CAIO JORDÃO TEIXEIRA

GONADECTOMIA E DHEA: EFEITOS METABÓLICOS EM RATAS ADULTAS ALIMENTADAS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

CAIO JORDÃO TEIXEIRA

GONADECTOMIA E DHEA: EFEITOS METABÓLICOS EM RATAS ADULTAS ALIMENTADAS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Teixeira, Caio Jordão.
Gonadectomia e DHEA: efeitos metabólicos em ratas adultas alimentadas com dieta hiperlipídica / Caio Jordão Teixeira. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia endócrina.

Versão do título para o inglês: Gonadectomy and DHEA: metabolic effects in adult female rats fed with high-fat diet.

1. Castração 2. Ovariectomia 3. Menopausa 4. Obesidade 5. Resistência à insulina 6. Deidroepiandrosterona I. Carvalho, Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0112/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Caio Jordão Teixeira.

Título da Dissertação: Gonadectomia e DHEA: efeitos metabólicos em ratas adultas alimentadas com dieta hiperlipídica.

Orientador(a): Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **024** nas fls. **126** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Carla Roberta de Oliveira Carvalho**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Efeito da suplementação com deidroepiandrosterona (DHEA) em fêmeas roedoras"* do qual participam o(s) alunos(s) **Caio Jordão Teixeira,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **10.04.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 12 de abril de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, pela minha existência e pela oportunidade de seguir esta trajetória para realização de um sonho, dando-me força, paciência e sabedoria diante dos desafios encontrados.

À minha família, meus pais Sebastião e Ivete, e meu irmão Ricardo, pelo amor, carinho, apoio e investimento, além de sonharem comigo esse sonho que está sendo concretizado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho, pela amizade, credibilidade, conselhos e estimada contribuição em minha formação profissional.

À Teca, pelos ensinamentos técnicos para realização dos experimentos e, principalmente, por sua amizade e profissionalismo.

Aos meus colegas de laboratório Gabriela, Mário Filho, Flávia, Vitor e Katherine pelas críticas, sugestões e ajudas de bancada quando precisei.

Ao Prof. Angelo Rafael Carpinelli (ICB/USP) por contribuir com as dosagens de insulina realizadas em seu laboratório.

À Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira-Whitton (IB/USP), por cooperar com as dosagens de estradiol apresentadas nesse estudo.

Aos técnicos e especialistas de laboratórios Patrícia Riva, Maristela Okamoto, Helayne Freitas, Julieta Scialfa, Gilson Murata, Tatiana Loureiro e Alexandre Ceroni pelo suporte técnico e prestatividade em me auxiliarem quando os procurei.

Aos funcionários do biotério da fisiologia Cláudio, Vilson, Cleonice, Nair e Maria (*in memoriam*) pelo auxílio e competência profissional.

Aos meus orientadores de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Márcia Batista e Roberto Bazotte, pelos conselhos e constante apoio para realização dessa conquista.

À Ana Carla Pozzi Oliveira, pela amizade, palavras de motivação, auxílio no desenvolvimento das Iniciações Científicas que fiz, além do investimento em minha formação.

Aos meus professores de graduação do Departamento de Fisilogia da UEM, Márcia Brito e seu esposo Nilton, Vilma Godoy, Cecília Mareze, Célia Ambiel e Montserrat Pedrosa pela amizade e competência.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

E por fim, aos colegas que me acolheram e a todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para conclusão desta etapa de minha formação. Muito obrigado por tudo!

“A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio.”

Martin Luther King Jr.

RESUMO

Teixeira CJ. Gonadectomia e DHEA: efeitos metabólicos em ratas adultas alimentadas com dieta hiperlipídica. [Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2014.

A privação dos hormônios sexuais em fêmeas, natural ou induzida, contribui para o aparecimento de diversos distúrbios metabólicos e endócrinos, como resistência à insulina, intolerância à glicose e diabetes, além de doenças cardiovasculares, devido, em parte, à perda do efeito protetor dos estrógenos. Deidroepiandrosterona (DHEA) e sua forma sulfatada (DHEAS) são os esteróides mais abundante em humanos, produzidos principalmente pela córtex das adrenais, convertidos a andrógenos e estrógenos em tecidos periféricos por enzimas esteroidogênicas tecido-específicas. Nesse estudo foi avaliado o impacto da suplementação com DHEA sobre a adiposidade e homeostase glicêmica. Ratas sham-operadas ou ooforectomizadas foram alimentadas com dieta hiperlipídica ao longo de 12 semanas e tratadas com veículo (óleo mineral) ou DHEA (10 mg/kg de peso corporal, sc) por 21 dias finais. A castração promoveu aumento no peso corporal em cerca de 30% em relação às ratas controles. Isso foi refletido em maior adiposidade nos coxins (subcutâneo, periuterino e retroperitoneal), índice de massa corporal e índice de Lee. Além disso, ratas ovariectomizadas apresentaram aumento no consumo de ração e ingestão energética e diminuição da ingestão hídrica em 10% e 40%, respectivamente, em referência aos animais intactos, e o uso do DHEA induziu um acréscimo em torno de 15% sobre o consumo alimentar e ingestão energética, além de reduzir a ingestão hídrica no grupo SHAM+DHEA. Ainda, ooforectomia induziu resistência à insulina e intolerância à glicose nos animais, e a administração de DHEA diminuiu a sensibilidade à insulina em aproximadamente 10% em relação às ratas que receberam veículo, sendo esse efeito mais expressivo no grupo OVX+DHEA. Quanto às dosagens bioquímicas, a remoção dos ovários levou a redução nos níveis plasmáticos de DHEA, estradiol, VLDL-c e triacilglicerol, albumina, uréia e creatinina, e o tratamento com DHEA elevou os níveis de DHEA nos grupos SHAM+DHEA e OVX+DHEA, indicando a eficiência do tratamento, além de restaurar parcialmente a concentração de estradiol no grupo OVX+DHEA e reduzir os níveis de creatinina, sendo esse efeito mais evidente no grupo SHAM+DHEA. E por fim, a castração também promoveu algumas alterações tecido-específicas nas etapas iniciais da via de sinalização de insulina em referência as ratas controles. No fígado, foi detectado redução da expressão proteica da AKT1/2/3 e aumento do grau de fosforilação em serina 307 do IRS1. No músculo, foi observada diminuição da expressão proteica do IR, IRS1 e redução do estado de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS1/2). No coração, houve diminuição da expressão proteica do IRS1 e da PI3K, além da redução do grau de fosforilação em tirosina dos grupos SHAM+DHEA, OVX e OVX+DHEA. Deste modo, nossos achados indicam que a castração contribuiu com o aparecimento da resistência à insulina e intolerância à glicose promovida pela obesidade, e neste modelo, o tratamento com DHEA não exerceu efeitos benéficos, mas sim, reduziu a sensibilidade à insulina nos animais.

Palavras-chave: Castração. Ovariectomia. Menopausa. Obesidade. Resistência à insulina. Deidroepiandrosterona.

ABSTRACT

Teixeira CJ. Gonadectomy and DHEA: metabolic effects in adult female rats fed with high-fat diet. [Masters thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Deprivation of sex hormones in females, natural or induced, contributes to the emergence of several metabolic and endocrine disorders, such as insulin resistance, glucose intolerance and diabetes, other than cardiovascular disease, due, in part, to the loss the protective effect of estrogens. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated form (DHEAS) are the most abundant steroid in humans, produced mainly by the adrenal cortex, converted to androgens and estrogens in peripheral tissues by tissue-specific steroidogenic enzymes. In this study the effect of castration and DHEA supplementation on adiposity and glucose homeostasis was evaluated. Rats sham-operated or ovariectomized were fed with a high-fat diet during 12 weeks and treated with vehicle (mineral oil) or DHEA (10 mg/kg of body weight, sc) for 21 days before the experiment. Castration promoted an increase in body weight of about 30% compared to control rats. This was reflected in greater adipose tissue in subcuteneous, retroperitoneal and periuterine, body mass index and index Lee. Moreover, ovariectomized rats showed an increase in food intake and energy intake and decrease in water intake by 10% and 40%, respectively, comparing to intact animals, and the use of DHEA induced an increase of around 15% on food consumption and energy intake, while reducing the water intake in SHAM+DHEA group**.** Additionally, ovariectomy induced insulin resistance and glucose intolerance in animals, and administration of DHEA decreased insulin sensitivity by approximately 10% compared to rats that received vehicle, this effect was more significant in OVX+DHEA group. Regarding biochemical levels, ovarium removal decreased plasma levels of DHEA, estradiol, VLDL-c and triacylglycerol, albumin, urea and creatinine, and treatment with DHEA increased DHEA levels in SHAM+DHEA and OVX+DHEA groups, indicating efficiency of the treatment, and partially restore the concentration of estradiol in the OVX+ DHEA group and lower creatinine levels, and this effect is more evident in SHAM+DHEA. Finally, ovariectomy also promoted certain tissue-specific changes in the initial stages of the insulin signaling pathway when compared to the control rats. In the liver, protein expression reduction of AKT1/2/3 and increasing of IRS1 (Ser307) phosphorylation status was detected. In the muscle, decreasement of IR, IRS1 protein expression and reduction of pp185 (IRS1/2) tyrosine phosphorylation status was observed. In the heart, there was a decreasement of IRS1 and PI3K protein expression, besides reduction of the tyrosine phosphorylation status in the SHAM+DHEA, OVX and OVX + DHEA groups. Thus, our findings indicate that castration contributed to onset of insulin resistance and glucose intolerance promoted by obesity, and in this model, the treatment with DHEA did not generated beneficial effects, but impaired insulin sensitivity in animals.

Keywords: Castration. Ovariectomy. Menopause. Obesity. Insulin resistance. Dehydroepiandrosterone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Desenho experimental…….....…….....27

Figura 2 – Fotomicrografias de esfregaços vaginais de ratas..... 35

Figura 3 – Massa corporal de animais tratados com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.....36

Figura 4 – Sensibilidade à ação da insulina exógena durante o teste de tolerância à insulina (ITT) curto de ratas tratadas com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia..... 39

Figura 5 – Teste de tolerância à glicose (ipGTT) de animais tratados com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.....40

Figura 6 – Expressão proteica e grau de fosforilação de proteínas no fígado de ratas tratadas com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.....45

Figura 7 – Expressão proteica e grau de fosforilação de proteínas no músculo gastrocnêmio de animais tratados com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia..... 48

Figura 8 – Expressão proteica e grau de fosforilação de proteínas no coração de ratas tratadas com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos diferentes constituintes que compõe a dieta utilizada..... 25

Tabela 2 – Dados zoométricos de ratas tratadas com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.....37

Tabela 3 – Efeito da dieta sobre a média do consumo de alimento, ingestão hídrica e calórica, eficiência alimentar e percentual de preferência pela ração de animais tratados com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.....38

Tabela 4 – Massa de órgãos e tecidos de ratas tratadas com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.....42

Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos de animais tratados com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.....43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT1	Proteína cinase B isoforma 1
AKT2	Proteína cinase B isoforma 2
AKT3	Proteína cinase B isoforma 3
ALT	Alanina aminotransferase
ArKO	Animais knockout para aromatase
AST	Aspartato aminotransferase
CT	Colesterol total
DHEA	Deidroepiandrosterona
DHEAS	Deidroepiandrosterona sulfatada
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DTT	Ditiotreitol
ECL	Sistema de detecção de quimiluminescência (Enhanced chemiluminescence)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)
ERs	Receptores de estrógenos
ERα	Receptor de estrógeno alfa
ERβ	Receptor de estrógeno beta
ERβ2	Isoforma do ERβ
ERK1	Cinase 1 regulada por sinal extracelular
ERK2	Cinase 2 regulada por sinal extracelular
ESR1	Receptor 1 de estrógeno (Outra nomenclatura para ERα)
ESR2	Receptor 2 de estrógeno (Outra nomenclatura para ERβ)
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
FoxO1	Fator de transcrição 1 da família FoxO
GPER	Receptor de estrógeno acoplado a proteína G
GPR30	Receptor de estrógeno acoplado a proteína G 30 (Outra nomenclatura para GPER)
GTT	Teste de tolerância à glicose
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade
IB	Imunoblotting

IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IKKβ	Subunidade β da cinase inibidora do fator nuclear kappa-B
ip	Via de adminstração intraperitoneal
IRβ	Subunidade β do receptor de insulina
IMC	Índice de massa corporal
IRS1	Substrato 1 do receptor de insulina
IRS2	Substrato 2 do receptor de insulina
ITT	Teste de tolerância à insulina
JNK	c-Jun cinase terminal NH_2
kDa	Quilodalton
K_{ITT}	Constante de decaimento da glicose
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
LKO	Animais knockout para ERα no fígado
MAPK	Proteína cinase ativadora da mitogênese
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PKCζ	Proteína cinase C zeta
PKCλ	Proteína cinase C lambda
p-Tyr	Fosfotirosina
p38	Membro da família da MAPK
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
sc	Via de adminstração subcutânea
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio para eletroforese
SERCA2	Cálcio ATPase do retrículo endoplasmático isoforma 2
TAG	Triacilglicerol
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TRIS	Tri(hidroximetil)-aminometano
VLDL-c	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

1.1 Importância dos estrógenos e menopausa 18

1.2 Deidroepiandrosterona (DHEA) 21

1.3 Considerações finais 23

2 OBJETIVOS 24

2.1 Geral 24

2.2 Específicos 24

3 MATERIAL E MÉTODOS 25

3.1 Animais 25

3.2 Ração 25

3.3 Grupos experimentais 25

3.4 Desenho experimental 26

3.5 Administração de DHEA 26

3.6 Determinação das fases do ciclo ovariano 27

3.7 Consumo de ração e ingestão hídrica 28

3.8 Constante de decaimento da glicose (K_{ITT}) 28

3.9 Teste de tolerância à glicose (ipGTT) 29

3.10 Características zoométricas 29

3.10.1 Determinação da massa corporal *29*

3.10.2 Índice de Massa Corporal e Lee *29*

3.10.3 Peso dos tecidos *29*

3.11 Análises bioquímicas 30

3.11.1 Dosagem de glicose no sangue total *30*

3.11.2 Dosagens espectrofométricas *30*

3.11.3 Dosagem de DHEA *30*

3.11.4 Dosagem de estradiol *31*

3.11.5 Dosagem de insulina *31*

3.12 Expressão das proteínas totais e fosforiladas envolvidas na sinalização da insulina no fígado, músculo gastrocnêmio e coração 31

3.12.1 Extração dos tecidos *32*

3.12.2 Immunoblotting *32*
3.13 Análise estatística 33
4 RESULTADOS 35
4.1 Determinação das fases do ciclo ovariano 35
4.2 Características zoométricas 36
4.3 Consumo de ração e ingestão hídrica 37
4.4 Constante de decaimento da glicose (K_{ITT}) 38
4.5 Teste de tolerância à glicose (ipGTT) 40
4.6 Massa de órgãos e tecidos 41
4.7 Parâmetros bioquímicos 42
4.8 Immunoblotting de proteínas 44
4.8.1 Tecido hepático *44*
4.8.2 Músculo gastrocnêmio *46*
4.8.3 Coração *49*
5 DISCUSSÃO 53
6 CONCLUSÃO 64
REFERÊNCIAS 65
APÊNDICES 80
APÊNDICE A – Representação gráfica do percentual (%) da frequência de ocorrência de cada fase do ciclo estral antes e após a ooforectomia ao longo de 4 dias. 81
APÊNDICE B – Percentual (%) de ganho de peso dos animais durante o período experimental. 81
APÊNDICE C – Efeito da ovariectomia bilateral sobre a média do consumo de alimento, ingestão hídrica e calórica e percentual de preferência pela ração hipercalórica/hiperlipídica 5 e 9 semanas após a castração. 82
APÊNDICE D – Constante de desaparecimento da glicose (K_{ITT}) mensurado nas ratas após 5 e 9 semanas de ooforectomia. 82
APÊNDICE E – Teste de tolerância à glicose (ipGTT) de animais após 9 semanas de castração. 83

APÊNDICE F – Expressão proteica e grau de fosforilação de proteínas envolvidas nas etapas intracelulares iniciais da ação insulínica no fígado de ratas tratadas com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia normalizadas com Ponceau. .83
APÊNDICE G – Expressão proteica e grau de fosforilação de proteínas envolvidas nas etapas intracelulares iniciais da ação insulínica no músculo gastrocnêmio de ratas tratadas com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia normalizadas com Ponceau. 84
APÊNDICE H – Expressão proteica e grau de fosforilação de proteínas envolvidas nas etapas intracelulares iniciais da ação insulínica no coração de ratas tratadas com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia normalizadas com Ponceau. 84
APÊNDICE I – Tabela geral dos resultados obtidos. 85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância dos estrógenos e menopausa

A menopausa é uma condição natural experimentada por todas as mulheres entre 48 e 55 anos, com média de idade de 51 anos (Barbo, 1998). A perda da função ovariana, fisiológica ou induzida, contribui para o aparecimento de diversos distúrbios metabólicos e endócrinos, como aumento do peso corporal, resistência à insulina, intolerância à glicose e diabetes mellitus tipo 2, além de doenças cardiovasculares, devido em parte, à perda do efeito protetor dos estrógênos (Polotsky, Polotsky, 2010).

Ao longo dos anos, a sociedade moderna tem passado por grandes mudanças no estilo alimentar, consumindo dietas cada vez menos saudáveis e ricas em gorduras (Satia-Abouta et al., 2002). A ingestão de alimentos aumentada associada à diminuição do gasto energético em decorrência ao sedentarismo disparou a prevalência da obesidade, que agora é considerada uma epidemia global (James, 2008; Wild et al., 2004; World Health Organization, 2000). Dados da Organização Mundial de Saúde mostraram que a incidência de obesidade pelo mundo duplicou desde a década de 1980, sendo que em 2008, mais de 1,4 bilhões de adultos acima de 20 anos estavam acima do peso, e destes, mais de 200 milhões de homens e quase 300 milhões de mulheres eram obesos (WHO, 2012). No Brasil, o Ministério da Saúde publicou em 2012 que aproximadamente 50% da população acima de 18 anos estavam acima do peso ideal, sendo que dentro deste percentual 54% eram homens e 48% foram mulheres. Nesse contexto, o desenvolvimento da obesidade é acelerado após a menopausa tanto em humanos (Bagnoli et al., 2014; Krishnan et al., 2014; Lovejoy et al., 2008), quanto em modelos experimentais (Camporez et al., 2013, 2011; Veras et al., 2014), confirmando o importante papel dos hormônios sexuais no controle do peso corporal.

Estrógenos são hormônios esteróides que regulam crescimento, diferenciação e função em uma ampla gama de tecidos-alvo no corpo humano. O estrógeno mais potente e dominante em seres humanos é 17β-estradiol (E2), todavia níveis mais baixos de estrona (E1) e estriol (E3) também são encontrados (Björnström, Sjöberg, 2005). Os efeitos biológicos desses hormônios são mediados através dos receptores clássicos de estrógenos (ERs), ERα e ERβ (também conhecidos como ESR1 e

ESR2, respectivamente), que são membros de uma grande superfamília de receptores nucleares, regulando processos de transcrição gênica (Björnström, Sjöberg, 2005; Konigame et al., 2011; Lucas et al., 2011; Royer et al., 2012). Além disso, recentemente foi descoberto um receptor não clássico de membrana acoplado a uma proteína G (GPR30), também conhecido como GPER, que parece exercer uma resposta estrogênica independente dos receptores intracelulares para o estrógeno (Filardo et al., 2000; Filardo, Thomas, 2012, 2005).

O E2 regula vários aspectos da homeostase energética, através de ações periféricas e mecanismos centrais. Diversos estudos demonstram que o estradiol modula a ingestão alimentar e acúmulo de gordura aumentando o gasto energético por meio de ações diretas no hipotálamo e cérebro posterior (ponte e bulbo) (Asarian, Geary, 2007; Musatov et al., 2007; Santollo et al., 2011; Thammacharoen et al., 2008). Os efeitos do estradiol no hipotálamo são mediados via ERα, pelo fato de que esta isoforma é altamente expressa nessa região (Roepke, 2009). Além disso, a literatura mostra que camundongos que tiveram a deleção do ERα em neurônios do núcleo ventromedial do hipotálamo (Mamounis et al., 2014), ou animais knockout para ERα (Heine et al., 2000), apresentam redução no gasto energético quando comparados aos animais normais, que é uma das primeiras causas de obesidade.

Outro efeito importante dos estrógenos está relacionado à distribuição da gordura corporal. Estudos demonstram que o estradiol promove o acúmulo de gordura subcutânea (Krotkiewski et al., 1983), e a perda estrogênica pela menopausa é associada com o acúmulo de gordura visceral (Lee et al., 2009; Poehlman et al., 1995), uma vez que o E2 estimula a atividade da lipase lipoprotéica em adipócitos femorais e lipólise em adipócitos abdominais (Rebuffe-Scrive et al., 1986). De acordo com Lovejoy et al. (2008), o aumento da adiposidade observado em mulheres na menopausa poderia ser explicado por redução no gasto energético, acompanhado de menor atividade física espontânea e menor oxidação de gordura. Por outro lado, alguns estudos demonstraram que animais ovariectomizados e que receberam a suplementação estrogênica tiveram redução do ganho de peso (Camporez et al., 2013; Roesch, 2006).

Dentre os distúrbios metabólicos associados à obesidade destaca-se a síndrome metabólica, que está correlacionada com alguns fatores de risco, como aumento da adiposidade intra-abdominal, dislipidemia, intolerância a glicose, e

hipertensão, sendo um problema de saúde altamente prevalente nas últimas décadas (Bentley-Lewis et al., 2007; Després, 1993; Reaven, 2005). A síndrome metabólica leva a um maior risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e aumenta a morbidade e mortalidade cardiovascular, e em mulheres na pós-menopausa, a incidência de doenças cardiovasculares é muito maior do que em homens de mesma idade ou mulheres na pré-menopausa (Kaaja, 2008).

