5; valor de P <0,01 em cpm/ug proteína; basal: 79,6 ± 35,3; insulina: 212,5 ± 34,5, valor de P <0,05 em cpm/10^6 células). Esses resultados apontam a insulina, bem como o IL6 e o NFKB como fatores importantes que desempenham um papel na função do CL canino e trazem o CL para o grupo de tecidos que respondem ao estímulo insulínico aumentando a expressão de GLUT4 e consequentemente a captação de glicose. Além disso, estes eventos parecem sofrer controle adicional pelos hormônios esteróides.

Palavras-chave: Cadelas. Diestro. Corpo lúteo. Insulina. Captação de glicose

ABSTRACT

SILVA, R.S. **Insulin and glucose uptake in canine corpus luteum**. [Insulina e captação de glicose em corpo lúteo canino]. 2012. 105 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Diestrus is the luteal phase in dogs characterized by an increase in progesterone (P4) levels in the first half and fluctuations of 17β-estradiol (E2) in the second half. The corpus luteum (CL) is a temporary endocrine gland, which undergoes a process of development, maintenance and regression, reaching full secretory activity when its formation is complete. Insulin is an anabolic hormone essential for the maintenance of glucose homeostasis, cell growth and differentiation, and is secreted by pancreatic beta cells. Intracellular signaling of insulin begins with its binding to a specific membrane receptor, which triggers a series of metabolic actions. It is known that one consequence of this connection is the translocation of glucose transporters 4 (GLUT4; gene *SLC2A4*) for glucose uptake. Our group demonstrated the expression of GLUT4 in the canine corpus luteum in a time-related manner throughout diestrus. The presence of this transporter led us to hypothesize that insulin is important for the regulation of luteal function. To test this hypothesis, we used immunohistochemistry to detect the insulin receptor (IR) and possible regulatory factors (IL6 and NFKB) of GLUT4 in canine CL during diestrus (days 10 to > 70 after ovulation, po) and western blotting to quantify these proteins. In addition, we investigated the gene expression of the above mentioned factors by real-time PCR and analyzed the effects of insulin on *IR* and *SLC2A4* gene expression in canine luteal cells at days 20 and 40 po and also on glucose uptake by these cells. Canine CL differentialy expressed RI, NFKB and IL6 during diestrus. The *IR* expression was higher on days 20 and 70, with and decreased at day 40. *NFKB* expression was higher on day 40 and *IL6* increased on days 10 to 40 po. It was observed a negative correlation between *IR* expression and insulin levels ($r = -0.69$ $P = 0.006$) and positive with *SLC2A4* ($r = 0.89$, $P = 0.01$) throughout diestrus. *IR* was positively correlated with *IL6* only in the first half of diestrus ($r = 0.96$, $P < 0.0001$), while it was negatively correlated with NFKB on days 30, 40 and 50 ($r = -0.57$ $P < 0.05$). After insulin treatment, *RI* and *SLC2A4* expressions behave differently according to the diestrus phase: on day 20, they increased and on day 40 they declined. Finally, we could observe through glucose uptake method that canine luteal cells are able to respond to insulin stimuli, increasing glucose uptake by approximately four folds (basal: 2.05 ± 0.8; insulin: 5.73 ± 0.5 cpm / ug protein, $P < 0.01$; basal: 79.6 ± 35.3; insulin: 212.5 ± 34.5 cpm/10^6 cells, $P < 0.05$). These results point towards a regulatory function

exerted by insulin, IL6 and NFKB in the canine CL and place this organ among the insulin sensitive ones, which respond to insulin stimuli increasing GLUT4 expression and glucose uptake. Moreover, these events seems to undergo a further control by steroid hormones.

Keywords: Bitches. Diestrus. Corpus luteum. Insulin. Glucose uptake

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da placa de cultivo de 24 poços contendo os grupos experimentais estabelecidos: controle (C) e insulina (I) e os respectivos tempos de tratamento (0, 6 e 24 horas)..... 49

Figura 2 - Placa de cultivo esquematizada para procedimento de captação de glicose..... 51

Figura 3 - Concentrações séricas de progesterona (ng/ml; linha cinza escura) e 17β-estradiol (pg/ml; linha cinza claro) ao longo do diestro em cadelas. Maiores concentrações foram observadas no dia 20 po e 40 po para progesterona e 17β-estradiol, respectivamente..... 63

Figura 4 - Concentrações de glicose (mg/dl; esquerda) e de insulina (µU/ml; direita) ao longo do diestro em cadelas. 10 – 70: dias após a ovulação. * valores aumentados de insulinemia em relação às demais fases do diestro..... 63

Figura 5 - Cultivo primário de células luteínicas de cadelas. A – Células em processo de adesão à placa de petri após 24 h. B – Agrupamento de células luteínicas após 2-3 dias de cultivo. C – Monocamada confluente formada por células luteínicas após 5-7 dias. D – Fotomicrografia de células luteínicas caninas demonstrando o formato poligonal característico, grânulos e vacúolos de lipídeos (a) e núcleo (b). Letras A, B e C aumento 40x; D aumento 100x. Barras = 50 µm..... 64

Figura 6 - Expressão gênica do *RI* em células luteínicas caninas após tratamento com insulina. A: expressão gênica do *RI* no dia 20 após a ovulação. B: expressão gênica *RI* no dia 40 após a ovulação. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa ($p<0,05$)..... 65

Figura 7 - Expressão gênica do *SLC2A4* em células luteínicas caninas após tratamento com insulina. A: expressão gênica do *SLC2A4* no dia 20 após a ovulação. B: expressão gênica *SLC2A4* no dia 40 após a ovulação. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa ($p<0,05$)..... 66

Figura 8 - Expressão proteica de AKT total e AKT fosforilado antes e depois da adição de insulina às células luteínicas. A: Blot AKT total células luteínicas em condições basal e após adição de insulina. B: Blot AKT fosforilado em condição basal e após adição de insulina. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos..... 67

Figura 9 - Imunocitoquímica para GLUT4 (sinal positivo equivale a cor laranja e ou marrom) em células luteínicas estimuladas ou não pela insulina em experimento de captação de glicose. A: GLUT4 em células luteínicas sem adição de insulina. B: GLUT4 em células luteínias com adição de insulina. Insert: controle negativo. Barra 50µm..... 68

Figura 10 - Expressão de receptores de insulina em corpo lúteo de cadelas durante o diestro. Expressão relativa do gene (média ± desvio padrão, n= 4). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre os grupos; 10 – 70: dias após a ovulação..... 69

Figura 11 - Expressão de NFKB em corpo lúteo de cadelas durante o diestro. Expressão relativa do gene (média ± desvio padrão, n= 4). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre os grupos; 10 – 70: dias após a ovulação..... 69

Figura 12 - Expressão de *IL6* em corpo lúteo de cadelas durante o diestro. Expressão relativa do gene (média ± desvio padrão, n= 4). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre os grupos; 10 – 70: dias após a ovulação..... 70

Figura 13 - Linhas de tendência demostrando a correlação do receptor de insulina com diferentes perfis estudados. A: Receptor de insulina x progesterona; B: Receptor de insulina x 17β-estradiol; C: Receptor de insulina x insulina; D: Receptor de insulina x Glicemia; E: Receptor de insulina x *NFKB*; F: Receptor de insulina x *IL6*..... 71

Figura 14 - Linhas de tendência demostrando a correlação do NFKB com diferentes perfis estudados. A: NFKB x progesterona; B: NFKB x 17β-estradiol; C: NFKB x insulina; D: NFKB x Glicemia E: NFKB x IL6..... 72

Figura 15 - Linhas de tendência demostrando a correlação do IL6 com diferentes perfis estudados. A: IL6 x progesterona; B: IL6 x 17β-estradiol; C: IL6 x insulina; D: IL6 x Glicemia..... 73

Figura 16 - Imunolocalização dos receptores de insulina em corpo lúteo de cadelas ao longo do diestro. A:10 dias; B:20 dias; C:30 dias; D:40 dias; E:50 dias; F:60 dias; G:70 dias e H: mais de 70 dias po. Setas pretas indicam a marcação citoplasmática tecidual e setas brancas indicam o núcleo. Controle positivo de músculo estriado esquelético de camundongo. Aumento 40x. Barra 50µm..... 74

Figura 17 - Imunolocalização de NFKB em corpo lúteo de cadelas ao longo do diestro. A:10 dias; B:20 dias; C:30 dias; D:40 dias; E:50 dias; F:60 dias; G:70 dias e H: mais de 70 dias po. Setas pretas indicam a marcação citoplasmática tecidual e setas brancas indicam imunolocalização no núcleo. Controle positivo de carcinoma humano. Aumento 40x. Barra 50µm..... 75

Figura 18 - Imunoflorescência de IL6 em corpo lúteo de cadelas ao longo do diestro. A:10 dias; B:30 dias; C:70 dias; D: mais de 70 dias po. Setas brancas indicam a marcação citoplasmática tecidual em vermelho. Aumento 40x. Barra 50µm..... 76

Figura 19 - Expressão da proteína RI em corpo lúteo canino. Blots ilustrativos e gráficos representam o conteúdo expresso em unidades arbitrárias (UA)/50 µg de proteína em relação à beta-actina. As barras representam a média ±desvio padrão de n= 4. * representa diferença significativa (p<0,05) entre os grupos..... 77

Figura 20 - Expressão da proteína NFKB em corpo lúteo canino. Blots ilustrativos e gráficos representam o conteúdo expresso em unidades arbitrárias (UA)/50 µg de proteína em relação à beta-actina. As barras representam a média ±desvio padrão de n= 4. * representa diferença significativa (p<0,05) entre os grupos..... 78

Figura 21 - Expressão da proteína IL6 em corpo lúteo canino. Blots ilustrativos e gráficos representam o conteúdo expresso em unidades arbitrárias (UA)/50 µg de proteína em relação à beta-actina. As barras representam a média ±desvio padrão de n= 4. * representa diferença significativa (p<0,05) entre os grupos..... 78

Figura 22 - Linhas de tendência demostrando a correlação do receptor de insulina com diferentes perfis estudados. A: Receptor de insulina x progesterona; B: Receptor de insulina x 17β-estradiol; C: Receptor de insulina x insulina; D: Receptor de insulina x Glicemia; E: Receptor de insulina x NFKB; F: Receptor de insulina x IL6..... 79

Figura 23 - Linhas de tendência demostrando a correlação do NFKB com diferentes perfis estudados. A: NFKB x progesterona; B: NFKB x 17β-estradiol; C: NKFB x insulina; D: NFKB x Glicemia; E: NFKB x IL6..... 80

Figura 24 - Linhas de tendência demostrando a correlação do IL6 com diferentes perfis estudados. A: IL6 x progesterona; B: IL6 x 17β-estradiol; C: IL6 x insulina; D: IL6 x Glicemia..... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers e sondas utilizados para o PCR em tempo real..... 55

Tabela 2 - Captação de glicose em células luteínicas. Células em condição basal e estimulada com insulina (100nM) por 20 minutos..... 66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Distribuição das cadelas utilizadas neste estudo em 8 grupos..... 46

Quadro 2 - Anticorpos usados na Imuno-histoquímica..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS

µm – micrometro

µg – micrograma

µl - microlitro

°C- graus Celsius

ACTH- hormônio adrenocorticotrófico

ANOVA – análise de variância

Akt – proteína quinase B

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina sérica bovina

Cbl – protooncogene Cbl

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CL – corpo lúteo

cm - centímetro

CO_2 – dióxido de carbono

DMEM – Dulbeco's Modified Eagle Medium

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNAse – enzima que degrada o ácido desoxirribonucleico

dNTP - desorribonuleotídeo trifosfatado

DTT - Dithiothreitol

E2 – 17β-estradiol

ECL – Enhanced Chemiluminescence

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ER – receptor de estradiol

Erk – quinase reguladora da sinalização intracelular

FSH – hormônio folículo estimulante

g – força g

Gab-1 – ligante associado Grb-1

GH – hormônio do crescimento

GLUT – transportador de glicose

Grb-2 – proteína ligante do receptor de fator de crescimento

h – hora

H_2O – água

HEPES – N-[2-hidroxietil] piperazina – [2-ácido etanosulfônico]

IGF-I – fator de crescimento semelhante à insulina

IL6 – interleucina 6

IgG – imunoglobulina G

IRS – substrato do receptor de insulina

IkBs – regulador de inibição kappa B

IKKs – fator de ativação kappa B

kDa – kilodaltons

kg – quilograma

LH – hormônio luteinizante

M – molar

MAPK – quinase mitógeno-ativada

Mek- MAPK/Erk quinase

mg – micrograma

min. – minutos

ml- mililitro

mM - milimolar

nM – nanomolar

ng - nanograma

NaCl – cloreto de sódio

NFKB – fator nuclear kappa B

p62 – substrato para receptor de insulina

p110 – subunidade catalítica do PI3K

p58 - subunidade regulatória da PI3K

p60dok – substrato do receptor de insulina

P4 – progesterona

PBS – solução tampão fosfato

PCR – reação em cadeia pela polimerase

pH – potencial hidrogênio iônico

PI3K – fosfatidilinositol 3 quinase

pg – picograma

PGF2-α – prostaglandina 2 alfa

P.M. – peso molecular

PMSF – fenilmetanossulfonilfluoreto

PKB – proteína quinase B

po – pós ovulação

PRL – prolactina

Ras- transdutor de sinal intracelular

Raf-serina-quinase citoplasmática ativada pelo Ras e ativadora da MAP quinase

RI – receptor de insulina

RNA - ácido ribonucleico

RNAm – ácido ribonucleico mensageiro

RT – transcrição reversa

rpm – rotação por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

SH – sarcoma homologo

Shc – colágeno homologoSrc

SLC2A4 – transportador de soluto 2 membro 4

STAT – proteína ativadora de transcrição e transdução do sinal

Tc10 - proteína de sinalização da proteína G

TCGAP – indica a junção de três domínios - TC10/Cdc42 GAP

TNF-α – fator de necrose tumoral alfa

TTBS – tampão base trifosfato com tween

Tris-HCL – tris base cloreto de hidrogênio

UI – unidade internacional

UNG – uracil N-glicosilase

V – volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 28

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 31

2.1 CICLO REPRODUTIVO DA CADELA..... 31

2.2 INSULINA.....33

2.3. RECEPTOR DE INSULINA.....34

2.4 MECANISMOS DE AÇÃO DA INSULINA.....35

2.5 AÇÕES DA INSULINA NO CORPO LÚTEO.....37

2.6 NFKB E IL6 COMO FATORES REGULATÓRIOS DE GLUT4..... 38

2.7 RESISTÊNCIA INSULÍNICA..... 40

3 OBJETIVOS.....43

3.1 GERAIS..... 43

3.2 ESPECÍFICOS.....43

4 MATERIAL E MÉTODOS.....45

4.1 DELINEAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....45

4.2 PROTOCOLO ANESTÉSICO..... 46

4.3 PROTOCOLO CIRÚRGICO.....46

4.4 DOSAGEM DE PROGESTERONA E 17β-ESTRADIOL.....47

4.5 DOSAGEM DE INSULINA.....48

4.6 DOSAGEM DE GLICEMIA..... 48

4.7 PROCEDIMENTOS PARA O CULTIVO DE CÉLULAS LUTEÍNICAS..... 48

4.8 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS LUTEÍNICAS..... 49

4.9 CAPTAÇÃO DE GLICOSE EM CÉLULAS LUTEÍNICAS..... 50

4.10 IMUNO-CITOQUÍMICA.....51

4.11 PCR EM TEMPO REAL.....52

4.12 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL..... 52

4.12.1 QUANTIFICAÇÃO DO RNA CÉLULAS TOTAL..... 53

4.13 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *IR*, *NFKB* e *IL6*..... 53

4.13.1 TRANSCRIÇÃO REVERSA.....53

4.14 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA RI E NFKB.....55

4.15 IMUNO-FLORESCÊNCIA PARA PROTEÍNA IL6.....57

4.16 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS PARA WESTERN BLOTTING.....58

4.17 WESTERN BLOTTING.....59

4.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS..... 60

5 RESULTADOS.....62

5.1 PERFIL SÉRICO DE PROGESTERONA E 17β-ESTRADIOL..... 62

5.2 PERFIL SÉRICO DE INSULINEMIA E GLICEMIA.....63

5.3 CULTIVO CELULAR.....64

5.4 CAPTAÇÃO DE GLICOSE.....66

5.5 IMUNO-CITOQUÍMICA DE GLUT4 EM CÉLULAS LUTEÍNICAS SOB ESTIMULAÇÃO DE INSULINA.....67

5.6 EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES DE INSULINA EM CORPO LÚTEO DE CADELAS DURANTE O DIESTRO..... 68

5.7 EXPRESSÃO GÊNICA DE *NFKB* EM CORPO LÚTEO DE CADELAS DURANTE O DIESTRO.....69

5.8 EXPRESSÃO GÊNICA DE *IL6* EM CORPO LÚTEO DE CADELAS DURANTE O DIESTRO.....70

5.9 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES ESTUDADOS E A PRODUÇÃO HORMONAL.....70

5.10 IMUNOLOCALIZÃO DE RECEPTORES DE INSULINA NO CORPO LÚTEO CANINO AO LONGO DO DIESTRO.....73

5.11 IMUNOLOCALIZAÇÃO DO NFKB EM CL DE CADELAS..... 74

5.12 IMUNOLOCALIZAÇÃO DO IL6 EM CL DE CADELAS..... 76

5.13 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOT..... 77

5.14 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ESTUDADAS E A PRODUÇÃO HORMONAL.....79

6 DISCUSSÃO..... 83

7 CONCLUSÃO.....92

8 REFERÊNCIAS.....94

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As fêmeas da espécie canina são classificadas como monoéstricas não estacionais por apresentarem apenas um estro a cada novo ciclo reprodutivo, o qual não apresenta relação com as estações do ano. O ciclo estral das cadelas difere das demais espécies domésticas, sendo dividido em proestro, estro, diestro e anestro (FELDMAN; NELSON, 2004). As cadelas ciclam de 1 a 4 vezes por ano, dependendo da raça e também de variações individuais, apresentando um ciclo reprodutivo muito particular. No diestro existe uma intensa atividade do corpo lúteo (medida através da secreção de progesterona), e este é tão longo nas cadelas prenhes quanto nas não prenhes, o que não ocorre em outras espécies. Os hormônios hipofisiários estimulam a produção de progesterona pelo corpo lúteo na segunda metade do diestro (CONCANNON, P. W. et al., 1987; OKKENS, A.; BEVERS, 1990; HOFFMANN et al., 1992; HOFFMANN; RIESENBECK; KLEIN, 1996), no entanto, a primeira metade parece transcorrer sem a influência hormonal central (HOFFMANN et al., 2004).

Como o CL apresenta períodos regulares de formação, atividade e regressão marcados por intensa remodelação tecidual, um suprimento de glicose adequado para as células luteínicas deve ser assegurado. Em recente estudo (comunicação pessoal[1]), foi identificada a expressão da proteína GLUT4 no corpo lúteo de cadelas, expressão esta presente no citoplasma de células luteínicas Este achado sugere a captação de glicose dependente de insulina no corpo lúteo. A insulina é o mais importante dos hormônios controladores do metabolismo energético. Exerce múltiplas ações sobre o metabolismo e o crescimento celular, que se iniciam sempre pela ligação da insulina com receptores específicos situados na membrana plasmática das células-alvo. É um hormônio capaz de induzir respostas anabólicas no fígado, tecido muscular e tecido adiposo, sendo importante para a homeostase de lipídios e carboidratos e, consequentemente, para o funcionamento do organismo. Além disso, a insulina regula vários processos fisiológicos em diferentes tipos celulares e tecidos como fluxo de íons, captação de aminoácidos, expressão gênica, proliferação celular, apoptose, rearranjo do citoesqueleto e regulação de enzimas celulares (MYERS; WHITE, 1996; MAASSEN; OWENS, 1997). A ação da insulina é mediada por um receptor de membrana, constituído por duas subunidades A e duas subunidades B, unidas por ligações dissulfeto. A subunidade A é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A

[1] Informação fornecida por SOUSA, L.M.M.C, 2012.

subunidade B é uma proteína transmembrânica responsável pela transmissão do sinal e possui atividade tirosina quinase. O ATP age como doador de fosfatos e a fosforilação ocorre em resíduos de tirosina.

A captação de glicose do plasma para o espaço intracelular é realizado por meio de compostos facilitadores no transporte de glicose, característico de células com metabolismo de carboidrato dependente de insulina. GLUT4 é o chamado transportador de glicose insulino-sensível, cujo principal papel é proporcionar a captação de glicose insulino-mediada em tecidos que expressam especificamente, mas não unicamente, a proteína GLUT4 (MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006). O estímulo insulínico determina a movimentação de GLUT4 e sua translocação em direção à membrana plasmática e aumenta agudamente a captação de glicose, participando de forma importante no controle da homeostase glicêmica em nível tecidual e plasmático (REA; JAMES, 1997). Os tecidos em que a captação da glicose é estimulada pela insulina são os músculos, esquelético e cardíaco, e os tecidos adiposos, branco e marrom, os quais são chamados de tecidos insulino-sensíveis: nestes territórios a insulina estimula a captação da glicose para estoque de sua energia (SERAPHIM et al., 2000). A presença deste transportador nos leva a acreditar que ocorra a presença de receptores de insulina em corpo lúteo de cadelas, uma vez que a ativação destes receptores são o primeiro passo para ocorrer a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, o que tornaria a insulina um importante hormônio regulador também da atividade luteínica. Se esta ação depende da influência dos hormônios esteroides secretados pelas células luteínicas da cadela (PAPA; HOFFMANN, 2011) de maneira estágio-dependente também necessita de esclarecimento. Vale ressaltar que modificações na expressão deste gene são correlacionadas de maneira direta com a resistência a insulina (THORENS; CHARRON; LODISH, 1990), e que diferentes fatores são descritos como reguladores destas modificações. O fator nuclear kappa B (NFKB) é citado na literatura como um regulador da expressão de GLUT4, e a depender do órgão estudado, pode agir como estimulador (ROHER et al., 2008) ou inibidor de sua expressão (KARNIELI; ARMONI, 2008). Assim como NFKB, a interleucina 6 (IL6) também é descrita como reguladora negativa (ROTTER; NAGAEV; SMITH, 2003) ou positiva da expressão de GLUT4. Com isso estudos sobre a expressão de receptores de insulina, e de possíveis reguladores de GLUT4 em corpo lúteo de cadelas ao longo do diestro são de grande importância para um melhor entendimento da morfofisiologia da célula luteínica e do papel dos hormônios esteróides em associação à ação da insulina no CL canino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão de literatura são abordados temas referentes ao ciclo reprodutivo de cadelas, insulina e seus mecanismos de ação no corpo lúteo, fatores reguladores de GLUT4 e sua influência na resistência insulínica.

2.1 CICLO REPRODUTIVO DA CADELA

Em cadelas, o ovário é um órgão par e de forma variável de acordo com o momento do ciclo estral, posiciona-se na cavidade abdominal dorsal e caudalmente em conformidade com a posição assimétrica dos rins. O ovário esquerdo localiza-se um pouco mais caudal em relação ao seu oposto (DYCE; SACK; WENSING, 2010). O tecido predominante do ovário é o córtex, e este contém folículos ovarianos e/ou corpos lúteos em vários estágios de desenvolvimento ou regressão (HAFEZ, 1995). Após a luteinização do folículo ovariano (em seu estágio mais avançado), e a ovulação serem estimuladas pelo aparecimento do hormônio luteinizante (LH) secretado pela adenohipófise 38 a 48 horas antes (MIALOT, 1988), as células foliculares da granulosa e teca interna cessam sua atividade estrogênica e começam a produzir progesterona. O folículo se luteiniza e este período do ciclo estral, dominado pela progesterona produzida pelo próprio corpo lúteo (KOLB, 1974; DERIVAUX, 1980) é denominado de fase luteínica.

O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina temporária, que passa por um processo de desenvolvimento, manutenção e regressão, atingindo atividade secretória plena quando sua formação está completa (STOUFFER, 2006).

A duração da atividade do CL em cadelas não prenhes pode superar o tempo das prenhes, e alcançar mais de 80 dias (BURKE, 1986; HOFFMANN; RIESENBECK; KLEIN, 1996; TSUTSUI et al., 2007). Uma das peculiaridades mais importantes é o fato de cadelas prenhes e não prenhes apresentarem praticamente o mesmo perfil hormonal de progesterona e 17β-estradiol (E2) até pouco antes do parto (CONCANNON, P. W., 1993).

A cadela é considerada monoéstrica, isto é, exibe apenas um ciclo estral por época reprodutiva. O ciclo estral da cadela compreende as três fases características: o proestro, o estro e diestro, as quais são sucedidas por um período de inatividade funcional ovárica – o

anestro. O diestro começa quando uma cadela previamente receptiva abruptamente se recusa a aceitar a monta de um macho (BRICHARD; SHERDING, 1994). O corpo lúteo está formado, e se mantém em pleno funcionamento, com uma elevada atividade proliferativa em células luteínicas e não luteínicas.

Posteriormente a ovulação inicia-se um processo hipertrófico e de luteínização das células granulosas, as quais secretam progesterona sob a forma de grânulos (HAFEZ, 1995). A concentração de progesterona no plasma eleva-se acima da concentração basal (>0,5 ng/ml) 72 a 96 horas antes da ovulação; o desenvolvimento do corpo lúteo ocorre na cavidade folicular, formando uma fonte contínua para manter a concentração plasmática elevada (FELDMAN; NELSON, 2004). O corpo lúteo ganha sua maior capacidade sintética avaliada pela concentração de P4 no sangue periférico entre os dias 25 e 35 depois da ovulação (po) e após este período a concentração de P4 diminui gradativamente para níveis de <1 ng/ml (CONCANNON, P. W., 1993). A integridade morfológica do CL é prolongada até 45 dias, embora as alterações que desencadeiem a regressão funcional ocorram nitidamente mais cedo (SONNACK, 2009). Durante a fase pré-ovulatória, o E2 atinge picos de concentrações bastante elevados, porém após a ovulação ocorre uma rápida queda desta concentração.

Os hormônios hipofisiários (LH e prolactina) não são essenciais para a sobrevivência do corpo lúteo (CONCANNON, 1980; OKKENS, et al., 1986) durante o primeiro terço da fase luteínica, mesmo tendo suas funções de suporte de hormônios gonadotróficos bastante conhecidas, porém possuem papel determinante na manutenção da produção luteínica de P4 na segunda metade do diestro.

Em cadelas não prenhes a regressão do corpo lúteo não é dependente de luteolisinas uterinas como acontece em outras espécies e em cadelas prenhes (HOFFMANN et al., 1992; KOWALEWSKI et al., 2006; PAPA; HOFFMANN, 2011). Durante a regressão, o fluxo sanguíneo para o ovário luteinizado declina bruscamente. De maneira interessante, recente avaliação através de microscopia eletrônica de transmissão revelou que os primeiros sinais de regressão ocorrem apenas após o dia 45 e que sinais de apoptose após o dia 65 foram observados também pelo método de TUNEL e caspase 3 (SONNACK, 2009). Ainda não há nenhuma evidência de um mecanismo ativo que leve a regressão luteínica em cadelas não prenhes.

2.2 INSULINA

A insulina é um polipeptídio formado por duas cadeias de aminoácidos (cadeias A e B), unidas entre si por duas pontes dissulfeto de cistina (AIRES, 1999). Uma terceira ponte de dissulfeto liga outros dois resíduos de cisteina pertencentes à própria cadeia A.

Em cães é codificada por um gene localizado no cromossomo 18 (KWOK; CHAN; STEINER, 1983). É um hormônio anabólico com efeitos metabólicos diversos, as implicações que ocorrem após a ligação da insulina são específicas. A cadeia A possui uma ponte dissulfeto interna. A ruptura dessas cadeias por álcalis ou agentes redutores inativa o hormônio. A estrutura da insulina varia com a espécie animal, mas apesar das diferenças na estrutura primária, a atividade biológica por unidade de peso é muito semelhante (COSTANZO, 2004). A insulina é o mais importante dos hormônios controladores do metabolismo energético. Além de exercer múltiplas ações sobre o metabolismo e o crescimento celular, que se iniciam sempre pela ligação da insulina com os receptores específicos situados na membrana plasmática (HABER et al., 2001).

A insulina atua como reguladora da homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo (COSTANZO, 2004). Além de estimular a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduzir a lipólise, a insulina ainda aumenta a síntese e inibe a degradação protéica (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). A principal função da insulina é o transporte da glicose para o interior das células, e também o transporte transmembrana de aminoácidos, formação de glicogênio, produção de triglicerídeos, e síntese de ácidos nucléicos e proteínas (JONES; HUNT; KING, 2000).

É formada a partir da pró-insulina, e sua síntese e secreção estão relacionadas à concentração sanguínea de glicose. A insulina é liberada por exocitose e se liga ao seu receptor, acarretando a ativação rápida dos sistemas de transporte de glicose e aminoácidos da membrana, o aumento da síntese protéica e a inibição da sua degradação, além da inibição da lipólise e da gliconeogênese hepática (ANDRADE, 2002).

2.3. RECEPTOR DE INSULINA

O receptor de insulina (RI) pertence a uma grande família com mais de 50 membros, denominados “receptores de tirosina quinase” que inclui vários fatores de crescimento celular, e está presente em todos os vertebrados (SEEDORF, 1995; NYSTROM; QUON, 1999). O receptor é um grande complexo glicoprotéico transmembrana que pertence à superfamília de receptores tipo 3 ligados a quinases (GROZOVSKY, 2006).

Os receptores exercem basicamente três funções: reconhecem e se ligam à insulina ou IGF-I com alta especificidade; transmitem um sinal que resulta na ativação/inativação de vias metabólicas intracelulares e são, posteriormente, internalizados, juntamente com o hormônio ligado por meio de proteólise lisossomal (FELIG; BERGMAN, 1995; GENUTH, 1998).

O RI é uma proteína heterotetramérica formada por duas subunidades (A) extracelulares dispostas simetricamente que se ligam cada uma delas por ponte de dissulfeto, a uma subunidade (B) transmembrânica, com domínio intracelular que possui atividade tirosina quinase, contendo resíduos específicos de tirosina passíveis de fosforilação (STEPHENS; PILCH, 1995; PROCÓPIO; CURI, 2009).

A insulina sérica se liga a um receptor específico na superfície de suas células alvo, como resultado final ocorre uma cascata de fosforilação de proteínas sinalizadoras. Esse evento de estimulação da atividade de proteína quinase, desencadeada pela ligação da insulina ao receptor, está relacionado com vários processos intracelulares, como: o metabolismo de carboidratos, lipídeo e proteínas, transporte de metabólitos e proliferação celular. Esse é um evento comum, a partir do qual várias vias de transdução de sinal podem ser ativadas, resultando em múltiplos efeitos da insulina sobre o metabolismo (WAHL et al., 1992).

Os receptores ocupados se agregam em grupos, que são interiorizados em vesículas, resultando em regulação. A ligação da subunidade A permite que a subunidade B adquira atividade quinase e autofosforilação do receptor (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Essa chamada autofosforilação faz com que a cadeia B passe a ter atividade tirosina quinase e fosforile à tirosina de substratos do receptor de insulina (IRS). Os substratos do receptor de insulina (IRSs) interagem especificamente com os receptores de insulina e IGF-I, funcionando como proteínas ancoradouras, que são fosforiladas em resíduos tirosina, recrutando proteínas para a cascata de sinalização (MYERS; WHITE, 1996).

A família de substratos do receptor de insulina (RI) apresenta nove membros: quatro substratos do receptor de insulina (IRSs), as proteínas IRS1, IRS2, IRS3, e IRS4; três

proteínas Shc (Src-Homology Collagen); Grb-2 (grown fator receptor bound-2) associado ao ligante-1 (Gab-1); e p62 (VAN OBBERGHEN et al., 2001). Dentre os IRS identificados, o IRS1 e o IRS2 são os mais expressos nos tecidos de mamíferos. A fosforilação do IRS1 propicia a ativação de outros intermediários da via de sinalização insulínica, desencadeando as várias ações do hormônio (PIPER; HESS; JAMES, 1991). O papel do receptor de insulina, assim como dos IRS1 e IRS2 parece ser fundamental para a sobrevivência, a falta ou a disfunção destes fatores estão associadas à resistência à insulina (KIDO; NAKAE; ACCILI, 2001).

2.4 MECANISMOS DE AÇÃO DA INSULINA

Sendo a insulina um hormônio de natureza protéica, age no receptor localizado na membrana plasmática das células-alvo dando início a um sinal que é transmitido para o citossol por uma sequência de reações. Todas as ações do hormônio iniciam-se com sua ligação a um receptor específico. Pode-se obter o efeito máximo de certas ações da insulina com apenas 5% dos receptores ocupados, fato que demonstra a existência de receptores de reserva (AIRES, 1999). Tanto a afinidade como a capacidade (número) desses receptores pode ser modulada por outros hormônios ou por metabólicos. A própria insulina produz uma diminuição do número de receptores (down regulation) quando seus níveis aumentam, ou um aumento (up regulation) quando os seus níveis do hormônio diminuem (PROCÓPIO; CURI, 2009). O RI está presente em praticamente todos os tecidos dos mamíferos, mas suas concentrações variam desde 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 nas células adiposas hepáticas (HABER et al., 2001).

A ligação da insulina à subunidade A permite que a subunidade B adquira atividade quinase levando a alteração conformacional e autofosforilação, que aumenta ainda mais a atividade quinase do receptor (PATTI; KAHN, 1998). Semelhante a outros fatores de crescimento, a insulina estimula a ativação da proteína mitógena quinase.

A ativação do RI resulta em fosforilação em tirosina de diversos substratos (WHITE, 1998), os pertencentes à família das proteínas substrato do receptor de insulina (IRS1, IRS-2, IRS3 e IR4) (SALTIEL; KAHN, 2001), além dos substratos Gab-1, p60dok, Cbl, APS,

isoformas de Shc assim como sinais de transdução e ativadores de transcrição – STAT (VAN OBBERGHEN et al., 2001).

As proteínas pertencentes aos substratos do receptor de insulina apresentam domínios SH (sarcoma-homology), tem como função principal promover a ligação a fosfotirosinas, com isso ajudam a ativar as proteínas para transmitir a função correspondente. Podemos encontrar quatro domínios principais. O SH1 que possui ação catalítica (atividade tirosina quinase); os domínios SH2 e SH3 mediam interação proteína-proteína em vias de sinalização intracelular e o SH4 está envolvido com a miristilação e sinal de localização de membrana (ACCILI, 2001). Coletivamente estas moléculas orquestram as numerosas respostas fisiológicas mediadas pela insulina (DOMINICI et al., 2005).

Após a fosforilação em tirosina, IRS1 e IRS2 associam-se e ativam a fosfatidilinositol 3- quinase (PI3-K) (HABER et al., 2001). PI3-K possuiu uma subunidade regulatória (p58) e uma subunidade catalítica (p110) A p58 contém domínio SH2, que se liga ao IRS1 e a p110 possui um domínio SH3, que se ligará a outras proteínas (CHEATHAM; KAHN, 1995).

A ativação da PI3-K aumenta a fosforilação em serina/treonina da proteína quinase B (Akt) (PESSIN; SALTIEL, 2000). A quinase serina/treonina (Akt), é composta de duas isoformas (Akt1 e Akt2), sendo uma das principais efetoras da PI3-K e medeiam muitas das respostas da insulina, fosforilando diversos substratos (SALE; SALE, 2007). A Akt pode regular o metabolismo da glicose em diversos níveis, pois aumenta a captação de glicose em tecidos responsivos à insulina aumentando a expressão dos transportadores de glicose (BARTHEL et al., 1999) e induz a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (KOHN et al., 1996), além de estimular a síntese de glicogênio no fígado e músculo, estimula a lipogênese no tecido adiposo (SHEPHERD; KAHN, 1999; ACCILI, 2001).

Portanto, a via PI3-K tem um importante papel nos efeitos metabólicos da insulina sendo necessária para muitas, mas não todas as ações da insulina (DOMINICI et al., 2005). De forma similar a outros fatores de crescimento, a insulina usa fosforilação e interações proteína-proteína como ferramentas essenciais para transmitir o sinal do receptor em direção ao efeito celular final, tais como translocação de vesículas contendo transportadores de glicose (GLUT4) do *pool* intracelular para a membrana plasmática, ativação da síntese de glicogênio e de proteínas, e transcrição de genes específicos (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

Vale ressaltar que para ocorrer uma eficiente sinalização insulínica são necessárias vias alternativas que complementam o funcionamento adequado desta cascata de eventos. Uma segunda via envolvendo a proto-oncogene Cbl é necessária para tal, e desta forma após

ativação do receptor de insulina as proteínas acopladoras CAP e APS recrutam o Cbl, que é então fosforilado, resultando na ativação da proteína G Tc10 e consequente ativação do efetor TCGAP, estimulando a translocação das vesículas. Esta via poderia servir como um sinal alternativo à ativação da via CAP/APS/Cbl/TC10 e esta, de alguma forma, envolvida em mecanismo que atenuam as ações da insulina (DOMINICI et al., 2005).

A ativação da via Ras-Raf-Mek-Erk é a terceira via principal de sinalização da insulina e resulta na ativação das proteínas quinases ativadoras de mitoses (MAPK) (DOMINICI et al., 2005). A via MAPK, apesar de apresentar um possível efeito sobre a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, parece estar envolvida com a regulação da expressão gênica e controle do crescimento e diferenciação celular; envolvida com os efeitos promotores do crescimento deste hormônio e parecendo ser relativamente dispensável na regulação metabólica estimulada pela insulina (SALTIEL; KAHN, 2001; PIROLA; JOHNSTON; VAN OBBERGHEN, 2004).

2.5 AÇÕES DA INSULINA NO CORPO LÚTEO

Trabalhos evidenciam que não somente as gonadotrofinas, FSH e LH, mas também a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) têm um importante papel na fisiologia ovariana (PIRES; RIBERIO, 2006). A insulina, bem como o GH e IGF-1 estão envolvidos nos estágios iniciais da foliculogênese, visando à dominância folicular e a resposta destes às gonadotrofinas (GONG; WEBB, 1996).

A insulina é considerada um dos principais hormônios metabólicos relacionado com a reprodução, apresentando efeitos diretos nas células ovarianas, incluindo produção de P4 pelas células luteínicas e a estimulação da mitose nestas células (PIRES; SUSIN, 1997), além de atuar diretamente na manutenção da glicemia, secreção pulsátil de LH e de IGF-I em algumas espécies (MAGGIONIL et al., 2008) estimulando a secreção de FSH e agindo sinergicamente na diferenciação morfológica das células da granulosa (PATE; PALMQUIST, 2001). As ações da insulina sobre os ovários são bastante semelhantes às das gonadotrofinas hipofisárias (PIRES; SUSIN, 1997). Essas ações sobre o ovário sugerem que sua disponibilidade pode limitar a atividade ovariana e a sua receptividade à ação das gonadotrofinas (PUSHPAKUMARA et al., 2003).

O consumo insuficiente de energia está relacionado com um baixo desempenho reprodutivo, resultando em um período prolongado de anestro pós-parto, baixa produção de progesterona pelo corpo lúteo, e baixa taxa de concepção (LUCY et al., 1991). Existem fortes evidências de que a associação entre a nutrição e a função ovariana esteja relacionada principalmente com o sistema glicose-insulina e IGF (SCARAMUZZI et al., 2006), como é visto quando ocorrem alterações na dieta de ruminantes modificando seu metabolismo e alterando alguns hormônios metabólicos, entre eles GH, insulina, IGF-1 e leptina, que têm grande participação na função ovariana (WEBB et al., 2004).

Trabalhos sugerem que as ações da insulina influenciam a função luteínica diretamente, sem a necessidade de serem mediados pelo ovário ou pela síntese de IGF-1 (WATHES et al., 1995). Em células luteínicas, estudos demonstram que a insulina aumenta a produção de progesterona pelo corpo lúteo *in vivo* (STEIN; BUSSMANN; TESONE, 1995), assim como foi demostrado em células rescém isoladas de ratas (LADENHEIM; TESONE; CHARREAU, 1984). Estes resultados indicam que a insulina pode aumentar a atividade esteroidogênica em ovários de ratas durante a fase lúteínica além de estimular a biossíntese de esteroides via mecanismos que envolvem a ativação de enzimas responsáveis pela clivagem da cadeia lateral do colesterol e aromatase (SARAGÜETA et al., 1989).

Em geral, os efeitos da insulina nas células ovarianas são positivos, estimulando a proliferação das células da granulosa, a atividade da aromatase e a produção de esteroides.

2.6 NFKB E IL6 COMO FATORES REGULATÓRIOS DE GLUT4

O transportador de glicose 4 (GLUT4) é o principal responsável pela entrada da glicose nas células do tecido muscular e adiposo. Localizado em vesículas intracelulares, seu transporte para a membrana da célula é ativado pela cascata de sinalização celular após ligação da insulina com o RI. A expressão reduzida da proteína GLUT4 está intimamente envolvida com resistência à insulina em indivíduos diabéticos do tipo II (ALZAID, 1996). Quando estimulado pela insulina, as vesículas contendo GLUT4 translocam-se e se fundem na membrana celular, facilitando a difusão de glicose (POLETTO et al., 2010).

É o único tipo de transportador regulado pela insulina e é expresso nos tecidos sensíveis a este hormônio (STEPHENS; PILCH, 1995; MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006).

Modificações na expressão deste gene, tanto em tecido adiposo quanto em músculo esquelético, correlacionam-se de maneira direta com aumento ou redução da sensibilidade insulínica (THORENS; CHARRON; LODISH, 1990). Diversos fatores biológicos ou farmacológicos influenciam na expressão gênica do GLUT4 como mudanças crônicas da sensibilidade à insulina e atividade contrátil (SILVA et al., 2005).

Um importante regulador de GLUT4 é o fator nuclear kappa B (NFKB) (RUAN et al., 2002). A depender do órgão estudado, é possível encontrar na literatura que o NFKB é capaz de atuar de maneira distinta, tanto como inibidor como estimulador das ações de GLUT4. Como fator inibitório, dados preliminares sugerem que o NFKB pode se ligar diretamente ao promotor do *SLC2A4* e reprimir sua transcrição (KARNIELI; ARMONI, 2008). Em ratos, o gene *SLC2A4* parece ser regulado negativamente pelo *NFKB* (SILVA et al., 2005) em músculo esquelético em diferentes condições (hipóxia, jejum, estímulo insulínico). O diabetes mellitus, a obesidade, a migração de macrófagos juntamente com o excesso de produção de macrófagos derivados das citocinas e a ativação da via NFKB, podem reduzir a expressão de GLUT4 e causar a resistência insulínica (YUAN M et al., 2001). No entanto, em células musculares de humanos, definidas como responsivas à insulina, existe um aumento da expressão de GLUT4 na membrana após aumento de expressão de NFKB (ROHER et al., 2008).

Estudos evidenciam correlação entre os níveis elevados de interleucina 6 (IL6) com o desenvolvimento da resistência insulínica, na obesidade e no diabetes mellitus (ROTTER; NAGAEV; SMITH, 2003; SHARMA; CHETTY, 2005). Em humanos foi descrito que a IL6 pode induzir a resistência insulínica em tecido adiposo, quando células adiposas tratadas com IL6 a longo prazo apresentaram a transcrição dos genes IRS1, IRS2 e SLC2A4 inibida. Estes estudos ratificam que a IL6 pode estar correlacionada com a inibição da expressão de GLUT4 (ROTTER; NAGAEV; SMITH, 2003). Porém, vale ressaltar que a IL6 é considerada um estimulador da expressão gênica do GLUT4 em algumas situações (ROHER et al., 2008).

A influência da IL6 em corpo lúteo vem sendo investigada. Foi demonstrado que IL6 tem um papel importante no sistema endócrino e atua na liberação de hormonios hipofisiários como GH e LH (NAITOH et al., 1988; SPANGELO et al., 1989), e contribui negativamente para a esteroidogênese, induzindo a luteólise em ratos (TELLERIA et al., 1998).

A presença da expressão do RNAm da *IL6* em corpo lúteo de cadelas já foi demostrada anteriormente, porém os resultados obtidos não foram conclusivos para a melhor compreensão de suas funções durante o diestro do ciclo estral canino (ENGEL et al., 2005).

Pesquisas apoiam o conceito de que as citocinas podem ser componentes normais do corpo lúteo e servir como fatores essenciais na regulação de sua função em algumas espécies (TELLERIA et al., 1998). Foi verificado em várias espécies que o sistema imunológico desempenha um papel importante na função do corpo lúteo, possivelmente através da liberação de citocinas provenientes de células imunes que adentram o CL via corrente sanguínea (SAKUMOTO et al., 2006). Dados sugerem que as citocinas encontradas no CL canino possam ter uma função modulatória na manutenção, diferenciação e regressão da fase luteínica (HOFFMANN et al., 2004).

A regulação da homeostasia intra e extra-celular da glicose está diretamente relacionada ao controle preciso da expressão dos genes que codificam as diferentes isoformas de proteínas transportadoras de glicose, as quais são expressas de maneira tecido-específica, em consequência do padrão de ativação dos fatores transcricionais reguladores de cada gene, em cada tipo celular (MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006). A regulação da transcrição do gene *SLC2A4* (GLUT4) envolve o controle de fatores transcricionais como *NFKB e IL6* e estes podem ativar ou inibir a transcrição do gene (FURURYA; FURUYA, 2010).

2.7 RESISTÊNCIA INSULÍNICA

Resistência à insulina é um termo empregado para definir uma situação onde a insulina que circula no sangue não tem sua atividade plena. Esse hormônio é fundamental não só para o controle das taxas de glicose no sangue, mas também têm inúmeras funções no fígado, tecido adiposo, rins e mesmo nos vasos sanguíneos. Quando o indivíduo é resistente à insulina, seu pâncreas produz o hormônio com estímulo gerado pela glicose, mas a ação dessa insulina não é a ideal. Esta resistência significa uma diminuição na capacidade da insulina em estimular a utilização de glicose, seja com deficiência no receptor de insulina ou com defeito em algum mecanismo pós-receptor durante sua utilização (COMMITTE, 2003).

O Diabetes mellitus tem como definição uma síndrome que abrange uma série de doenças de etiologias diferentes e clinicamente heterogêneas, que se caracterizam pela hiperglicemia, decorrente da falta de insulina ou da incapacidade desta em exercer adequadamente seus efeitos metabólicos (ASSOCIATION, 1997). Tem como principais causas a predisposição genética e insulinite imunemediada, associadas à exposição

prolongada a fatores de resistência à insulina, como por exemplo, obesidade, progestágenos, infecções, diestro e corticoides (DUNN, 2001).

O processo de instalação da resistência insulínica é caracterizado por alterações teciduais da expressão de algumas proteínas transportadoras de glicose, como o GLUT4. (MUECKLER, 1994; JAMES, D., 1995; DUNAIF, 1997; MUECKLER, 2001).

O transporte de glicose para as células de mamíferos é essencial para a sobrevivência. Grande parte da glicose circulante no estado pós-absortivo é captada por órgãos independentes da insulina, sendo que apenas 1/4 é utilizado em tecidos dependentes de insulina, principalmente a musculatura esquelética e o tecido adiposo (DEFRONZO, 1997). No entanto, qualquer desequilíbrio nesta captação de glicose periférica pode levar à intolerância à glicose ou mesmo ao diabetes mellitus.

Animais diabéticos não insulino dependentes apresentam resistência à insulina devido a causas secundárias como hiperadrenocorticismo e diestro, porém, a administração de insulina pode ser benéfica caso haja uma hiperglicemia persistente (FLEEMAN; RAND, 2001). A incidência da diabetes mellitus é de duas a três vezes mais frequentemente em fêmeas caninas do que em mulheres e a fase clínica da doença ocorre durante o diestro ou durante a gestação, quando os níveis de progesterona são elevados e prolongados (PENEDA; DOOLEY, 2003).

A progesterona atua de duas formas na resistência insulínica: a forma direta, na qual diminui o transporte da glicose para os tecidos, e indiretamente induzindo a hipersecreção de hormônio do crescimento (GH) pelas glândulas mamárias; neste caso o GH diminui o número de receptores de insulina nas células e o transporte de glicose aos tecidos (EIGENMANN, 1984; RYAN; ENNS, 1988; SELMAN et al., 1994; PÖPPL et al., 2009). O estrógeno e a progesterona reduzem a sensibilidade dos órgãos alvos para a ação da insulina. Logo, as fêmeas não esterilizadas são mais propensas a desenvolverem diabetes mellitus. Alguns estudos têm demonstrado que os sinais clínicos geralmente são observados durante o estro ou diestro. Ainda, a administração frequente de progestágenos sintéticos pode levar a uma influência persistente da progesterona promovendo a liberação de GH, que resulta em hiperglicemia e resistência insulínica (MARMOR et al., 1982).

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

Investigar a ação da insulina em corpo lúteo canino mediada pelo receptor de insulina e por possíveis agentes reguladores da sinalização insulínica.

3.2 ESPECÍFICOS

- Isolar e cultivar células luteínicas com ou sem adição de insulina para observação da expressão gênica de *RI* e *SLC2A4* nos dias 20 e 40 após a ovulação.
- Avaliar a captação de glicose pelas células luteínicas estimulada pela insulina
- Verificar se a captação estimulada por insulina se dá via GLUT4.
- Localizar e quantificar a expressão da proteína e do RNAm do receptor de insulina (RI), IL6 e NFKB no tecido luteínico ao longo do diestro
- Determinar a correlação dos genes e proteínas estudadas entre si e com os perfis hormonais de E2, P4 e insulina bem como com a glicemia durante o diestro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de corpos lúteos de cadelas em diferentes fases do diestro (10, 20, 30 40, 50 60 70 >70) foram coletadas em outra oportunidade (MARIANI et al., 2006), agora, estas foram utilizadas para análises de RI, NFKB e IL6 através de imuno-histoquímica para identificar e localizar as proteínas, western blotting para quantificar as mesmas, além de PCR em tempo real para avaliar as expressões de seu RNAm. O sangue destes animais também foi coletado para análise de insulinemia, glicemia bem como E2 e P4. A dosagem hormonal e de glicemia está descrita a seguir para efeitos formais uma vez que os valores obtidos foram usados para os estudos de correlação, porém não fez parte deste trabalho.