A resistência à insulina é uma marca bem conhecida da síndrome metabólica, que por sua vez, é um importante mecanismo fisiopatológico do DM2 (Gregor, Hotamilsligil, 2011; Harcourt et al., 2013). Em muitos casos, está associada a uma complexa rede de vias de sinalização, incluindo redução da fosforilação em tirosina do IR e seus substratos (IRS1/2), bem como redução da fosforilação em serina da AKT nos tecidos-alvos da insulina (Boura-Halfon, Zick, 2009; Hotamisligil et al., 1996; Veras et al., 2014). Em situações de obesidade, há uma elevação nos níveis de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), que podem ativar diversas serinas quinases (JNK e IKKβ). Estas serinas estimulam a fosforilação em serina do IRS1, que inibem a ação da insulina (Aguirre et al., 2003; Gao et al., 2002; Hirosumi et al., 2002; Hotamisligil et al., 1996; Lee et al., 2003). Nesse contexto, uma alternativa para a avaliação da resistência à insulina poderia ser a fosforilação do IRS1 em resíduos serina 307 em roedores ou serina 312 em humanos (Bandyopadhyay et al., 2005; Gao et al; 2002).

Tem sido demonstrado que a menopausa, independente da idade, é um fator de risco para o aumento dos níveis plasmáticos da glicose de jejum em mulheres não diabéticas (Otsuki et al., 2007). Ademais, vários estudos demonstram que a resistência à insulina aumenta em mulheres na pós-menopausa (Bonora et al., 2000; Goyal et al., 2013; Krishnan et al., 2014; Llaneza et al., 2010; Rasgon et al., 2014). De acordo com a literatura, mulheres que fizeram a terapia de reposição hormonal com estrogênio e progestágenos apresentaram diminuição nos valores de insulina plasmática (Saraç et al., 2009) e melhora na sensibilidade à insulina (Margolis et al., 2004; Saraç et al., 2009). Em modelos experimentais, a castração também reduz a sensibilidade à insulina nos animais, e a suplementação com estradiol é capaz de reverter tais efeitos (Abbas, Elsamanoudy, 2011; Camporez et al., 2013; Riant et al., 2009; Stubbins, et al., 2012), indicando um importante efeito dos estrógenos no metabolismo da glicose. Todavia, é importante salientar que embora a terapia de reposição hormonal com estradiol apresente efeitos favoráveis a alguns aspectos

metabólicos, ela pode aumentar a incidência de câncer de mama, câncer endometrial, câncer coloretal, tromboembolismo venoso e acidente vascular cerebral (Chlebowski et al., 2010; Prentice et al., 2009). Nesse sentido, a busca por tratamentos alternativos para o alívio dos sintomas provocados pela menopausa, ao invés da reposição clássica com estrogênios, deve ser investigada.

1.2 Deidroepiandrosterona (DHEA)

Deidroepiandrosterona (DHEA) e seu éster sulfatado (DHEAS) são os principais hormônios esteróides circulantes produzidos abundantemente pela córtex das glândulas suprarrenais em humanos (Jacob et al., 2008). A síntese desse hormônio é baixa ou quase nula nos mamíferos, exceto nos primatas (Cutler at al., 1978). Alguns humanos e outros primatas são os únicos entre as espécies animais que possuem suprarrenais que secretam grandes quantidades de precursor inativo do DHEA, o DHEAS e a androstenediona (4-diona), que são biotransformados em andrógenos e estrógenos potentes nos tecidos periféricos (Labrie et al., 1998). No entanto, tem sido demonstrado que alguns tecidos, como o cérebro, fígado e ovários também podem produzir DHEA tanto em humanos quanto em roedores (Baulieu, 1998; Grasfeder et al., 2009; Mellon et al., 2001).

Ao nascimento, as concentrações plasmáticas de DHEA estão elevadas, e os níveis deste esteróide vão diminuindo gradativamente até o primeiro ano de vida e continuam baixos até a adrenarca, por volta de 6 a 8 anos. A diminuição da concentração de DHEA está relacionada com a involução da zona fetal da cortéx das suprarrenais e a substituição pela cortéx definitiva, que inicialmente sintetiza pouco DHEA (De Peretti, Forest, 1976).

O aumento nas concentrações circulantes de DHEA e DHEAS são características bioquímicas da adrenarca, e ocorre antes do aumento de estrógenos ou andrógenos associados com a puberdade (Ducharme et al., 1976; Smith et al., 1975). As concentrações séricas de DHEAS continuam a subir, e um pico ocorre na segunda década de vida, atingindo seus valores máximos, com níveis maiores em homens do que em mulheres (Migeon et al., 1957; Orentreich et al., 1984; Smith et al., 1975). A partir da quarta década de vida, os níveis de DHEA começam a declinar novamente, chegando a concentrações mínimas por volta dos 80 anos de idade (Bélanger et al., 1994; Genazzani et al., 2007; Orentreich et al., 1984).

Estima-se que mais de 40% do total de andrógenos nos homens e acima de 90% de estrógeno em mulheres na pós-menopáusa são derivados da conversão periférica de DHEA e DHEAS (Labrie et al., 1995). A diminuição da síntese de DHEA pelas suprarrenais durante o envelhecimento, aproximadamente 80%, resulta na redução expressiva da formação de andrógenos e estrógenos por tecidos-específicos na periferia (Labrie et al., 1995), implicando em diversas patologias, como doença cardiovascular (Barrett-Connor et al., 1986), obesidade (Nestler et al., 1988), resistência à insulina (Schriock et al., 1988), câncer (Labrie et al., 2003) e depressão e redução da sensação de bem estar (Schmidt et al., 2005). Logo, vários estudos têm focado nos efeitos do DHEA sobre a resistência à insulina, obesidade e doenças cardiovasculares.

Em seres humanos, foi observado que baixas concentrações plasmáticas de DHEA e DHEAS estão relacionadas com excesso de peso e obesidade, pelo aumento da adiposidade (De Pergola et al., 1996; Tchernof et al., 1995). Por outro lado, a suplementação com DHEA em pacientes idosos anos apresentou efeitos benéficos, reduzindo a gordura visceral e subcutânea, além de melhorar a sensibilidade à insulina (Lasco et al., 2001; Villareal, Holloszy, 2004), embora Mortolla e Yen (1990) demonstrarem que o uso do DHEA em doses suprafisiológicas aumentou a resistência à insulina em mulheres na menopausa.

Efeitos positivos também foram observados quanto ao uso do DHEA em modelos animais. Roedores alimentados com dieta hiperlipídica tiveram aumento da adiposidade e resistência à insulina, e o tratamento com DHEA reduziu o acúmulo de gordura visceral e reverteu o desenvolvimento da resistência à insulina (Hansen et al., 1997; Mohan et al., 1990). Além disso, vários outros estudos publicados por nosso laboratório demonstraram que o tratamento com DHEA induziu melhora na sensibilidade à insulina por modular a via PI3K/AKT, aumentando a o grau fosforilação da AKT em resíduos serina (Campbel et al., 2004; Medina et al., 2006; Veras et al., 2014). Kimura et al. (1998) sugeriram que um mecanismo pelo qual o DHEA melhora a resistência à insulina é pela diminuição dos níveis de TNF-α, que apresenta-se elevado em situações de obesidade, uma vez que essa citocina pode ativar serinas quinases, como JNK e IKKβ, e impeder a fosforilação do IRS1 em tirosina, prejudicando a ação da insulina dos tecidos-alvos.

1.3 Considerações finais

Em suma, diversos trabalhos reportam uma gama de efeitos deletérios relacionados à perda da função ovariana. DHEA e sua forma sulfatada (DHEAS), produzidos pelas suprarrenais, são os esteróides mais abundantes na circulação dos humanos, e podem ser biotransformados em esteróides sexuais em tecidos-específicos. Há décadas em países como Estados Unidos, França, Bélgica, Suiça e outros na Europa o DHEA tem sido vendido como um suplemento alimentar. Na literatura é possível encontrarmos estudos que apontam efeitos benéficos como a redução da obesidade, melhora da sensibilidade à insulina e redução do risco de doenças cardiovasculares, tanto em humanos quanto em modelos animais (Hansen et al., 1997; Lasco et al., 2001; Medina et al., 2006; Veras et al., 2014; Villareal, Holloszy, 2004), além de suprimir a proliferação de células cancerígenas na mama (Lopéz-Marure et al., 2011).

É importante salientar que embora a terapia de reposição hormonal clássica com estradiol apresente efeitos favoráveis a alguns aspectos metabólicos, ela pode aumentar a incidência de câncer de mama, câncer endometrial, câncer coloretal, tromboembolismo venoso e acidente vascular cerebral (Chlebowski et al., 2010; Prentice et al., 2009). Diante da necessidade crescente de ampliar o arsenal terapêutico para o controle dessas mesmas condições que afetam a saúde mulheres à medida que envelhecem, a busca dentro do conjunto de drogas e/ou suplementos alimentares testados pelo uso prolongado é uma opção que deve ser estudada.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos da castração sobre aspectos metabólicos em ratas adultas jovens alimentadas com dieta hiperlipídica e suplementadas com DHEA.

2.2 Específicos

Avaliar:

a) Parâmetros zoométricos – evolução ponderal, peso dos coxins adiposos (subcutâneo, periuterino, e retroperitoneal), peso uterino, peso cardíaco úmido e rins;
b) Consumo alimentar e ingestão hídrica;
c) Homeostase glicêmica através da constante de decaimento da glicose (K_{ITT}) e do teste de tolerância à glicose (ipGTT);
d) Parâmetros bioquímicos (DHEA, estradiol, insulina, glicemia, colesterol total e frações (HDL-c, LDL-c e VLDL-c), triacilglicerol, proteínas totais, albumina, uréia, creatinina, ALT e AST);
e) Expressão das proteínas envolvidas nas vias de insulina (subunidade β do IR, IRS1, p85PI3K e AKT), no fígado, músculo esquelético (gastrocnêmio) e coração (ventrículo esquerdo - VE), e SERCA2, no VE;
f) Fosforilação das proteínas IR, IRS1 (Ser307) e AKT (Ser473) no fígado, músculo esquelético e VE, e pp185 (IRS1/IRS2) no músculo esquelético e VE.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar com 60 dias de vida, adquiridas do Biotério de Criação Profa. Dra. Lor Cury do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Estas foram mantidas em gaiolas plásticas, sob condições de controle de temperatura (22 ± 2 ºC) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água *ad libitum* e alimentação no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB/USP). Todo o experimento foi conduzido de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB/USP, registrado sob o n.º 24 nas fls. 126 do livro 02.

3.2 Ração

Ao longo de todo o procedimento experimental, os animais foram alimentados com dieta hiperlipídica, formulada pela PragSoluções (PragSoluções Biociências, Jaú, SP, Brasil) (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação dos diferentes constituintes que compõem a dieta utilizada.

Constituintes	Dieta hiperlipídica (g)	kcal/kg
Carboidratos	36,0	1.438
Lipídeos	34,0	3.060
Proteínas	20,3	812
Fibras	5,0	0
Mix de vitaminas	1,3	40
Mix de minerais	3,5	0
Total	100	5.350

Nota: Os valores acima apresentados foram expressos para cada 100g de ração.
Constituição lipídica: óleo de soja (4%) + banha (30%).
Fonte: Adaptada de PragSoluções Biociências, 2014.

3.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais:

a) grupo 1 – Sham (SHAM);
b) grupo 2 – Sham + DHEA (SHAM+DHEA);
c) grupo 3 – Ovariectomizada (OVX);

d) grupo 4 – Ovariectomizada + DHEA (OVX+DHEA).

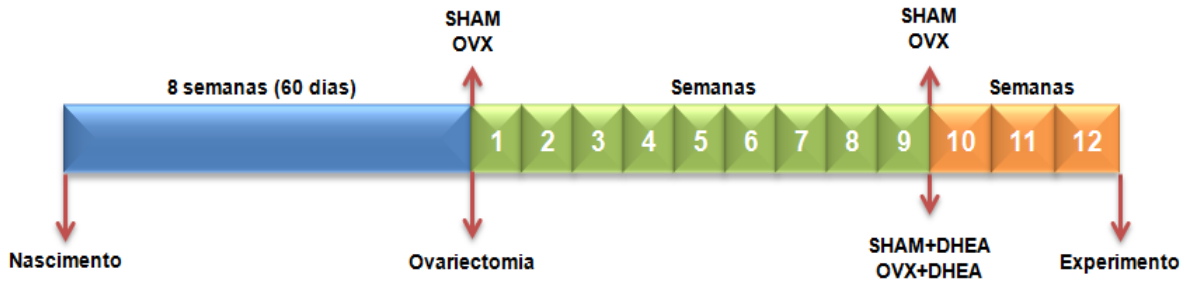
3.4 Desenho experimental

Na 8ª semana de vida, as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral. Os animais foram anestesiados com uma mistura contendo ketamina, xilazina e acepromazina (100, 20 e 1 mg/kg de peso corporal do animal, respectivamente, intraperitoneal). Após a confirmação da anestesia através da ausência de reação de retirada da pata a estímulo doloroso com pressão, foi feito a tricomia e a abertura da cavidade abdominal. Depois, os ovários foram clampeados e removidos. Ao final, a parede abdominal foi suturada e os animais ficaram em observação por 4 horas, até acordarem. Para analgesia pós-operatória, as ratas receberam uma injeção intramuscular de tramadol (5 mg/kg de peso corporal). Os grupos SHAM e SHAM+DHEA sofreram o mesmo procedimento, porém os ovários não foram retirados.

3.5 Administração de DHEA

Após a cirurgia, os animais foram divididos em dois grupos apenas, SHAM ou ovariectomizadas (OVX), até 9ª semana. A partir do início da 10ª semana, os animais foram subdivididos em dois grupos cada, onde receberam veículo (óleo mineral) ou DHEA (10 mg/kg de peso corporal, diluído em óleo mineral, subcutâneo), por mais 21 dias. As injeções foram administradas uma vez por semana, no início da 10ª, 11ª e 12ª semana após a ovariectomia, totalizando 3 doses e volume inferior a 0,5 mL. Ao final da 12ª semana foi realizada a retirada dos tecidos e sangue em animais anestesiados (Figura 1).

Figura 1 – Desenho experimental.



A cirurgia para remoção dos ovários ocorreu na 8ª semana de vida. Ao fim da 9ª semana pós-castração, os animais foram subdivididas em 4 grupos (SHAM, SHAM+DHEA, OVX e OVX+DHEA). As ratas SHAM+DHEA e OVX+DHEA foram tratadas por 21 dias com DHEA (10 mg/kg de peso corporal, sc), enquanto as SHAM e OVX foram tratadas com volume semelhante de veículo. A extração dos tecidos e coleta de sangue ocorreu ao final da 12ª semana.

3.6 Determinação das fases do ciclo ovariano

Uma das questões importantes quando se utiliza ratas em experimentos é a determinação do ciclo estral. Portanto, para a comprovação da castração, esfregaços vaginais foram feitos antes da cirurgia e seis semanas após a mesma.

Durante quatro dias consecutivos, amostras de secreção vaginal foram coletadas entre 8 e 9h da manhã. Com o auxílio de uma micropipeta, 50µL de solução salina (NaCl 0,9%) foi injetado na vagina de cada animal. A vagina foi lavada duas a três vezes com essa solução, e em seguida, o fluido foi colocado numa lâmina de vidro. O material a fresco foi observado através de microscópio de luz com lentes objetivas de 10 e 40x (Marcondes et al., 2002). Três tipos de células foram reconhecidas: células epiteliais (arredondadas e nucleadas), células cornificadas (irregulares e anucleadas) e leucócitos.

A determinação das fases do ciclo estral foi feita de acordo com a proporção de células presente nos campos observados. Na fase de proestro, observou-se o predomínio de células epiteliais nucleadas, enquanto no estro, verificaram-se células cornificadas anucleadas. Na fase de metaestro constatou-se uma diversidade de células em proporção semelhantes, como leucócitos, células cornificadas e células epiteliais. Já na fase de diestro, observou-se o predomínio de leucócitos (Long, Evans, 1922; Mandl, 1951).

3.7 Consumo de ração e ingestão hídrica

Para obter uma média de consumo de ambas variáveis, alguns animais foram acomodados em caixas plásticas individuais por dois dias, e o cálculo foi feito pela diferença entre o ofertado (previamente mensurado) e a sobra, a cada 24 h.

Com base na ingestão de alimentos e da quantidade de calorias, considerando o percentual de carboidratos (4 kcal/g), lipídeos (9 kcal/g) e proteínas (4 kcal/g) (Diniz et al., 2005; Marçal et al., 2013), foram calculados os seguintes parâmetros:

Ingestão energética

= média do consumo de ração x energia metabolizável da dieta

Eficiência alimentar

= média do ganho de peso (g) / consumo de ração (g)

Percentual de preferência (%)

= (quantidade ingerida da dieta x 100) / 40 g da dieta ofertada

3.8 Constante de decaimento da glicose (K_{ITT})

Considerando que os roedores apresentam padrão alimentar espontâneo no período noturno, o controle de um jejum alimentar imposto durante a noite seria extenso. Assim, as ratas foram submetidas à privação alimentar por 6 horas, no período das 8 h às 14 h, e logo após, submetidas ao teste de tolerância à insulina (0,75 U/kg de peso corporal). Com os animais acordados, a primeira coleta de sangue foi realizada no tempo 0 (basal). Em seguida, as ratas receberam uma injeção intraperitoneal do hormônio, e amostras de sangue da cauda foram coletadas nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para mensuração da glicemia. A constante de desaparecimento da glicose de sangue total foi calculada pela fórmula 0,693/t½. O t½ da glicose foi calculado a partir do *slope* da concentração de glicose no plasma durante a fase linear de decaimento (Bonora et al., 1989).

3.9 Teste de tolerância à glicose (ipGTT)

Após jejum de 6 h, no período das 8 h às 14 h, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose. Com os animais acordados, a primeira coleta de sangue foi realizada no tempo 0 (basal). Em seguida, uma solução de glicose 20% (2,0 g/kg de peso corporal) foi administrada na cavidade intraperitoneal. Amostras de sangue foram coletadas da veia caudal nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos para determinação da concentração de glicose. Os resultados foram apresentados pela análise da área sob a curva, de acordo com Cintra et al. (2012).

3.10 Características zoométricas

3.10.1 Determinação da massa corporal

Para determinação da evolução corporal, os animais foram pesados a cada 7 dias em balança de precisão, ao longo de todo o procedimento experimental.

3.10.2 Índice de Massa Corporal e Lee

O comprimento naso-anal (cm) também foi coletado para o cálculo do índice de massa corporal (IMC) (Nascimento et al., 2008) e índice de Lee (Bernardis, 1970), de acordo com as equações abaixo.

$$\text{IMC} = \text{peso do animal (g)} / \text{comprimento naso-anal (cm)}^2$$

$$\text{Índice de Lee} = \sqrt[3]{\text{peso do animal (g)} / \text{comprimento naso-anal (cm)}}$$

3.10.3 Peso dos tecidos

No dia da extração dos tecidos, os coxins adiposos (subcutâneo, periuterino e retroperitoneal), útero, coração e rins (direto+esquerdo) foram mensurados em balança analítica.

3.11 Análises bioquímicas

Após restrição alimentar de 6 h, os animais foram anestesiados com tiopental e amostras de sangue foram obtidas por decapitação no dia da extração dos tecidos. O soro foi separado após centrifugação a 1.500 rpm por 20 minutos a 4 ºC, e armazenado a -80 ºC para posterior análise.

3.11.1 Dosagem de glicose no sangue total

A glicose plasmática foi determinada com tiras reativas e medidor de glicose Optium Xceed (Abbott Diabetes Care, Inc., Alameda, CA, Estados Unidos).

3.11.2 Dosagens espectrofométricas

O colesterol total, colesterol HDL, triacilglicerol, proteínas totais e albumina foram analisados usando kits de ensaio colorimétrico da Wiener (Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina) seguindo as instruções do fabricante. Uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram analisados usando kits de ensaio colorimétrico da Labtest (Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil). Os níveis séricos de colesterol LDL e VLDL foram calculados de acordo com Friedewald et al. (1972).

$$\text{VLDL-c} = \text{TAG}/5$$

$$\text{LDL-c} = \text{CT} - (\text{HDL-c} + \text{VLDL-c})$$

3.11.3 Dosagem de DHEA

A concentração sérica de DHEA foi medida por radioimunoensaio, usando o kit comercial da Immunotech (Beckman Coulter Inc., Praga, República Checa), referência DSL8900, e dosado em contador tipo gama (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, Estados Unidos).

3.11.4 Dosagem de estradiol

A concentração sérica de estradiol foi feita pelo método de Elisa, usando o kit comercial da IBL (IBL International GMBH, Humburg, Germânia), referência RE52041.

3.11.5 Dosagem de insulina

A determinação da quantidade de insulina sérica foi determinada por radioimunoensaio, por meio de quantidades conhecidas de anticorpo e do hormônio marcado radioativamente (insulina marcada com iodo – [^{125}I]) (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, Estados Unidos) e uma quantidade desconhecida de hormônio não-radioativo (amostra). As duas formas do hormônio, radioativos e não-radioativos, competem por um mesmo número de locais de ligação ao anticorpo. O complexo insulina-anticorpo marcado formado foi precipitado com polietilenoglicol (PM 6000) e dosado em contador tipo gama (PerkinElmer Life Sciences, Turku, Finlândia). Uma curva padrão foi preparada, na qual a relação ligado/livre para o hormônio radioativo foi plotada como função da concentração do hormônio não-radioativo. A seguir, a curva padrão foi utilizada para determinar a concentração do hormônio em cada amostra.

3.12 Expressão das proteínas totais e fosforiladas envolvidas na sinalização da insulina no fígado, músculo gastrocnêmio e coração

A membrana de nitrocelulose, ditiotreitol (DTT), acrilamida, temed e os aparelhos para eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Estados Unidos). Tri(hidroximetil)-aminometano (TRIS), DHEA e albumina foram fornecidos pela Sigma (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, Estados Unidos). A insulina regular foi procedente da Lilly (Eli Lilly and Company, Indianápolis, IN, Estados Unidos). Os anticorpos antifosfotirosina, anti-AKT e anti-SERCA2 foram obtidos da Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, Estados Unidos). Também foram utilizados os anticorpos anti-IRS1 e anti-p-IRS1 (Ser307) da Millipore (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, Estados Unidos), anti-IRβ da Cell (Cell Signaling

Technology, Inc., Danvers, MA, Estados Unidos), anti-p-Akt (Ser473) e anti-PI3-cinase p85α da R&D (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, Estados Unidos).

3.12.1 Extração dos tecidos

Após restrição alimentar de 6 horas (8 às 14 h), as ratas foram anestesiadas ip com tiopental sódico (1,3 g/kg de peso corporal), e a ausência de reação de retirada da pata a estímulo doloroso com pressão foi utilizada como controle da anestesia. A cavidade abdominal foi aberta, e 20 UI de insulina regular Lilly ou 200 µL de salina foram injetadas na veia porta. Após 30 segundos, o fígado foi removido, imediatamente homogeneizado em tampão específico com Polytron PT-MR 2100 (Kinematica AG, Luzern, Switzerland, Suíça). Em 90 segundos depois da infusão de insulina ou salina, fragmento do músculo gastrocnêmio foi retirado e homogeneizado como descrito acima. Do mesmo modo, no tempo de 120 segundos, fragmento do ventrículo esquerdo do coração foi removido e homogeneizado. Todas as amostras permaneceram em fervura por 7 minutos, e seguida, foram colocadas no gelo. O tampão de extração em que os tecidos foram homogeneizados continha SDS 10%, Tris 100 mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM. Logo após, os extratos foram centrifugados a 12.000 rpm por 40 minutos a 4 °C, para a remoção do material insolúvel. O sobrenadante das amostras teve seu conteúdo proteico total quantificado utilizando o reagente Bradford (Bio-Rad), e depois tratado com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970), acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 4:1, mantido a 4 °C durante o manuseio. Em seguida, essas amostras foram fervidas em banho-maria a 100 °C durante 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), ou ficaram estocadas em freezer a -80 ºC ate a eletroforese.

3.12.2 Immunoblotting

Cinquenta µg de proteínas por amostras foram submetidas no SDS-PAGE de 1,5 mm, sendo que em cada gel foi aplicado um marcador de peso molecular (Bio-Rad), para gel de poliacrilamida, com valores pré-estabelecidos e corados (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10 kDa). A eletroforese foi realizada em cuba de minigel Mini-PROTEAN (Bio-Rad), com solução tampão previamente diluída. A voltagem

inicial de corrida para SDS-PAGE foi de 20 volts, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento “staking” e 100 volts até o final do gel de resolução “resolving”. Em seguida, as proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas eletricamente para a membrana de nitrocelulose, utilizando o equipamento de eletrotransferência do minigel da Bio-Rad. Durante a transferência, a cuba foi mantida a 120 volts por 120 minutos, como descrito por Towbin et al. (1992). Para evitar aumento excessivo da temperatura, foram efetuadas trocas sucessivas da forma de gelo durante a transferência. As membranas com as proteínas transferidas foram coradas com Ponceau e escaneadas em 300 dpi, usando um digitalizador WorkCentre 3119 (Xerox Corporation Webster, Nova Iorque, NY, Estados Unidos) para análise posterior. Na sequência, foram incubadas em solução basal acrescida de leite em pó desnatado Molico 5% (Nestlé Brasil Ltda, Araçatuba, SP, Brasil), denominada, portanto, de solução bloqueadora, por duas horas a temperatura ambiente sob leve agitação, a fim de minimizar a ligação inespecífica de proteínas. A solução basal continha Tris 10 mM, NaCl 5 M e Tween 20 0,02%. Em seguida, as membranas foram lavadas em solução basal por três sessões de 10 minutos antes da incubação com o anticorpo específico. Tal incubação foi feita durante a noite (10-12 horas) a 4 ºC, em agitação constante, e novamente as membranas foram lavadas com solução basal por três sessões de 10 minutos. Logo após, elas foram submetidas à nova incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1 hora em temperatura ambiente, e por fim, lavadas com solução basal por três sessões de 10 minutos. Um reagente de detecção de quimiluminescência foi utilizado, o ECL Prime (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, Reino Unido), e a emissão de luz foi detectada e captada pelo sistema de detecção MF-ChemiBIS 3.2 (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Jerusalém, Israel). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através do programa ImageJ versão 1.46r (Bethesda, MD, Estados Unidos), e a as bandas das proteínas foram normalizadas pela densitometria das membranas coradas com Ponceau (Aldridge et al., 2008; Romero-Calvo et al., 2010).

3.13 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através dos programas GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, Estados

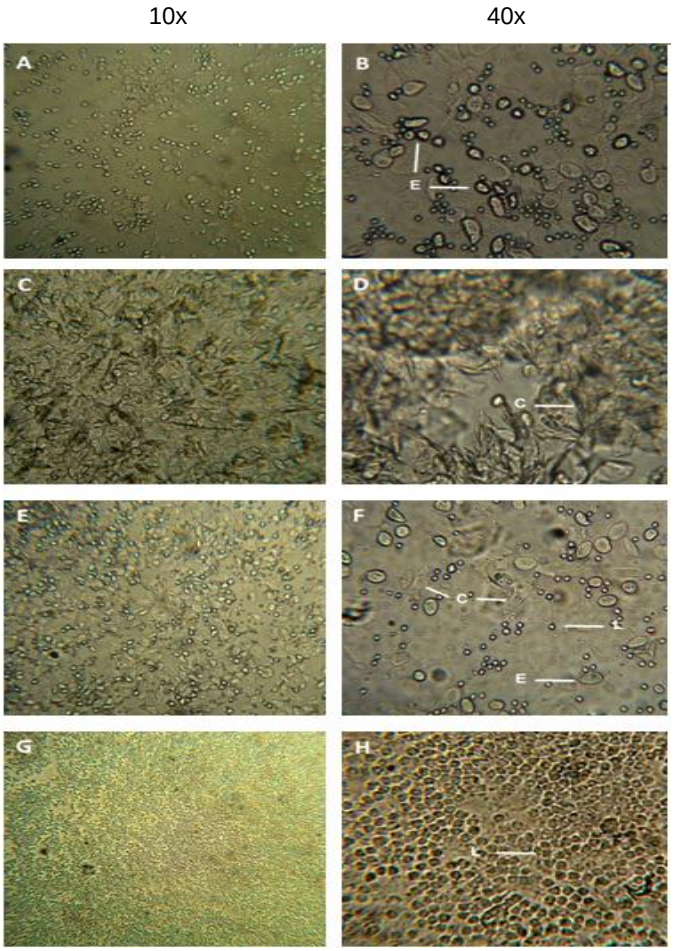
Unidos), SigmaPlot versão 11.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, Estados Unidos) e SPSS Statistics versão 21 (IBM Corporation, Armonk, NY, Estados Unidos). Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias (Bartlett). Quando as amostras não apresentaram homogeneidade, adotou-se uma das seguintes transformações direta dos dados: a logarítmica, a logarítmica dos (dados + 1), a raiz quadrada dos dados, ou a raiz quadrada dos (dados + 1). Após atender esse critério, o tratamento estatístico utilizado foi a análise de variância de dois (2way ANOVA) ou três fatores (3way ANOVA). Quando o teste apresentou diferença significativa, a análise foi seguida do teste post-hoc Tukey ou Bonferroni. Diferenças simples entre o grau fosforilação basal vs. estado de fosforilação após estímulo agudo com insulina foram detectadas pelo teste t de Student. O nível de significância adotado foi de 5% ($p<0,05$), e os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão da média (M ± DPM).

4 RESULTADOS

4.1 Determinação das fases do ciclo ovariano

Para verificação da eficácia da cirurgia de remoção dos ovários, 12 ratas foram submetidas à avaliação do ciclo estral antes e após a ovariectomia, durante quatro dias consecutivos. Antes da cirurgia, pode-se observar uma homogeneidade na transição entre as fases do ciclo ovariano, indicando que os animais ciclavam regularmente (Figura 2A-H). Todavia, como esperado, cinco semanas após a castração os animais não clicaram e permaneceram em diestro contínuo (Figura 2G-H) (Apêndice A).

Figura 2 – Fotomicrografias de esfregaços vaginais de ratas.



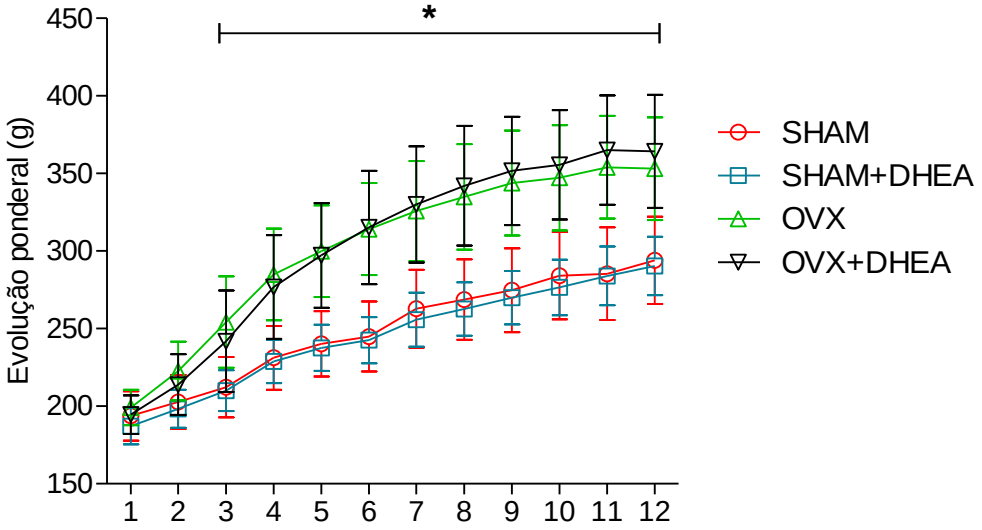
Fotomicrografias de esfregaço vaginal de ratas em proestro (A e B), estro (C e D), metaestro (E e F) e diestro (G e H). O esfregaço vaginal a fresco foi observado em microscópio de luz com lentes objetivas de 10x e 40x. As etapas do ciclo estral foram determinadas através da análise da proporção dos tipos celulares predominantes nos esfregaços vaginais. Proestro foi caracterizado primariamente por células epiteliais grandes e nucleadas (E); estro foi caracterizado por grandes aglomerações de células

cornificadas (C); metaestro foi caracterizado por células menores e anucleadas, os leucócitos (L) misturados células cornificadas e epiteliais; e diestro foi caracterizado pela abundancia de leucócitos.

4.2 Características zoométricas

Os animais foram distribuídos aleatoriamente, de forma que não houvesse diferença no peso inicial entre os grupos castrados e não castrados. Avaliando o fator castração, notou-se que ratas ovariectomizadas apresentaram aumento no peso corporal a partir da terceira semana quando comparadas aos animais controles ($p<0,05$). Todavia, ao analisar o fator tratamento, foi possível observar que a suplementação com DHEA não modificou esse parâmetro (Figura 3A). A retirada dos ovários promoveu um acréscimo de aproximadamente 30% sobre a massa corporal final das ratas intactas (Apêndice B).

Figura 3 – Massa corporal de animais tratados com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.



Evolução ponderal durante o período experimental. Os resultados foram representados pela média ± DPM. Tamanho amostral: SHAM=11; SHAM+DHEA=13; OVX=24 e OVX+DHEA=26. 3Way ANOVA, Bonferroni, $p<0,05$.

Além disso, a castração levou ao aumento do comprimento naso-anal ($P<0,0001$), índice de massa corporal ($P<0,0001$) e índice de Lee ($p<0,02$) em relação aos grupos intactos, e a administração com DHEA não interferiu nessas variáveis (Tabela 2).

Tabela 2 – Dados zoométricos de ratas tratadas com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.

	SHAM	SHAM+DHEA	OVX	OVX+DHEA
Naso-anal final (cm)	22,91±0,54	22,92±0,67	24,27±0,96*	24,38±0,86*
IMC	0,56±0,04	0,55±0,03	0,63±0,06*	0,64±0,05*
Índice de Lee	0,29±0,01	0,29±0,01	0,30±0,01*	0,30±0,01*

Nota: Os dados foram expressos pela média ± DPM. O tamanho amostral variou entre 11 e 13 animais. 2Way ANOVA, Tukey.
*p<0,05 – em relação aos animais ovariectomizados e seus respectivos controles.
Abreviaturas:
IMC: índice de massa corporal, calculado pela fórmula: g/cm^2
Índice de Lee: calculado pela fórmula: $\sqrt[3]{g/cm}$

4.3 Consumo de ração e ingestão hídrica

A dieta hiperlipídica utilizada no presente estudo foi constituída de 5,3 kcal/g de energia metabolizável, sendo composta por 36,0% de carboidratos, 34,0% de lipídeos, 20,3% de proteínas e 9,7% de outros componentes (Tabela 1). Analisando o fator castração, verificou-se que as ratas ooforectomizadas apresentaram aumento em torno de 10% no consumo de ração, ingestão energética, percentual de preferência pela comida (p<0,03), além de aproximadamente 50% na eficiência alimentar (p<0,0001), e redução de 40% na ingestão hídrica, em referência aos grupos intactos (p<0,001) (Tabela 3).

Ao avaliar o fator tratamento, a análise 2way ANOVA mostrou que o uso do DHEA induziu aumento no consumo de ração, ingestão energética e percentual de preferência pela comida quando comparado à somatória de animais tratados com veículo (p<0,05). Ademais, o teste de múltiplas comparações de Tukey detectou que esse acréscimo advindo do tratamento com DHEA foi de mesma proporção para cada variável citada acima em relação aos animais do mesmo subgrupo tratados com veículo, em 17% (SHAM+DHEA *vs.* SHAM) e 14% (OVX+DHEA *vs.* OVX) (p<0,05) (Tabela 3). Os animais tratados com DHEA apresentaram menor ingestão hídrica em referência ao conjunto de ratas tratadas com veículo (p= 0,0360). Além disso, o teste de múltiplas comparações de Tukey mostrou que o grupo SHAM+DHEA reduziu cerca de 30% o volume de água ingerido em relação ao grupo SHAM (p=0,001). Todavia, a administração de DHEA ao grupo OVX (OVX+DHEA) foi semelhante ao grupo OVX, que recebeu veículo. Ademais, houve uma

significativa interação entre os fatores testados (ooforectomia e tratamento), onde o grupo SHAM+DHEA apresentou um comportamento distinto dos demais grupos (p=0,0119).

Tabela 3 – Efeito da ovariectomia bilateral e do tratamento com DHEA sobre a média do consumo de alimento, ingestão hídrica e calórica, eficiência alimentar e percentual de preferência pela ração hipercalórica/hiperlipídica.

	SHAM	SHAM+DHEA	OVX	OVX+DHEA	Interação
Consumo de alimento (g/dia)	10,6±1,1	12,4±1,3#	11,8±1,6*	13,5±1,6* #	NS
Ingestão energética (kcal/dia)	56,5±6,1	66,4±7,1#	63,3±8,6*	72,1±8,8* #	NS
Eficiência alimentar	9,4±1,7	8,6±1,3	14,5±2,8*	13,4±2,2*	NS
Preferência pela ração (%)	26,4±2,9	31,0±3,3#	29,6±4,0*	33,7±4,1* #	NS
Ingestão hídrica (mL/dia)	30,1±6,3	21,4±4,0#	17,0±4,1*	17,9±5,9*	p=0,0119

Nota: Os dados foram representados pela média ± DPM. O tamanho amostral variou entre 7 e 12 animais. 2Way ANOVA, Tukey.
*p<0,05 – entre os animais castrados (OVX e OVX+DHEA) *vs.* intactos (SHAM e SHAM+DHEA);
#p<0,05 – em relação ao subgrupo tratado com DHEA *vs.* subgrupo tratado com veículo.
Abreviaturas:
NS: estatisticamente não significativo
Ingestão energética = média do consumo de ração x energia metabolizável da dieta
Eficiência alimentar = média do ganho de peso (g) / consumo de ração (g)
Percentual de preferência (%) = (quantidade ingerida da dieta x 100) / 40 g da dieta ofertada

4.4 Constante de decaimento da glicose (K_{ITT})

Analisando o fator castração, obsevou-se que ratas ovariectomizadas tiveram redução de 24% no decaimento da glicose quando comparadas às ratas controles (SHAM: 3,66±0,61%min^{-1}; SHAM+DHEA: 3,28±0,54%min^{-}1; OVX: 2,87±0,61%min^{-1}; OVX+DHEA: 2,40±0,49%min^{-}1, p<0,001), indicando, baixa responsividade à ação da insulina (Figura 4A).

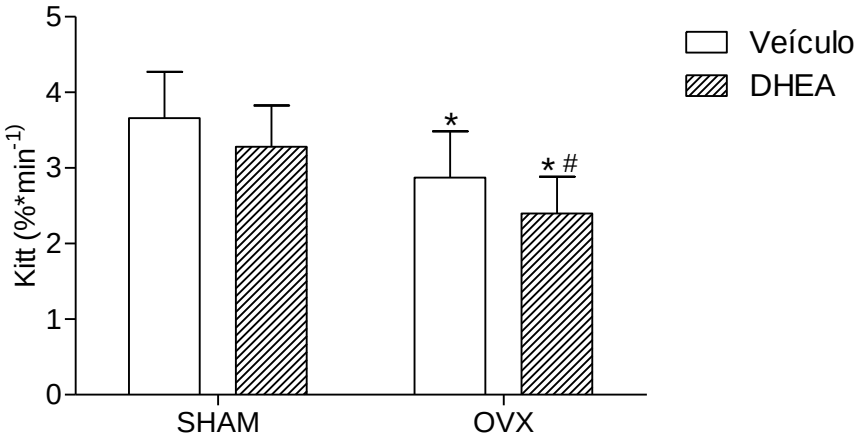
Ao avaliar o fator tratamento, a análise 2way ANOVA detectou que os animais suplementados com DHEA tiveram diminuição na sensibilidade à insulina em relação à somatória de animais tratados com veículo (p=0,018). No entanto, teste de múltiplas comparações de Tukey mostrou que a redução promovida pelo tratamento com DHEA foi significativa apenas entre os grupos OVX+DHEA *vs.* OVX, em 16% (p=0,046) (Figura 4A). A figura 4B representa o percentual de diminuição da glicose

durante os 30 minutos após a infusão de insulina em relação aos valores das glicemias basais. Ratas ooforectomizadas tiveram menor decaimento significativo da glicemia durante os 15 primeiros minutos do teste quando comparadas às ratas sham. Nos minutos seguintes o decaimento prosseguiu, porém de forma semelhante entre os grupos.

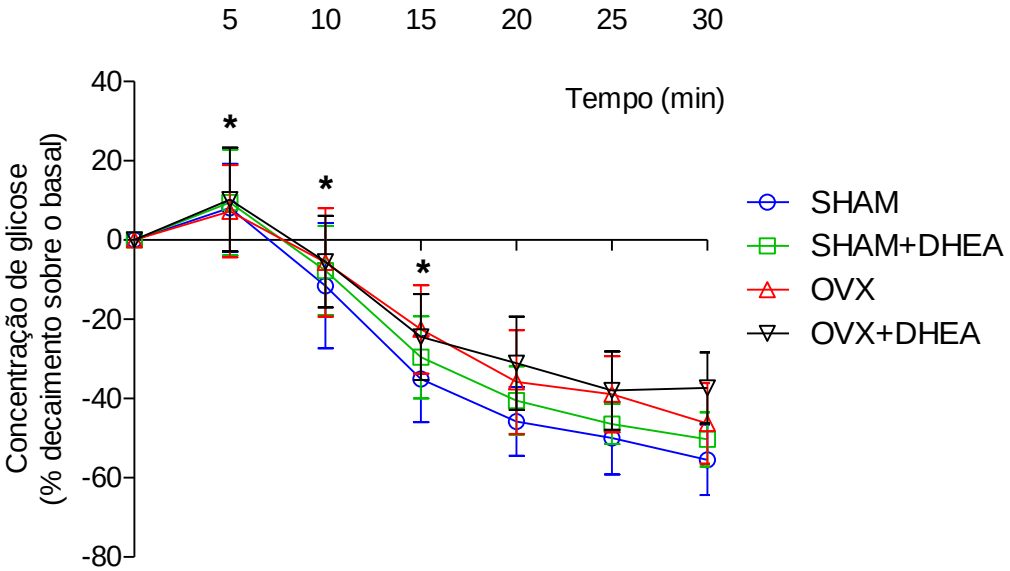
Figura 4 – Constante de desaparecimento da glicose (K_{ITT}) mensurado nas ratas tratadas com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.

.