Para o cultivo celular, corpos lúteos de novas cadelas provenientes de campanhas de castração foram coletados para observação dos efeitos da insulina sobre a expressão gênica do *IR* e *SLC2A4* através de PCR em tempo real e sobre a captação de glicose. O cultivo celular foi feito em células do dia 20 e 40 po, períodos estes que apresentaram elevação de P4 e E2 respectivamente pós-ovulação para avaliação da expressão de *IR* e *SCL2A4* e do dia 30 po para captação de glicose.

4.1 DELINEAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para análises através de imuno-histoquímica, western blotting e PCR em tempo real, foram utilizados corpos lúteos provenientes de cadelas clinicamente sadias, de diferentes idades e sem padrão racial definido. Estas passaram por ovariosalpingohisterectomia nos dias 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e acima de 70 dias após a ovulação (Quadro 1). O acompanhamento das cadelas a serem ovariohisterectomizadas ocorreu a partir do surgimento de sinais de proestro, como edema vulvar e secreção vaginal sanguinolenta. Com o surgimento de tais sinais foram iniciadas as coletas de sangue, feitas em dias alternados. A partir desse material foram feitas dosagens de progesterona sérica a fim de se detectar a data de ovulação de cada animal. O dia da ovulação foi determinado quando a concentração de progesterona plasmática atingiu o valor $\geq$5 ng/mL (CONCANNON; MCCANN; TEMPLE, 1989). Esses animais estavam alojados em um canil localizado no município de Itapecerica da Serra. Todos eram saudáveis e recebiam ração para cães uma vez ao dia pela manhã.

Quadro 1 - Distribuição das cadelas utilizadas neste estudo em 8 grupos

10 p.o.	20 p.o.	30 p.o.	40 p.o.	50 p.o.	60 p.o.	70 p.o.	>70 p.o.
Bombom	Linda	Cacá	Jade	Pastora	Jambinha	Eva	Lara 224
Luna	Zezinha	Bruna	Bocó	Vilma	Bca Neve	Pastora	Cherry 330
Tica	Joana	Clara	Elza	Jasmin	Animal 483	Pastora 2	Ely 334
Bianca 2	Linda 2	Dercy	Malhada	Latifa	Sandy	Ursa	Helo 222
Animal 208	Animal 414		Preta	Lala 476	Animal 202	Juju	Lindinha338

p.o. = pós ovulação

4.2 PROTOCOLO ANESTÉSICO

Foi utilizada como medicação pré-anestésica a Acepromazina 0,2% na dose de 0,5 a 1,3 ml para cada 10 Kg de peso vivo. Como medicação anestésica foram utilizados cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina nas doses de 0,2 ml/Kg e 0,1 ml/kg, respectivamente, ambos por via intra-muscular.

4.3 PROTOCOLO CIRÚRGICO

Primeiramente foi realizada incisão abdominal de aproximadamente 5 cm na linha alba, caudalmente à cicatriz umbilical. Após localização do primeiro corno uterino com um gancho de plástico autoclavável, foi colocada uma pinça no ligamento próprio do ovário, enquanto o ligamento suspensor foi divulsionado com o dedo indicador. O pedículo ovariano foi pinçado e a secção feita entre a pinça mais próxima ao ovário e a pinça média. A pinça mais distante ao ovário foi removida e a ligadura do pedículo feita no sulco deixado pelo instrumento.

Nas ligaduras foram usados fios não absorvíveis monofilamentosos de Nylon 2-0. O pedículo foi pinçado com pinça hemostática, a última pinça foi removida e o pedículo

inspecionado quanto a possíveis hemorragias. O pedículo foi então reposicionado no abdome e a pinça hemostática removida. O processo foi repetido no pedículo ovariano oposto.

No corpo uterino também foram colocadas três pinças na região imediatamente cranial à cérvix. O corpo uterino foi seccionado entre as pinças proximal e intermediária e as artérias uterinas ligadas, quando necessário, individualmente. A pinça mais caudal foi removida e o útero ligado no sulco deixado por este último instrumento. O pedículo foi pinçado com uma pinça hemostática, a pinça intermediária removida, o pedículo inspecionado quanto a possíveis hemorragias e depois recolocado no abdome removendo-se a pinça hemostática.

A sutura interna foi feita com fio não absorvível monofilamentoso de Nylon 2-0 e a sutura externa com fio de algodão preto 2-0. O curativo foi feito com nitrofurazona, atadura de crepe e esparadrapo. Foi aplicado como antibiótico a Benzilpenicilina benzatina 1.200.000 UI na dose de 40.000 UI por Kg de peso vivo. Como anti-inflamatório e analgésico foi utilizada a Dipirona na dose de 25 mg/Kg. O curativo e a aplicação do antibiótico foram refeitos a cada dois dias durante 7 dias.

4.4 DOSAGEM DE PROGESTERONA E 17β-ESTRADIOL

Para a dosagem da P4 e do E2 foram utilizados os meios de cultura e Kits de radioimunoensaio Genese®, onde a e o marcados com I^{125} competiram por sítios de anticorpos fixos em tubos de polipropileno, com a progesterona e o estradiol presentes nas amostras. Após a realização dos procedimentos descritos para a montagem da reação, e decorridas 3 horas de incubação em temperatura ambiente, findou-se a competição, e a e o radiomarcados estavam separados da fração de P4 e E2 que se ligaram aos anticorpos. Em seguida, os tubos foram colocados em um contador gama, o qual fornece um número, que convertido por meio de uma curva padrão, determinou os níveis destes hormônios esteróides presentes nas amostras analisadas.

4.5 DOSAGEM DE INSULINA

Para a dosagem de insulina foi utilizado Kits de radioimunoensaio de fase sólida Coat-A-Count®, onde a insulina marcada com I^{125}competiu por sítios de anticorpos fixos em tubos de polipropileno, com a insulina presente na amostra. Após a realização dos procedimentos descritos para a montagem da reação, e decorridas 3 horas de incubação em temperatura ambiente, findou-se a competição, e a insulina radiomarcada foi separada da fração de insulina que se ligou aos anticorpos. Em seguida, os tubos foram colocados em um contador gama, o qual forneceu um número, que convertido por meio de uma curva padrão, determinou os níveis deste hormônio presente nas amostras analisadas.

4.6 DOSAGEM DE GLICEMIA

A glicemia foi analisada através do método enzimático colorimétrico de glicose-oxidase da empresa CELM. Este método é específico para determinação da concentração de glicose no sangue e outros líquidos biológicos (LOTT; TURNER, 1975). Adicionou-se o reativo de trabalho fornecido pelo Kit nos tubos das amostras, com incubação por 10 minutos em banho a 37°C. Após a retirada das amostras do banho foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 505nm.

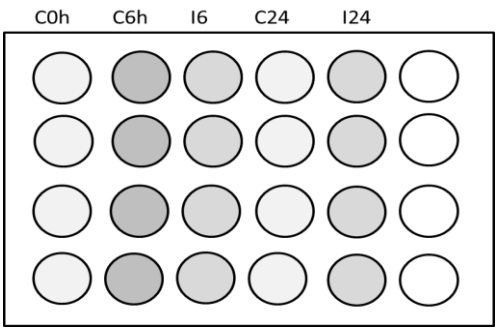
4.7 PROCEDIMENTOS PARA O CULTIVO DE CÉLULAS LUTEÍNICAS

O cultivo foi realizado a partir de células provenientes do corpo lúteo de cadelas dos dias 20 e 40 po. Estas foram cultivadas sem insulina e com adição de 100ng/ml de insulina. As amostras foram coletadas com 0, 06, e 24 horas após início do cultivo para determinação da expressão do RNAm do *RI* e *SLC2A4*.

4.8 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS LUTEÍNICAS

Os ovários foram coletados em tampão fosfato (PBS) estéril e gelado contendo 1% de 100.000 UI/ml de solução antibiótica (A5955; Sigma Aldrich, USA), transferidos em condições assépticas para uma placa de Petri no interior do fluxo laminar, onde os corpos lúteos foram dissecados e cortados em pedaços de aproximadamente 1 mm. Estas amostras foram incubadas em colagenase tipo I (1 mg/ml; C0130; Sigma Aldrich, USA) diluída em DMEM pH 7,2 - 7,4 (41965-039; Gibco BRL). O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma Aldrich, USA), 1% de L-glutamina (Sigma Aldrich, USA), 20 mM HEPES (Sigma Aldrich, USA) e 1% 100.000 U/ ml de solução antibiótica e antimicótica (Sigma Aldrich, USA). A incubação foi realizada por 1 hora à temperatura de 37 ^{o}C em atmosfera úmida com 5% de $CO_{2.}$ A suspensão foi centrifugada por 10 min a 200g, a amostra ressuspensa em DMEM e filtrada em rede de 150 µm de diâmetro para remover os tecidos não digeridos. O filtrado foi novamente centrifugado por 10 min a 200g, ressuspenso em solução tampão de lise de eritrócitos (0,16 M NH_4Cl; 0,01 M Tris-HCl pH 7,2-7,4) diluído em DMEM por 10 min, centrifugado por 10 min a 200g e ressuspenso em DMEM. As células, foram colocadas em placas de 24 poços (Figura 1) e incubadas a 37 ^{o}C sob atmosfera umidificada (5% de CO_2). Os grupos experimentais foram divididos da seguinte maneira: grupo controle, cultivados em meio livre de insulina; e meio suplementado com insulina a 100ng/mL (100mg, I6634; Sigma Aldrich, USA). As amostras de meio de cultivo foram coletadas após 0, 6 e 24 horas. Para a determinação da expressão do *RI* e SLC2A4, as células foram raspadas e colocadas em tubos livres de RNAse contendo 250 µl de TRIzol®, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 ^{o}C para análise por PCR em tempo real.

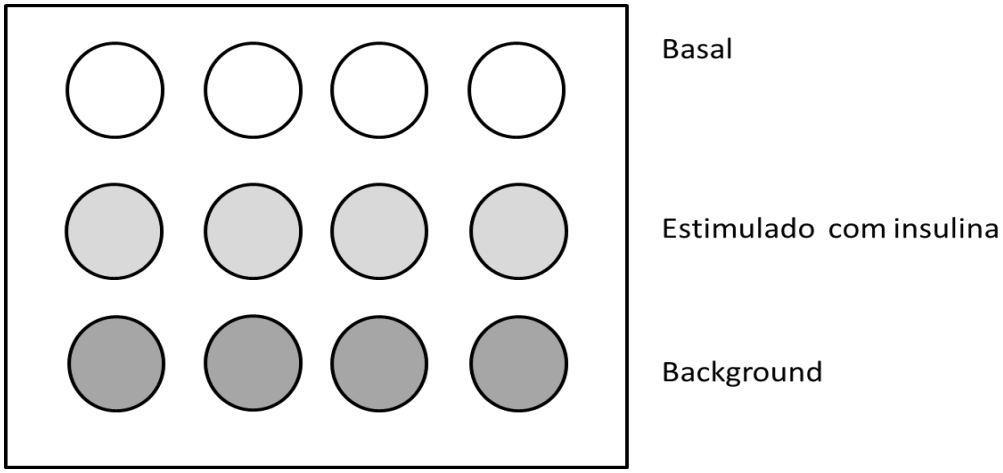
Figura 1- Representação esquemática da placa de cultivo de 24 poços contendo os grupos experimentais estabelecidos: controle (C) e insulina (I) e os respectivos tempos de tratamento (0, 6 e 24 horas)



4.9 CAPTAÇÃO DE GLICOSE EM CÉLULAS LUTEÍNICAS

Células luteínicas de cadelas provenientes do dia 30 po foram cultivadas em placas de 12 poços (Figura 2), (seguindo mesmo protocolo já descrito de isolamento de células luteínicas), e separadas em três grupos, sendo: grupo basal, grupo estimulado com insulina e grupo background utilizado como controle da captação de glicose. Após confluência as células passaram pelo processo de captação sendo que alíquotas de células luteínicas isoladas (40µL em suspensão de células de 10%) foram transferidas em eppendorfs de 1,5ml com e sem insulina (0,1; 1,0 e 10 nmol/l) diluída em tampão de EHB 2 (pH 7,4). As células foram, em seguida, incubadas durante 20 minutos a 37°C. No final do período de incubação, foi adicionado 10ul de 2-desoxi-D-[3H]-glicose (3H-2DG, 0,4 concentração mmol/ I final e 0,05 uCi / tubo), sendo deixada em absorção por 3 minutos. A ação foi inativada pela adição de 250ul de florentina gelada (0,3 mmol / l em EHB e DMSO a 0,05%). Subsequentemente, 200 µl desta mistura foi transferida para tubos de microcentrifugação (capacidade de 450-µl) em camadas de 200µl de óleo de silicone (densidade = 0,963 mg / ml) e centrifugado (Microfuge E, Beckman Instruments, Paio Alto, EUA) durante 10 segundos, a 11,000 x g. Os sedimentos de células de cima da camada de óleo foi removido para frascos de 4 ml contendo 3 ml de cintilação (Ecolume, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, EUA), e a radioatividade aprisionada foi medida em um contador de cintilação líquida (Tri Carp 2100TR, Instrumento Packard, Meriden, CT). Valores inespecíficos de 3H-2DG radiomarcado foram estabelecido em um tubo paralelo já preparado com 250µl de florentina gelada para interromper a reação do transporte antes de adicionar o marcador. Este valor foi descontado do aprisionamento total, e a captação resultante específica foi recalculada para ser expresso como picomol por centímetro quadrado de área de superfície da célula. A sensibilidade à insulina das células luteínicas foi avaliada pela determinação da concentração de insulina no semi-máxima eficaz (EC50) a partir da curva dose-resposta 2DGU.

Figura 2- Placa de cultivo esquematizada para procedimento de captação de glicose



4.10 IMUNO-CITOQUÍMICA

Para análise imuno-citoquímica, as células foram cultivadas em placas de cultivo de 12 poços, após confluência das células, estas foram incubadas com meio de cultivo acrescido de BSA (controle basal) e meio de cultivo estimulado com insulina 100nM por 20 minutos a 37°, ao término deste tempo as placas de cultivo preparadas com lamínulas foram fixadas com metanol, até a realização do experimento descrito a seguir.

A atividade peroxidase endógena foi bloqueada com Dual endogenous enzyme block (DAKO, S2003, Califórnia-USA) durante 10 minutos, em seguida, lavada em tampão PBS. Para reduzir ligações inespecíficas, as células foram incubadas por 10 minutos em solução de bloqueio Protein block serum-free (DAKO, X0909, Califórnia-USA). As células foram incubadas com o anticorpo primário GLUT4 (IgG policlonal de coelho, C-terminal humano, Milipore 07-1404) na diluição 1:2000 diluído em PBS, por 20 horas a 4ºC.

No dia seguinte as células foram lavadas três vezes em PBS, e incubadas com anticorpo secundário por 15 minutos, após este período estas foram lavadas novamente três vezes em PBS. Em seguida, incubaram-se por 15 minutos com o complexo STREPTAVIDIN + HRP (DAKO, K0690, Califórnia-USA) para a amplificação do sinal da reação. A reação de imuno-citoquímica específica foi revelada utilizando-se DAB + Substrate Cromogen System (DAKO, K3468, Califórnia, USA) por 30 segundos. As células foram novamente lavadas em água destilada (2 x 10 min), contracorados com Hematoxilina de Harris por 15 segundos, lavadas em água destilada três vezes de 5 minutos e, em seguida, montados com Permount®

(Fischer Scientific, 15969B, USA). Como controle negativo foram utilizados cortes que não receberam o anticorpo primário, apenas incubados com PBS.

4.11 PCR EM TEMPO REAL

Para a preservação do RNA, as amostras de tecidos foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a extração. Amostras de corpo lúteo, transportadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas em gelo (4ºC), pesadas e cortes feitos com lâmina de bisturi foram colocadas em tubos estéreis de 1,5 ml.

4.12 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Para a extração utilizou-se o reagente TRIzol®, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen™ Corporation, EUA). Em tubos livres de RNAse foi adicionado TRIzol® (1 ml), onde cada amostra passou por processo de homogeneização em Polytron em velocidade máxima de três ciclos, cada tubo foi homogeneizado vigorosamente em vortex por 10 segundos e centrifugados por 10 minutos (12.000 g) a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril (de 1,5 ml) contendo 200 µl de clorofórmio (200µl para cada 1 ml de TRIzol), os tubos foram agitados vigorosamente por aproximadamente 30 segundos e incubados em temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos, 12.000g a 4°C. Em seguida, novos tubos foram identificados e acrescidos de 500 µl álcool isopropílico, incubados por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugado por 15 minutos (12.000g) a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (RNA-Total) solubilizado com 1 ml de etanol 75% diluído em água ultrapura. Uma nova centrifugação foi realizada por 5 minutos, 9.000g à 4 °C, todo o conteúdo do eppendorf foi descartado, com exceção do precipitado (RNA Total). Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos para secagem e então o precipitado solubilizado em 10 µl de água ultrapura. Uma alíquota foi removida para quantificação e análise da qualidade, e o restante da solução armazenada imediatamente em freezer –80°C até sua utilização.

4.12.1 QUANTIFICAÇÃO DO RNA CÉLULAS TOTAL

Para a quantificação do RNA total as amostras foram diluídas na proporção 1:50, ou seja, em 49 µl de água ultrapura foram adicionados 1 µl do RNA total. A quantificação foi realizada no Biofotômetro (Eppendorf 22331, Hamburgo - Germany) a 260/280nm. Foi utilizada água ultrapura para calibração do equipamento.

4.13 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *IR*, *NFKB* e *IL6*

4.13.1 TRANSCRIÇÃO REVERSA

Para eliminar o DNA genômico, o RNA extraído foi tratado com DNAse I (Kit SuperScript III, Invitrogen®, Carlsband, USA), de modo que a solução final contivesse 1 µg de RNA total. A esta solução foram adicionados: 1 µl de tampão DNAse, 1 µl de DNAse I e água ultrapura, completando-se para o volume de 9 µl. Para inativar a atividade da DNAse I, foi adicionado 1 µl de EDTA. Após incubação por 10 minutos a 65°C, foram adicionados os iniciadores da reação, Oligo (dt - Invitrogen®) e dNTP (Invitrogen®) 10µM (1µl cada), incubou-se por 5 minutos a 65°C e por 1 minuto e 30 segundos em gelo. Em seguida, foram adicionados 4 µl de tampão, 1 µl de DTT (0,1M), 1 µl de inibidor RNAse (RNAse OUT Inhibitor - Invitrogen®) e 1 µl da enzima SuperScript III. Tubos estéreis de 0,5 ml contendo o RNA e os compostos para a síntese de cDNA foram colocados no termociclador, onde permaneceram por 50 minutos a 50°C, para ocorrer a transcrição do RNA em cDNA e, posteriormente, por 15 minutos a 70°C e 2 minutos a 4°C para inativação da enzima. Os cDNAs foram armazenados a -20°C.

As reações de PCR foram realizadas em um fluorometro automatizado (ABI PRISM™ 7500, Applied Biosystems, Foster, USA), usando placas ópticas de 96 poços. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Primeiramente, os cDNAs foram diluídos em água ultrapura autoclavada na proporção de 1:8, mantidos em gelo. Em seguida, foi preparado um mix para cada gene estudado contendo: 6,25 µl de TaqMan® qPCR MasterMix, 3,25 µl de água ultrapura autoclavada e 0,5 µl de primer/sonda (Tabela 1), totalizando 10 µl para cada

amostra. Este mix foi pipetado na placa e recebeu imediatamente 2,5 µl da respectiva amostra de cDNA. Após pipetar todas as amostras nos poços, a placa foi vedada com um parafilme óptico próprio, submetida à centrifugação rápida (menos de 1 minuto) e levada ao aparelho de PCR.

Neste sistema, as fases de anelamento, extensão e desnaturação ocorrem durante os ciclos de maneira similar quando da utilização do termociclador comum, uma vez que o ABIPrism 7500 é um termociclador acoplado a uma câmera CCD. A diferença é que a amplificação da sequência alvo é detectada em tempo real pela emissão de fluorescência, que ocorre quando há formação de dupla fita na região codificada pelo par de primers. A quantificação relativa da amplificação foi feita pela fluorescência captada pela unidade óptica do aparelho. Neste experimento as condições padronizadas de amplificação utilizadas foram: 2 minutos a 50°C – ativação da UNG (Uracil N-Glicosilase), que degrada resíduos de RNA caso as amostras não tenham sido tratadas com RNAse ao final da RT, evitando contaminações, 10 minutos a 95°C – ativação da polimerase (Amplitaq Gold®), 40 ciclos por 15 segundos a 95ºC e 60°C por 1 minuto, 15 segundos a 95°C – desnaturação para abertura da fita de cDNA. Aproximadamente a 70°C – ocorre o anelamento da sonda do TaqMan. Aproximadamente a 60°C – os primers se anelam e promovem a extensão da fita de DNA. Neste momento, a sonda Taqman é liberada e a fluorescência é emitida.

A quantificação relativa foi realizada normalizando-se os sinais desses genes com o sinal do gene *PPIA* (*ciclofilina A*) (como controle endógeno), através do programa LinRegPCR® versão 7.0 (RAMAKERS et al., 2003), seguido do método matemático de Pfaffl (PFAFFL, 2001) e análise estatística dos dados.

Tabela 1 – Primers e sondas utilizados para o PCR em tempo real

Gene	Primers	Sequencia	Sondas	GenBank nº *
	Reverse	5' GCTTCCGCTTCTCCTCCTT 3'		
RI	Forward	5'GCAGGATGAGGTGAATTGTTGTG 3'	AAAACGAGGCCCGAGGATTT	AIBJWTL_R
	Reverse	5'CCGAGACCTCAGTTTCCCCA3'		
PPIA	Forward			
	Reverse	ID Cf03986523_gH		XM_843327.1
IL6	Forward	5'AAAGAGCAAGGTAAAGAATCAGGATG3'	GTGATGTCTGCTCGGTAAG-TAMRA	
	Reverse	5'GCAGGATGAGGTGAATTGTTGTG3'		
NFKB	Forward	5'GCAGAAAGAGGACATTGAAGTGTATT3'	ACCAGGCTGGGAGGCCCGA-TAMRA	NW_876266.1
SLC2A4	Reverse	5' GCCTGCCAGAAAGAGTCTGAAG 3'	CAGTGCCCCAGATACAT	NM_001159327
	Forward	5' GCTTCCGCTTCTCCTCCTT 3'		

* GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.14 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA RI E NFKB

Para obtenção do material para imuno-histoquímica, amostras de tecidos foram fixadas em formol tamponado 4% por 24 horas. Após este período estas amostras foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS) e desidratadas em uma série crescente de etanol (70%, 90% e absolutos I, II e III; 1 hora cada), as amostras foram diafinizadas em xilol (I, II e III; 1 hora cada) e embebidas em parafina (I e II e de inclusão; 1 hora cada).

Os cortes de 2µm foram montados em lâminas silanizadas, desparafinizadas em xilol (2x 10 min), rehidratados em uma série de etanol em concentrações decrescentes (etanol 100% 2 x 5 minutos, etanol 95% 5 minutos, etanol 70% 5 minutos) e lavados em água corrente (5 minutos). Para a recuperação antigênica incubou-se em solução tampão citrato 10 nM, pH 6, por 5 minutos à temperatura ambiente, em seguida, as lâminas foram levadas ao micro-ondas (em potência alta) em tampão citrato durante 15 minutos. Após resfriamento de 20 minutos, foram realizadas duas lavagens com água destilada em tempos de dois minutos cada. Em seguida uma lavagem com PBS em agitação de 5 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com Peroxidase block (DAKO, 0679, Califórnia-USA) (10 minutos a temperatura ambiente e em câmara úmida). Os cortes foram lavados em tampão PBS / Triton X 0,3%, pH 7,2 - 7,4 (0,8 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4; 2,68 mM KCl, 137

mM NaCl), três vezes de 5 minutos, e incubadas em caseína (Protein block Serum-Free, X0909, Dako North America, Inc) por 10 minutos, à temperatura ambiente, para bloquear sítios de ligações inespecíficas. Em seguida, os cortes foram incubados por 22 horas a 4ºC com anticorpos primários específicos para cada proteína estudada (Quadro 2). Controles negativos foram incubados com um anticorpo monoclonal irrelevante, isotipo-específico em uma concentração igual ao do respectivo anticorpo primário (Coulter Immunotech Diagnostics, Germany). Após o período de incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em PBS por 3 vezes de 5 minutos cada. Retirou-se o excesso de solução e os cortes foram incubadas à temperatura ambiente, durante 15 minutos com anticorpo secundário biotinilado (Biotinylated Link; kit Dako LSAB + System-HRP, K0679, Dako North America, Inc). Os mesmos foram lavados em tampão PBS por três vezes de 5 minutos e incubados com o complexo estreptavidina-peroxidase (Streptavidin-HRP; kit Dako LSAB + System-HRP, K0679, Dako North America, Inc) por 15 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens em PBS por 5 minutos cada. Os cortes foram incubados durante 5 minutos com solução DAB (DAB + Subtrate buffer; kit Dako LSAB + System-HRP, K0679, Dako North America, Inc) para exposição da marcação da proteína estudada (marcação marrom). As lâminas foram lavadas 3 vezes em água destilada, por 5 minutos. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris por 30 segundos ou variável dependendo do corte, seguido de uma lavagem com água corrente por no máximo 10 minutos. Em seguida foram lavadas em uma sequência de etanol em diferentes concentrações por 2 minutos e xilol I e xilol II, respectivamente e fechadas com lamínula e Permont. Para validação positiva da imunolocalização foram feitos controles positivos utilizando cortes histológicos de músculo estriado esquelético de camundongos para RI e carcinoma humano para NFKB, onde foi testada a mesma concentração do anticorpo primário estudado.

Quadro 2 – Anticorpos usados na Imuno-histoquímica

Anticoorpos	**Isotipo**	**Epitope**	**Diluição**	**Fornecedor (n°ordem)**
RI	Rabbit polyclonal IgG	N-terminus human	1:100	Abcam (ab. 78424)
NFKB	Mouse monoclonal IgG3	Human p65	1:400	Milipore (MAB 3026)

4.15 IMUNO-FLORESCÊNCIA PARA PROTEÍNA IL6

O material fixado e processado de forma rotineira para inclusão histológica em parafina foi seccionado em cortes histológicos de 2µm de espessura. As lâminas contendo os tecidos parafinizados, foram imersas em xilol (Reagentes Analíticos Dinâmica) aquecido a 60°C por 20 minutos, e em seguida, em xilol à temperatura ambiente por mais 20 minutos, para que fossem desparafinizados. Logo depois foram hidratados com etanol 100%, duas vezes de 10 minutos cada. Em seguida, em álcool 90% e 70%, por 10 minutos cada. Na sequência, foram lavados com água destilada por 10 minutos, e em água corrente por mais 10 minutos. A recuperação antigênica foi realizada ao colocar as lâminas sob ação de tampão citrato de sódio (pH 6,0) aquecido por 10 minutos. Depois o material foi lavado duas vezes em PBS sob agitação, por 5 minutos cada vez. A permeabilização foi feita com a incubação, por 15 minutos, em PBS contendo 0,2% de Triton X-100 (Triton®, Merck).

Após a permeabilização, foram realizadas três lavagens das lâminas com PBS, por 5 minutos cada. Em seguida, foi feita a incubação deste material com Peroxidase Blocking (Ref. S2001, Dako®) por 30 minutos, para que houvesse o bloqueio das ligações dos anticorpos não-específicos. O material foi lavado duas vezes em PBS, sob agitação, por 5 minutos cada. Depois houve a incubação com Protein Block (Ref. X0909, Dako®), por 30 minutos. Novamente o material foi lavado com PBS por 5 minutos; e em seguida, incubado com o anticorpo primário (IgG2a mouse monoclonal, para IL6 ab9324 da empresa Abcam, Cambridge, UK, diluição 1:500).

No dia seguinte o material foi lavado uma vez em PBS, por 5 minutos; e incubado com o anticorpo secundário que continha o fluoróforo (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, A11029, Invitrogen®), por 2 horas no escuro. Depois, o material foi lavado mais uma vez em PBS, por 5 minutos; e foi feita a montagem das lâminas utilizando-se Vectashield (mounting médium for fluorescence with DAPI – H-1200, Vector Laboratories, Inc), e finalmente sendo selada, também no escuro, com esmalte para prevenir a secagem e a movimentação sob o microscópio. As lâminas foram armazenadas no escuro à 4°C. O material foi observado e fotografado ao microscópio para imuno-florescênicia (Olympus BX 60), utilizando-se o programa AxioVision (AxioCam HRc – Zeiss).

4.16 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS PARA WESTERN BLOTTING

Para quantificação do RI e dos possíveis reguladores de GLUT4, NFKB e IL6, amostras de CL de cadelas foram coletadas em fragmentos de tecidos e imediatamente armazenadas em criotubos em nitrogênio líquido e posteriormente em -80°C até a extração de proteínas.

Após pesado o tecido foi cortado a fim de separar o que seria utilizado, em cima de uma placa de Petri com gelo seco para não desnaturar as proteínas. Em seguida, no tubo para homogeneização (falcon), foi colocado em solução tampão de lise (Tris 10mM, EDTA 1mM, Sacarose 250 nM e Água ultrapura pH 7.4), na presença de uma mistura de inibidores de proteases, tais como benzamida (20µg/ml), pepstatina (1µg/ml), leupeptina (0.5µg/ml), apoproteína (0.1µg/ml) e PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride, 100µg/ml), em uma proporção de 1:6 (peso/volume) (ex. 0, 0881g – 500ul (tampão) Xg (peso tecido)- Xul), sempre conservado em gelo. Foi homogeneizado em Polytron PT 3000 KINEMATICA® (Brinkman, Westbury, USA) em velocidade máxima por no máximo 3 ciclos de 10 segundos para dissociar e romper a célula. Após homogeneização, o material extraído foi colocado em eppendorfs mantidos no gelo para transporte e posterior centrifugação, a 1000g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foi separado o sobrenadante. O pellet foi resuspenso em mesmo tampão (1/3 do volume inicial) e submetido ao vortex, posteriormente à centrifugação por 1000g, 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante então foi desprezado e o sedimento resuspenso novamente em tampão de homogeneização. O produto foi estocado a -20°C até a realização do experimento western blotting.

A concentração de proteína das amostras foi analisada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) (Protein Assay Kit; Bio-Rad, Califórnia, USA), comparando as medidas obtidas para as amostras com a curva padrão de albumina lida a 595 nm.

4.17 WESTERN BLOTTING

Para a realização do western blotting foi utilizado 50ug das amostras de proteínas totais de corpos lúteos. As amostras foram separadas em um mini gel SDS-poliacrilamida (Mini Protean II System, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, EUA), 6% para receptor de insulina e 12% para NFKB e IL6. A eletroforese foi realizada a 100V durante 2 horas (ou até que as proteínas completassem a corrida). Após a separação em gel, foi realizada a transferência eletroforética para uma membrana de fifluoreto de polivinilideno (immunoblot Bio-Rad Laboratories, Inc.), sob corrente constante de 400V, durante 2 horas, a 4ºC, em tampão Tris HCl 12,5 mM, glicina 95 mM, metanol 20%, pH 8,3. Em seguida, foi realizado o bloqueio da reação de transferência utilizando TTBS (Tween 20 0,1% em tampão Tris: 100 mM Tris, cloreto de sódio 0,9%, pH 7,5) acrescido de leite desnatado em pó (5%) por 1 hora à temperatura ambiente (20-25°C) com agitação constante. A membrana foi lavada três vezes em TTBS, com intervalos de cinco minutos e incubadas com o anticorpo primário específico para cada proteína testada overnight a 4°C.

No dia seguinte, foram realizadas três lavagens em TTBS e incubação de 1 hora, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (anticorpo conjugado à peroxidase IgG anti-mouse ECL, Amersham Biosciences, NJ-USA) na titulação de 1:7500, diluído em solução de 2,5% de leite desnatado. Após este processo, cada membrana correspondente a cada proteína foi lavadas três vezes em TTBS durante 5 minutos. O sinal foi detectado pela adição de um substrato para peroxidase (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce), por 5 minutos, o qual produz uma reação de luminescência no local da ligação do segundo anticorpo. As membranas foram expostas a um filme de fotográfico (Hyperfilm - Amersham), a temperatura ambiente, durante 10 minutos. O filme foi revelado com solução reveladora e reforçadora GBX e solução fixadora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira).

4.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A expressão diferencial dos RNAm e proteínas estudados ao longo do ciclo estral no CL foi avaliado pelo teste ANOVA. Caso os dados não apresentassem distribuição normal, foi aplicado o Teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico) seguido do Teste de Comparações Múltiplas de Dunn. Para testar a relação entre as expressões dos RNAm e proteínas bem como, entre estes e a glicemia e a insulinemia, além da concentração plasmática de P4 e E2, foi aplicado o Teste de Correlação de Pearson. Para todos os testes foi utilizado o software estatístico GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) e o nível de significância adotado foi de 0,05.

5 RESULTADOS

5. RESULTADOS

Inicialmente, estão demonstrados os perfis séricos de P4 e E2, bem como os índices de insulinemia e glicemia. Mesmo não pertencendo exclusivamente a este trabalho, os valores serão apresentados por terem sido utilizados para as análises de correlação desta dissertação.

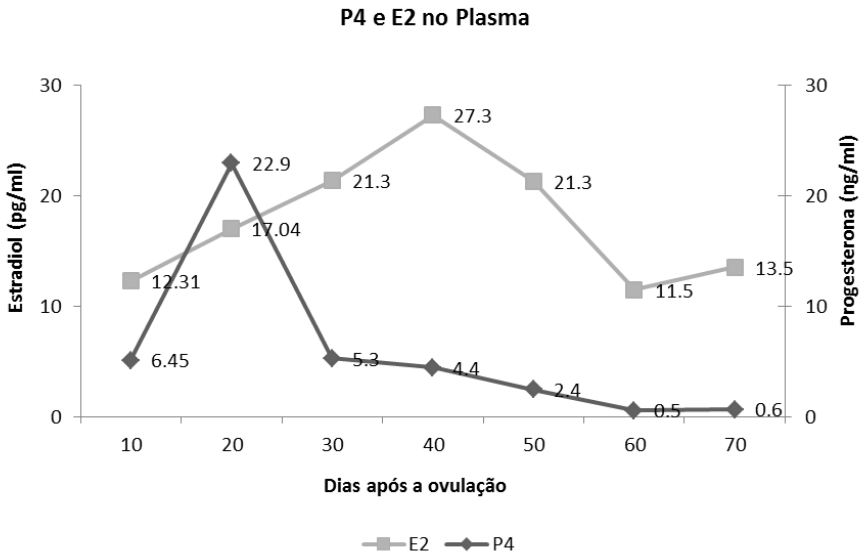
Posteriormente são demonstrados os resultados obtidos de expressão de *RI* e *SLC2A4* em células luteínicas em cultura após estímulo da insulina, e os índices de captação de glicose pelas mesmas.

Por fim, os resultados relativos à imunolocalização do receptor de insulina, NFKB e IL6 em corpo lúteo de cadelas, seguido das análises da quantificação proteica e gênica destas amostras. Correlações entre a expressão gênica do receptor de insulina, o *NFKB* e *IL6*, bem como com os perfis hormonais de P4 e E2 e a insulina também serão apresentados.

5.1 PERFIL SÉRICO DE PROGESTERONA E 17β-ESTRADIOL

Através das análises hormonais foi possível estabelecer o perfil apresentado durante o diestro do ciclo estral das cadelas, onde, os níveis séricos de P4 atingiram valores máximos de 22,96 ng/ml no dia 20 após a ovulação, diminuindo gradativamente até o dia 70 (0,68ng/ml), enquanto os níveis séricos de E2 aumentaram continuamente, atingindo o valor máximo de 27,34 pg/ml no dia 40 após a ovulação e diminuindo para 11,52 pg/ml no dia 60 p.o, assim como podemos visualizar na figura 3.

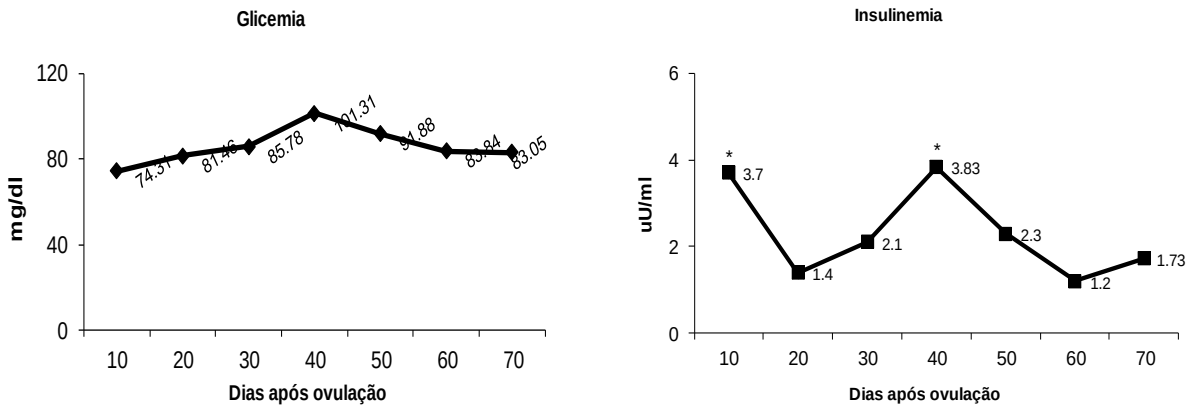
Figura 3 – Concentrações séricas de progesterona (ng/ml; linha cinza escura) e 17β-estradiol (pg/ml; linha cinza claro) ao longo do diestro em cadelas. Maiores concentrações foram observadas no dia 20 po e 40 po para progesterona e 17β-estradiol, respectivamente



5.2 PERFIL SÉRICO DE INSULINEMIA E GLICEMIA

Na figura 4 são apresentados os resultados obtidos para glicemia e insulinemia. Não houve diferenças significativas entre as médias de glicemia no decorrer do diestro ($p>0,05$). No entanto, os níveis insulinêmicos foram significativamente maiores nos dias 10 e 40 após a ovulação e menores no dia 60 ($p\leq0,05$).

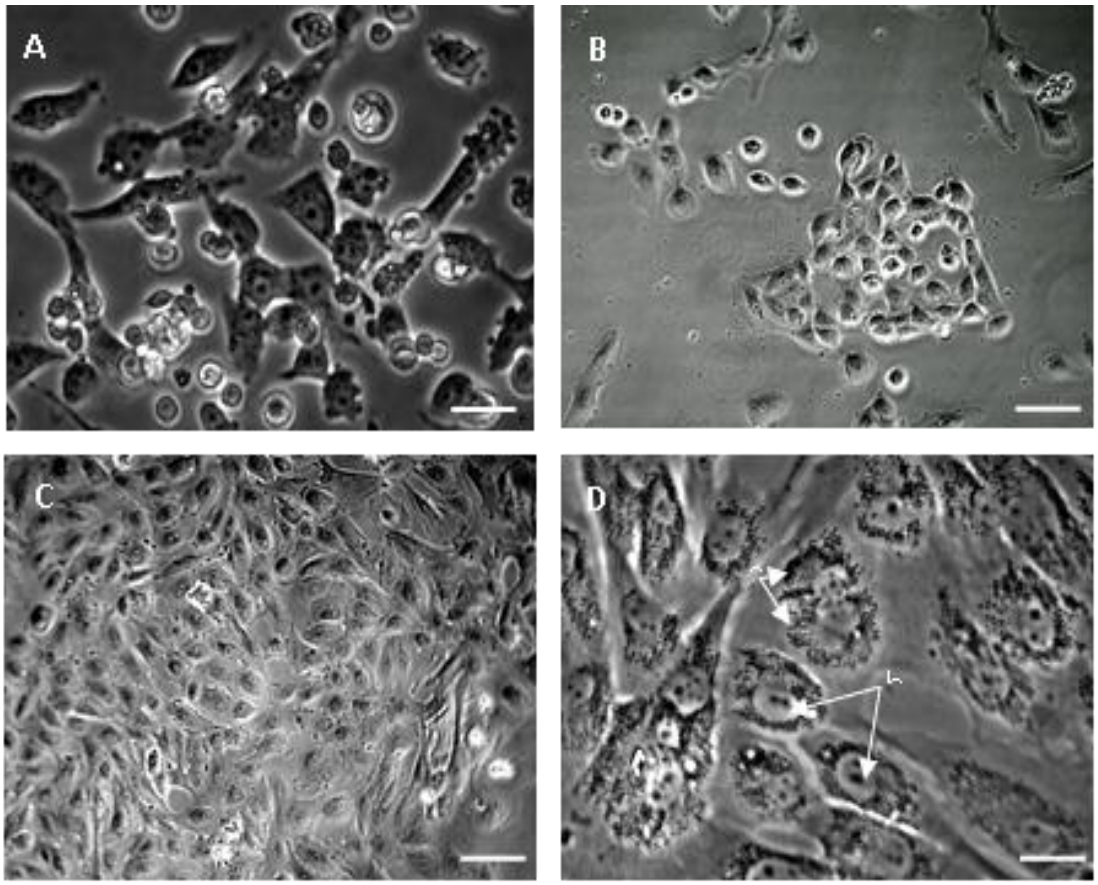
Figura 4 – Concentrações de glicose (mg/dl; esquerda) e de insulina (µU/ml; direita) ao longo do diestro em cadelas. 10 – 70: dias após a ovulação. * valores aumentados de insulinemia em relação às demais fases do diestro



5.3 CULTIVO CELULAR

Células obtidas de diferentes cadelas, cultivadas em DMEM. Dentro de 5-7 dias, desenvolveu-se uma monocamada celular confluente (≥ 80%), cujas células apresentaram formato poligonal (estrelado), núcleo arredondado e numerosas inclusões citoplasmáticas granulares e vacúolos de lipídios (Figura 5).

Figura 5 - Cultivo primário de células luteínicas de cadelas. A – Células em processo de adesão à placa de petri após 24 h. B – Agrupamento de células luteínicas após 2-3 dias de cultivo. C – Monocamada confluente formada por células luteínicas após 5-7 dias. D – Fotomicrografia de células luteínicas caninas demonstrando o formato poligonal característico, grânulos e vacúolos de lipídeos (a) e núcleo (b). Letras A, B e C aumento 40x; D aumento 100x. Barras = 50 µm

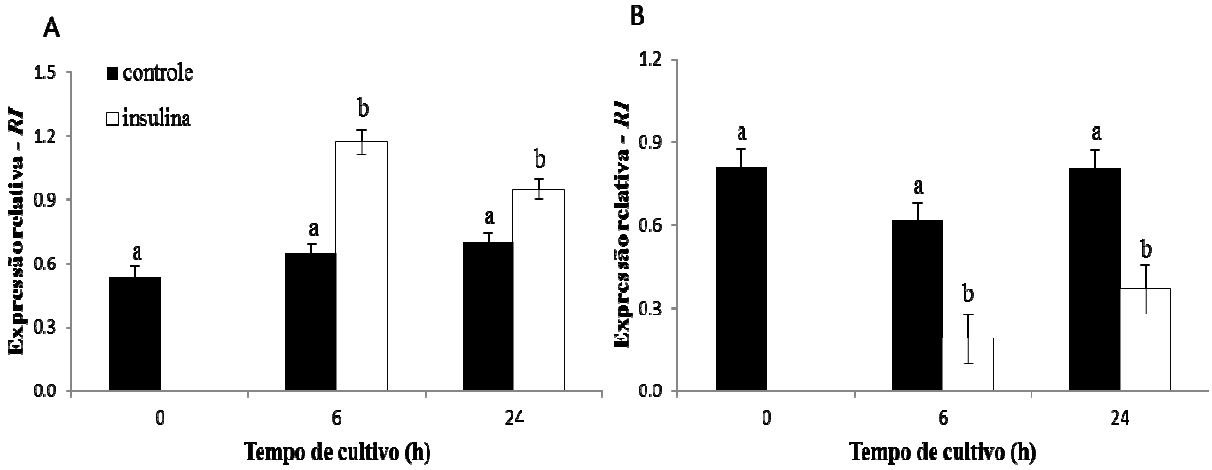


Após confluência, estas células foram utilizadas para experimento com adição de insulina para mensuração da expressão gênica de *RI* e *SLC2A4*.

A expressão gênica do *RI* foi regulada diferencialmente aos 20 e 40 dias po sob o mesmo estímulo insulínico. No dia 20 houve um aumento bastante significativo as 6 e 24

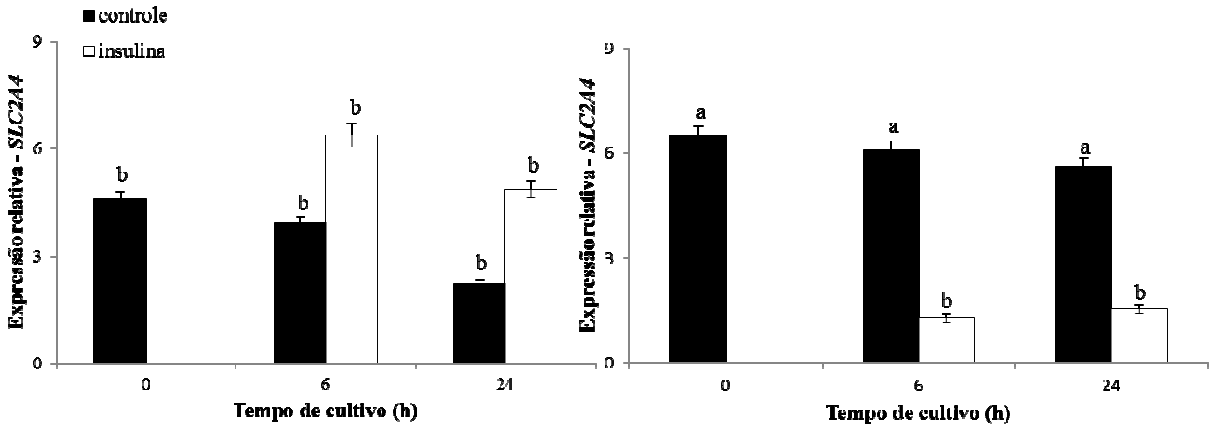
horas após início do tratamento, enquanto que os valores de *RI* de células não tratadas mantiveram-se constantes. Células do dia 40 po apresentaram diminuição da expressão do *RI* sob estímulo insulínico enquanto células não tratadas não modificaram sua expressão de *RI* (Figura 6).

Figura 6 - Expressão gênica do *RI* em células luteínicas caninas após tratamento com insulina. A: expressão gênica do *RI* no dia 20 após a ovulação. B: expressão gênica *RI* no dia 40 após a ovulação. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa (p<0,05)



A expressão gênica de *SLC2A4* seguiu o mesmo padrão descrito para de *RI*, ou seja, aumentou ($p < 0,05$) em células do dia 20 po e diminuiu ($p < 0,05$) em células do dia 40 po sob estímulo insulínico (Figura 7).

Figura 7 - Expressão gênica do *SLC2A4* em células luteínicas caninas após tratamento com insulina. A: expressão gênica do *SLC2A4* no dia 20 após a ovulação. B: expressão gênica *SLC2A4* no dia 40 após a ovulação. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa (p<0,05)



5.4 CAPTAÇÃO DE GLICOSE

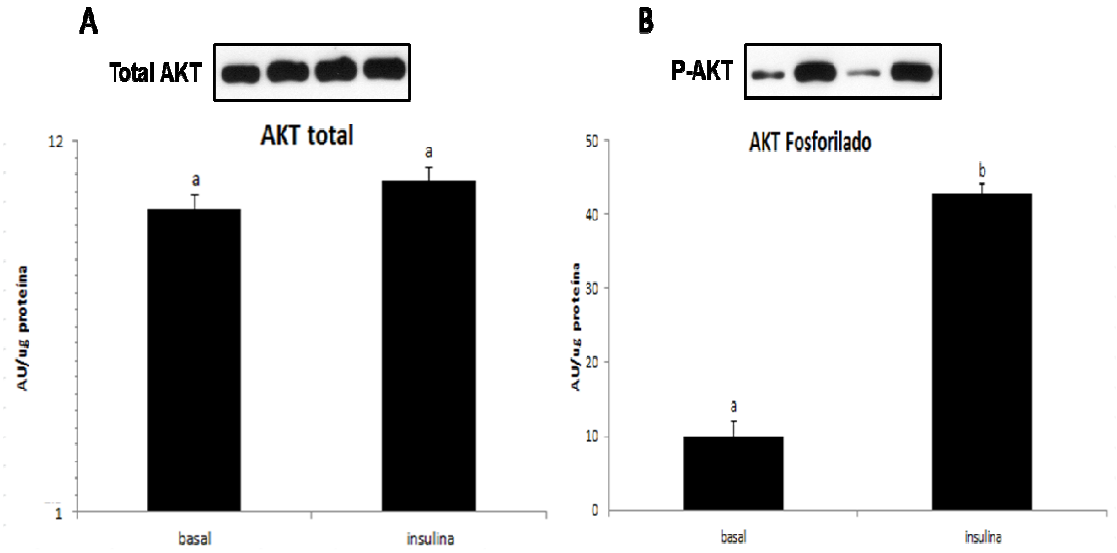
Através da captação de glicose foi possível verificar que as células luteínicas caninas do dia 30 po respondem aumentando a captação de glicose após tratamento com insulina a 100 nM por 20 minutos. Quando comparados os níveis basais de captação de glicose com aqueles estimulados pela insulina, verificamos aumento considerável tanto em relação à quantidade de proteínas totais como em relação à quantidade de células (Tabela 2).

Tabela 2 - Captação de glicose em células luteínicas caninas do dia 30 após ovulação. Células em condição basal e estimulada com insulina (100nM) por 20 minutos.

	Basal	Insulina	P
Captação de glicose (cpm/ug proteína)	2.05 ± 0.8	5.73 ± 0.5	<0.01
Captação de glicose (cpm/10^6 células)	79.6 ± 35.3	212.5 ± 34.5	<0.05

Para confirmar que houve ativação da sinalização insulínica, foi realizado western blotting para quantificação da proteína AKT total e fosforilada, que participa da via principal responsável pelo sinal para a translocação de GLUT4. Os valores proteicos de AKT total mantiveram-se constantes mesmo com adição de insulina enquanto o AKT fosforilado aumentou após a adição de insulina (Figura 8).