A



B



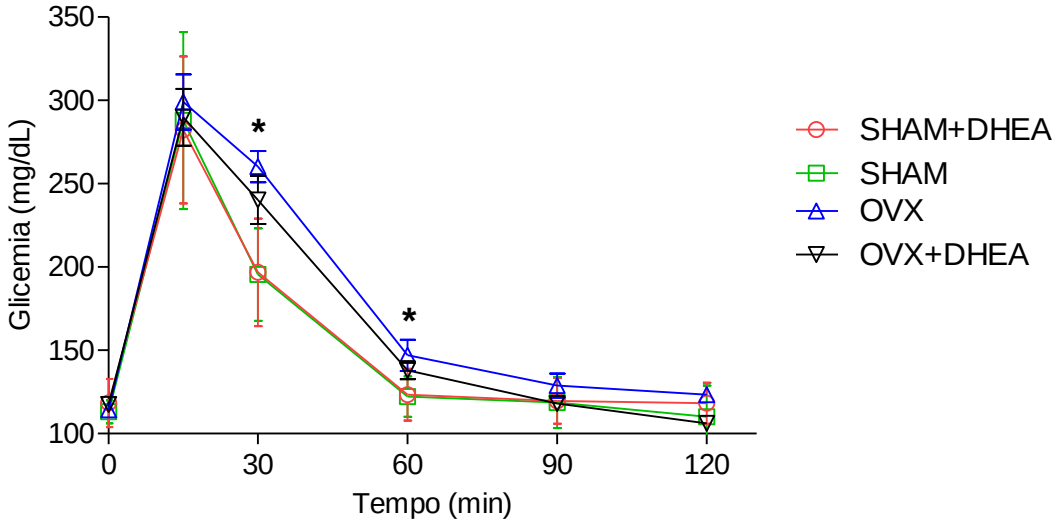
(A) Após restrição alimentar de 6 h, os animais acordados receberam uma carga de insulina ip (0,75U/kg de peso corporal). A glicose foi determinada por meio de glicosímetro em amostras de sangue retiradas da cauda nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a administração de insulina. (B) Percentual (%) de redução da glicose após infusão de insulina em relação aos valores das glicemias basais. As barras representam a média ± DPM, n=9-13. 2Way ANOVA, Tukey e Bonferroni.
*p<0,05 – entre os animais castrados (OVX e OVX+DHEA) *vs.* intactos (SHAM e SHAM+DHEA);
#p<0,05 – em relação ao grupo tratado com DHEA *vs.* grupo tratado com veículo.

4.5 Teste de tolerância à glicose (ipGTT)

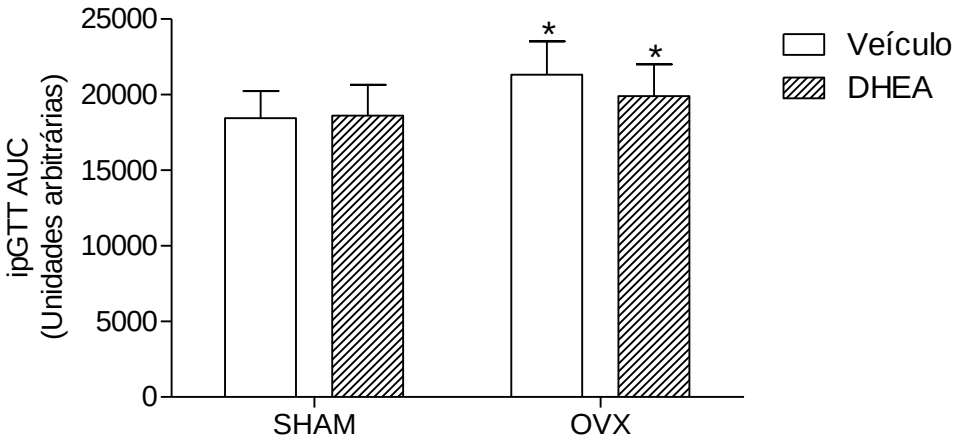
A figura 5 mostra a curva glicemia (A) e a área sobre a curva (B) do teste de tolerância à glicose. A avaliação do fator castração detectou maior glicemia nos tempos 30 e 60 minutos nos animais ooforectomizados quando comparados aos intactos ($p<0,05$) (Figura 5A). Essa maior glicemia refletiu na maior área sob a curva das ratas ovariectomizadas do que a dos intactos ($p<0,01$) (Figura 5B), indicando redução na tolerância à glicose daqueles animais. O tratamento com DHEA não apresentou efeito sobre esse parâmetro.

Figura 5 – Teste de tolerância à glicose (ipGTT) de animais tratados com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.

A



B



(A) Após restrição alimentar de 6 h, os animais acordados receberam uma solução de glicose 20% (2,0 g/kg de peso corporal) na cavidade intraperitoneal. A glicose foi determinada por meio de glicosímetro em amostras de sangue retiradas da cauda nos tempos 0 (basal), 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da carga de glicose. (B) Análise da área total sob a curva (AUC) da glicemia gerada após o teste. As barras representam a média ± DPM, n=8-13. 2Way e 3way ANOVA, Bonferroni.
*p<0,05 – entre os animais castrados (OVX e OVX+DHEA) *vs.* intactos (SHAM e SHAM+DHEA).

4.6 Massa de órgãos e tecidos

Após a eutanásia dos animais, as gorduras subcutânea (SC) (região abdominal e inguinal), periuterina (PG) e retroperitoneal (RP) foram retiradas e quantificadas em peso relativo (g/100 g de massa corporal). Coração, rins e útero também foram pesados. Analisando o fator castração, ratas ooforectomizadas tiveram aumento significativo da adiposidade nestas três regiões em aproximadamente 60% quando comparadas às ratas não castradas (p<0,001). Todavia, a suplementação com DHEA não interferiu (Tabela 4).

Quanto ao peso úmido do coração e rins, não houve diferença entre os grupos. No entanto, como esperado, houve diminuição de aproximadamente 80% no peso do útero das ratas castradas em relação às ratas controles (p<0,001), e o tratamento com DHEA não apresentou efeito (Tabela 4).

Tabela 4 – Massa de órgãos e tecidos de ratas tratadas com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.

	SHAM	SHAM+DHEA	OVX	OVX+DHEA
TA SC ($g.100g^{-1}$)	1,36±0,40 (11)	1,39±0,43 (13)	2,47±0,69* (14)	1,96±0,36* (16)
TA PG ($g.100g^{-1}$)	1,39±0,51 (11)	1,40±0,46 (13)	2,44±0,61* (19)	2,06±0,52* (19)
TA RP ($g.100g^{-1}$)	1,51±0,48 (11)	1,35±0,48 (13)	2,20±0,55* (20)	2,35±0,51* (22)
Coração (g)	0,86±0,09 (6)	0,87±0,15 (8)	0,88±0,09 (8)	0,96±0,14 (9)
Rins (g)	1,62±0,14 (11)	1,62±0,13 (13)	1,61±0,13 (7)	1,58±0,11 (7)
Útero (g)	0,53±0,13 (11)	0,56±0,17 (13)	0,11±0,03* (19)	0,11±0,02* (22)

Nota: Os dados foram expressos pela média ± DPM e o número de animais utilizados entre parênteses. 2Way ANOVA, Tukey.
*p<0,05 – entre os animais castrados (OVX e OVX+DHEA) *vs.* intactos (SHAM e SHAM+DHEA).
Abreviaturas:
TA SC: tecido adiposo subcutâneo, representado por 100 g de peso corporal
TA PG: tecido adiposo periuterino, representado por 100 g de peso corporal
TA RP: tecido adiposo retroperitoneal, representado por 100 g de peso corporal

4.7 Parâmetros bioquímicos

Os animais anestesiados e submetidos à privação alimentar de 6h foram eutanasiados por decapitação e amostras de sangue foram obtidas. A análise do fator castração detectou menor concentração sanguínea de DHEA (cerca de 40%, p<0,01), estradiol (cerca de 50%, p<0,001), albumina (cerca de 10%, p<0,03), triacilglicerol e VLDL-c (cerca de 30%, p<0,01), e uréia e creatinina (cerca de 20%, p<0,01) quando comparadas as ratas intactas (Tabela 5).

Por outro lado, a avaliação do fator tratamento demonstrou aumento na concentração sanguínea de DHEA e estradiol em relação aos animais que receberam veículo (p<0,05) e redução da creatinina (p=0,037). Como esperado, na avaliação dos níveis séricos de DHEA, o teste de múltiplas comparações de Tukey detectou que o acréscimo promovido pelo uso do DHEA foi significativo entre os dois subgrupos (SHAM+DHEA *vs.* SHAM, em 67%, p=0,005; OVX+DHEA *vs.* OVX, em 50%, p=0,018), demonstrando a eficiência do tratamento (Tabela 5). Além disso, o tratamento com DHEA levou a um aumento da concentração de estradiol nas ratas do grupo OVX+DHEA para o dobro em relação ao grupo OVX (p=0,004). Esse aumento na concentração de estradiol representou, ademais, uma significativa interação entre os fatores testados (ooforectomia e tratamento) (p=0,031) (Tabela 5). Quanto à avaliação da creatinina sérica, o teste de múltiplas comparações de Tukey

detectou que o grupo SHAM+DHEA apresentou redução de 20% nos valores desse parâmetro em relação ao grupo SHAM (p=0,001), sendo que o tratamento no grupo OVX (OVX+DHEA vs. OVX) não teve efeito (Tabela 5).

Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos de animais tratados com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.

	SHAM	SHAM+DHEA	OVX	OVX+DHEA	Interação
DHEA (ng/mL)	1,0±0,2 (5)	1,5±0,3# (6)	0,5±0,1* (4)	1,0±0,4* # (4)	NS
Estradiol (pg/mL)	82±16 (5)	81±23 (6)	29±17* (5)	59±7* # (8)	p=0,031
Insulina (ng/mL)	1,3±0,4 (6)	1,5±0,6 (8)	1,7±0,7 (5)	1,1±0,2 (5)	NS
Glicemia (mg/dL)	110±9 (9)	119±16 (10)	110±15 (11)	104±10 (13)	NS
CT (mg/dL)	42±8 (7)	50±15 (9)	43±7 (12)	46±12 (14)	NS
HDL-c (mg/dL)	12±4 (7)	10±2 (9)	10±1 (4)	10±2 (4)	NS
LDL-c (mg/dL)	30±6 (7)	40±15 (9)	36±9 (4)	41±9 (4)	NS
VLDL-c (mg/dL)	14±4 (7)	15±4 (9)	10±6* (12)	9±5* (14)	NS
TAG (mg/dL)	71±22 (7)	74±22 (9)	52±28* (12)	47±23* (14)	NS
Prot. totais (g/dL)	5,2±0,8 (7)	4,8±0,84 (9)	5,0±0,9 (12)	5,5±1,1 (13)	NS
Albumina (g/dL)	6,0±0,8 (7)	5,6±0,7 (9)	5,0±1,1* (12)	5,1±0,9* (14)	NS
Uréia (mg/dL)	46±7 (7)	46±6 (9)	39±11* (10)	37±5* (14)	NS
Creatinina (mg/dL)	0,82±0,05 (7)	0,65±0,13# (9)	0,60±0,15* (10)	0,57±0,14* (10)	NS
ALT (U/L)	301±68 (7)	326±57 (8)	266±39 (4)	296±150 (4)	NS
AST (U/L)	50±27 (7)	41±12 (8)	49±9 (4)	48±23 (5)	NS

Nota: Os dados foram expressos pela média ± desvio padrão da média e o tamanho amostral utilizado entre parênteses. 2Way ANOVA, Tukey.
*p<0,05 – entre os animais castrados (OVX e OVX+DHEA) *vs.* intactos (SHAM e SHAM+DHEA);
#p<0,05 – em relação ao subgrupo tratado com DHEA *vs.* subgrupo tratado com veículo.

Abreviaturas:
DHEA: deidroepiandrosterona
CT: colesterol total
HDL-c: colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade)
LDL-c: colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade)
VLDL-c: colesterol VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade)
TAG: triacilglicerol
Prot. totais: proteínas totais
ALT: alanina aminotransferase
AST: aspartato aminotransferase

4.8 Immunoblotting de proteínas

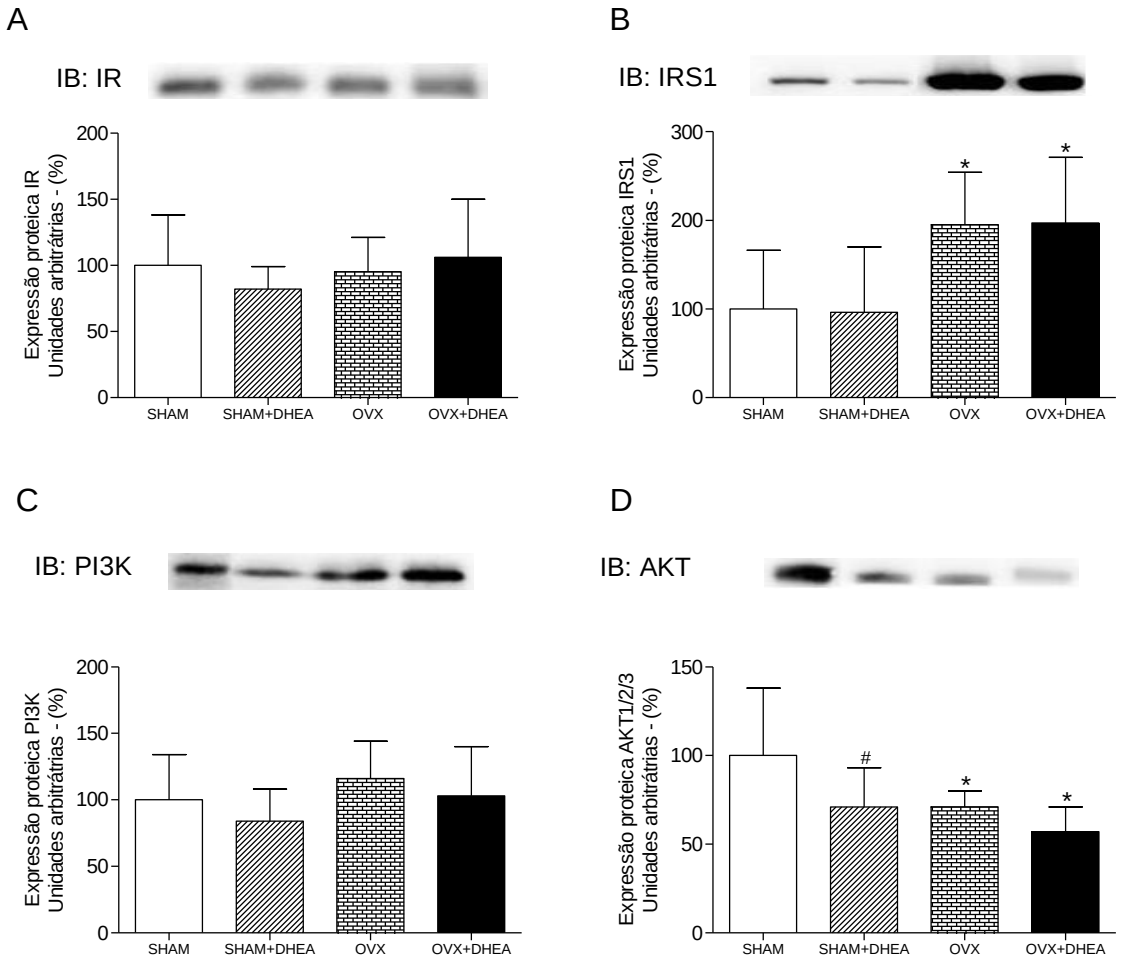
4.8.1 Tecido hepático

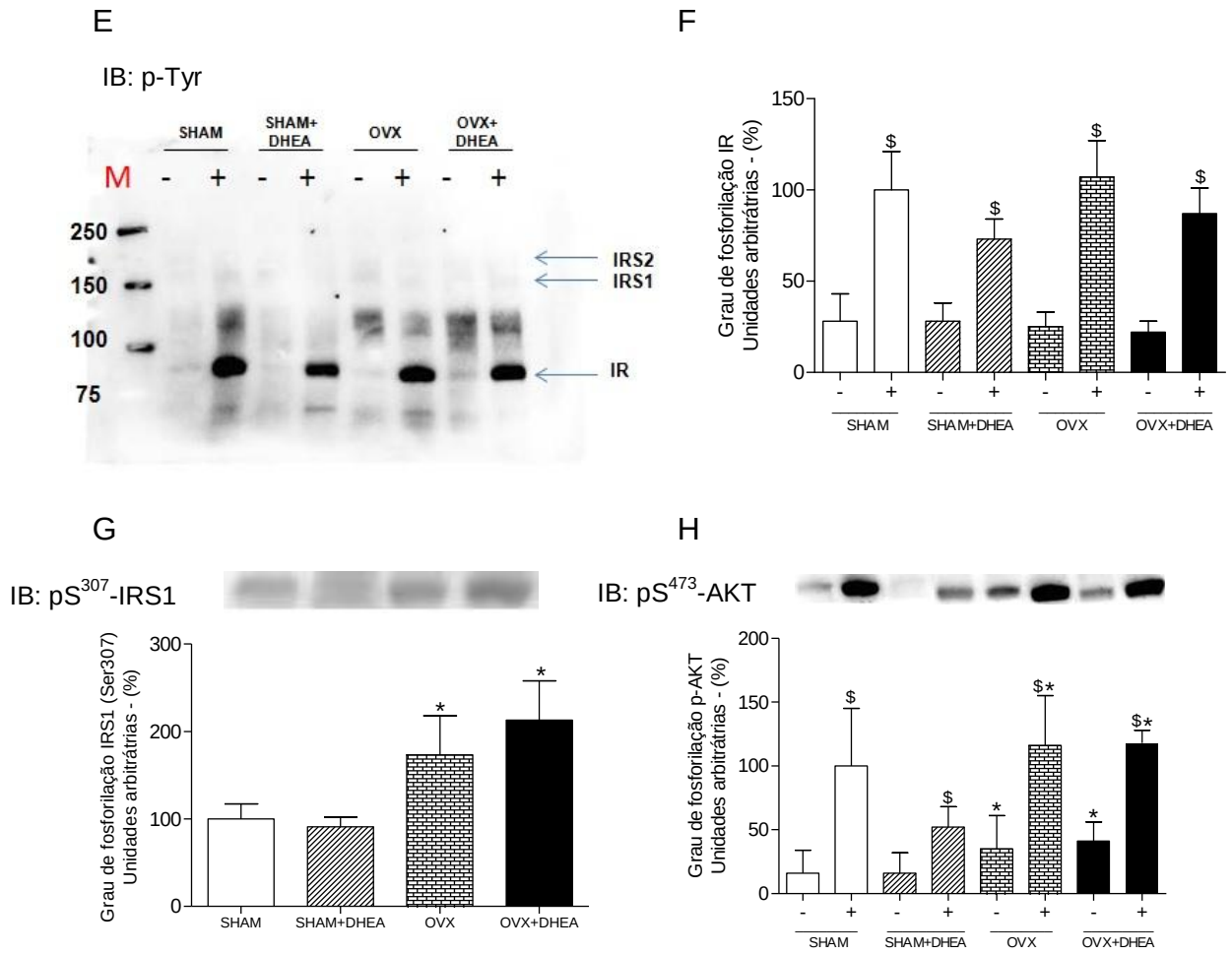
Não foi observado alterações na expressão proteica do receptor de insulina (IRβ) (Figura 6A), bem como da subunidade de 85 kDa da PI3K entre os animais (Figura 6C). No entanto, ao avaliar o fator castração, foi detectado aumento na expressão do IRS1 nos animais ovariectomizados para aproximadamente o dobro, em relação aos animais intactos (SHAM: 100±66%; SHAM+DHEA: 96±74%; OVX: 195±59%; OVX+DHEA: 197±74%; p<0,001) (Figura 6B). Além disso, a castração promoveu um decréscimo em cerca de 20% na expressão da AKT em referência aos animais não castrados (SHAM: 100±38%; SHAM+DHEA: 71±22%; OVX: 71±9%; OVX+DHEA: 57±14%; p<0,04). Ao avaliar o fator tratamento, a análise 2way ANOVA detectou que os animais suplementados com DHEA tiveram redução na expressão da AKT em comparação à somatória de animais tratados com veículo (p=0,021). Ademais, o teste de múltiplas comparações de Tukey mostrou que a diminuição promovida pelo tratamento com DHEA foi significativa apenas entre os subgrupos SHAM+DHEA *vs.* SHAM, cerca de 30% (p=0,029) (Figura 4A) (Apêndice F).

Através da incubação das membranas com o anticorpo antifosfotirosina (p-Tyr) (Figura 6E), constatou-se que o grau de fosforilação basal do IRβ, observado entre os marcadores correspondentes a 100 e 75 kDa, foi semelhante entre as ratas. Contudo, o estímulo agudo com insulina através da infusão na veia porta foi capaz de aumentar o grau de fosforilação em tirosina do IRβ em aproximadamente 3,5 vezes em relação ao estado basal nos grupos (SHAM: 28±15% para 100±21%; SHAM+DHEA: 28±10% para 73±11%; OVX: 25±8% para 107±20%; OVX+DHEA: 22±6% para 87±14%; p<0,05). Além disso, a fosforilação induzida pela insulina nos animais tratados com DHEA foi menor em relação à somatória de animais tratados com veículo (p<0,02) (Figura 6F), embora ao avaliar o teste de múltiplas comparações de Tukey essa diferença não foi detectada entre os subgrupos SHAM+DHEA *vs.* SHAM e OVX+DHEA *vs.* OVX. Ademais, a fosforilação no resíduo serina 307 do IRS1 foi aumentada para aproximadamente o dobro nas ratas cadastradas em relação às ratas intactas (p< 0,001), e o tratamento com DHEA não modificou o resultado (Figura 6G) (Apêndice F).

A etapa posterior à ativação da PI3K pode ser analisada pela intensidade da fosforilação em serina 473 da AKT (proteína cinase B). A castração induziu aumento na fosforilação basal da AKT em referência às ratas controles, cerca de 140% ($p<0,04$). Além disso, a administração de insulina foi capaz de aumentar o grau de fosforilação em serina da AKT em aproximadamente 5 vezes nas ratas controles e 3 vezes nas ratas ovariectomizadas em relação ao estado basal (SHAM: 16±18% para 100±45%; SHAM+DHEA: 16±16% para 52±16%; OVX: 35±26% para 116±39%; OVX+DHEA: 41±15% para 118±10%; $p<0,05$). Ademais, a análise 2way ANOVA detectou que ratas castradas tiveram aumento de aproximadamente 40% na fosforilação induzida por insulina da AKT em comparação à somatória de ratas não castradas ($p=0,0355$) (Figura 6H) (Apêndice F), e o uso do DHEA não teve interferência .

Figura 6 – Expressão proteica e grau de fosforilação de proteínas envolvidas nas etapas intracelulares iniciais da ação insulínica no fígado de ratas tratadas com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.