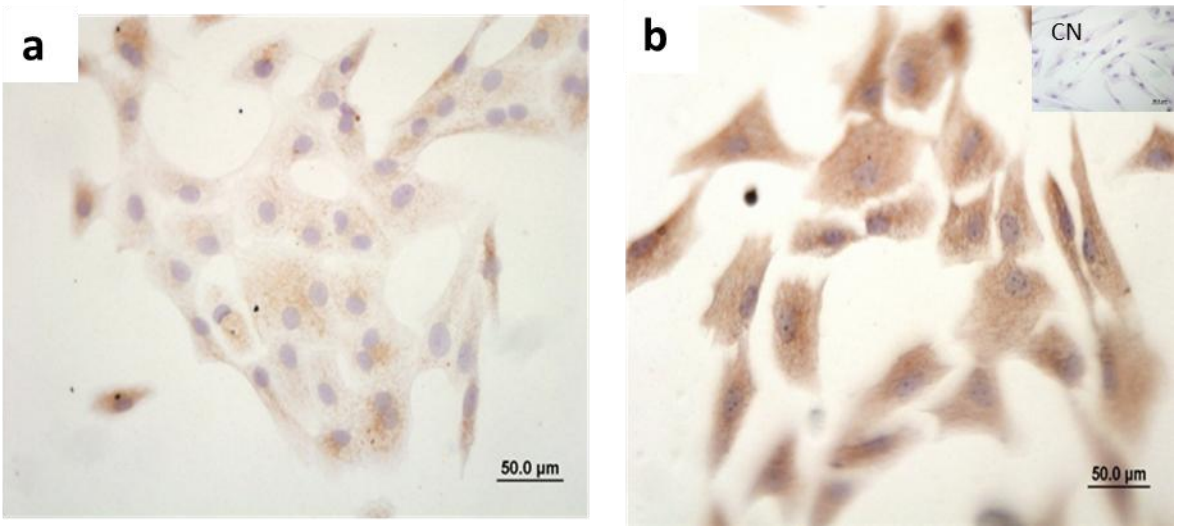
Figura 8 - Expressão proteica de AKT total e AKT fosforilado antes e depois da adição de insulina às células luteínicas. A: Blot AKT total células luteínicas em condições basal e após adição de insulina. B: Blot AKT fosforilado em condição basal e após adição de insulina. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.



5.5 IMUNO-CITOQUÍMICA DE GLUT4 EM CÉLULAS LUTEÍNICAS SOB ESTIMULAÇÃO DE INSULINA

Foi realizada imuno-citoquímica para GLUT4 após estimulação das células luteínicas com insulina, para confirmação do aumento de expressão do GLUT4. Na figura 16 é possível verificar uma maior intensidade na marcação marrom citoplasmática das células tratadas com insulina (Figura b), quando comparadas às células em condição basal (Figura a) onde sua marcação é bem menos expressiva.

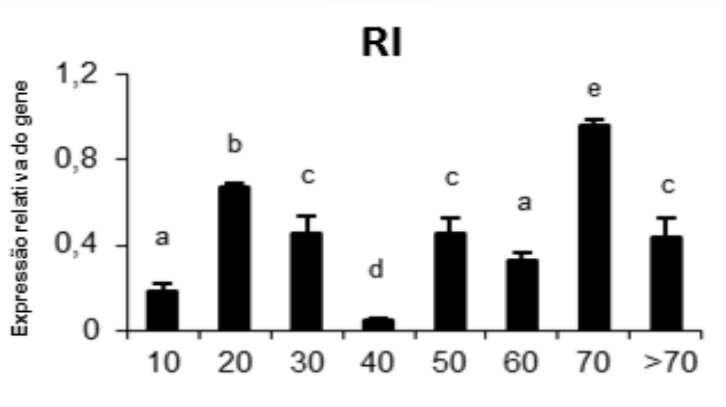
Figura 9 - Imunocitoquímica para GLUT4 (sinal positivo equivale a cor laranja e ou marrom) em células luteínicas estimuladas ou não pela insulina em experimento de captação de glicose. A: GLUT4 em células luteínicas sem adição de insulina. B: GLUT4 em células luteínias com adição de insulina. Insert: controle negativo. Barra 50µm



5.6 EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES DE INSULINA EM CORPO LÚTEO DE CADELAS DURANTE O DIESTRO

A expressão gênica dos receptores de insulina (Figura 10) foi regulada diferencialmente durante o diestro: foi observada uma *up regulation* nos dias 20 e 70 e *down regulation* em torno do dia 40 po. Ressalta-se que esta queda de expressão gênica acontece coincidindo com o declínio de produção de progesterona e com o aumento da taxa de resistência insulínica. Observamos diferenças significativas entre os grupos conforme demonstram as diferentes letras sobre as barras.

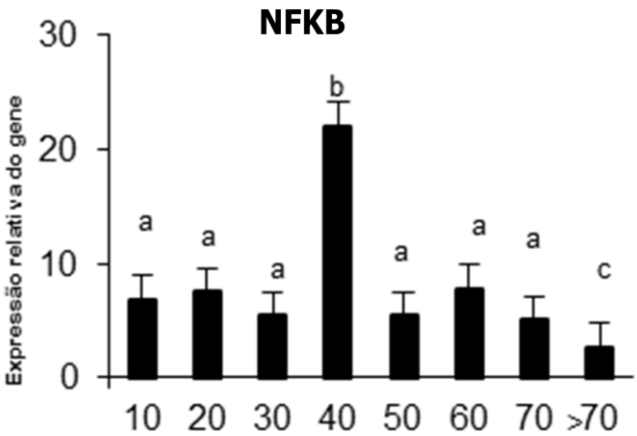
Figura 10 - Expressão de receptores de insulina em corpo lúteo de cadelas durante o diestro. Expressão relativa do gene (média ± desvio padrão, n= 4). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre os grupos; 10 – 70: dias após a ovulação.



5.7 EXPRESSÃO GÊNICA DE *NFKB* EM CORPO LÚTEO DE CADELAS DURANTE O DIESTRO

O *NFKB* apresenta expressão aumentada no dia 40 po e diminuída a partir do dia 70 po. Percebe-se que no CL a expressão é constante e um pico de expressão ($p < 0.05$) ocorre no dia 40 po (Figura 11).

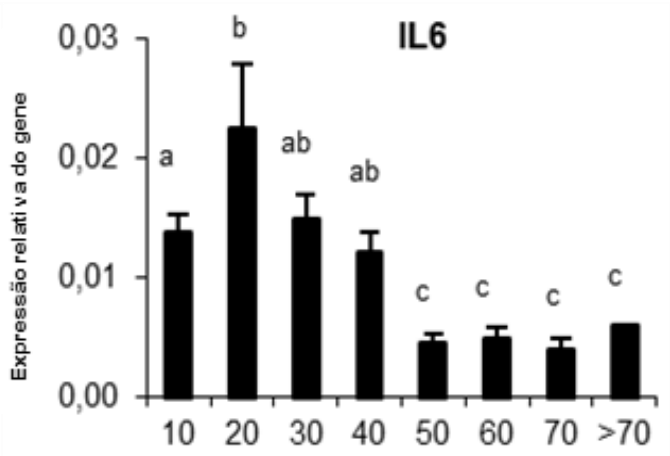
Figura 11 - Expressão de NFKB em corpo lúteo de cadelas durante o diestro. Expressão relativa do gene (média ± desvio padrão, n= 4). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre os grupos; 10 – >70: dias após a ovulação.



5.8 EXPRESSÃO GÊNICA DE *IL6* EM CORPO LÚTEO DE CADELAS DURANTE O DIESTRO

A expressão do *IL6* mostrou-se bastante variável ao longo do diestro do ciclo estral canino. Pode-se observar uma maior expressão no início do diestro nos dias 10, 20, 30 e 40 po ($p < 0.01$). Após este período, observou-se que a expressão gênica de *IL6* sofre um declínio, fato este que se mantém até o final do diestro e início do anestro (figura 12).

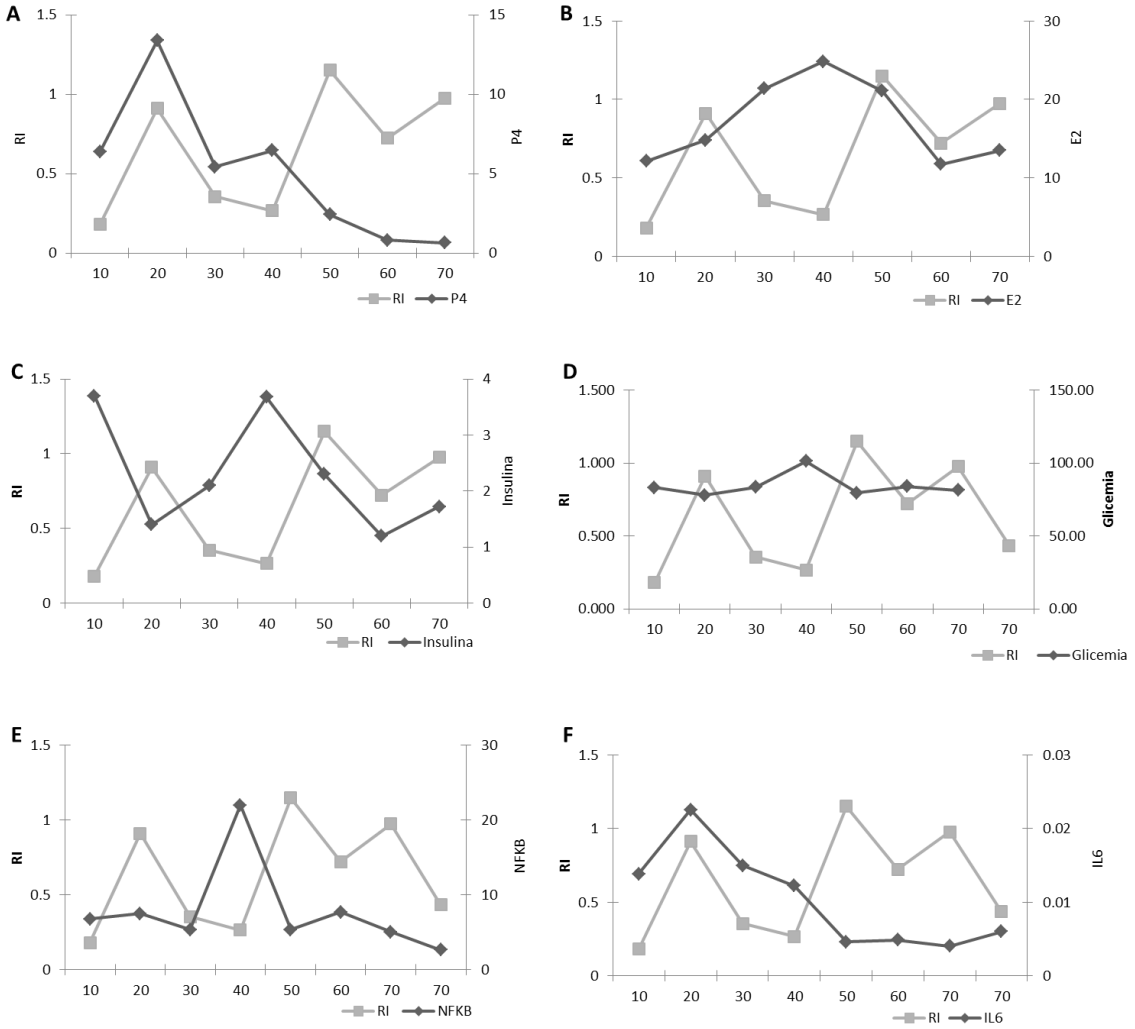
Figura 12 - Expressão de *IL6* em corpo lúteo de cadelas durante o diestro. Expressão relativa do gene (média ± desvio padrão, n= 4). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos; 10 – 70: dias após a ovulação



5.9 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES ESTUDADOS E A PRODUÇÃO HORMONAL

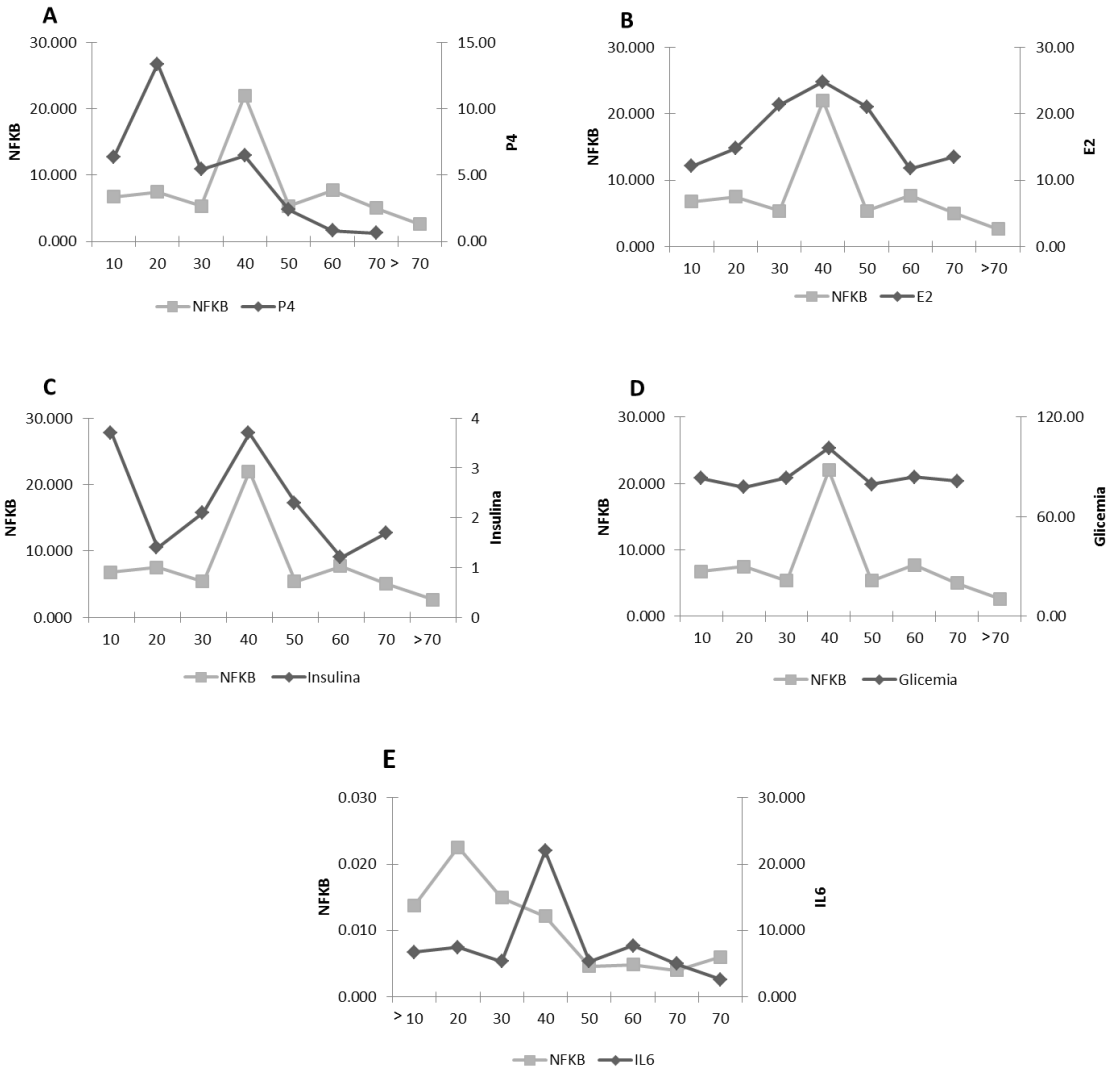
A expressão do RI foi negativamente associada com os níveis de insulina ($r = -0,69$ $P = 0,006$) ao longo diestro. Nenhuma correlação pode ser observada entre a expressão RI e P4, glicemia e as concentrações de E2. A expressão do *RI* foi correlacionada positivamente com IL6 ($r = 0,96$, $P <0,0001$) do dia 10 ao 40, enquanto o *RI* foi negativamente correlacionado com a expressão de *NFKB* ($r = -0,57$ $P <0,05$) nos dias 30, 40 e 50 (figura 13).

Figura 13 –. Linhas de tendência demostrando a correlação do *RI* com diferentes perfis estudados. A: Receptor de insulina x progesterona; B: Receptor de insulina x 17β-estradiol; C: Receptor de insulina x insulina; D: Receptor de insulina x Glicemia; E: Receptor de insulina x *NFKB*; F: Receptor de insulina x *IL6*



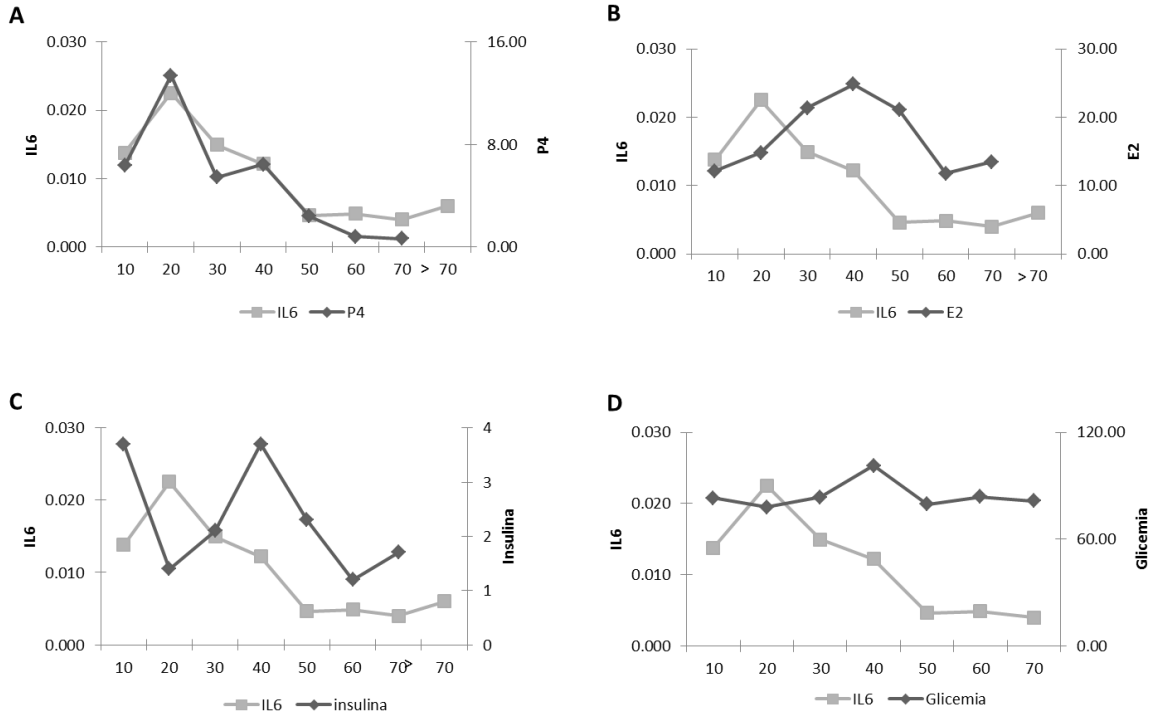
Houve correlação positiva entre a expressão de *NFKB* e E2 (r= 0,99, P= 0,001) durante toda a fase luteínica, com a glicemia na segunda metade do diestro (40, 50, 60,70 dpo; r= 0,94, P= 0,001) e com *IL6* nos dias 10, 20, 30, 50 e 70 do diestro (r= 0,84, P= 0,002). Não houve correlação entre *NFKB* e P4 ou insulina (figura 14).

Figura 14 –. Linhas de tendência demostrando a correlação do NFKB com diferentes perfis estudados. A: NFKB x progesterona; B: NFKB x 17β-estradiol; C: NFKB x insulina; D: NFKB x Glicemia E: NFKB x IL6.



A expressão gênica de IL6 foi correlacionada positivamente com P4 (r= 0,87 P= 0,009). Em relação ao E2, insulina e glicemia não houve correlação (Figura 15).

Figura 15 – Linhas de tendência demostrando a correlação do IL6 com diferentes perfis estudados. A: IL6 x progesterona; B: IL6 x 17β-estradiol; C: IL6 x insulina; D: IL6 x Glicemia

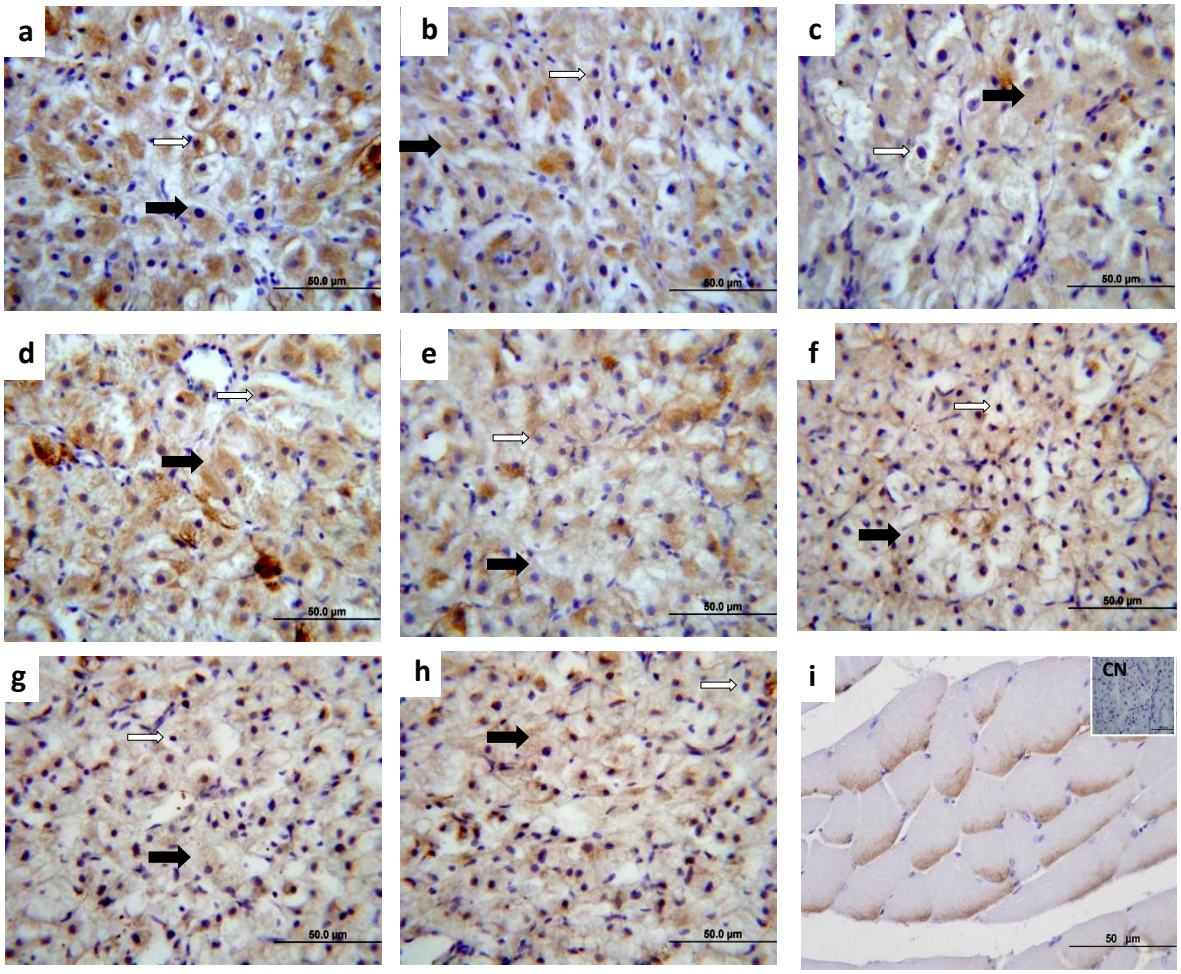


5.10 IMUNOLOCALIZÃO DE RECEPTORES DE INSULINA NO CORPO LÚTEO CANINO AO LONGO DO DIESTRO

Através da imuno-histoquímica pode-se observar a distribuição tecidual do RI durante o diestro. Visualmente foi possível verificar sua marcação de diferentes maneiras ao longo desta fase do ciclo estral. No dia 10 sua marcação apresenta-se mais intensa no compartimento citoplasmático das células luteínicas, quando comparado com os outros períodos estudados, os quais apresentam uma diminuição gradativa do sinal positivo (Figura 16). Células endoteliais apresentam marcação nos dias 40, 50, 70 e mais que 70; em contrapartida, as do estroma apresentam marcação citoplasmática mais evidente entre os dias 10 e 40 po, a qual diminui gradativamente. A expressão do RI localiza-se apenas no citoplasma das células. Não foi identificado RI no núcleo em nenhum momento estudado, o

que era de se esperar uma vez que os receptores de insulina encontram-se distribuídos em membranas de diferentes células.