Representação gráfica das médias da expressão total de proteínas e grau de fosforilação avaliados por densitometria óptica. Os painéis superiores correspondem a immunoblottings representativos. Após a extração de fragmento de fígado, 50 µg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese de gel de poliacrilamida, e posteriormente transferidas para membrana de nitrocelulose. O immunoblotting típico foi realizado com os anticorpos (A) anti-IRβ, (B) anti-IRS1, (C) anti-PI3K, (D) anti-AKT1/2/3, (E e F) anti-fosfotirosina (anti-p-Tyr), (G) anti-p-IRS1 (Ser307) e (H) anti-p-AKT (Ser473). Os valores foram expressos em percentagem (%) de Unidades Arbitrárias em relação ao grupo SHAM. As barras representam a média ± DPM, n=6-8 e 3-4, para expressão proteica e para avaliação do grau de fosforilação, respectivamente. Teste t de Student e 2Way, Tukey.
*p<0,05 – entre os animais castrados (OVX e OVX+DHEA) vs. intactos (SHAM e SHAM+DHEA);
#p<0,05 – em relação ao subgrupo tratado com DHEA vs. subgrupo tratado com veículo.
$p<0,05 – entre o grau de fosforilação basal vs. estado de fosforilação após estímulo agudo com insulina.

4.8.2 Músculo gastrocnêmio

Avaliando o fator castração, ratas ooforectomizadas tiveram redução na expressão do IRβ e IRS1 em cerca de 30% em relação às ratas intactas (IRβ – SHAM: 100±31%; SHAM+DHEA: 116±41%; OVX: 73±30%; OVX+DHEA: 73±30%; p<0,02) (IRS1 – SHAM: 100±34%; SHAM+DHEA: 92±33%; OVX: 76±36%; OVX+DHEA: 61±31%; p<0,001) (Figuras 7A-B). Por outro lado, a expressão proteica da subunidade de 85 kDa da PI3K e AKT foram semelhantes entre os grupos

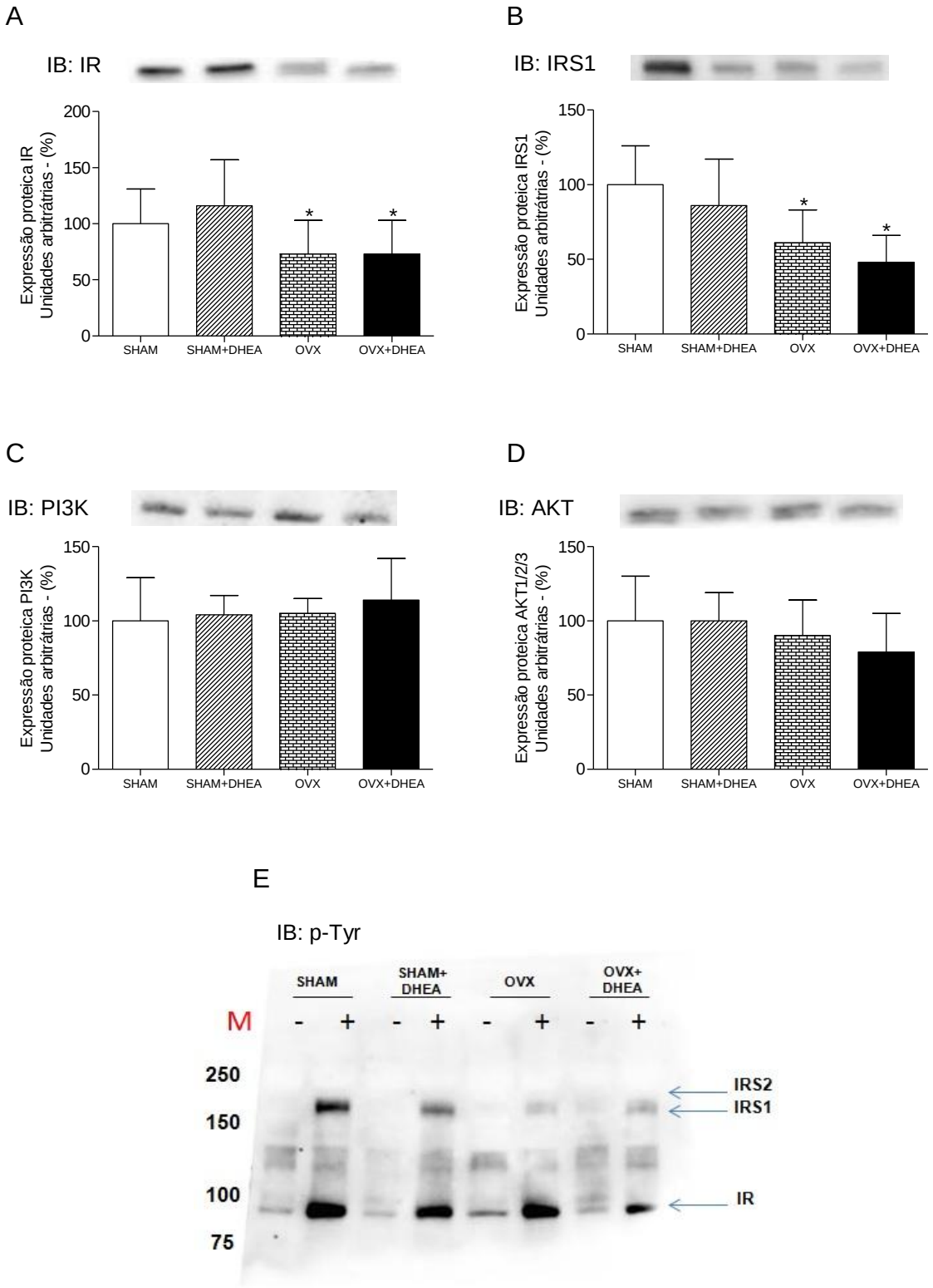
avaliados, e o tratamento com DHEA não provocou alterações (Figuras 7C-D) (Apêndice G).

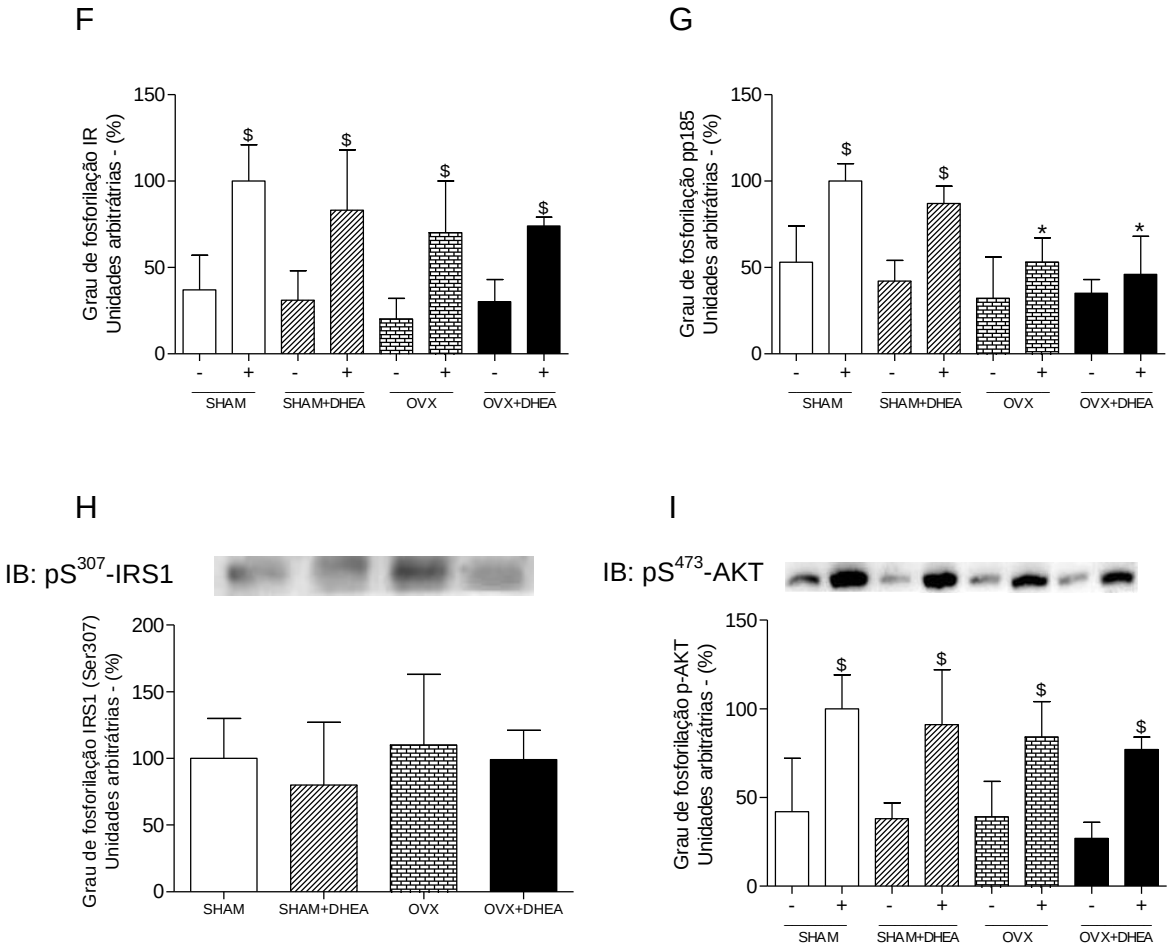
Quando as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-pTyr (Figura 7E), verificou-se semelhança no grau de fosforilação basal do IRβ entre os animais. No entanto, o estímulo agudo com insulina na veia porta foi capaz de aumentar o estado de fosforilação em tirosina do IRβ, de modo semelhante entre os grupos, em aproximadamente 2,5 vezes em relação ao grau de fosforilação basal (SHAM: 37±20% para 100±21%; SHAM+DHEA: 31±17% para 83±35%; OVX: 20±12% para 70±30%; OVX+DHEA: 30±13% para 74±5%; $p<0,05$), e a suplementação com DHEA não exerceu qualquer tipo de efeito (Figura 7F) (Apêndice G).

Analisando as proteínas fosforiladas da região de 185 kDa (IRS1/2), denominada de pp185, não foi possível detectar diferença no grau de fosforilação basal entre os grupos. Entretanto, a administração de insulina promoveu aumento no estado de fosforilação em tirosina da pp185 apenas nas ratas intactas, em aproximadamente 2 vezes em relação ao grau de fosforilação basal, enquanto ratas castradas apresentaram redução em 45% no estado de fosforilação pós-estímulo dos substratos 1 e 2 do receptor de insulina (pp185) em relação as ratas controles (SHAM: 53±21% para 100±10%; SHAM+DHEA: 42±12% para 87±10%; OVX: 32±24% para 53±14%; OVX+DHEA: 35±8% para 46±22%; $p<0,05$), e o tratamento com DHEA não interferiu (Figura 7G). Ademais, a fosforilação em serina 307 do IRS1 foi semelhante entre os grupos, e o tratamento com DHEA não modificou o resultado (Figura 7H) (Apêndice G).

A intensidade da fosforilação basal da AKT (Ser473) foi semelhante entre os grupos. No entanto, o estímulo agudo com insulina promoveu aumento no estado de fosforilação em serina da AKT, de modo semelhante, em aproximadamente 2,5 vezes nas ratas intactas e ooforectomizadas em relação ao grau de fosforilação basal, e o uso do DHEA não provocou mudanças (SHAM: 42±30% para 100±19%; SHAM+DHEA: 38±9% para 91±31%; OVX: 39±20% para 84±20%; OVX+DHEA: 27±9% para 77±7%; $p<0,05$) (Figura 7I) (Apêndice G).

Figura 7 – Expressão proteica e grau de fosforilação de proteínas envolvidas nas etapas intracelulares iniciais da ação insulínica no músculo gastrocnêmio de animais tratados com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.





Representação gráfica das médias da expressão total de proteínas e grau de fosforilação avaliados por densitometria óptica. Os painéis superiores correspondem a immunoblottings representativos. Após a extração de fragmento do músculo gastrocnêmio, 50 µg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese de gel de poliacrilamida, e posteriormente transferidas para membrana de nitrocelulose. O immunoblotting típico foi realizado com os anticorpos (A) anti-IRβ, (B) anti-IRS1, (C) anti-PI3K, (D) anti-AKT1/2/3, (E-G) anti-fosfotirosina (anti-p-Tyr), (H) anti-p-IRS1 (Ser307) e (I) anti-p-AKT (Ser473). Os valores foram expressos em percentagem (%) de Unidades Arbitrárias em relação ao grupo SHAM. As barras representam a média ± DPM, n=6-8 e 3-4, para expressão proteica e para avaliação do grau de fosforilação, respectivamente. Teste t de Student e 2Way, Tukey.
*p<0,05 – entre os animais castrados (OVX e OVX+DHEA) *vs.* intactos (SHAM e SHAM+DHEA);
#p<0,05 – em relação ao subgrupo tratado com DHEA *vs.* subgrupo tratado com veículo.
$p<0,05 – entre o grau de fosforilação basal *vs.* estado de fosforilação após estímulo agudo com insulina.

4.8.3 Coração

A expressão proteica do IRβ, AKT e SERCA2 foi semelhante entre os grupos (Figuras 8A e D-E). Todavia, a castração induziu um decréscimo de aproximadamente 30% na expressão do IRS1 e 20% na subunidade de 85 kDa da PI3K em relação aos grupos intactos (IRS1 – SHAM: 100±28%; SHAM+DHEA: 70±37%; OVX: 58±28%; OVX+DHEA: 59±40%; p<0,04) (PI3K – SHAM: 100±12%;

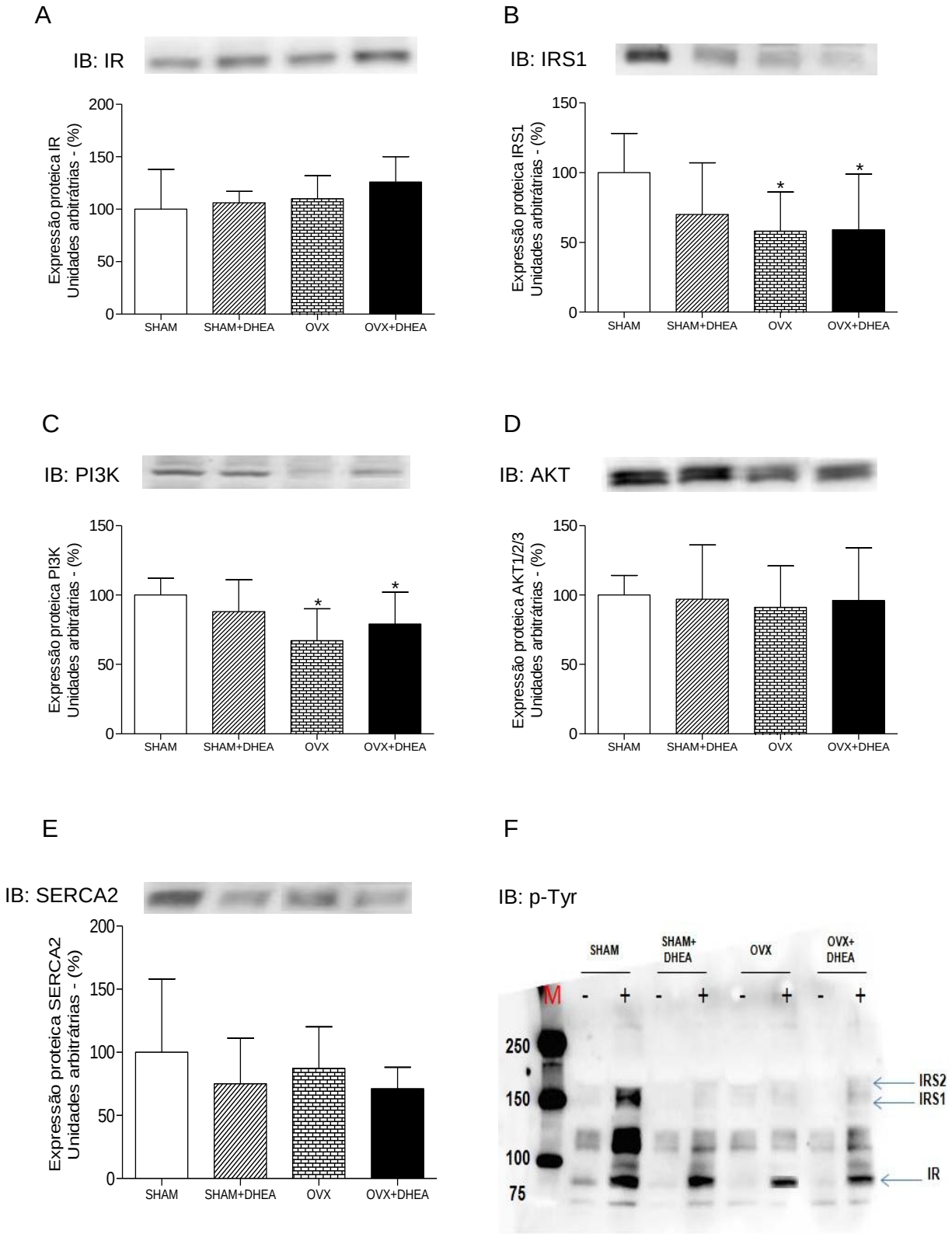
SHAM+DHEA: 80±23%; OVX: 67±23%; OVX+DHEA: 79±23%; p<0,04) (Figuras 8B-C) (Apêndice H).

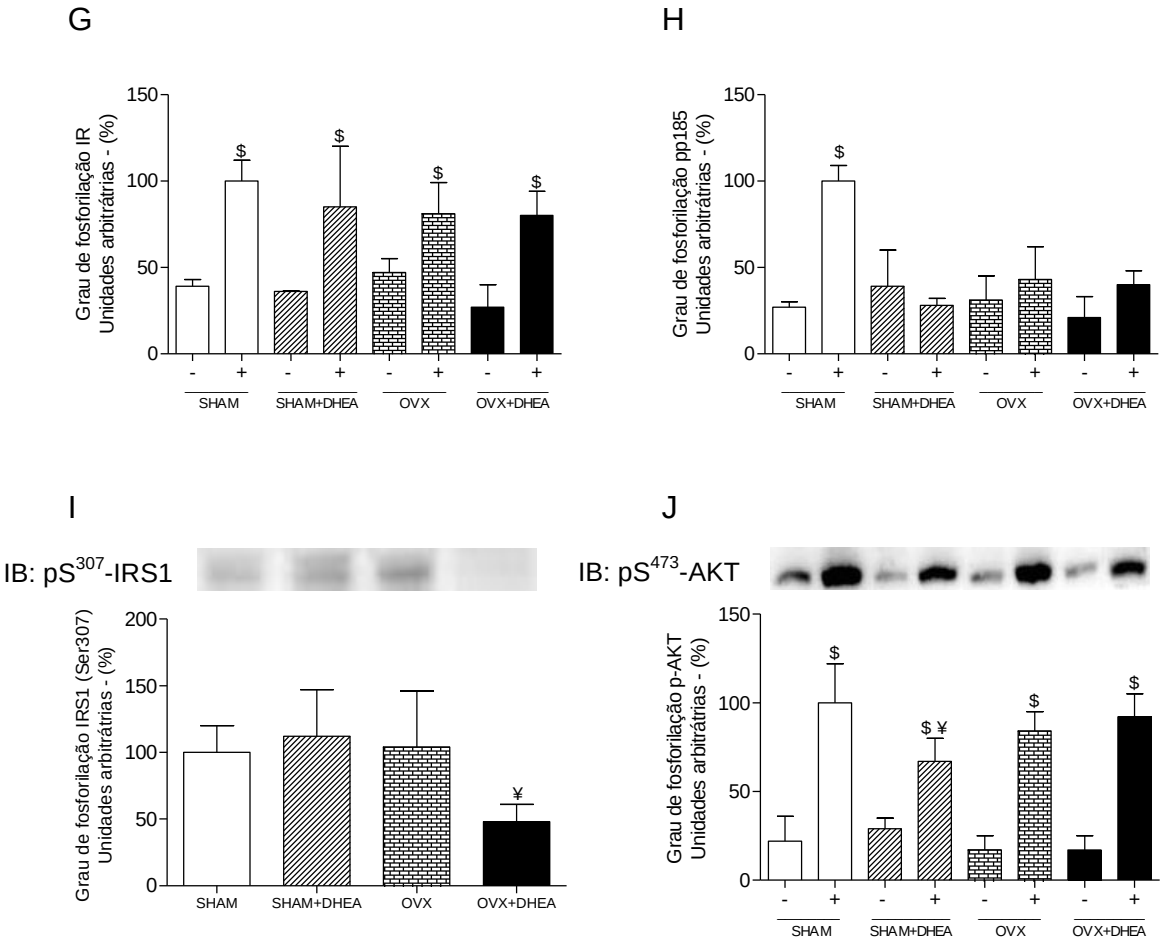
Através da incubação das membranas com o anticorpo anti-pTyr (Figura 8F), constatou-se que não houve alterações entre os animais no grau de fosforilação basal do IRβ, observado na região de 95 kDa. Todavia, a adminstração de insulina na veia porta foi capaz de aumentar a fosforilação em tirosina do IRβ, de modo semelhante entre os grupos, em aproximadamente 2,5 vezes em relação ao estado basal, e a suplementação com DHEA não modificou esse parâmetro (SHAM: 39±4% para 100±12%; SHAM+DHEA: 36±0,4% para 85±35%; OVX: 47±8% para 81±18%; OVX+DHEA: 34±16% para 80±14%; p<0,05) (Figura 8G) (Apêndice H).