Figura 16- Imunolocalização dos receptores de insulina em corpo lúteo de cadelas ao longo do diestro. A:10 dias; B:20 dias; C:30 dias; D:40 dias; E:50 dias; F:60 dias; G:70 dias e H: mais de 70 dias po. Setas pretas indicam a marcação citoplasmática tecidual e setas brancas indicam o núcleo. Controle positivo de músculo estriado esquelético de camundongo. Aumento 40x. Barra 50µm

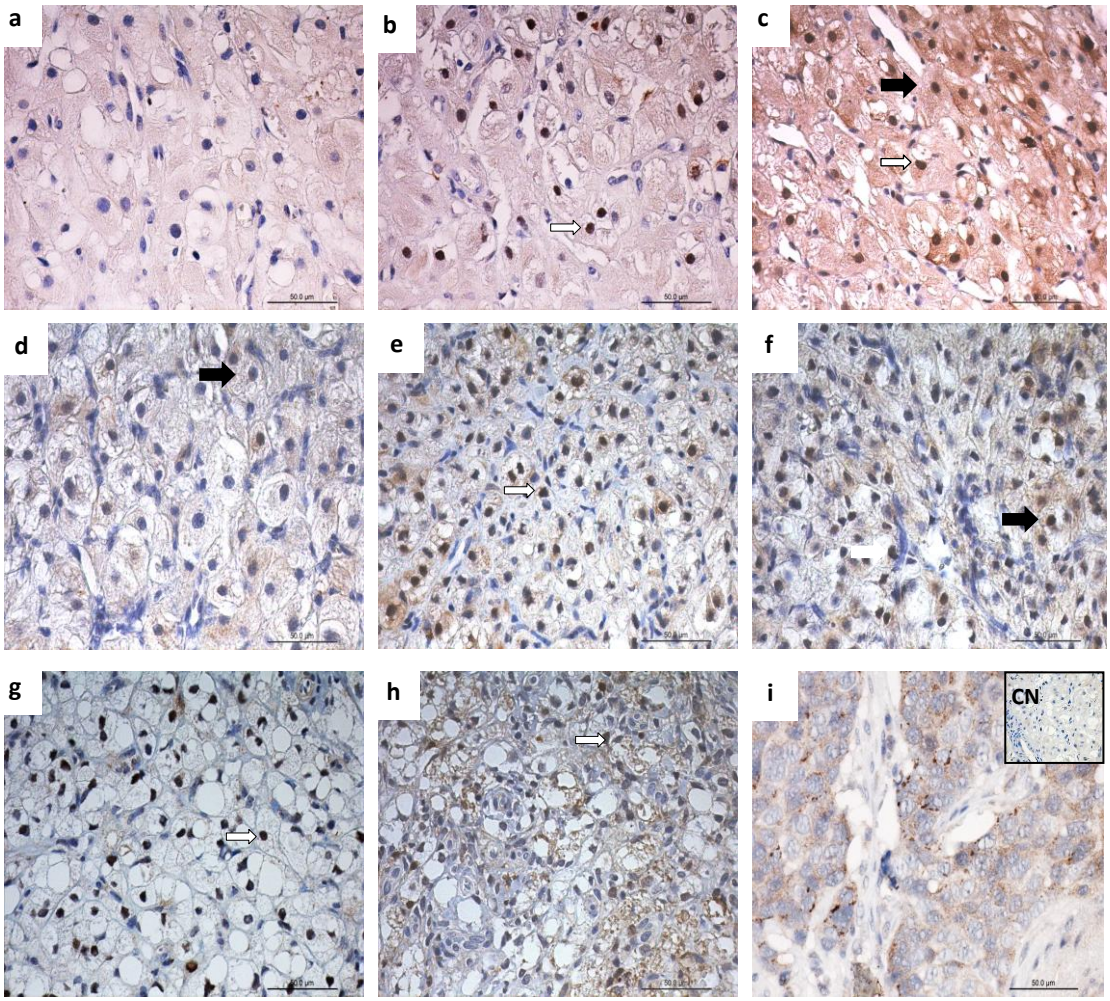


5.11 IMUNOLOCALIZAÇÃO DO NFKB EM CL DE CADELAS

A imunolocalização de NFKB pode ser observada no corpo lúteo ao longo do diestro do ciclo estral das cadelas. A marcação para esta proteína se dá não apenas no citoplasma como também no núcleo a depender da fase do ciclo observada. A localização nuclear denota ativação do fator nuclear de transcrição e a citoplasmática a proteína não ativa (Figura 17). Pode-se observar uma marcação citoplasmática intensa das células luteínicas no dia 30 e uma

diminuição na intensidade do sinal nas demais fases do diestro. Quando visualizamos a marcação nuclear esta imunolocalização está presente nos dias 20, 30,40, 50, 60, 70 e >70 de forma bastante evidente. Células endoteliais e do estroma apresentam marcação citoplasmática e nuclear evidente no dia 30, fato este que não ocorre nas outras fases do diestro.

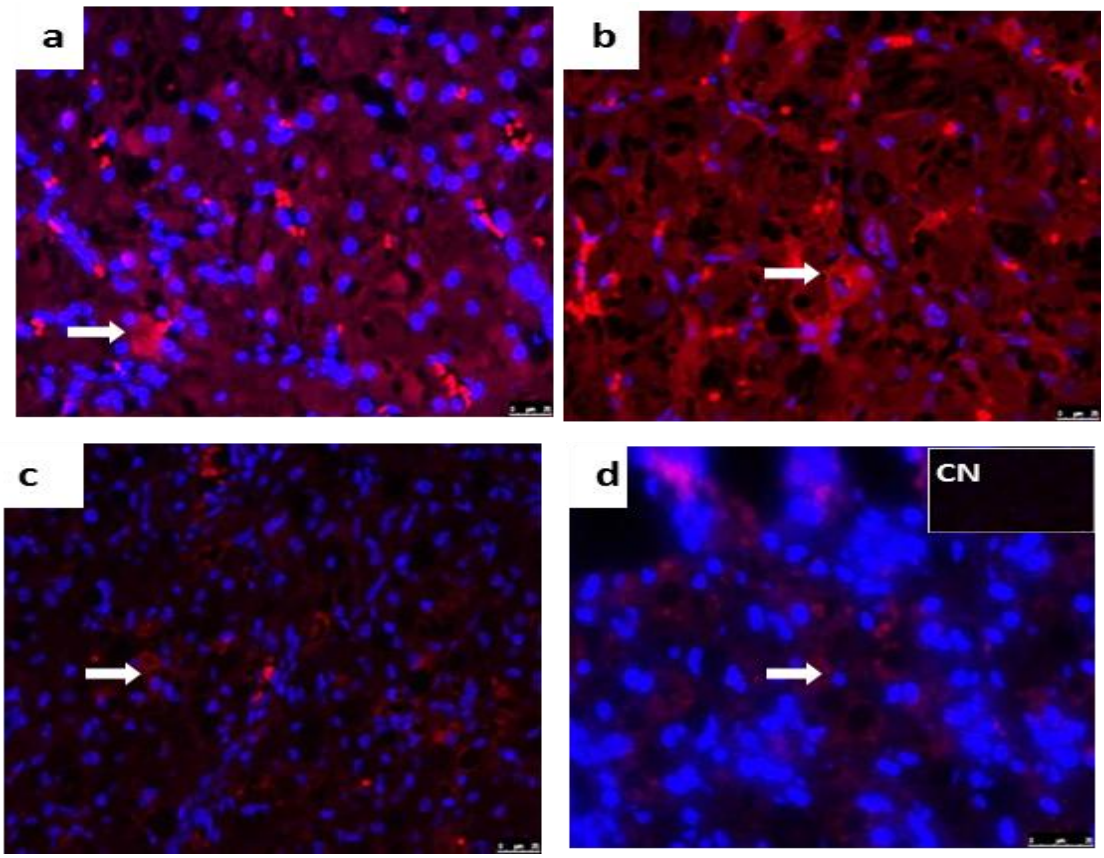
Figura 17- Imunolocalização de NFKB em corpo lúteo de cadelas ao longo do diestro. A:10 dias; B:20 dias; C:30 dias; D:40 dias; E:50 dias; F:60 dias; G:70 dias e H: mais de 70 dias po. Setas pretas indicam a marcação citoplasmática tecidual e setas brancas indicam imunolocalização no núcleo. Controle positivo de carcinoma humano. Aumento 40x. Barra 50µm



5.12 IMUNOLOCALIZAÇÃO DO IL6 EM CL DE CADELAS

Através da imuno-fluorescência foi possível verificar uma diferença na intensidade da marcação positiva nas células luteínicas durante o diestro do ciclo estral canino. Pode-se observar que a presença de IL6 ocorre mais intensa nos dias 10, 30, 70 e >70 (Figura 18) do diestro em células luteínicas. Nos outros períodos estudados a marcação citoplasmática não ocorre de maneira tão evidente. A intensidade de marcação positiva (sinal vermelho) foi mais alta no dia 30 p.o. (C). Células do estroma e endoteliais aparentemente não apresentam marcação.

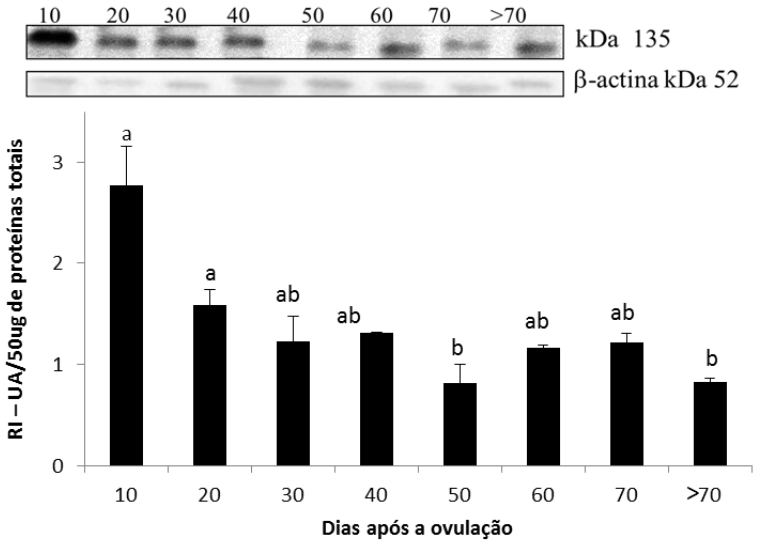
Figura 18- Imunoflorescência de IL6 em corpo lúteo de cadelas ao longo do diestro. A:10 dias; B:30 dias; C:70 dias; D:>70 dias po. Setas brancas indicam a marcação citoplasmática tecidual em vermelho. Aumento 40x. Barra 50µm



5.13 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOT

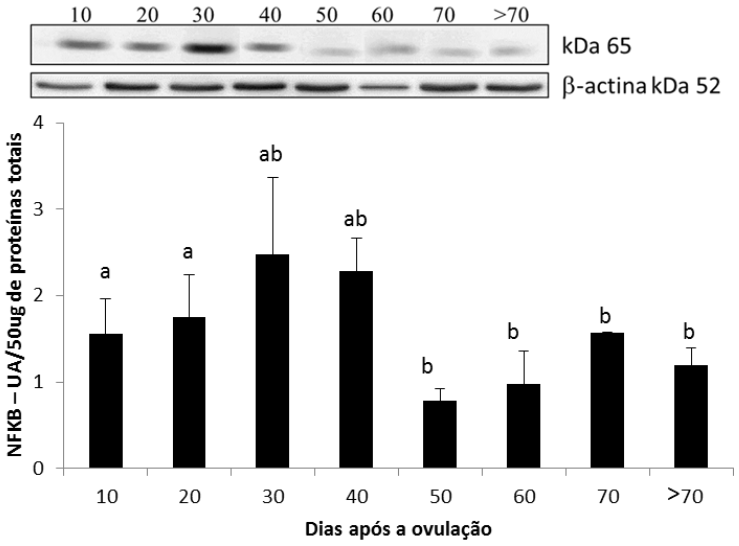
As proteínas RI, NFKB e IL6 foram quantificadas pela técnica de Western Blotting. Para a proteína RI foi observada uma banda de aproximadamente 135 kDa (Figura 19). A expressão do receptor de insulina esteve presente em todas as fases do diestro. Houve uma expressão maior no dia 10 po, seguida de diminuição ao longo da fase luteínica. Houve diferença significativa entre os grupos estudados.

Figura 19 – Expressão da proteína RI em corpo lúteo canino. Blots ilustrativos e gráficos representam o conteúdo expresso em unidades arbitrárias (UA)/50 µg de proteína em relação à beta-actina. As barras representam a média ±desvio padrão de n= 4. * representa diferença significativa (p<0,05) entre os grupos



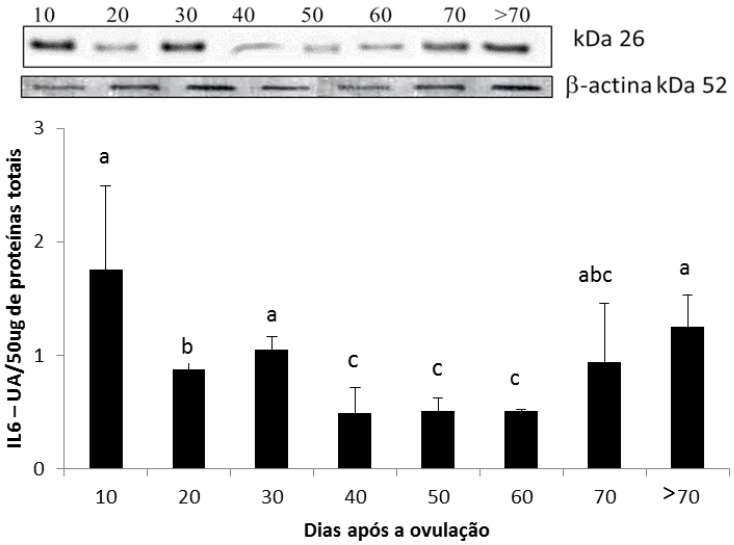
Uma banda de 65 kDa correspondente a proteína NFKB foi observada em todos os períodos estudados do diestro. Na primeira metade do diestro a expressão proteica mostrou-se mais elevada, decaindo após dia 50 po (Figura 20).

Figura 20 – Expressão da proteína NFKB em corpo lúteo canino. Blots ilustrativos e gráficos representam o conteúdo expresso em unidades arbitrárias (UA)/50 µg de proteína em relação à beta-actina. As barras representam a média ±desvio padrão de n= 4. * representa diferença significativa (p<0,05) entre os grupos



Uma banda de aproximadamente 26 kDa correspondente ao IL6 (figura 21) foi observada em todos os períodos estudados. A expressão proteica mostrou-se maior nos dias 10, 30, 70 e >70 e não tão intensa nos outros períodos estudados. Houve diferença significativa estre grupos.

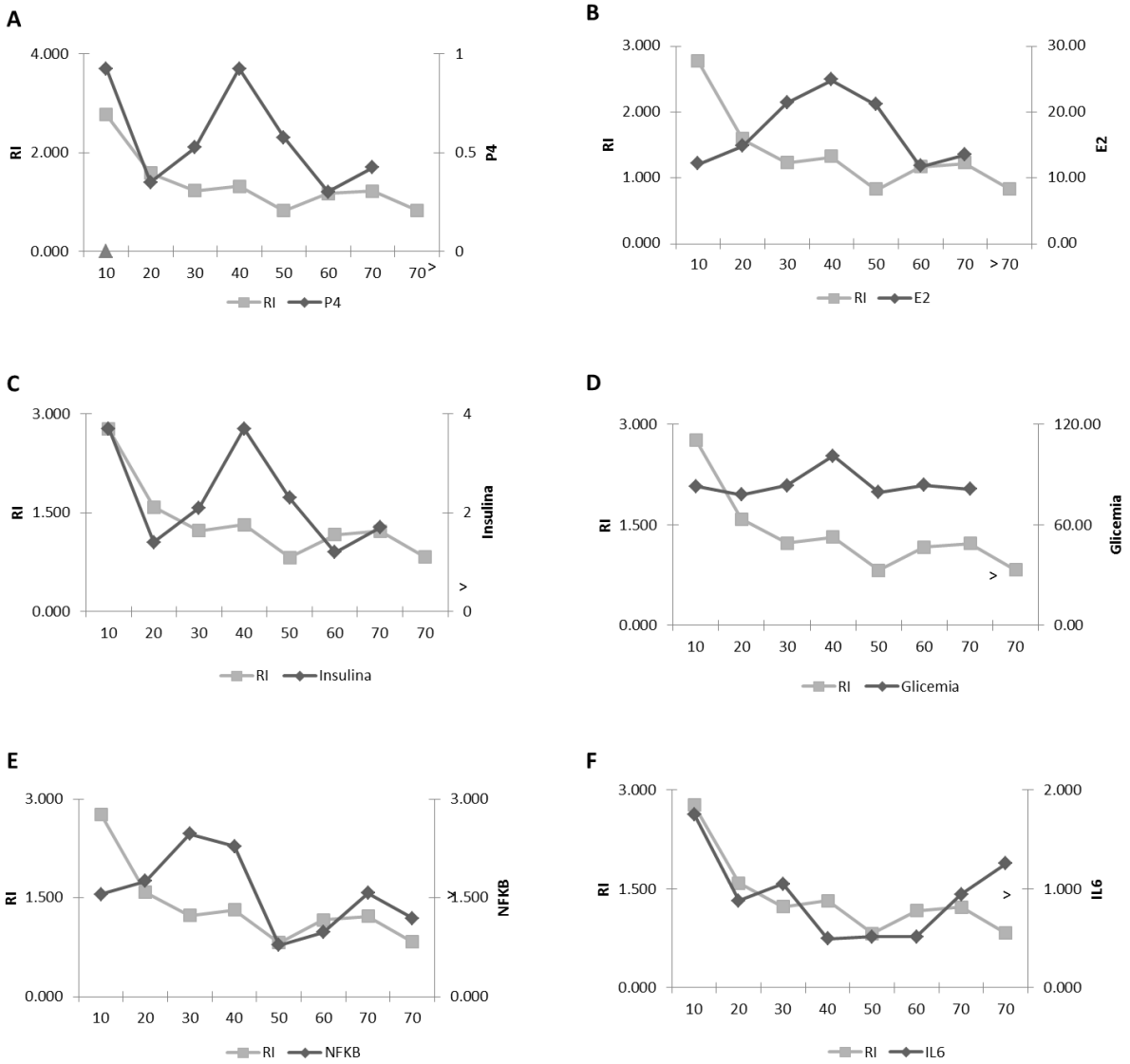
Figura 21 – Expressão da proteína IL6 em corpo lúteo canino. Blots ilustrativos e gráficos representam o conteúdo expresso em unidades arbitrárias (UA)/50 µg de proteína em relação à beta-actina. As barras representam a média ±desvio padrão de n= 4. * representa diferença significativa (p<0,05) entre os grupos



5.14 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ESTUDADAS E A PRODUÇÃO HORMONAL

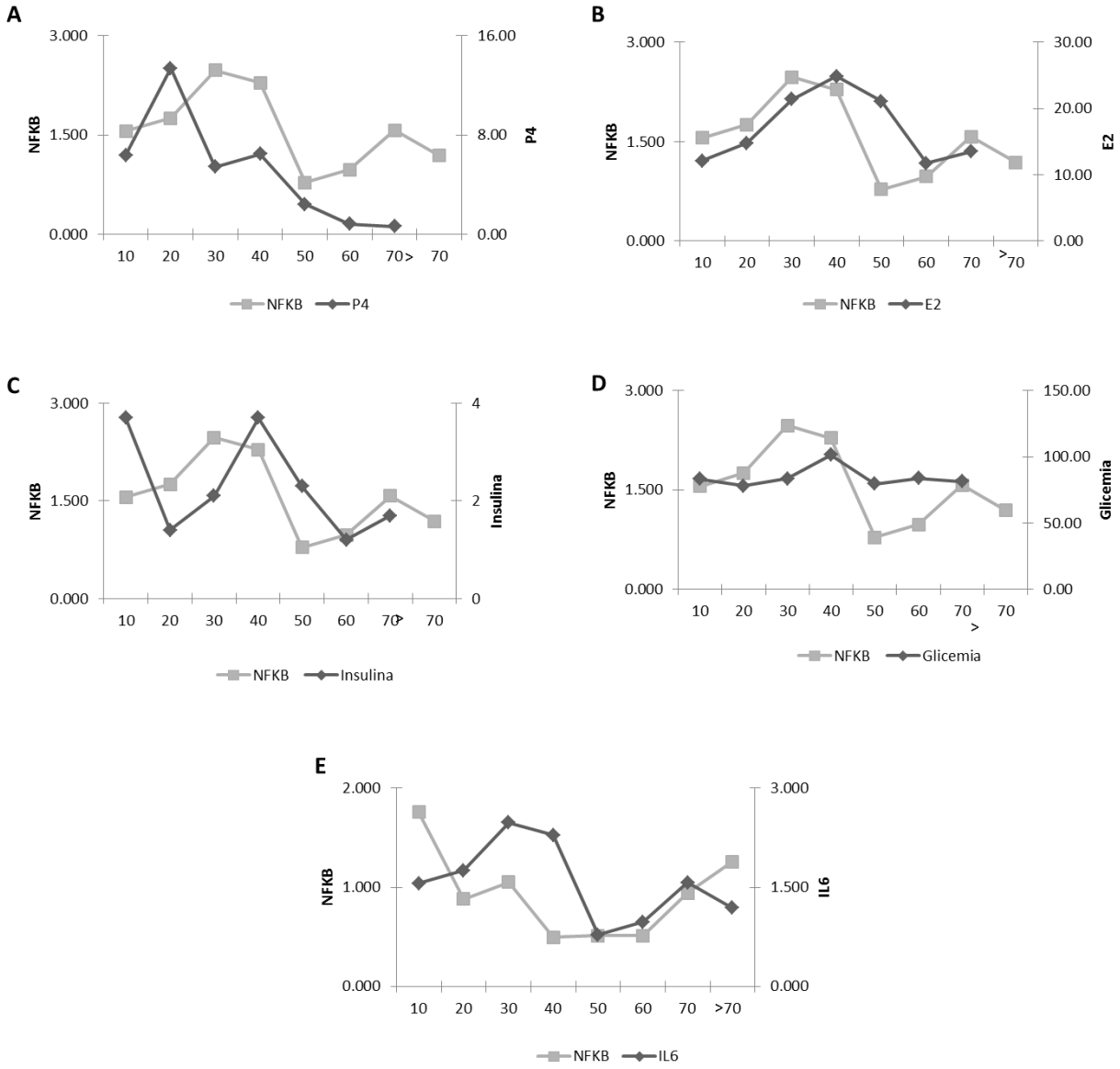
A expressão do receptor de insulina foi negativamente associada com os níveis de insulina (r = -0,96 P = 0,005) ao longo diestro. Nenhuma correlação pode ser observada entre a expressão RI e P4, glicemia e as concentrações de E2. A expressão do RI foi correlacionada positivamente com NFKB (r= 0,63 P= 0,01) durante o diestro e com IL6 (r = 0,96, P <0,0001) nos dias 10, 20, 60 e 70 (figura 22).

Figura 22 –. Linhas de tendência demostrando a correlação da expressão protéica do receptor de insulina com diferentes perfis estudados. A: Receptor de insulina x progesterona; B: Receptor de insulina x 17β-estradiol; C: Receptor de insulina x insulina; D: Receptor de insulina x Glicemia; E: Receptor de insulina x NFKB; F: Receptor de insulina x IL6



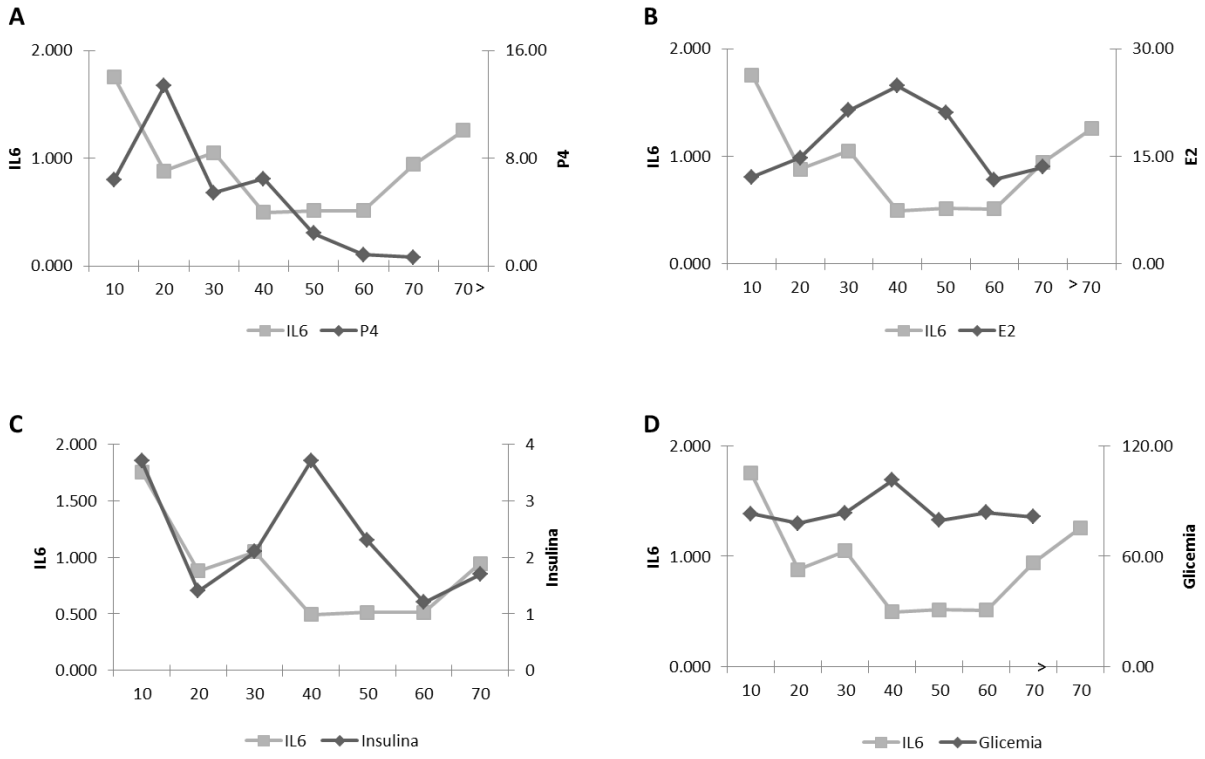
A expressão de NFKB foi associada positivamente com a P4 (r= 0,88 P= 0,01) nos dias 10, 20 e 50 e com o E2 (r= 0,99, P= 0,001) na primeira metade do diestro nos dias 10, 20 e 30. Não houve correlação com os valores de insulina, glicemia, bem como com a expressão de IL6 (Figura 23).