O grau de fosforilação em tirosina basal da banda denominada pp185 kDa (IRS1/2) foi semelhante entre os grupos. No entanto, a administração aguda de insulina promoveu aumento no estado de fosforilação em tirosina da pp185 apenas no grupo SHAM, em aproximadamente 3,5 vezes em relação à condição basal, e o tratamento com DHEA não modificou o resultado (SHAM: 27±3% para 100±9%; SHAM+DHEA: 39±21% para 28±4%; OVX: 31±14% para 43±19%; OVX+DHEA: 21±12% para 40±8%; p<0,05) (Figura 8H). Ademais, avaliando a fosforilação em serina 307 do IRS1, não foi detectada diferença entre os fatores castração e tratamento com DHEA. Contudo, observou-se significativa interação entre os fatores testados, onde o grupo OVX+DHEA apresentou um comportamento distinto dos demais grupos (p=0,0117) (Figura 8I) (Apêndice H).

A fosforilação basal em serina 473 da AKT foi semelhante entre os grupos. No entanto, o estímulo agudo com insulina promoveu aumento no estado de fosforilação em serina da AKT, de modo semelhante, em aproximadamente 3,5 vezes nos grupos não castrados e 5 vezes nos grupos castrados em relação à condição basal (SHAM: 22±14% para 100±22%; SHAM+DHEA: 29±6% para 67±13%; OVX: 17±8% para 84±11%; OVX+DHEA: 17±8% para 92±13%; p<0,01). Ademais, foi detectada significativa interação entre os fatores testados, onde o grupo SHAM+DHEA apresentou um comportamento distinto dos demais grupos (p=0,0186) (Figura 8J) (Apêndice H).

Figura 8 – Expressão proteica e grau de fosforilação de proteínas envolvidas nas etapas intracelulares iniciais da ação insulínica no coração de animais tratados com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia.





Representação gráfica das médias da expressão total de proteínas e grau de fosforilação avaliados por densitometria óptica. Os painéis superiores correspondem a immunoblottings representativos. Após a extração de fragmento do coração, 50 µg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese de gel de poliacrilamida, e posteriormente transferidas para membrana de nitrocelulose. O immunoblotting típico foi realizado com os anticorpos (A) anti-IRβ, (B) anti-IRS1, (C) anti-PI3K, (D) anti-AKT1/2/3, (E) anti-SERCA2, (F-H) anti-fosfotirosina (anti-p-Tyr), (I) anti-p-IRS1 (Ser307) e (J) anti-p-AKT (Ser473). Os valores foram expressos em percentagem (%) de Unidades Arbitrárias em relação ao grupo SHAM. As barras representam a média ± DPM, n=6-8 e 3-4, para expressão proteica e para avaliação do grau de fosforilação, respectivamente. Teste t de Student e 2Way, Tukey.

*p<0,05 – entre os animais castrados (OVX e OVX+DHEA) *vs.* intactos (SHAM e SHAM+DHEA);

[#]p<0,05 – em relação ao subgrupo tratado com DHEA *vs.* subgrupo tratado com veículo;

[$]p<0,05 – entre o grau de fosforilação basal *vs.* estado de fosforilação após estímulo agudo com insulina;

[¥]p<0,05 – efeito de interação entre os fatores analisados (castração e tratamento).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi utilizada a combinação de um modelo experimental de privação de hormônios sexuais femininos + obesidade, induzida pelo uso da dieta hiperlipídica, acrescido da suplementação com DHEA, um precursor da produção de andrógenos e estrógenos, nas últimas 03 semanas do protocolo experimental (Labrie et al., 1998). Embora o tempo desse protocolo experimental pareça curto, ao fazermos uma equivalência para o tempo dos humanos, esses animais no momento da avaliação final representariam ter estado por aproximadamente 5 anos sem os ovários (ou 63 meses), sendo que nos últimos 15 meses teriam recebido o esteroide (Quinn, 2005).

A perda da função ovariana de produção hormonal está associada com o aumento da gordura, juntamente com condições metabólicas anormais, como resistência à insulina associada ao diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares (Polotsky, Polotsky, 2010). Seguindo-se a menopausa, mulheres podem aumentar a massa da gordura corporal e a adiposidade visceral associada a uma diminuição do gasto energético (Lovejoy et al., 2008). Tais observações vistas em mulheres estão diretamente relacionadas com nosso trabalho, uma vez que a gonadectomia favoreceu o ganho de peso precocemente nos animais, a partir da terceira semana após a cirurgia, em relação às ratas intactas, e o tratamento com DHEA não foi capaz de reverter o aumento de peso observado no grupo OVX+DHEA. Ademais, estudos demonstraram que animais ovariectomizados e que receberam a suplementação estrogênica tiveram redução do ganho de peso (Camporez et al., 2013; Roesch, 2006). Portanto, os hormônios gonadais parecem exercer um papel importante na homeostase do peso corpóreo.

O aumento do peso corporal foi acompanho por alterações nos depósitos de gordura corporal. Observamos que a ooforectomia promoveu o acúmulo de gordura intra-abdominal nos três coxins adiposos avaliados, a saber, subcutâneo, periuterino e retroperitoneal. Os estrógenos regulam a adiposidade corporal e a distribuição de gorduras através de seus receptores nucleares, ERα e ERβ. Todavia, o ERα parece exercer uma participação mais efetiva na homeostase energética (Brow, Clegg, 2010). Segundo Heine et al. (2000), camundongos geneticamente modificados para ERα, de ambos os sexos, apresentaram aumento de peso e maior adiposidade intra-abdominal quando comparados aos animais controles. Além disso, animais knockout

para aromatase (ArKO) apresentaram os mesmos efeitos (Jones et al., 2000). De acordo com Lafontan e Berlan (2003), a principais co-morbidades associadas à obesidade estão relacionadas à deposição de gordura em excesso na região subcutânea e visceral em humanos. Isso favorece o aumento de eventos deletérios relacionados ao sistema cardiovascular (Lovejoy et al., 2008).

Em relação ao consumo alimentar, observamos que ratas ovariectomizadas tiveram um discreto aumento na ingestão de ração 12 semanas após a remoção dos ovários, diferença essa não observada com 5 e 9 semanas pós-castração (Apêndice C). Diversos estudos sustentam a ideia de que a castração leva a hiperfagia e maior ganho de peso corporal em roedores (Roesch, 2006; Wade, Gray, 1979), e que o tratamento com estradiol pode prevenir tais efeitos (Asarian, Geary, 2002; Geary, Asarian, 1999). É interessante salientar que as oscilações nos níveis plasmáticos desse hormônio durante o ciclo ovariano também estão correlacionadas com a ingestão alimentar. Em mulheres, o período peri-ovulatório, que coincide com elevadas concentrações de estradiol no plasma, há uma acentuada diminuição na ingestão de alimentos (Eckel, 2011; Gong et al., 1989; Lyons et al., 1989). O mesmo acontece em ratas, no qual é possível observar que na fase de estro, seguida por um aumento plasmático de estradiol, há hipofagia, demonstrando, portanto, que este esteróide exerce um importante efeito anorexigênico (Asarian, Geary, 2006; Brow, Clegg, 2010; Drewett, 1973; Geary, 2001).

Dados com animais transgênicos demonstraram que os efeitos do estradiol no metabolismo são realizados por sua ação sobre os neurônios do núcleo ventromedial do hipotálamo, uma vez que a deleção do ERα nessa região (Mamounis et al., 2014), ou animais knockout para ERα (Heine et al., 2000), apresentam redução no gasto energético quando comparados aos animais normais, que é uma das primeiras causas de obesidade. Ainda, outros autores comprovaram o ganho de peso em decorrência à castração e diminuição no gasto de energia, onde foi observada a redução no consumo de oxigênio e, portanto, redução da atividade metabólica (Camporez et al., 2013; Rogers et al., 2009). Portanto, como demonstrado em nosso estudo e outros, acreditamos que o ganho do peso seguido do aumento da gordura visceral observado nos animais castrados não se deve exclusivamente a hiperfagia, mas provavelmente à redução no gasto energético, uma vez que o ganho de peso ocorreu antes da ingestão aumentada de ração. Isso deixa claro a papel do estradiol na regulação da adiposidade.

Nossa observação de que os animais tratados com DHEA tiveram aumento do consumo alimentar, refletindo na ingestão calórica e percentual de preferência pela ração em relação aos animais tratados com veículo, parece ser distinta do relatado na literatura específica. Há diversos estudos demonstrando o efeito do DHEA na redução do peso corporal. Em síntese, o DHEA parece induzir diminuição da ingestão calórica através de mecanismos celulares do sistema serotonérgico (restaura os níveis de serotonina) em ratos Zucker, um modelo de obesidade infantil associado com hiperfagia (Abadie et al., 1993; Navar et al., 2006; Porter et al., 2005, 1995), e em camundongos (Catalina et al., 2001, 1999; Weindruch et al., 1984). Algumas hipóteses para essa diferença detectada são passíveis de consideração, como por exemplo, aspectos metodológicos empregados nos diferentes trabalhos. Cada autor adota uma dose (2,5 a 75 mg/kg ip ou 0,4% suplementados diretamente na ração) e um tempo de tratamento ideal (2 a 4 dias; 3 à 18 semanas), considerando o uso de uma dieta padrão e animais de ambos os sexos, sem castração. Outra diferença importante envolve o uso de animais com mutações que resultam na obesidade desde fase inicial da vida. O modelo proposto neste estudo difere nesses aspectos, pois utilizamos fêmeas castradas da linhagem Wistar, dieta hiperlipídica e dose de 10 mg/kg sc durante 3 semanas.

A ingestão hídrica foi alterada entre os animais. Detectamos que fêmeas castradas apresentaram menor ingestão hídrica quando comparadas aos animais intactos. Isso contraria alguns estudos presentes na literatura que demonstraram aumento da ingestão hídrica na ausência de estradiol em decorrência à ooforectomia (Tarttelin, Gorski, 1971; Wade, 1975), e o tratamento com esse hormônio reverte tal efeito (Asarian, Geary, 2002; Findlay et al., 1979; Santollo et al., 2013). Interessante destacar que, assim como descrito para a ingestão alimentar, a variação no consumo hídrico modifica de acordo com as fases do ciclo estral. Ratas na fase de estro, que ocorre um pico de secreção de estradiol, há uma significativa redução no consumo hídrico (Blaustein, Wade, 1976; Drewett, 1973; Eckel et al., 2000; Tarttelin, Gorski, 1971). No entanto, Santollo et al. (2013) demonstraram que os efeitos do estradiol na modulação da ingestão hídrica é independente do consumo de ração, uma vez que doses maiores desse esteroide (10 µg) são necessárias para provocar hipodpsia do que para reduzir a ingestão alimentar, no qual 5 µg já é suficiente. Assim, uma limitação importante desse dado detectado por nós envolve o período de observação realizado, que pode ter sido demasiadamente curto, e a manutenção

dos animais em gaiolas individuais pequenas. Considerando que os estrógenos podem modular a atividade motora e o consumo energético dos animais, é possível especularmos que as ratas intactas tenham se movimentado mais dentro das caixas em que estavam alojadas e acabaram esbarrando no bico do bebedouro pelo curto espaço destas, o que pode ter provocado uma perda de água e ter mascarado tal resultado. Ademais, não há relatos na literatura sobre a influência do DHEA no consumo hídrico.

A alimentação hipercalórica e rica em lipídeos associada ao sedentarismo é um dos fatores mais importantes que leva a obesidade. De acordo com uma pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde em 2012, aproximadamente 50% da população acima de 18 anos no Brasil está acima do peso ideal, perfazendo um percentual de 54% entre os homens e 48% entre as mulheres. Dentre os distúrbios metabólicos associados à obesidade, destaca-se a tolerância diminuída à glicose, que, por sua vez, tem sido relacionada à resistência à insulina (Akamine et al., 2010; Atanasovska et al., 2014; Veras et al., 2014). Resultados semelhantes foram encontrados em nosso estudo, sendo importante salientar que somente após 12 semanas de gonadectomia foi detectada modificação da tolerância à glicose e da sensibilidade à ação da insulina, uma vez que experimentos adicionais realizados com 9 semanas pós-castração demonstraram manutenção desses parâmetros (Apêndices D e E).

Em mulheres, é possível observar que a sensibilidade à insulina diminui com o tempo, isto é, mulheres em idade fértil são mais responsivas a ação deste hormônio do que mulheres menopausadas (Goyal et al., 2013; Sakurai et al., 2010). De acordo com a literatura, é possível observar que mulheres na pós-menopausa e que fizeram a terapia de reposição hormonal com estrogênio e progestágenos apresentaram diminuição nos valores de insulina plasmática (Saraç et al., 2009) e melhora na sensibilidade à insulina (Margolis et al., 2004; Saraç et al., 2009). Em modelos experimentais efeitos benéficos semelhantes são observados após a suplementação com estrógenos. Ratas Sprague-Dawley quando ovariectomizadas apresentaram aumento da resistência à insulina, e o tratamento com estradiol melhorou esse parâmetro (Abbas, Elsamanoudy, 2011). Ainda, outros trabalhos demonstraram que camundongos fêmeas castradas e alimentadas com dieta hiperlipídica apresentaram intolerância à glicose e resistência à insulina quando

comparadas aos animais controles, e a suplementação com estradiol reverteu tais efeitos (Riant et al., 2009; Stubbins et al., 2012).

Em nível celular, a insulina tem papel central na captação de glicose e substratos, como aminoácidos, através da indução de fosforilação e desfosforilação de enzimas, além de modular o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (Luchs, 2006). Estudos em animais demonstram que a insulina controla o crescimento celular, metabolismo e sobrevivência através da ativação da sua cascata de sinalização que inclui as vias da PI3K e da MAPK (Guo, 2014). Existe uma gama de hipóteses de que a gênese da resistência à insulina esteja relacionada com pelo menos cinco órgãos, a saber, pâncreas, fígado, tecido adiposo, músculo esquelético e cérebro (Wiernsperger, 2013). Em nosso estudo, avaliamos as etapas iniciais da sinalização da insulina no fígado, músculo gastrocnêmio e coração.

É bem estabelecida a redução da fosforilação em tirosina do IR e seus substratos (IRS1/2), bem como a diminuição do grau de fosforilação em serina da AKT nos tecidos-alvos da insulina como indicadores do quadro de resistência à insulina (Boura-Halfon, Zick, 2009; Hotamisligil et al., 1996; Veras et al., 2014). Em concordância a isso, diversos trabalhos presentes na literatura demonstraram a influência da castração na via de sinalização da insulina tanto no fígado (Kim et al. 2010; Wang et al., 2013) quanto no músculo gastrocnêmio (Riant et al., 2009; Wang et al., 2013) e coração (Koricanac et al., 2009). Corroborando com esses achados, nossos resultados detectaram redução da expressão proteica de algumas proteínas, como IRβ, IRS1, PI3K e AKT nos tecidos estudados, além de redução do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS1/2) no músculo gastrocnêmio e cardíaco. Paralelamente, foi demonstrado pela relação estequiométrica que a fosforilação em serina 307 do IRS1 estava aumentada no músculo gastrocnêmio.

É importante salientar que Kim et al. (2010) demonstram a redução da fosforilação em tirosina do IRS1 somente após 10 semanas de ovariectomia, fato não observado com apenas duas semanas pós-castração, sugerindo que o aumento da resistência à insulina e as alterações nos componentes da via de sinalização da insulina pode ocorrer como um efeito da obesidade induzida pela ovariectomia e da deficiência estrogênica a longo prazo, e não como um efeito direto da ausência dos estrógenos. Por outro lado, a suplementação com estradiol pode aumentar a sensibilidade à insulina nos tecidos-alvos restaurando as modificações ocasionadas pela castração (Riant et al., 2009; Wang et al., 2013). Além disso, estudos com

camundongos machos knockout para ERα no fígado (LKO) tiveram redução da fosforilação da p-AKT Ser473 induzida pela insulina (Zhu et al., 2014) em relação aos controles, confirmando a importância da sinalização insulínica neste órgão na proteção contra a resistência à insulina em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

Embora o coração também seja um músculo estriado, sua contribuição na captação de glicose é muito pequena, mesmo sendo um órgão responsivo à insulina. Ademais, o coração consume muita energia e necessita de suprimento energético constante para a manutenção do ATP intracelular utilizado na contração do miocárdio (Randle et al., 1963). Recentemente foi demonstrado que a deleção do IRS1 e IRS2 no músculo cardíaco diminuiu a fosforilação da AKT (Thr308 e Ser473) e FoxO1 (Ser253) e provocou morte súbita em camundongos machos entre 6 e 8 semanas de vida (Qi et al., 2013), sugerindo que os IRS1 e IRS2 atuem como componentes chave para a associação entre resistência à insulina e insuficiência cardíaca.

Já está bem estabelecida a relação entre associação dos substratos do receptor de insulina, IRS1 e IRS2, e a ativação da PI3K e AKT e, em escala menor com a atividade da MAPK (Guo et al., 2014). Aliás, há várias evidencias demonstrando que deficiência dos substratos 1 e 2 do receptor de insulina leva a inativação da PI3K e mantém ativa a MAPK no fígado e coração (Dong et al., 2008; Guo et al., 2009; Qi et al., 2013). Nesse contexto, as alterações provocadas pela redução da expressão das proteínas IRS1 e IRS2 podem ser consideradas elementos importantes do mecanismo intracelular que associa o desenvolvimento da resistência à insulina e o diabetes mellitus tipo 2 e da obesidade a doenças cardiovasculares; uma vez que a inativação da via PI3K/AKT interfere na homeostase energética e leva a ativação de proteínas quinases ativadoras de mitogênese, as MAPKs (ERK 1/2, p38 e JNK), promovendo um crescimento excessivo e instaurando o quadro de obesidade (Guo et al., 2014).

Nosso estudo demonstrou que os animais tratados com DHEA tiveram uma piora na sensibilidade à insulina, fato este que difere de vários trabalhos em que foram utilizados modelos animais e até mesmo em humanos. Nesse sentido, é possível sugerirmos que tal diferença possa estar relacionada com pelo menos três fatores: 1) efeito do gênero associado ao modelo de indução de resistência à

insulina, 2) presença ou ausência das gônadas e tempo de ausência da mesma e, 3) possibilidade de efeito dual do DHEA (efeito estrogênico ou androgênico).

Em relação ao primeiro fator, a administração de DHEA em ratos machos obesos, quer por dieta hipercalórica (Sato et al., 2012), quer em cepa selecionada, ratos Otsuka Long-Evans (Ishizuka et al., 2007), trouxe efeitos benéficos sobre sensibilidade à insulina, reduzindo a glicemia basal. Ademais, nos adipocitos dos ratos Otsuka Long-Evans esse esteroide induziu redução da adiposidade com aumento da via intracelular PI3K/PKCζ (Ishizuka et al., 2007, 1999). Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que o tratamento agudo com DHEA em ratos envelhecidos (10 mg/kg, sc), administrado em dose única uma semana antes do experimento, melhorou a secreção de insulina induzida por glicose nas ilhotas pancreáticas, que foi acompanhada pelo aumento da massa das células β-pancreáticas e da expressão proteica da AKT1 (Almeida et al., 2013; Medina et al., 2006). Ainda, o DHEA foi capaz de aumentar a associação entre IRS1/PI3K e o grau de fosforilação da PKCζ/λ no músculo; no fígado, esse esteroide aumentou a associação entre IRS2/PI3K e o estado de fosforilação da AKT, melhorando, portanto, a sensibilidade à insulina nestes animais em relação aos ratos tratados com veículo (Campbell et al., 2004). Quanto à presença ou ausência das gônadas, sugerida como segundo fator, um estudo recente demonstrou que ratas ovariectomizadas e submetidas à dieta hiperlipídica por 6 semanas tiveram hipertrofia das ilhotas pancreáticas, diminuição da secreção de insulina e redução da fosforilação da AKT Ser473, e o tratamento com DHEA subcutâneo por 21 dias reverteu todas essas alterações, mostrando um efeito protetor deste esteroide sobre pâncreas endócrino em situações de obesidade e menopausa (Veras et al., 2014).

Contudo, em humanos os efeitos do DHEA são menos concordantes. Enquanto alguns trabalhos demonstraram que o tratamento com DHEA em longo prazo, com doses de 25 e 50 mg/dia via oral, promoveu uma melhora da sensibilidade à insulina (Lasco, 2001; Villareal, Holloszy, 2004; Weiss et al., 2011), outros relataram que o DHEA não influenciou (Casson et al., 1998; Nair et al., 2006; Panjari et al., 2009) ou até mesmo aumentou resistência à insulina (Mortola, Yen, 1990), sendo este último semelhante ao detectado em nosso estudo e que pode estar relacionado ao efeito androgênico do DHEA.

O conceito de hiperandrogenismo e resistência à insulina são demonstrados na literatura de forma clássica tanto em homens (Cohen, Hickman, 1987) quanto em

mulheres (Stuckey et al., 2014). Nesse sentido, um estudo recente com mulheres na pré-menopausa demonstrou que os esteroides sexuais androgênicos podem contribuir com alterações metabólicas, incluindo resistência à insulina, e estão associados a riscos à saúde (Perry et al., 2013). Uma vez que os níveis plasmáticos de andrógenos diminuem ao longo da fase reprodutiva da mulher e permancem constantes na menopausa (Davison et al., 2005), é possível pensarmos que, em nosso modelo, possa ter ocorrido a biotransformação do DHEA para maiores concentrações de andrógenos do que a estrógenos, justificando a piora na sensibilidade à insulina nos animais tratados com esse esteroide, como Mortola e Yen (1990) relataram em seu estudo.

Ademais, nestes últimos 15 anos estudos epidemiológicos e experimentais descreveram uma teoria do tempo ou janela de oportunidade para uso da reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa recente e ou com menos de 60 anos de idade. Nesse período, a reposição hormonal trouxe significativa ampliação na sobrevida e redução no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e risco de câncer de mama (Colditz, Rosner, 2000; Hodis et al., 2012; North American Menopause Society, 2012; Stefanick et al., 2006), tendo em vista que pacientes que adotaram a reposição hormonal após 60 anos apresentaram maior incidência de dessas doenças (Colditz, Rosner, 2000; Hsia et al., 2006; Hulley et al., 1998) em relação àquelas que não fizeram o uso da mesma . No entanto, a duração da hormonioterapia é um dos maiores desafios atuais para entender qual o momento mais apropriado para o interrompimento da mesma (Pardini, 2014). Uma das hipóteses mecanísticas relacionadas a essa condição envolve o aparecimento de isoformas do ERβ, em particular o ERβ2, que atuaria como regulador negativo da ação estrogênica mediada pelos receptores nucleares, sugerindo que níveis elevados de ERβ2 poderiam diminuir os efeitos benéficos da reposição hormonal em mulheres acima de 60 anos (Wang et al., 2012).

Outro aspecto interessante dos nossos resultados é que a castração promoveu um aumento do comprimento naso-anal final relação às ratas intactas. Estudos realizados por Turner et al. (1987) demonstraram que ratas ovariectomizadas apresentaram aumento na taxa de crescimento ósseo quando comparadas as ratas controles, corroborando nossos achados. De acordo com esse autor, a ooforectomia levou ao aumento tanto da formação quanto à reabsorção óssea na diáfise, e o tratamento com estradiol reverteu esses efeitos. No presente

estudo não detectamos efeitos do DHEA sobre o desenvolvimento longitudinal dos animais, todavia, a literatura reporta que esse esteroide pode suprimir o crescimento ósseo agindo diretamente na placa epifisária através de receptores de estrógenos (ERα e ERβ), diminuindo a proliferação, hipertrofia e diferenciação dos condrócitos e aumentando a apoptose dos mesmos (Sun et al., 2011), além de melhorar a densidade mineral óssea tanto em humanos (Nair et al., 2006) quanto em modelos experimentais (Engdahl et al., 2014).

A avaliação dos efeitos da ooforectomia bilateral sobre o perfil bioquímico dos animais também foi realizada. Como esperado, ratas castradas tiveram os níveis plasmáticos de estradiol reduzidos e atrofia uterina. Por outro lado, a suplementação com DHEA nas ratas ovariectomizadas restaurou parcialmente a concentração de estradiol, mas não foi capaz de modificar a diminuição da massa do útero, enquanto que nas ratas intactas o DHEA não influenciou os valores circulantes de estradiol. Resultados semelhantes foram encontrados por Camporez et al. (2011), mostrando que o DHEA, apesar de ter sido convertido a estradiol, não promoveu alterações sobre a atrofia uterina observada. Ainda, a literatura demonstra que ratas ovariectomizadas e que foram suplementadas com estradiol apresentaram aumento do peso uterino (Koricanac et al., 2008; Paquette et al., 2007; Rataj et al., 2014), uma vez que ele modula o desenvolvimento das células epiteliais do endométrio, além de induzir angiogênise (Huang et al., 2014).

Importante salientar que há trabalhos publicados comentando que as glândulas suprarrenais de roedores são incapazes de sintetizar DHEA (Davis et al., 2011; El Kihel, 2012; Wolf, Kirschbaum, 1999). No entanto, outros estudos demonstraram que alguns tecidos, como o cérebro, fígado e ovários também podem produzir DHEA tanto em humanos quanto em roedores (Baulieu, 1998; Grasfeder et al., 2009; Mellon et al., 2001). Nossos resultados demonstram que a ovariectomia promoveu a redução dos níveis plasmáticos de DHEA, e a suplementação exógena com esse hormônio elevou a concentração sérica do mesmo, em relação às ratas que foram tratadas com o veículo. Todavia, em roedores, não há relatos na literatura que correlacionem os níveis plasmáticos de DHEA com o tempo de vida (Wolf, Kirschbaum, 1999), fato interessante, pois demonstramos que após a ovariectomia há decréscimo dos níveis circulantes desse esteroide, indicando o papel dos ovários na produção desse esteroide.

Os valores séricos de colesterol total, HDL-c e LDL-c foi semelhante entre os grupos. Todavia, os níveis de triacilglicerol e VLDL-c nas ratas castradas foram significativamente menores do que nas ratas controles, dados estes que corroboram com a literatura (Liu et al., 2004; Paquette et al., 2007). Os estrógenos exercem um importante papel sobre a produção de lipoproteínas hepáticas e modulam a expressão das apolipoproteínas. De acordo com Paquette et al. (2007), há uma inversa relação entre os valores de triacilglicerol hepático e triacilglicerol sérico. Tanto em humanos, quanto em modelos experimentais, a suplementação com estrógenos induz o aumento do RNAm e a subsequente síntese da apolipoproteína B-100 no fígado, sendo essa envolvida na síntese de VLDL (Schaefer et al., 1983; Srivastava et al., 1992). Assim, a redução da secreção de VLDL pelo fígado apresenta relação direta com baixas concentrações sanguíneas de estrógenos. Nesse contexto, a baixa concentração plasmática de triacilglicerol pode contribuir para o aparecimento da estreatose hepática por induzir acumulo do triacilglicerol nos hepatócitos; e a esteatose hepática pode estar associada ao desenvolvimento de defeitos na sinalização da insulina e da resistência à insulina (Bojic et al., 2014; Ortiz-Lopez et al., 2012; Samuel et al., 2004).

Tem sido demonstrado que as concentrações plasmáticas de albumina são baixas em indivíduos obesos quando comparados a pessoas não obesas, e há uma correlação negativa com o índice de massa corporal (IMC) e percentual de gordura (Salas-Salvadó et al., 2006; Wang et al., 2012). Ademais, há diversos estudos correlacionando inflamação, obesidade e doenças cardiovasculares (Bentley-Lewis et al., 2007; Bulló et al., 2003; Gregor, Hotamisligil, 2011). Esse quadro é acompanhado pelo aumento de diversas citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-6, IL-1β, CCL2, dentre outras (Berg, Scherer, 2005; Gregor, Hotamisligil, 2011; Shoelson et al., 2006). Um dos efeitos destas citocinas pró-inflamatórias é interferir na síntese hepática de proteínas de fase aguda negativa, que inclui a albumina (Don, Kaysen, 2004; Salas-Salvadó et al., 2006). Dessa maneira, a reduzida concentração de albumina detectada no presente estudo nas ratas castradas pode ser explicada pelo contexto da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica, modelo associado à doença inflamatória subaguda (Gregor, Hotamisligil, 2011).

A ovariectomia bilateral induziu redução nos parâmetros da função renal avaliados, uréia e creatinina. Em humanos, um trabalho recente demonstrou que mulheres num estágio de menopausa igual ou inferior a cinco anos não apresentam

modificações nos níveis plasmáticos de uréia e creatinina (Matsui et al., 2014), e a terapia de reposição hormonal não modifica ambos parâmetros, embora tenha apresentado efeitos favoráveis em outros aspectos renais, como na taxa de filtração glomerular (Kaygusuz et al., 2012). Em modelos experimentais, Ulas e Cay (2011) demonstram que ratas castradas e alimentadas com dieta padrão não tiveram alterações nos níveis plasmáticos desses marcadores da função renal quando comparadas aos animais controles, e a suplementação com estradiol também não exerceu qualquer efeito. Considerando que a creatinina pode ser sintetizada pelos rins (Ambrose et al., 1983), fígado (Myers et al., 2006) e pâncreas (Perrone et al. 1992), enquanto a uréia, que é derivada do catabolismo de proteínas, e é formada exclusivamente por enzimas hepáticas no ciclo da uréia (Lamb, Price, 2008), é possível sugerir que a redução desses marcadores renais apresentados nas ratas ovariectomizadas em nosso estudo poderia estar relacionada com um desbalanço da função hepática, devido ao possível acúmulo de gordura no fígado, uma vez que este órgão é importante para a síntese da uréia e creatinina. Ademais, não há relatos diretos na literatura que reportam a influência do DHEA sobre os níveis de creatinina plasmática, mas foi possível observar que baixas concentrações de DHEAS aumenta o risco de mortalidade em pacientes dependentes de hemodiálise (Hsu et al., 2012; Kakiya et al., 2012).

De modo geral, nossos resultados demonstraram que a ovariectomia influenciou de forma negativa vários aspectos metabólicos avaliados, como a homeostase glicêmica que foi associada à obesidade, e parâmetros bioquímicos, além de provocar alterações nas etapas iniciais da via de sinalização da insulina (Apêndice I). Embora alguns trabalhos publicados por nosso laboratório e a literatura específica demonstrar que o DHEA pode exercer efeitos benéficos sobre a resistência à insulina e intolerância à glicose, neste estudo observamos que a deidroepiandrosterona, além de não ser capaz de recuperar a ação da insulina nos tecidos avaliados, piorou a sensibilidade à insulina nesses animais.

6 CONCLUSÃO

Esse estudo confirma que a ooforectomia bilaterial levou ao aumento da massa corporal e obesidade, resultando no aparecimento do quadro de resistência à insulina e intolerância à glicose, além de promover alterações tecido-específicas nas etapas iniciais da via de sinalização de insulina. Ademais, o tratamento com DHEA piorou a sensibilidade à insulina, além de induzir maior ingestão calórica nesses animais.

Tomados em conjuntos, nossos resultados sugerem que suplementação com DHEA não é benéfica em todos os modelos, uma vez que o uso desse esteroide pareceu induzir um estado androgênico nos animais, cujos efeitos foram refletidos sobre os parâmetros endócrinos e metabólicos.

REFERÊNCIAS[1]

Abadie JM, Wright B, Correa G, Browne ES, Porter JR, Svec F. Effect of dehydroepiandrosterone on neurotransmitter levels and appetite regulation of the obese Zucker rat. The Obesity Research Program. Diabetes. 1993 May;42(5):662-9.

Abbas AM, Elsamanoudy AZ. Effects of 17ß-estradiol and antioxidant administration on oxidative stress and insulin resistance in ovariectomized rats. Can J Physiol Pharmacol. 2011 Jul;89(7):497-504.

Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. J Biol Chem. 2002 Jan 11;277(2):1531-7.

Akamine EH, Marçal AC, Camporez JP, Hoshida MS, Caperuto LC, Bevilacqua E, et al. Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. J Endocrinol. 2010 Jul;206(1):65-74.

Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. J Neurosci Methods. 2008 Jul 30;172(2):250-4.

Almeida FN, Veras KM, Camporez JP, Felitti V, Chimin P, Carvalho CRO. Dehydroepiandrosterone Increases Pancreatic Duodenal Homebox-1 (PDX-1) and Reduces Cleaved Caspase-3 Protein Expression in Insulin-Secreting INS-1E Cells. Research in Endocrinology. 2013;2013:1-8.

Ambrose RT, Ketchum DF, Smith JW. Creatinine determined by "high-performance" liquid chromatography. Clin Chem. 1983 Feb;29(2):256-9.

Asarian L, Geary N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. Horm Behav. 2002 Dec;42(4):461-71.

Asarian L, Geary N. Estradiol enhances cholecystokinin-dependent lipid-induced satiation and activates estrogen receptor-alpha-expressing cells in the nucleus tractus solitarius of ovariectomized rats. Endocrinology. 2007 Dec;148(12):5656-66.

Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006 Jul 29;361(1471):1251-63.

Atanasovska E, Tasic V, Slaninka-Miceska M, Alabakovska S, Zafirov D, Kostova E, et al. Six week follow-up of metabolic effects induced by a high-fat diet and streptozotocin in a rodent model of type 2 diabetes mellitus. Prilozi. 2014;35(1):169-79.

[1]De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

Bagnoli VR, Fonseca AM, Arie WM, Das Neves EM, Azevedo RS, Sorpreso IC, et al. Metabolic disorder and obesity in 5027 Brazilian postmenopausal women. Gynecol Endocrinol. 2014 Jun 5:1-4. [Epub ahead of print]

Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM. Increased p85/55/50 expression and decreased phosphotidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. Diabetes. 2005 Aug;54(8):2351-9.

Barbo DM. Menopause. In: Wallis LA, Kasper AS, Reader GG, et al., eds. Textbook of women's health. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998:721.

Barrett-Connor E, Khaw KT, Yen SS. A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate, mortality, and cardiovascular disease. N Engl J Med. 1986 Dec 11;315(24):1519-24.

Baulieu EE. Neurosteroids: a novel function of the brain. Psychoneuroendocrinology. 1998 Nov;23(8):963-87.

Bélanger A, Candas B, Dupont A, Cusan L, Diamond P, Gomez JL, et al. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. J Clin Endocrinol Metab. 1994 Oct;79(4):1086-90.

Bentley-Lewis R, Koruda K, Seely EW. The metabolic syndrome in women. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2007 Oct;3(10):696-704.

Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. Circ Res. 2005 May 13;96(9):939-49.

Bernardis LL. Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's "nutritive ratio" in rats with hypothalamic obesity. Experientia. 1970;26(7):789-90.

Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. Mol Endocrinol. 2005 Apr;19(4):833-42.

Blaustein JD, Wade GN. Ovarian influences on the meal patterns of female rats. Physiol Behav. 1976 Aug;17(2):201-8.

Bojic LA, Telford DE, Fullerton MD, Ford RJ, Sutherland BG, Edwards JY, et al. PPARd activation attenuates hepatic steatosis in Ldlr-/- mice by enhanced fat oxidation, reduced lipogenesis and improved insulin sensitivity. J Lipid Res. 2014 May 26. [Epub ahead of print]

Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corgnati A, Muggeo M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. J Clin Endocrinol Metab. 1989 Feb;68(2):374-8.

Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. Diabetes Care. 2000 Jan;23(1):57-63.

Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 Apr;296(4):E581-91.

Brown LM, Clegg DJ.Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity.J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Oct;122(1-3):65-73.

Bulló M, García-Lorda P, Megias I, Salas-Salvadó J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. Obes Res. 2003 Apr;11(4):525-31.

Campbell CS, Caperuto LC, Hirata AE, Araujo EP, Velloso LA, Saad MJ, et al. The phosphatidylinositol/AKT/atypical PKC pathway is involved in the improved insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo. Life Sci. 2004 Nov 19;76(1):57-70.

Camporez JP, Akamine EH, Davel AP, Franci CR, Rossoni LV, Carvalho CR. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. J Physiol. 2011 May 15;589(Pt 10):2585-96.

Camporez JP, Jornayvaz FR, Lee HY, Kanda S, Guigni BA, Kahn M, et al.Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance. Endocrinology. 2013 Mar;154(3):1021-8

Casson PR, Santoro N, Elkind-Hirsch K, Carson SA, Hornsby PJ, Abraham G, et al. Postmenopausal dehydroepiandrosterone administration increases free insulin-like growth factor-I and decreases high-density lipoprotein: a six-month trial. Fertil Steril. 1998 Jul;70(1):107-10.

Catalina F, Kumar V, Milewich L, Bennett M.Food restriction-like effects of dehydroepiandrosterone: decreased lymphocyte numbers and functions with increased apoptosis. Proc Soc Exp Biol Med. 1999 Sep;221(4):326-35.

Catalina F, Speciale SG, Kumar V, Milewich L, Bennett M. Food restriction-like effects of dietary dehydroepiandrosterone. Hypothalamic neurotransmitters and metabolites in male C57BL/6 and (C57BL/6 x DBA/2)F1 mice. Exp Biol Med (Maywood). 2001 Mar;226(3):208-15.

Chlebowski RT, Anderson GL, Gass M, Lane DS, Aragaki AK, Kuller LH, et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. JAMA. 2010 Oct 20;304(15):1684-92.

Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, Souza CT, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. PLoS One. 2012;7(1):e30571.

Cohen JC, Hickman R. Insulin resistance and diminished glucose tolerance in powerlifters ingesting anabolic steroids. J Clin Endocrinol Metab. 1987 May;64(5):960-3.

Colditz GA, Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. Am J Epidemiol. 2000 Nov 15;152(10):950-64.

Cutler GB Jr, Glenn M, Bush M, Hodgen GD, Graham CE, Loriaux DL. Adrenarche: a survey of rodents, domestic animals, and primates. Endocrinology. 1978 Dec;103(6):2112-8.

Davis SR, Panjari M, Stanczyk FZ. Clinical review: DHEA replacement for postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab. 2011 Jun;96(6):1642-53.

Davison SL Bell R, Donath S, Montalto JG, Davis SR. Androgen levels in adult females: changes with age, menopause, and oophorectomy. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Jul;90(7):3847-53.

De Peretti E, Forest MG. Unconjugated dehydroepiandrosterone plasma levels in normal subjects from birth to adolescence in human: the use of a sensitive radioimmunoassay. J Clin Endocrinol Metab. 1976 Nov;43(5):982-91.

De Pergola G, Zamboni M, Sciaraffia M, Turcato E, Pannacciulli N, Armellini F, et al. Body fat accumulation is possibly responsible for lower dehydroepiandrosterone circulating levels in premenopausal obese women. Int J Obes Relat Metab Disord. 1996 Dec;20(12):1105-10.

Després JP. Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. Nutrition. 1993 Sep-Oct;9(5):452-9.

Diniz YS, Faine LA, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GX, Burneiko RC, et al. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. Nutrition. 2005 Jun;21(6):749-55.

Don BR, Kaysen G. Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. Semin Dial. 2004 Nov-Dec;17(6):432-7.

Dong XC, Copps KD, Guo S, Li Y, Kollipara R, DePinho RA, et al. Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. Cell Metab. 2008 Jul;8(1):65-76.

Drewett RF. Oestrous and dioestrous components of the ovarian inhibition on hunger in the rat. Anim Behav. 1973 Nov;21(4):772-80.

Drewett RF. Sexual behaviour and sexual motivation in the female rat. Nature. 1973 Apr 13;242(5398):476-7.

Ducharme JR, Forest MG, De Peretti E, Sempé M, Collu R, Bertrand J. Plasma adrenal and gonadal sex steroids in human pubertal development. J Clin Endocrinol Metab. 1976 Mar;42(3):468-76.

Eckel LA, Houpt TA, Geary N. Spontaneous meal patterns in female rats with and without access to running wheels. Physiol Behav. 2000 Aug-Sep;70(3-4):397-405.

El Kihel L. Oxidative metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) and biologically active oxygenated metabolites of DHEA and epiandrosterone (EpiA) - recent reports. Steroids. 2012 Jan;77(1-2):10-26.

Engdahl C, Lagerquist MK, Stubelius A, Andersson A, Studer E, Ohlsson C, et al. Role of androgen and estrogen receptors for the action of dehydroepiandrosterone (DHEA). Endocrinology. 2014 Mar;155(3):889-96.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. Mol Endocrinol. 2000 Oct;14(10):1649-60.

Filardo EJ, Thomas P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. Trends Endocrinol Metab. 2005 Oct;16(8):362-7.

Filardo EJ, Thomas P. Minireview: G Protein-Coupled Estrogen Receptor-1, GPER-1: Its Mechanism of Action and Role in Female Reproductive Cancer, Renal and Vascular Physiology. Endocrinology. 2012;153(7):1-10.

Findlay AL, Fitzsimons JT, Kucharczyk J. Dependence of spontaneous and angiotensin-induced drinking in the rat upon the oestrous cycle and ovarian hormones. J Endocrinol. 1979 Aug;82(2):215-25.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972 Jun;18(6):499-502.

Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, et al. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. J Biol Chem. 2002 Dec 13;277(50):48115-21.

Geary N, Asarian L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. Physiol Behav. 1999 Aug 1;67(1):141-7.

Geary N. Estradiol, CCK and satiation. Peptides. 2001 Aug;22(8):1251-63.

Genazzani AD, Lanzoni C, Genazzani AR. Might DHEA be considered a beneficial replacement therapy in the elderly? Drugs Aging. 2007;24(3):173-85.

Gong EJ, Garrel D, Calloway DH. Menstrual cycle and voluntary food intake. Am J Clin Nutr. 1989 Feb;49(2):252-8.

Goyal S, Baruah M, Devi R, Jain K. Study on relation of metabolic syndrome with menopause. Indian J Clin Biochem. 2013 Jan;28(1):55-60.

Grasfeder LL, Gaillard S, Hammes SR, Ilkayeva O, Newgard CB, Hochberg RB, et al. Fasting-induced hepatic production of DHEA is regulated by PGC-1alpha, ERRalpha, and HNF4alpha. Mol Endocrinol. 2009 Aug;23(8):1171-82.

Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. Annu Rev Immunol. 2011;29:415-45.

Guo S, Copps KD, Dong X, Park S, Cheng Z, Pocai A, et al. The Irs1 branch of the insulin signaling cascade plays a dominant role in hepatic nutrient homeostasis. Mol Cell Biol. 2009 Sep;29(18):5070-83.

Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. J Endocrinol. 2014 Jan 8;220(2):T1-T23.

Hansen PA, Han DH, Nolte LA, Chen M, Holloszy JO. DHEA protects against visceral obesity and muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. Am J Physiol. 1997;273(5):R1704-R1708.

Harcourt BE, Penfold SA, Forbes JM. Coming full circle in diabetes mellitus: from complications to initiation. Nat Rev Endocrinol. 2013 Feb;9(2):113-23.

Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-a knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(23):12729-12734.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. Nature. 2002 Nov 21;420(6913):333-6.

Hodis HN, Collins P, Mack WJ, Schierbeck LL. The timing hypothesis for coronary heart disease prevention with hormone therapy: past, present and future in perspective. Climacteric. 2012 Jun;15(3):217-28.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. Science. 1996 Feb 2;271(5249):665-8.

Hsia J, Langer RD, Manson JE, Kuller L, Johnson KC, Hendrix SL, et al. Conjugated equine estrogens and coronary heart disease: the Women's Health Initiative. Arch Intern Med. 2006 Feb 13;166(3):357-65.

Hsu HJ, Yen CH, Chen CK, Hsu KH, Hsiao CC, Lee CC, et al. Low plasma DHEA-S increases mortality risk among male hemodialysis patients. Exp Gerontol. 2012 Dec;47(12):950-7.

Huang TS, Chen YJ, Chou TY, Chen CY, Li HY, Huang BS, et al. Oestrogen-induced angiogenesis promotes adenomyosis by activating the Slug-VEGF axis in endometrial epithelial cells. J Cell Mol Med. 2014 Apr 24. [Epub ahead of print]

Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. JAMA. 1998 Aug 19;280(7):605-13.