Figura 23 –. Linhas de tendência demostrando a correlação do NFKB com diferentes perfis estudados. A: NFKB x progesterona; B: NFKB x 17β-estradiol; C: NKFB x insulina; D: NFKB x Glicemia; E: NFKB x IL6



Não houve correlação entre a expressão proteica de IL6 com a P4, E2 e a glicemia. A expressão de IL6 correlacionou-se positivamente com a insulina (r= 0,99 P= 0,006) na primeira metade do diestro, nos dias 10, 20 e 30 (Figura 24).

Figura 24 –. Linhas de tendência demostrando a correlação do IL6 com diferentes perfis estudados. A: IL6 x progesterona; B: IL6 x 17β-estradiol; C: IL6 x insulina; D: IL6 x Glicemia



6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Estudos sobre o papel da glicose e a participação da insulina como fonte de energia em células luteínicas (caninas ou de outras espécies) não havia sido abordado até o momento. Na literatura já é possível encontrarmos trabalhos sobre os transportadores de glicose nas células da granulosa de ratas (KODAMAN; ATEN; BEHRMAN, 1998), em seres humanos (ROBERTS et al., 2004) e bovinos (CHASE et al., 1992), o que aumenta a importância de se entender o papel dos transportadores de glicose e da insulina dentro do ovário, mais especificamente no corpo lúteo, que desempenha um papel primordial na reprodução. Assim nosso trabalho demonstrou que as células luteínicas respondem ao estímulo da insulina de acordo com as concentrações plasmáticas de hormônios esteroides e que os receptores para insulina assim como outras moléculas reguladoras da expressão de transportadores de glicose são reguladas ao longo do diestro no CL de cadelas.

Análise da captação de glicose estimulada pela insulina em células luteínicas não havia sido demostrada até o momento para nenhuma espécie. O mecanismo de captação de glicose em músculo esquelético e tecido adiposo são dependentes da transmissão do sinal insulínico (PIPER; HESS; JAMES, 1991; REA; JAMES, 1997). Estudos sobre a captação de glicose eram pensados exclusivamente em órgãos insulino-dependentes clássicos como os adipócitos, músculo esquelético e cardíaco (JAMES, D. E. et al., 1988; SLOT et al., 1991; MARETTE et al., 1992; KLIP et al., 1996; PURCELL; CHI; MOLEY, 2012b; a), porém já é possível encontrarmos alguns trabalhos que buscam entender estas vias de sinalização em órgãos considerados não clássicos. Foram realizados ensaios em corpos lúteos bovinos que demostram que estes são capazes de responder a captação de glicose mensurando-se a oxidação (CHASE et al., 1992), entretanto, estes estudos não conduzidos sob estímulo da insulina. Em pesquisa realizada em células do cumulus e oócitos de ratos e humanos, foi demostrado que respondem ao estimulo da insulina captando glicose, o que foi medido através da fosforilação de Akt (PURCELL; CHI; MOLEY, 2012a).

Após estimulação com insulina, os valores apresentados pelas células luteínicas caninas para captação de glicose demonstram que estas são capazes de responder ao estímulo insulínico, como comprovado pela fosforilação da Akt, e pelo aumento de expressão/ translocação de GLUT4. Akt é uma proteína quinase obrigatoriamente fosforilada quando a insulina desencadeia sua sinalização intracelular (SALE; SALE, 2007), após a ligação insulina-receptor. Em recente estudo (PURCELL; CHI; MOLEY, 2012a) foi confirmado que

ao se inibir a via Akt não ocorre captação de glicose, a qual é dependente, assim como a translocação de GLUT4, desta fosforilação. A Akt pode regular o metabolismo de glicose em diversos níveis, pois aumenta a captação de glicose em tecidos responsivos à insulina aumentando a expressão dos transportadores de glicose (BARTHEL et al., 1999) e induz a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (KOHN et al., 1996), o que foi confirmada em nosso estudo através da imuno-citoquímica, corroborando que a via Akt fosforilada após a estimulação teve seu funcionamento pleno. A captação de glicose já foi vista em outros órgãos considerados não insulino dependentes, entretanto os dados do presente estudo nos levam a acreditar que os efeitos metabólicos desencadeados pela insulina no CL canino estão diretamente relacionados aos níveis energéticos disponíveis para sua manutenção e funcionalidade, apesar deste órgão não ser considerado, até o momento, insulíno-sensível.

Os resultados apresentados pelo cultivo celular realizado a partir de células de 20 e 40 dias po nos mostram com mais clareza a importância dos perfis plasmáticos de P4 e E2 na regulação e manutenção na fase luteínica, bem como no papel da insulina no CL. Foi demostrado que o E2 e P4 estão envolvidos na regulação da expressão gênica do GLUT4 no tecido adiposo, sofrendo uma redução significativa na presença de E2, mas não de P4 (SUGAYA, 1999). Em nosso estudo, no dia 20 po, período este que apresenta a maior concentração de P4 plasmática, a expressão gênica do RI e SLC2A4 aumentou em relação às células controle que não foram estimuladas com insulina. Diferentemente, no dia 40 po esta expressão gênica apresentou o comportamento oposto, coincidindo com o aumento de E2 que foi observado nesta fase do ciclo estral.

O 17β-estradiol participa na homeostasia da glicose pela modulação da expressão dos genes que estão envolvidos na sensibilidade à insulina e na captação de glicose (BARROS et al., 2006). Uma vez que o E2 é um potente modulador da expressão de GLUT4 (positivamente via ER-A e negativamente via ER-B) (BARROS et al., 2009) e que a expressão destes dois receptores varia ao longo do ciclo em cadelas (HOFFMANN et al., 2004; PAPA; HOFFMANN, 2011), onde, o ERβ não apresenta variação significativa ao longo do ciclo, enquanto que a expressão do RNAm do ERα encontra-se maior no dia 25 po (PAPA; HOFFMANN, 2011). O ERα e ERβ apresentam alta homologia e ambos regulam a expressão de genes de proliferação celular de maneira distinta em determinados tipos celulares, sendo que em um panorama geral, o ERα é muitas vezes considerado envolvido com a proliferação celular e o ERβ como anti-proliferativo (WEIHUA et al., 2003). Diante

disso, seria plausível propor que a ativação dos receptores de E2 pudesse modular diferencialmente a expressão de GLUT4 e RI durante o diestro, uma vez que ERα é considerado modulador positivo de GLUT4 e este encontra-se mais expresso no dia 25 po em corpo lúteo.

Observou-se para cadelas em estudo paralelo de nosso grupo que um aumento de E2 no diestro no dia 40 po está associado aos maiores índices de resistência insulínica e menor expressão de GLUT4, o que corrobora com relatos de várias condições caracterizadas por concentrações de estrógenos elevadas que também são acompanhadas por resistência insulínica (OKUNO et al., 1995; SOLOMON et al., 2001; KAAJA; GREER, 2005) como gestação normal, diabetes gestacional e síndrome do ovário policístico (GARVEY et al., 1993; ROSENBAUM; HABER; DUNAIF, 1993; OKUNO et al., 1995). Nossos achados sugerem que elevados níveis de E2 podem reprimir a expressão de RI e SLC2A4 no corpo lúteo canino mesmo sob estímulo insulínico mais efetivo, e pode assim participar da resistência insulínica observada no diestro (DUNN, 2001; FLEEMAN; RAND, 2001; PENEDA; DOOLEY, 2003; PÖPPL et al., 2009). Estudos semelhantes que meçam a resposta do tecido adiposo e muscular de cadelas frente aos mesmos estímulos serão necessários para elucidar se nestes órgãos, classicamente considerados insulino-sensíveis, as concentrações plasmáticas de E2 desencadeariam as mesmas consequências.

Adiciona-se a esta discussão o fato de que no dia 40 po, ocorre um aumento na expressão gênica de NFKB e este se correlaciona negativamente com RI. É possível que este seja mais um indicio de que o NFKB regule o corpo lúteo negativamente nesta fase do diestro e colabore para a inibição de RI e SLC2A4, uma vez que esta regulação negativa de NFKB sobre a expressão de SLC2A4 já foi descrita em outros estudos (YUAN et al., 2001; SILVA et al., 2005; KARNIELI; ARMONI, 2008).

A ocorrência do diestro em cadelas encontra-se associada à resistência insulínica. Classicamente, a resistência à insulina observada durante essa fase reprodutiva é atribuída aos efeitos diretos da progesterona sobre a sensibilidade à insulina (RYAN; ENNS, 1988; FELDMAN; NELSON, 2004), por vias ainda não completamente elucidadas, e à ação do hormônio de crescimento (GH), cuja secreção pela glândula mamária é estimulada pela P4 (SELMAN et al., 1994). Embora as concentrações plasmáticas da P4 e do GH sejam superiores na primeira metade da fase luteínica (KOOISTRA et al., 2000), resultados de nosso grupo sugerem que há uma maior resistência insulínica na segunda metade da fase luteínica, logo não somente estes hormônios seriam os responsáveis por ocasionar a resistência insulínica e uma possível indução do diabetes em cadelas. Vale ressaltar que no dia 20 os

níveis de E2 estão mais baixos, e os níveis glicêmicos e insulinêmicos encontram-se constantes, o que constitui mais um indício de que apenas a P4 e o GH não seriam os elementos capazes de induzir a resistência insulínica e nem interferir na expressão de RI e SLC2A4.

Outro fato que pode esclarecer os níveis aumentados do RNAm do RI e do SLC2A4 apresentados no cultivo do dia 20 po é a presença de aumento da expressão do IL6, que nesta fase do diestro apresenta-se correlacionado positivamente com RI. Este efeito do IL6 como fator estimulatório da captação de glicose já foi evidenciado em células humanas *in vivo* (CAREY et al., 2006) e em outro estudo dados demostraram que a administração aguda de IL6 não prejudica a disponibilidade de glicose *in vivo* em seres humanos saudáveis (STEENSBERG et al., 2003).

Os hormônios esteróides produzidos pelas células luteínicas apresentam ação parácrina e autócrina, modulando assim sua própria produção (PAPA; HOFFMANN, 2011) também via disponibilidade do transportador de glicose GLUT4, responsivo à insulina. Diante dos dados apresentados, sugerimos que os diferentes fatores estudados estão expressos diferencialmente no CL ao longo do diestro de acordo com o perfil hormonal, regulando o substrato energético para sua produção e atuando diretamente na função luteínica canina.

A imunolocalização do receptor de insulina, NFKB e IL6 foi observada através de imuno-histoquímica (RI e NFKB) e imuno-fluorescência (IL6) e quantificada sua expressão através de western blotting. Estas proteínas expressaram-se distintamente de acordo com a fase do diestro. Através da imuno-histoquímica e western blotting observamos o RI está mais expressos no dia 10 po, após o qual ocorre uma diminuição da intensidade do seu sinal ao longo do período estudado. É provável que o aumento da expressão do RI no início do diestro ocorra para garantir uma sinalização insulínica adequada uma vez que esta glândula esta no começo de sua formação e precisa se tornar funcional o mais rapidamente possível até atingir sua plena atividade. A presença do RI e do GLUT4 sugere uma captação de glicose dependente de insulina pelo corpo lúteo, o que era de se esperar uma vez que o mesmo consiste em uma glândula endócrina temporária que apresenta períodos regulares de formação, atividade e regressão marcados por intensa remodelação tecidual (MILVAE, 2000; DAVIS; RUEDA; SPANEL-BOROWSKI, 2003; FRASER; WULFF, 2003; BERISHA; SCHAMS, 2005; STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007) e que, portanto, um suprimento de glicose adequado para a célula deva ser assegurado.

Estes achados ainda não haviam sido apresentados na literatura para o CL canino. Em outras espécies a presença do receptor de insulina em corpo lúteo já foi estudada (SAMOTO et al., 1993; NEUVIANS et al., 2003; BOSSAERT et al., 2010). Em mulheres a expressão do RI foi estuda em ovário durante a fase folicular e a fase luteínica através de imuno-histoquímica e foi descrita uma expressão distinta a depender da fase observada (SAMOTO et al., 1993): até a metade do diestro a imunolocalização ocorre de maneira mais intensa, seguida de um declínio desta marcação. Durante a regressão, apenas as células periféricas adjacentes ainda possuem alguma marcação. Isto implica que a insulina pode participar na remodelação de tecidos ovarianos locais e na atresia folicular e luteólise no ovário humano. Em bovinos estudos sobre RI em células da granulosa foram realizados e evidenciaram que alterações na ligação da insulina com seu receptor podem afetar o crescimento folicular e a esteroidogênese e consequentemente levar a alteração na fase luteínica (BOSSAERT et al., 2010). Além disso, a expressão gênica do RI já foi estudada em diferentes espécies: em humanos (SEINO; BELL, 1989; LIGHTEN et al., 1997) ratos (WATSON et al., 1992; SERRANO et al., 2005) e bovinos, foi observada a presença das subunidades A e B do receptor de insulina. Estes achados indicam um papel fisiológico na mediação de efeitos mitogênicos, no desenvolvimento, manutenção e função do corpo lúteo (NEUVIANS et al., 2003).

Sabendo que a proteína NFKB é um regulador das atividades de GLUT4 e RI (YUAN et al., 2001; SILVA et al., 2005; KARNIELI; ARMONI, 2008; ROHER et al., 2008) e interfere diretamente na captação de glicose pelo corpo lúteo, realizamos sua imunolocalização e quantificação. O mecanismo de ação pelo qual o NFKB, um dos principais reguladores do GLUT4, é ativado depende da fosforilação de proteínas inibitórias, as IkBs, por quinase específicas, as IKKs, que promovem a translocação para o núcleo do NFKB liberado. Uma vez no núcleo, a atividade transcricional do NFKB se dá pela ativação das MAPKs (mitogen-activated protein kinases), o que pode gerar cross-talk de sinalização com outras vias (BAUD; KARIN, 2001), inclusive influenciar a expressão de GLUT4 (ROHER et al., 2008). Células musculares em humanos são definidas como responsivas à insulina, aumentam sua expressão de GLUT4 na membrana após aumento de expressão de NFKB (ROHER et al., 2008). Por outro lado, o mesmo fator é considerado inibitório para expressão do RNAm de GLUT4 (SILVA et al., 2005) em músculo esquelético de ratos sob diferentes condições (hipóxia, jejum, estímulo insulínico). A expressão proteica do NFKB durante a fase luteínica canina não se correlacionou negativamente com a expressão de GLUT4 e RI, o que corrobora com a ideia de que quando se trata dos valores proteicos a regulação da expressão de GLUT4 responda de maneira positiva a expressão de NFKB, o que

é o contrário do observado para a expressão do mRNA de *NFKB* em relação ao *SLC2A4* e *RI*. No dia 40 os valores da expressão gênica apresentam um elevado aumento quando comparado com os demais períodos estudados, o que coincide com o declínio da expressão do receptor de insulina e do *SLC2A4* (GLUT4), sugerindo uma correlação negativa quando se trata da expressão do RNAm, o que pode levar a um quadro de resistência insulínica. Vale ressaltar que este pico da expressão gênica de *NFKB* coincide com os níveis plasmáticos elevados de E2, o que caracteriza uma correlação positiva entre estes dois parâmetros. Células T humanas tratadas sob concentrações elevadas de E2 apresentam aumento de expressão de NFKB, indicando que o E2 em concentração fisiologicamente alta modula o NFKB em células T humanas, o que pode levar a um quadro de doenças auto-imunes. Os índices elevados de E2 encontrados no plasma de cadelas poderiam ser considerados um desencadeador do aumento da expressão gênica de NFKB. Este, por sua vez já é considerado um regulador da expressão de GLUT4 (HIRANO; FURUTAMA; HANAFUSA, 2007), o que aponta para um papel inibitório do NFKB na expressão de SCL2A4 sob influência dos elevados índices de estradiol presentes no dia 40 po.

O IL6 também é expresso diferencialmente ao longo do diestro. Conforme descrito (ROTTER; NAGAEV; SMITH, 2003; ROHER et al., 2008), esta interleucina se constitui em outro regulador da expressão proteica e gênica de GLUT4 e RI. O sistema imune já foi estudado no CL canino (ENGEL et al., 2005) e também em CL de diferentes espécies como bovinos (PETROFF; PETROFF; PATE, 1999) e ratos (TELLERIA et al., 1998). O sistema imune parece desempenhar um papel importante no controle da função luteínica (O'SHEA; RODGERS; D'OCCHIO, 1989), especificamente na formação, manutenção e regressão do corpo lúteo (PETROFF; PETROFF; PATE, 1999; PATE; PALMQUIST, 2001). Assim como NFKB, a depender do órgão estudado a interleucina 6 desempenha diferente papel na regulação de GLUT4. Em ratas já foi demostrado um efeito prejudicial do IL6 na função gonadal, já que esta citocina tem sido apontada como reguladora negativa da esteroidogênese e participante da luteólise nestes animais (TELLERIA et al., 1998).

A expressão de IL6, diferentemente da de NFKB, ocorreu juntamente com o pico de P4 do diestro e da expressão do SLC2A4 no tecido luteínico. Ainda, na cultura celular houve a regulação positiva do RI e SLC2A4 em células provenientes do dia 20 po; tais achados corroboram que a IL6 possa interferir positivamente na manutenção da função do CL. Nos monócitos humanos, a P4 eleva a síntese das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL6 (KLIP et al., 1996; JAIN; KANNAN; PROUTY, 2004); em ratos estudos relatam aumento do nível de produção de IL6 em osteoblastos tratados com P4 (KECK et al., 1998). A IL6 é

considerada um estimulador da expressão gênica do *SLC2A4* em humanos (ROHER et al., 2008) e nossos resultados indicam que a modulação do *SLC2A4* e RI no CL em diestro ocorra também subordinada às concentrações hormonais, assim como da interleucina 6, principalmente na primeira metade do diestro.

A expressão gênica e proteica do receptor de insulina foi negativamente correlacionada aos níveis de insulina e positivamente com SLC2A4 (comunicação pessoal[2]) ao longo do diestro o que demonstra que os níveis de glicemia, de maneira geral, estão assegurados. Ainda, RI e GLUT4 correlacionam-se positivamente para garantir uma sinalização insulínica eficiente. Nenhuma correlação pôde ser observada entre a expressão RI e as concentrações de P4, E2 e glicemia. A expressão gênica do RI foi correlacionada positivamente com IL6 do dia 10 ao dia 40, e com a proteína nos dias 10, 20 e 50 o que indica que o IL6 seja importante principalmente na primeira metade do diestro, colaborando na manutenção dos níveis glicêmicos adequados e agindo como fator luteotrófico. Em contrapartida, o RI foi negativamente correlacionado com a expressão de NFKB nos dias 30, 40 e 50, o que demonstra que a expressão gênica do NFKB é inibitória neste período. Por outrro lado, a expressão proteíca do RI encontra-se correlaciona-se positivamente com NFKB ao longo do diestro, o que constitui mais um indício de um papel estimulatório quando se trata da proteína. Valores do RI do dia 40 associados à expressão gênica de NFKB e ao índice HOMA (comunicação pessoal[2]), apontam para a um quadro de resistência insulínica no CL neste período do diestro (VARGAS et al., 2004), levando à diminuição da expressão do GLUT4, que por sua vez, resulta na diminuição da captação de glicose pelas células do CL, o que pode contribuir para a regressão luteínica observada após o dia 45 po (SONNACK, 2009). A expressão proteica de IL6 também foi correlacionada positivamente com a insulina, e uma vez que a IL6 não interfere na disponibilidade de glicose (STEENSBERG et al., 2003) era de se esperar que não interviesse na captação de glicose com isso, mas ao contrário, pudesse garanti-la no CL canino.

Considerando estes resultados podemos sugerir que a insulina, os fatores regulatórios de GLUT4 e os hormônios esteroides desempenham um papel importante nas atividades da fase luteínica em cadelas e que trabalhos nesta área devam ser desenvolvidos para uma melhor compreensão da função do corpo lúteo de cadelas.

[2] Informação fornecida por SOUSA, L.M.M.C, 2012.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

- As células luteínicas respondem à insulina aumentando sua captação de glicose.
- O aumento de captação de glicose está relacionado à via Akt e ao aumento da expressão do GLUT4
- As células luteínicas respondem de maneira diferente ao estímulo insulínico de acordo com o ambiente hormonal prévio ao qual estavam expostas (P4 ou E2).
- A expressão gênica e protéica diferencial do receptor de insulina indica que a mesma seja importante para regulação da função luteínica.
- A expressão gênica e protéica de *NFKB* indica que o mesmo atue de maneira negativa sobre a captação de glicose pela célula luteínica e função do CL no diestro e ainda intrinsecamente relacionado ao E2.
- A expressão gênica e protéica de IL6 confere a esta interleucina uma característica luteotrófica para o CL canino.
- As correlações que se estabeleceram entre genes, proteínas e hormônios estudados indicam que a regulação da função do CL canino se orquestra de maneira minuciosa e atribui à insulina para um papel central na regulação deste órgão.

8 REFERÊNCIAS

8 Referências

ACCILI, D. **Receptor tyrosine kinases. In: Leskiw SM, ed. MCR Syllabus 2001: Introduction to molecular and cellular research**: secondary title: Endocrine Society, 2001.

AIRES, M. M. **Fisiologia**: Guanabara Kookan, 1999. 934 p.

ALZAID, A. A. Insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A review. **Acta Diabetol**, v. 33, n. 2, p. 87-99, 1996.

ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**: secondary title. São Paulo: Roca, 2002**,** 331-342 p.

ASSOCIATION, A. D. **Report of the Expert Committe on the diagnosis and classification of diabetes mellitus**: secondary title: Diabetes Care, 1997. 20.

BARROS, R. P.; MACHADO, U. F.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 5, p. 1605-1608, 2006.

BARROS, R. P.; GABBI, C.; MORANI, A.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. Participation of ERalpha and ERbeta in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 297, n. 1, p. E124-133, 2009.

BARTHEL, A.; OKINO, S. T.; LIAO, J.; NAKATANI, K.; LI, J.; WHITLOCK, J. P.; ROTH, R. A. Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. **J Biol Chem**, v. 274, n. 29, p. 20281-20286, 1999.

BAUD, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends Cell Biol**, v. 11, n. 9, p. 372-377, 2001.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domest Anim Endocrinol**, v. 29, n. 2, p. 305-317, 2005.

BOSSAERT, P.; DE COCK, H.; LEROY, J. L.; DE CAMPENEERE, S.; BOLS, P. E.; FILLIERS, M.; OPSOMER, G. Immunohistochemical visualization of insulin receptors in formalin-fixed bovine ovaries post mortem and in granulosa cells collected in vivo. **Theriogenology**, v. 73, n. 9, p. 1210-1219, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, n., p. 248-254, 1976.

BRICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Saunders Manual of Small Animal Practice**: secondary title. Philadelphia: Saundrs Company, 1994.

BURKE, T. J. **Small Animal Reproduction and infertility.**: secondary title. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986.

CAREY, A. L.; STEINBERG, G. R.; MACAULAY, S. L.; THOMAS, W. G.; HOLMES, A. G.; RAMM, G.; PRELOVSEK, O.; HOHNEN-BEHRENS, C.; WATT, M. J.; JAMES, D. E.; KEMP, B. E.; PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. **Diabetes**, v. 55, n. 10, p. 2688-2697, 2006.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. **Vias de sinalização da insulina.**: secondary title. São Paulo: Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabolismo, 2002. 46.

CHASE, C. C.; DEL VECCHIO, R. P.; SMITH, S. B.; RANDEL, R. D. In vitro metabolism of glucose by bovine reproductive tissues obtained during the estrous cycle and after calving. **J Anim Sci**, v. 70, n. 5, p. 1496-1508, 1992.

CHEATHAM, B.; KAHN, C. R. Insulin action and the insulin signaling network. **Endocr Rev**, v. 16, n. 2, p. 117-142, 1995.

COMMITTE, R. **Report of the expert committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus.** : secondary title: Diabetes Care, 2003. 26.

CONCANNON, P. Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma progesterone levels in the beagle bitch. **J Reprod Fertil**, v. 58, n. 2, p. 407-410, 1980.

CONCANNON, P. W.; WEINSTEIN, P.; WHALEY, S.; FRANK, D. Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine. **J Reprod Fertil**, v. 81, n. 1, p. 175-180, 1987.

CONCANNON, P. W.; MCCANN, J. P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 39, n., p. 3-25, 1989.

CONCANNON, P. W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 47, n., p. 3-27, 1993.

COSTANZO, L. S. **Fisiologia**: secondary title. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

DAVIS, J. S.; RUEDA, B. R.; SPANEL-BOROWSKI, K. Microvascular endothelial cells of the corpus luteum. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 1, n., p. 89, 2003.

DEFRONZO, R. **Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes.** : secondary title: Diabetes, 1997. 5**,** 177-267 p.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos**: secondary title. Zaragoza: Acribia, 1980**,** 03-82 p.

DOMINICI, F. P.; ARGENTINO, D. P.; MUÑOZ, M. C.; MIQUET, J. G.; SOTELO, A. I.; TURYN, D. Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. **Growth Horm IGF Res**, v. 15, n. 5, p. 324-336, 2005.

DUNAIF, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. **Endocr Rev**, v. 18, n. 6, p. 774-800, 1997.

DUNN, J. K. **Tratado de medicina de pequenos animais**: secondary title. São Paulo: Roca, 2001**,** 569-584 p.

DYCE, K. M.; SACK, K. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária**: secondary title: Elsevier, 2010**,** 856 p.

EIGENMANN, J. E. Acromegaly in the dog. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 14, n. 4, p. 827-836, 1984.

ENGEL, E.; KLEIN, R.; BAUMGÄRTNER, W.; HOFFMANN, B. Investigations on the expression of cytokines in the canine corpus luteum in relation to dioestrus. **Anim Reprod Sci**, v. 87, n. 1-2, p. 163-176, 2005.

FELDMAN, E. C.; NELSON, W. R. **Canine feline endocrinology and reproduction**: secondary title. Missouri: Saunders, 2004**,** 399-480 p.

FELIG, P.; BERGMAN, M. **The endocrine pancreas: Diabetes Mellitus.**: secondary title: Endocrinology and Metabolism, 1995**,** 1107-1250 p.

FLEEMAN, L. M.; RAND, J. S. Management of canine diabetes. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 31, n. 5, p. 855-880, vi, 2001.

FRASER, H. M.; WULFF, C. Angiogenesis in the corpus luteum. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 1, n., p. 88, 2003.

FURURYA, W. M.; FURUYA, V. R. B. **Nutritional innovations on amino acids supplementation in Nile tilapia diets.** : secondary title: Revista Brasileira de Zootecnia, 2010. 39**,** 88-94 p.

GARVEY, W. T.; MAIANU, L.; ZHU, J. H.; HANCOCK, J. A.; GOLICHOWSKI, A. M. Multiple defects in the adipocyte glucose transport system cause cellular insulin resistance in gestational diabetes. Heterogeneity in the number and a novel abnormality in subcellular localization of GLUT4 glucose transporters: secondary title: **Diabetes**, 1993. 42**,** 1773-1785 p.

GENUTH, S. For aggressive preventive management of type 2 diabetes. What is the evidence and is it enough? **J Fam Pract**, v. 47, n. 5 Suppl, p. S23-26, 1998.

GONG, J. G.; WEBB, R. Control of ovarian follicle development in domestic ruminants: its manipulation to increase ovulation rate and improve reproductive performance.: secondary title: ***Animal Breeding*** **Abstracts**, 1996. 64**,** 195-204 p.

GROZOVSKY, R. **Substratos do receptor de insulina-1 e 2 (RIS-1 e RIS-2) na tRIeóide e no fígado – estudo do dimorfismo sexual e da modulação pelo estrogênio.**: secondary title. Rio de Janeiro: Faculdade de medicina do Rio de Janeiro, 2006**,** 83 p.

HABER, E. P.; CURI, R.; CARVALHO, R. O.; CARPINELLI, A. R. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. : secondary title. São Paulo: **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**., 2001. 45.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal.** : secondary title. São Paulo: Manole, 1995**,** 21-145 p.

HIRANO, S.; FURUTAMA, D.; HANAFUSA, T. Physiologically high concentrations of 17beta-estradiol enhance NF-kappaB activity in human T cells. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 4, p. R1465-1471, 2007.

HOFFMANN, B.; HÖVELER, R.; HASAN, S. H.; FAILING, K. Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. **J Reprod Fertil**, v. 96, n. 2, p. 837-845, 1992.

HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. **Reproductive endocrinology of bitches.**: secondary title: Animal Reproduction Science, 1996. 42**,** 275-288 p.

HOFFMANN, B.; BÜSGES, F.; ENGEL, E.; KOWALEWSKI, M. P.; PAPA, P. Regulation of corpus luteum-function in the bitch. **Reprod Domest Anim**, v. 39, n. 4, p. 232-240, 2004.

JAIN, S. K.; KANNAN, K.; PROUTY, L. Progesterone, but not 17beta-estradiol, increases TNF-alpha secretion in U937 monocytes. **Cytokine**, v. 26, n. 3, p. 102-105, 2004.

JAMES, D. The mammalian facilitative glucose transporter family: secondary title: **NIPS**, 1995. 10**,** 67-71 p.

JAMES, D. E.; BROWN, R.; NAVARRO, J.; PILCH, P. F. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. **Nature**, v. 333, n. 6169, p. 183-185, 1988.

JONES, T.; HUNT, R.; KING, N. **Patologia veterinária**: secondary title. São Paulo: Manole, 2000. 6ª**,** 1275 p.

KAAJA, R. J.; GREER, I. A. Manifestations of chronic disease during pregnancy. **JAMA**, v. 294, n. 21, p. 2751-2757, 2005.

KARNIELI, E.; ARMONI, M. Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, n. 1, p. E38-45, 2008.

KECK, C.; HERCHENBACH, D.; PFISTERER, J.; BRECKWOLDT, M. Effects of 17beta-estradiol and progesterone on interleukin-6 production and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 106, n. 4, p. 334-339, 1998.

KIDO, Y.; NAKAE, J.; ACCILI, D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 3, p. 972-979, 2001.

KLIP, A.; VOLCHUK, A.; HE, L.; TSAKIRIDIS, T. **The glucose transporters of skeletal muscle.**: secondary title: *Seminars* in *Cell* & *Developmental* Biology 1996. 7**,** 229-237 p.

KODAMAN, P. H.; ATEN, R. F.; BEHRMAN, H. R. Accumulation of ascorbate by endocrine-regulated and glucose-sensitive transport of dehydroascorbic acid in luteinized rat ovarian cells. **Biol Reprod**, v. 58, n. 2, p. 407-413, 1998.

KOHN, A. D.; SUMMERS, S. A.; BIRNBAUM, M. J.; ROTH, R. A. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. **J Biol Chem**, v. 271, n. 49, p. 31372-31378, 1996.

KOLB, E. **Fisiologia Veterinária**. São Paulo: Acribia, 1974, v.2

KOOISTRA, H. S.; DEN HERTOG, E.; OKKENS, A. C.; MOL, J. A.; RIJNBERK, A. Pulsatile secretion pattern of growth hormone during the luteal phase and mid-anoestrus in beagle bitches. **J Reprod Fertil**, v. 119, n. 2, p. 217-222, 2000.

KOWALEWSKI, M. P.; SCHULER, G.; TAUBERT, A.; ENGEL, E.; HOFFMANN, B. Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1423-1430, 2006.

KWOK, S. C.; CHAN, S. J.; STEINER, D. F. Cloning and nucleotide sequence analysis of the dog insulin gene. Coded amino acid sequence of canine preproinsulin predicts an additional C-peptide fragment. **J Biol Chem**, v. 258, n. 4, p. 2357-2363, 1983.

LADENHEIM, R. G.; TESONE, M.; CHARREAU, E. H. Insulin action and characterization of insulin receptors in rat luteal cells. **Endocrinology**, v. 115, n. 2, p. 752-756, 1984.

LIGHTEN, A. D.; HARDY, K.; WINSTON, R. M.; MOORE, G. E. Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. **Mol Reprod Dev**, v. 47, n. 2, p. 134-139, 1997.

LOTT, J. A.; TURNER, K. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. **Clin Chem**, v. 21, n. 12, p. 1754-1760, 1975.

LUCY, M. C.; STAPLES, C. R.; MICHEL, F. M.; THATCHER, W. W. Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 74, n. 2, p. 473-482, 1991.

MAASSEN, J.; OWENS, D. Mechanism of Insulin Action: secondary title: **Molecular Pathogenesis of Diabetes mellitus**, 1997. 22**,** 201-221 p.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. [Glucose transporters in the metabolic syndrome]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 50, n. 2, p. 177-189, 2006.

MAGGIONIL, D.; ROTTA, P.; ITOL, R.; MARQUES, J.; ZAWADZKI, F.; PRADO, R.; PRADO, I. **Efeito da nutrição sobre a reprodução de ruminantes:** uma revisão: secondary title: PUBVET, 2008. 2.

MARETTE, A.; BURDETT, E.; DOUEN, A.; VRANIC, M.; KLIP, A. Insulin induces the translocation of GLUT4 from a unique intracellular organelle to transverse tubules in rat skeletal muscle. **Diabetes**, v. 41, n. 12, p. 1562-1569, 1992.

MARIANI, T. C.; DO PRADO, C.; SILVA, L. G.; PAARMANN, F. A.; LIMA, M. C.; CARVALHO, I.; CAMPOS, D. B.; ARTONI, L. P.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PAPA, P. C. Immunohistochemical localization of VEGF and its receptors in the corpus luteum of the bitch during diestrus and anestrus. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1715-1720, 2006.

MARMOR, M.; WILLEBERG, P.; GLICKMAN, L. T.; PRIESTER, W. A.; CYPESS, R. H.; HURVITZ, A. I. Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in dogs. **Am J Vet Res**, v. 43, n. 3, p. 465-470, 1982.

MIALOT, J. P. **Patologia da reprodução de carnívoros domésticos**: secondary title. São Paulo: A hora veterinária, 1988**,** 17-22 p.

MILVAE, R. A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F2alpha in corpus luteum function. **Rev Reprod**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2000.

MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters. **Eur J Biochem**, v. 219, n. 3, p. 713-725, 1994.

MUECKLER, M. Insulin resistance and the disruption of Glut4 trafficking in skeletal muscle. **J Clin Invest**, v. 107, n. 10, p. 1211-1213, 2001.

MYERS, M.; WHITE, M. Insulin signal transduction and the IRS proteins: secondary title: **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 1996. 36**,** 615-658 p.

NAITOH, Y.; FUKATA, J.; TOMINAGA, T.; NAKAI, Y.; TAMAI, S.; MORI, K.; IMURA, H. Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotropic hormone in conscious, freely-moving rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 155, n. 3, p. 1459-1463, 1988.

NEUVIANS, T. P.; PFAFFL, M. W.; BERISHA, B.; SCHAMS, D. The mRNA expression of insulin receptor isoforms (IR-A and IR-B) and IGFR-2 in the bovine corpus luteum during the estrous cycle, pregnancy, and induced luteolysis. **Endocrine**, v. 22, n. 2, p. 93-100, 2003.

NYSTROM, F.; QUON, M. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity: secondary title: **Cell Signal**, 1999**,** 563-574 p.

O'SHEA, J. D.; RODGERS, R. J.; D'OCCHIO, M. J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **J Reprod Fertil**, v. 85, n. 2, p. 483-487, 1989.

OKKENS, A.; BEVERS, M. Evidence for prolactin as the main luteotropic factor in the cyclic dog: secondary title: **Veterinary Quarterly**, 1990. 12**,** 193-201 p.

OKKENS, A. C.; DIELEMAN, S. J.; BEVERS, M. M.; LUBBERINK, A. A.; WILLEMSE, A. H. Influence of hypophysectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog. **J Reprod Fertil**, v. 77, n. 1, p. 187-192, 1986.

OKUNO, S.; AKAZAWA, S.; YASUHI, I.; KAWASAKI, E.; MATSUMOTO, K.; YAMASAKI, H.; MATSUO, H.; YAMAGUCHI, Y.; NAGATAKI, S. Decreased expression of the GLUT4 glucose transporter protein in adipose tissue during pregnancy. **Horm Metab Res**, v. 27, n. 5, p. 231-234, 1995.

PAPA, P. C.; HOFFMANN, B. The corpus luteum of the dog: source and target of steroid hormones? **Reprod Domest Anim**, v. 46, n. 4, p. 750-756, 2011.

PATE, J. L.; PALMQUIST, D. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows: secondary title: **Animal Reproduction Science**, 2001. 68**,** 29-43 p.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 9, n. 2-4, p. 89-109, 1998.

PENEDA, M.; DOOLEY, M. McDonald's veterinary endocrinology and reprodution. In: **Female Reproductive System**: secondary title, 2003. 5**,** 283-340 p.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 106, n. 2, p. 165-169, 2000.

PETROFF, M. G.; PETROFF, B. K.; PATE, J. L. Expression of cytokine messenger ribonucleic acids in the bovine corpus luteum. **Endocrinology**, v. 140, n. 2, p. 1018-1021, 1999.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PIPER, R. C.; HESS, L. J.; JAMES, D. E. Differential sorting of two glucose transporters expressed in insulin-sensitive cells. **Am J Physiol**, v. 260, n. 3 Pt 1, p. C570-580, 1991.

PIRES, A.; SUSIN, I. **Relações entre nutrição e reprodução. Piracicaba.**: secondary title: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1997**,** 69-96 p.

PIRES, A.; RIBERIO, C. Aspectos da nutrição relacionados à reprodução: secondary title. Jaboticabal-SP: **Nutrição de Ruminantes**, 2006.

PIROLA, L.; JOHNSTON, A. M.; VAN OBBERGHEN, E. Modulation of insulin action. **Diabetologia**, v. 47, n. 2, p. 170-184, 2004.

POLETTO, A. C.; ANHÊ, G. F.; EICHLER, P.; TAKAHASHI, H. K.; FURUYA, D. T.; OKAMOTO, M. M.; CURI, R.; MACHADO, U. F. Soybean and sunflower oil-induced insulin resistance correlates with impaired GLUT4 protein expression and translocation specifically in white adipose tissue. **Cell Biochem Funct**, v. 28, n. 2, p. 114-121, 2010.

PÖPPL, A.; LASTA, C.; GONZÁLEZ, F.; KUCHARSKI, L.; SILVA, R. Índices de sensibilidade à insulina em fêmeas caninas: efeito do ciclo estral e da piometra: secondary title: **Acta Scientiae Veterinariae**, 2009. 37**,** 361-370 p.

PROCÓPIO, J.; CURI, R. **Fisiologia Básica**, 2009

PURCELL, S. H.; CHI, M. M.; MOLEY, K. H. Insulin-Stimulated Glucose Uptake Occurs in Specialized Cells within the Cumulus Oocyte Complex. **Endocrinology**, v. 153, n. 5, p. 2444-2454, 2012a.

PURCELL, S. H.; CHI, M. M.; MOLEY, K. H. Insulin-Stimulated Glucose Uptake Occurs in Specialized Cells within the Cumulus Oocyte Complex secondary title. **REPRODUCTION DEVELOPMENT**, 2012b.

PUSHPAKUMARA, P. G.; GARDNER, N. H.; REYNOLDS, C. K.; BEEVER, D. E.; WATHES, D. C. Relationships between transition period diet, metabolic parameters and fertility in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 60, n. 6, p. 1165-1185, 2003.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci Lett**, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

REA, S.; JAMES, D. E. Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. **Diabetes**, v. 46, n. 11, p. 1667-1677, 1997.

ROBERTS, R.; STARK, J.; IATROPOULOU, A.; BECKER, D. L.; FRANKS, S. Energy Substrate Metabolism of Mouse Cumulus-Oocyte Complexes: Response to Follicle-Stimulating Hormone Is Mediated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway and Is Associated with Oocyte Maturation: secondary title: **Biology of Reproduction,** 2004. 71, 199-209 p.

ROHER, N.; SAMOKHVALOV, V.; DÍAZ, M.; MACKENZIE, S.; KLIP, A.; PLANAS, J. V. The proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha increases the amount of glucose transporter-4 at the surface of muscle cells independently of changes in interleukin-6. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1880-1889, 2008.

ROSENBAUM, D.; HABER, R. S.; DUNAIF, A. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: decreased expression of GLUT-4 glucose transporters in adipocytes. **Am J Physiol**, v. 264, n. 2 Pt 1, p. E197-202, 1993.

ROTTER, V.; NAGAEV, I.; SMITH, U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. **J Biol Chem**, v. 278, n. 46, p. 45777-45784, 2003.

RUAN, H.; HACOHEN, N.; GOLUB, T. R.; VAN PARIJS, L.; LODISH, H. F. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. **Diabetes**, v. 51, n. 5, p. 1319-1336, 2002.

RYAN, E. A.; ENNS, L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 67, n. 2, p. 341-347, 1988.

SAKUMOTO, R.; KOMATSU, T.; KASUYA, E.; SAITO, T.; OKUDA, K. Expression of mRNAs for interleukin-4, interleukin-6 and their receptors in porcine corpus luteum during the estrous cycle. **Domest Anim Endocrinol**, v. 31, n. 3, p. 246-257, 2006.

SALE, E.; SALE, G. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting: secondary title: **Cellular and Mollecular Life Sciences**, 2007.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.

SAMOTO, T.; MARUO, T.; LADINES-LLAVE, C. A.; MATSUO, H.; DEGUCHI, J.; BARNEA, E. R.; MOCHIZUKI, M. Insulin receptor expression in follicular and stromal compartments of the human ovary over the course of follicular growth, regression and atresia. **Endocr J**, v. 40, n. 6, p. 715-726, 1993.

SARAGÜETA, P.; KRIMER, A. R.; CHARREAU, E. H.; TESONE, M. Insulin regulation of steroidogenic activity in rat culture luteal cells. **J Steroid Biochem**, v. 32, n. 3, p. 393-397, 1989.

SCARAMUZZI, R. J.; CAMPBELL, B. K.; DOWNING, J. A.; KENDALL, N. R.; KHALID, M.; MUÑOZ-GUTIÉRREZ, M.; SOMCHIT, A. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the

mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. **Reprod Nutr Dev**, v. 46, n. 4, p. 339-354, 2006.

SEEDORF, K. Intracellular signaling by growth factors. **Metabolism**, v. 44, n. 10 Suppl 4, p. 24-32, 1995.

SEINO, S.; BELL, G. I. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 159, n. 1, p. 312-316, 1989.

SELMAN, P. J.; MOL, J. A.; RUTTEMAN, G. R.; RIJNBERK, A. Progestin treatment in the dog. II. Effects on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Eur J Endocrinol**, v. 131, n. 4, p. 422-430, 1994.

SERAPHIM, P. M.; ASSIS, T. G. R.; VOLPATO, C. B.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. GLUT4 gene expression insulin-resistant obese rats involves post-transcriptional poly-A tails mRNA modulation: secondary title: **Diab Res Clin Prac**, 2000**,** 50:S157-158 p.

SERRANO, R.; VILLAR, M.; MARTÍNEZ, C.; CARRASCOSA, J. M.; GALLARDO, N.; ANDRÉS, A. Differential gene expression of insulin receptor isoforms A and B and insulin receptor substrates 1, 2 and 3 in rat tissues: modulation by aging and differentiation in rat adipose tissue. **J Mol Endocrinol**, v. 34, n. 1, p. 153-161, 2005.

SHARMA, A. M.; CHETTY, V. T. Obesity, hypertension and insulin resistance. **Acta Diabetol**, v. 42 Suppl 1, n., p. S3-8, 2005.

SHEPHERD, P. R.; KAHN, B. B. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 341, n. 4, p. 248-257, 1999.

SILVA, J. L.; GIANNOCCO, G.; FURUYA, D. T.; LIMA, G. A.; MORAES, P. A.; NACHEF, S.; BORDIN, S.; BRITTO, L. R.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. NF-kappaB, MEF2A, MEF2D and HIF1-a involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. **Mol Cell Endocrinol**, v. 240, n. 1-2, p. 82-93, 2005.

SLOT, J. W.; GEUZE, H. J.; GIGENGACK, S.; JAMES, D. E.; LIENHARD, G. E. Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 17, p. 7815-7819, 1991.

SOLOMON, C. G.; HU, F. B.; DUNAIF, A.; RICH-EDWARDS, J.; WILLETT, W. C.; HUNTER, D. J.; COLDITZ, G. A.; SPEIZER, F. E.; MANSON, J. E. Long or highly irregular menstrual cycles as a marker for risk of type 2 diabetes mellitus. **JAMA**, v. 286, n. 19, p. 2421-2426, 2001.

SONNACK, M. Untersuchungen zur Bildung, Regression und Funktionalität des Corpus Luteum der nicht graviden Hündin, morphologische und biochemische Aspekte: secondary title. Justus-Liebig- Universität Gießen: **Diss med vet**, 2009.

SPANGELO, B. L.; JUDD, A. M.; ISAKSON, P. C.; MACLEOD, R. M. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. **Endocrinology**, v. 125, n. 1, p. 575-577, 1989.

STEENSBERG, A.; FISCHER, C. P.; SACCHETTI, M.; KELLER, C.; OSADA, T.; SCHJERLING, P.; VAN HALL, G.; FEBBRAIO, M. A.; PEDERSEN, B. K. Acute interleukin-6 administration does not impair muscle glucose uptake or whole-body glucose disposal in healthy humans. **J Physiol**, v. 548, n. Pt 2, p. 631-638, 2003.

STEIN, P.; BUSSMANN, L. E.; TESONE, M. In vivo regulation of the steroidogenic activity of rat luteal cells by insulin. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 52, n. 4, p. 329-335, 1995.

STEPHENS, J. M.; PILCH, P. F. The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT4, the major insulin-responsive glucose transporter. **Endocr Rev**, v. 16, n. 4, p. 529-546, 1995.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocr Rev**, v. 28, n. 1, p. 117-149, 2007.

STOUFFER, R. Structure, Function, and Regulation of the Corpus Luteum. In: NEILL JD.: secondary title: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 2006. 3**,** 475-526 p.

SUGAYA. Glucose transporter 4 (GLUT4) mRNA abundance in the adipose tissue and skeletal-muscle tissue of ovariectomized rats treated with 17 beta-estradiol or progesterone.: secondary title: **Journal of Obstetrics and Gynaecology Researc**h, 1999**,** 9-14 p.

TELLERIA, C. M.; OU, J.; SUGINO, N.; FERGUSON, S.; GIBORI, G. The expression of interleukin-6 in the pregnant rat corpus luteum and its regulation by progesterone and glucocorticoid. **Endocrinology**, v. 139, n. 8, p. 3597-3605, 1998.

THORENS, B.; CHARRON, M. J.; LODISH, H. F. Molecular physiology of glucose transporters. **Diabetes Care**, v. 13, n. 3, p. 209-218, 1990.

TSUTSUI, T.; KIRIHARA, N.; HORI, T.; CONCANNON, P. W. Plasma progesterone and prolactin concentrations in overtly pseudopregnant bitches: a clinical study. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 1032-1038, 2007.

VAN OBBERGHEN, E.; BARON, V.; DELAHAYE, L.; EMANUELLI, B.; FILIPPA, N.; GIORGETTI-PERALDI, S.; LEBRUN, P.; MOTHE-SATNEY, I.; PERALDI, P.; ROCCHI, S.; SAWKA-VERHELLE, D.; TARTARE-DECKERT, S.; GIUDICELLI, J. Surfing the insulin signaling web. **Eur J Clin Invest**, v. 31, n. 11, p. 966-977, 2001.

VARGAS, A. M.; BARROS, R. P.; ZAMPIERI, R. A.; OKAMOTO, M. M.; DE CARVALHO PAPA, P.; MACHADO, U. F. Abnormal subcellular distribution of GLUT4 protein in obese and insulin-treated diabetic female dogs. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 7, p. 1095-1101, 2004.

WAHL, R.; BROSSART, P.; EIZENBERGER, D.; SCHUCH, H.; KALLEE, E. Direct effects of protirelin (TRH) on cultured porcine thyrocytes. **J Endocrinol Invest**, v. 15, n. 5, p. 345-351, 1992.

WATHES, D. C.; PERKS, C. M.; DAVIS, A. J.; DENNING-KENDALL, P. A. Regulation of insulin-like growth factor-I and progesterone synthesis by insulin and growth hormone in the ovine ovary. **Biol Reprod**, v. 53, n. 4, p. 882-889, 1995.

WATSON, A. J.; HOGAN, A.; HAHNEL, A.; WIEMER, K. E.; SCHULTZ, G. A. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. **Mol Reprod Dev**, v. 31, n. 2, p. 87-95, 1992.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **J Anim Sci**, v. 82 E-Suppl, n., p. E63-74, 2004.

WEIHUA, Z.; ANDERSSON, S.; CHENG, G.; SIMPSON, E. R.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. Update on estrogen signaling. **FEBS Lett**, v. 546, n. 1, p. 17-24, 2003.

WHITE, M. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action: secondary title: **Molecular Cell Biochemistry**, 1998**,** 182:183 p.

YUAN, M.; KONSTANTOPOULOS, N.; LEE, J.; HANSEN, L.; LI, Z. W.; KARIN, M.; SHOELSON, S. E. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. **Science**, v. 293, n. 5535, p. 1673-1677, 2001.