Ishizuka T, Kajita K, Miura A, Ishizawa M, Kanoh Y, Itaya S, et al. DHEA improves glucose uptake via activations of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase. Am J Physiol. 1999 Jan;276(1 Pt 1):E196-204.

Ishizuka T, Miura A, Kajita K, Matsumoto M, Sugiyama C, Matsubara K, et al. Effect of dehydroepiandrosterone on insulin sensitivity in Otsuka Long-Evans Tokushima-fatty rats. Acta Diabetol. 2007 Dec;44(4):219-26.

Jacob MH, Janner Dda R, Belló-Klein A, Llesuy SF, Ribeiro MF. Dehydroepiandrosterone modulates antioxidant enzymes and Akt signaling in healthy Wistar rat hearts. J Steroid Biochem Mol Biol. 2008 Nov;112(1-3):138-44.

James WP. The epidemiology of obesity: the size of the problem. J Intern Med. 2008 Apr;263(4):336-52.

Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(23):12735-12740.

Kaaja RJ. Metabolic syndrome and the menopause. Menopause Int. 2008 Mar;14(1):21-5.

Kakiya R, Shoji T, Hayashi T, Tatsumi-Shimomura N, Tsujimoto Y, Tabata T, et al. Decreased serum adrenal androgen dehydroepiandrosterone sulfate and mortality in hemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant. 2012 Oct;27(10):3915-22.

Kaygusuz I, Gumus II, Yuvaci HU, Kasapoglu B, Carlioglu A. Does hormone replacement therapy have beneficial effects on renal functions in menopausal women? Arch Gynecol Obstet. 2012 Jun;285(6):1643-6.

Kim JY, Jo KJ, Kim OS, Kim BJ, Kang DW, Lee KH, et al. Parenteral 17beta-estradiol decreases fasting blood glucose levels in non-obese mice with short-term ovariectomy. Life Sci. 2010 Sep 11;87(11-12):358-66.

Kimura M, Tanaka SI, Yamada Y, Kiuchi Y, Yamakawa T, Sekihara H. Dehydroepiandrosterone decreases serum tumor necrosis factor-alpha and restores insulin sensitivity: independent effect from secondary weight reduction in genetically obese Zucker fatty rats. Endocrinology. 1998 Jul;139(7):3249-53.

Konigame VC, Siu ER, Royer C, Lucas TF, Porto CS, Abdalla FM. Estrogen receptors mediate rapid activation of phospholipase C pathway in the rat endometrium. Steroids. 2011 Dec 20;76(14):1582-9.

Koricanac G, Milosavljevic T, Stojiljkovic M, Zakula Z, Ribarac-Stepic N, Isenovic ER. Insulin signaling in the liver and uterus of ovariectomized rats treated with estradiol. J Steroid Biochem Mol Biol. 2008 Jan;108(1-2):109-16.

Koricanac G, Milosavljevic T, Stojiljkovic M, Zakula Z, Tepavcevic S, Ribarac-Stepic N, et al. Impact of estradiol on insulin signaling in the rat heart. Cell Biochem Funct. 2009 Mar;27(2):102-10.

Krishnan S, Gustafson MB, Campbell C, Gaikwad NW, Keim NL. Association between circulating endogenous androgens and insulin sensitivity changes with exercise training in midlife women. Menopause. 2014 Feb 3. [Epub ahead of print]

Krotkiewski M, Björntorp P, Sjöström L, Smith U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. J Clin Invest. 1983 Sep;72(3):1150-62.

Labrie F, Bélanger A, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Cusan L, et al. DHEA and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: its role during aging. Steroids. 1998 May-Jun;63(5-6):322-8.

Labrie F, Bélanger A, Simard J, Van Luu-The, Labrie C.DHEA and peripheral androgen and estrogen formation: intracinology. Ann N Y Acad Sci. 1995 Dec 29;774:16-28.

Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Bélanger A, Simard J, Lin SX, et al. Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles

of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. Endocr Rev. 2003 Apr;24(2):152-82.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970;15(5259):680-5.

Lafontan M, Berlan M. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? Trends Pharmacol Sci. 2003 Jun;24(6):276-83.

Lamb JE, Price CP. Creatinine, urea and uric acid. In: Burtis CA; Ashwood ER; Bruns DE. Tietz: fundamentals of clinical chemistry. 6th ed. Philadelphia: Elsevier; 2008. p. 363-72.

Lasco A, Frisina N, Morabito N, Gaudio A, Morini E, Trifiletti A, et al. Metabolic effects of dehydroepiandrosterone replacement therapy in postmenopausal women. Eur J Endocrinol. 2001 Oct;145(4):457-61.

Lee CG, Carr MC, Murdoch SJ, Mitchell E, Woods NF, Wener MH, et al. Adipokines, inflammation, and visceral adiposity across the menopausal transition: a prospective study. J Clin Endocrinol Metab. 2009 Apr;94(4):1104-10.

Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. J Biol Chem. 2003 Jan 31;278(5):2896-902.

Liu ML, Xu X, Rang WQ, Li YJ, Song HP. Influence of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function. Int J Cardiol. 2004 Dec;97(3):485-93.

Llaneza P, Gonzalez C, Fernandez-Iñarrea J, Alonso A, Diaz-Fernandez MJ, Arnott I, et al. Soy isoflavones, Mediterranean diet, and physical exercise in postmenopausal women with insulin resistance. Menopause. 2010 Mar;17(2):372-8.

Long JA, Evans HM. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. Memories of University of California. 1922;6:1-148.

López-Marure R, Contreras PG, Dillon JS. Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation, migration, and death of breast cancer cells. Eur J Pharmacol. 2011 Jun 25;660(2-3):268-74.

Lovejoy JC, Champagne CM,de Jonge L, Xie H, Smith SR. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. Int J Obes (Lond). 2008;32(6):949-958.

Lucas TF, Pimenta MT, Pisolato R, Lazari MF, Porto CS. 17β-estradiol signaling and regulation of Sertoli cell function. Spermatogenesis. 2011 Oct;1(4):318-324.

Luchs A. Signal transduction: an overview on insulin. Rev Inst Adolfo Lutz. 2006;65(3): 157-164.

Lyons PM, Truswell AS, Mira M, Vizzard J, Abraham SF. Reduction of food intake in the ovulatory phase of the menstrual cycle. Am J Clin Nutr. 1989 Jun;49(6):1164-8.

Mamounis KJ, Yang JA, Yasrebi A, Roepke TA. Estrogen response element-independent signaling partially restores post-ovariectomy body weight gain but is not sufficient for 17β-estradiol's control of energy homeostasis. Steroids. 2014 Mar;81:88-98.

Mandl AM. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. Journal of Experimental Biology. 1951;28:576-584.

Marçal AC, Camporez JP, Lima-Salgado TM, Cintra DE, Akamine EH, Ribeiro LM, et al. Changes in food intake, metabolic parameters and insulin resistance are induced by an isoenergetic, medium-chain fatty acid diet and are associated with modifications in insulin signalling in isolated rat pancreatic islets. Br J Nutr. 2013 Jun 28;109(12):2154-65.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Braz J Biol. 2002 Nov;62(4A):609-14.

Margolis KL, Bonds DE, Rodabough RJ, Tinker L, Phillips LS, Allen C, et al. Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial. Diabetologia. 2004 Jul;47(7):1175-87.

Matsui S, Yasui T, Keyama K, Tani A, Kato T, Uemura H, et al. High adiponectin level in late postmenopausal women with normal renal function. Clin Chim Acta. 2014 Mar 20;430:104-8.

Medina MC, Souza LC, Caperuto LC, Anhê GF, Amanso AM, Teixeira VP, et al. Dehydroepiandrosterone increases beta-cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. FEBS Lett. 2006 Jan 9;580(1):285-90.

Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA. Biosynthesis and action of neurosteroids. Brain Res Brain Res Rev. 2001 Nov;37(1-3):3-12.

Migeon CJ, Keller AR, Lawrence B, Shepard TH 2nd. Dehydroepiandrosterone and androsterone levels in human plasma. effect of age and sex; day-to-day and diurnal variations. J Clin Endocrinol Metab. 1957 Sep;17(9):1051-62.

Ministério da Saúde. Portal Brasil. Obesidade atinge mais da metade da população brasileira, aponta estudo. [acesso em: 2014 jun. 10]. Disponível em: http://www.brasil.gov.br/saude/2013/08/obesidade-atinge-mais-da-metade-da-populacao-brasileira-aponta-estudo.

Mohan PF, Ihnen JS, Levin BE, Cleary MP. Effects of dehydroepiandrosterone treatment in rats with diet-induced obesity. J Nutr. 1990 Sep;120(9):1103-14.

Mortola JF, Yen SS. The effects of oral dehydroepiandrosterone on endocrine-metabolic parameters in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab. 1990 Sep;71(3):696-704.

Musatov S, Chen W, Pfaff DW, Mobbs CV, Yang XJ, Clegg DJ, et al. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 13;104(7):2501-6.

Myers GL, Miller WG, Coresh J, Fleming J, Greenberg N, Greene T, et al. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. Clin Chem. 2006 Jan;52(1):5-18.

Nair KS, Rizza RA, O'Brien P, Dhatariya K, Short KR, Nehra A, et al. DHEA in elderly women and DHEA or testosterone in elderly men. N Engl J Med. 2006 Oct 19;355(16):1647-59.

Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nogueira CR, Novelli EL, et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. Biol Res. 2008;41(3):253-9.

Navar D, Saulis D, Corll C, Svec F, Porter JR. Dehydroepiandrosterone (DHEA) blocks the increase in food intake caused by neuropeptide Y (NPY) in the Zucker rat. Nutr Neurosci. 2006 Oct-Dec;9(5-6):225-32.

Nestler JE, Barlascini CO, Clore JN, Blackard WG. Dehydroepiandrosterone reduces serum low density lipoprotein levels and body fat but does not alter insulin sensitivity in normal men. J Clin Endocrinol Metab. 1988 Jan;66(1):57-61.

North American Menopause Society. The 2012 hormone therapy position statement of: The North American Menopause Society. Menopause. 2012 Mar;19(3):257-71.

Orentreich N, Brind JL, Rizer RL, Vogelman JH. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. J Clin Endocrinol Metab. 1984 Sep;59(3):551-5.

Ortiz-Lopez C, Lomonaco R, Orsak B, Finch J, Chang Z, Kochunov VG, et al. Prevalence of prediabetes and diabetes and metabolic profile of patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Diabetes Care. 2012 Apr;35(4):873-8.

Otsuki M, Kasayama S, Morita S, Asanuma N, Saito H, Mukai M, Koga M. Menopause, but not age, is an independent risk factor for fasting plasma glucose levels in nondiabetic women. Menopause. 2007 May-Jun;14(3 Pt 1):404-7.

Panjari M, Bell RJ, Jane F, Adams J, Morrow C, Davis SR. The safety of 52 weeks of oral DHEA therapy for postmenopausal women. Maturitas. 2009 Jul 20;63(3):240-5.

Paquette A, Shinoda M, Rabasa Lhoret R, Prud'homme D, Lavoie JM. Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: impact of a high-fat diet. Maturitas. 2007 Oct 20;58(2):182-90.

Pardini D. Hormone replacement therapy in menopause. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2014 Mar;58(2):172-81.

Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. Clin Chem. 1992 Oct;38(10):1933-53.

Perry A, Wang X, Goldberg R, Ross R, Jackson L. Androgenic sex steroids contribute to metabolic risk beyond intra-abdominal fat in overweight/obese black and white women. Obesity (Silver Spring). 2013 Aug;21(8):1618-24.

Poehlman ET, Toth MJ, Gardner AW. Changes in energy balance and body composition at menopause: a controlled longitudinal study. Ann Intern Med. 1995 Nov 1;123(9):673-5.

Polotsky HN, Polotsky AJ. Metabolic implications of menopause. Semin Reprod Med. 2010 Sep;28(5):426-34.

Porter J, Van Vrancken M, Corll C, Thompson H, Svec F. The influence of dehydroepiandrosterone and 8-OH-DPAT on the caloric intake and hypothalamic neurotransmitters of lean and obese Zucker rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005 Apr;288(4):R928-35.

Porter JR, Abadie JM, Wright BE, Browne ES, Svec F. The effect of discontinuing dehydroepiandrosterone supplementation on Zucker rat food intake and hypothalamic neurotransmitters. Int J Obes Relat Metab Disord. 1995 Jul;19(7):480-8.

Prentice RL, Manson JE, Langer RD, Anderson GL, Pettinger M, Jackson RD, et al. Benefits and risks of postmenopausal hormone therapy when it is initiated soon after menopause. Am J Epidemiol. 2009 Jul 1;170(1):12-23.

Qi Y, Xu Z, Zhu Q, Thomas C, Kumar R, Feng H, et al. Myocardial loss of IRS1 and IRS2 causes heart failure and is controlled by p38a MAPK during insulin resistance. Diabetes. 2013 Nov;62(11):3887-900.

Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? Nutrition. 2005 Jun;21(6):775-7.

Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet. 1963 Apr 13;1(7285):785-9.

Rasgon NL, Kenna HA, Wroolie TE, Williams KE, Demuth BN, Silverman DH. Insulin resistance and medial prefrontal gyrus metabolism in women receiving hormone therapy. Psychiatry Res. 2014 Apr 15. pii: S0925-4927(14)00091-2.

Rataj F, Möller FJ, Jähne M, Hönscheid P, Zierau O, Vollmer G, et al. Progesterone, as well as 17ß-estradiol, is important for regulating AHR battery homoeostasis in the rat uterus. Arch Toxicol. 2014 Apr 29. [Epub ahead of print]

Reaven GM. Why Syndrome X? From Harold Himsworth to the insulin resistance syndrome. Cell Metab. 2005 Jan;1(1):9-14.

Rebuffé-Scrive M, Eldh J, Hafström LO, Björntorp P. Metabolism of mammary, abdominal, and femoral adipocytes in women before and after menopause. Metabolism. 1986 Sep;35(9):792-7.

Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. Endocrinology. 2009 May;150(5):2109-17.

Roepke TA. Oestrogen modulates hypothalamic control of energy homeostasis through multiple mechanisms. J Neuroendocrinol. 2009 Feb;21(2):141-50.

Roesch DM.Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. Physiol Behav. 2006 Jan 30;87(1):39-44.93.

Rogers NH, Perfield JW 2nd, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomyinduced obesity. Endocrinology. 2009;150(5):2161-2168.

Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. Anal Biochem. 2010 Jun 15;401(2):318-20.

Royer C, Lucas TF, Lazari MF, Porto CS. 17Beta-stradiol signaling and regulation of proliferation and apoptosis of rat Sertoli cells.Biol Reprod. 2012 Apr 12;86(4):108.

Sakurai T, Iimuro S, Araki A, Umegaki H, Ohashi Y, Yokono K, Ito H. Age-associatedincrease in abdominal obesity and insulin resistance, and usefulness of AHA/NHLBI definition of metabolic syndrome for predicting cardiovascular disease in Japanese elderly with type 2 diabetes mellitus. Gerontology. 2010;56(2):141-9.`

Salas-Salvadó J, Bulló M, García-Lorda P, Figueredo R, Del Castillo D, Bonada A, et al. Subcutaneous adipose tissue cytokine production is not responsible for the restoration of systemic inflammation markers during weight loss. Int J Obes (Lond). 2006 Dec;30(12):1714-20.

Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. J Biol Chem. 2004 Jul 30;279(31):32345-53.

Santollo J, Marshall A, Daniels D. Activation of membrane-associated estrogen receptors decreases food and water intake in ovariectomized rats. Endocrinology. 2013 Jan;154(1):320-9.

Santollo J, Torregrossa A-M, Eckel LA. Estradiol acts in the medial preoptic area, arcuate nucleus, and dorsal raphe nucleus to reduce food intake in ovariectomized rats. Horm Behav 2011;60:86–93.

Saraç F, Saydam G, Sahin F, Oztekin K, Saygili F, Tüzün M, Yilmaz C. Effects of hormone replacement therapy on insulin resistance and platelet function tests. Med Princ Pract. 2009;18(1):43-7.

Satia-Abouta J, Patterson RE, Schiller RN, Kristal AR. Energy from fat is associated with obesity in U.S. men: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. Prev Med.2002 May;34(5):493-501.

Sato K, Iemitsu M, Aizawa K, Mesaki N, Ajisaka R, Fujita S. DHEA administration and exercise training improves insulin resistance in obese rats. Nutr Metab (Lond). 2012 May 30;9:47.

Schaefer EJ, Foster DM, Zech LA, Lindgren FT, Brewer HB Jr, Levy RI. The effects of estrogen administration on plasma lipoprotein metabolism in premenopausal females. J Clin Endocrinol Metab. 1983 Aug;57(2):262-7.

Schmidt PJ, Daly RC, Bloch M, Smith MJ, Danaceau MA, St Clair LS, et al. Dehydroepiandrosterone monotherapy in midlife-onset major and minor depression. Arch Gen Psychiatry. 2005 Feb;62(2):154-62.

Schriock ED, Buffington CK, Hubert GD, Kurtz BR, Kitabchi AE, Buster JE, et al. Divergent correlations of circulating dehydroepiandrosterone sulfate and testosterone with insulin levels and insulin receptor binding. J Clin Endocrinol Metab. 1988 Jun;66(6):1329-31.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. J Clin Invest. 2006 Jul;116(7):1793-801.

Smith MR, Rudd BT, Shirley A, Rayner PH, Williams JW, Duignan NM, et al. A radioimmunoassay for the estimation of serum dehydroepiandrosterone sulphate in normal and pathological sera. Clin Chim Acta. 1975 Nov 15;65(1):5-13.

Srivastava RA, Tang J, Baumann D, Schonfeld G. Hormonal and nutritional stimuli modulate apolipoprotein B mRNA editing in mouse liver. Biochem Biophys Res Commun. 1992 Oct 15;188(1):135-41.

Stefanick ML, Anderson GL, Margolis KL, Hendrix SL, Rodabough RJ, Paskett ED, et al. Effects of conjugated equine estrogens on breast cancer and mammography screening in postmenopausal women with hysterectomy. JAMA. 2006 Apr 12;295(14):1647-57.

Stubbins RE, Najjar K, Holcomb VB, Hong J, Núñez NP. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. Diabetes Obes Metab. 2012 Jan;14(1):58-66.

Stuckey BG, Opie N, Cussons AJ, Watts GF, Burke V. Clustering of metabolic and cardiovascular risk factors in the polycystic ovary syndrome: a principal component analysis. Metabolism. 2014 May 10. pii: S0026-0495(14)00144-9. [Epub ahead of print]

Sun H, Zang W, Zhou B, Xu L, Wu S. DHEA suppresses longitudinal bone growth by acting directly at growth plate through estrogen receptors. Endocrinology. 2011 Apr;152(4):1423-33.

Tarttelin MF, Gorski RA. Variations in food and water intake in the normal and acyclic female rat. Physiol Behav. 1971 Dec;7(6):847-52.

Tchernof A, Després JP, Bélanger A, Dupont A, Prud'homme D, Moorjani S, et al. Reduced testosterone and adrenal C19 steroid levels in obese men. Metabolism. 1995 Apr;44(4):513-9.

Thammacharoen S, Lutz TA, Geary N, Asarian L. Hindbrain administration of estradiol inhibits feeding and activates estrogen receptor-alpha-expressing cells in the nucleus tractus solitarius of ovariectomized rats. Endocrinology. 2008 Apr;149(4):1609-17.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins frompolyacrylamidegels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Biotechnology, 1992;24:145-149.

Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH. The effects of ovariectomy and 17 beta-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. J Bone Miner Res. 1987 Apr;2(2):115-22.

Ulas M, Cay M. 17ß-Estradiol and vitamin E modulates oxidative stress-induced kidney toxicity in diabetic ovariectomized rat. Biol Trace Elem Res. 2011 Dec;144(1-3):821-31.

Veras K, Almeida FN, Nachbar RT, de Jesus DS, Camporez JP, Carpinelli AR, et al. DHEA supplementation in ovariectomized rats reduces impaired glucose-stimulated insulin secretion induced by a high-fat diet. FEBS Open Bio. 2014 Jan 18;4:141-6.

Villareal DT, Holloszy JO. Effect of DHEA on abdominal fat and insulin action in elderly women and men: a randomized controlled trial. JAMA. 2004 Nov 10;292(18):2243-8.

Wade GN, Gray JM. Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. Physiol Behav. 1979 Mar;22(3):583-93.

Wade GN. Some effects of ovarian hormones on food intake and body weight in female rats. J Comp Physiol Psychol. 1975 Jan;88(1):183-93.

Wang F, Ma X, Hao Y, Yang R, Ni J, Xiao Y, et al. Serum glycated albumin is inversely influenced by fat mass and visceral adipose tissue in Chinese with normal glucose tolerance. PLoS One. 2012;7(11):e51098.

Wang JM, Hou X, Adeosun S, Hill R, Henry S, Paul I, et al. A dominant negative ERβ splice variant determines the effectiveness of early or late estrogen therapy after ovariectomy in rats. PLoS One. 2012;7(3):e33493.

Wang Y, Li B, Zhang W, Liu Y, Xue P, Ma J, et al. Impaired PI3 K Akt expression in liver and skeletal muscle of ovariectomized rats. Endocrine. 2013 Dec;44(3):659-65.

Weindruch R, McFeeters G, Walford RL. Food intake reduction and immunologic alterations in mice fed dehydroepiandrosterone. Exp Gerontol. 1984;19(5):297-304.

Weiss EP, Villareal DT, Fontana L, Han DH, Holloszy JO. Dehydroepiandrosterone (DHEA) replacement decreases insulin resistance and lowers inflammatory cytokines in aging humans. Aging (Albany NY). 2011 May;3(5):533-42.

World Helath Organization (WHO). Obesity and overweight. Fact Sheet 311. [acesso em: 2014 jun. 10]. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/.

World Helath Organization (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000;894:i-xii, 1-253.

Wiernsperger N. Hepatic function and the cardiometabolic syndrome. Diabetes Metab Syndr Obes. 2013 Oct 10;6:379-388.

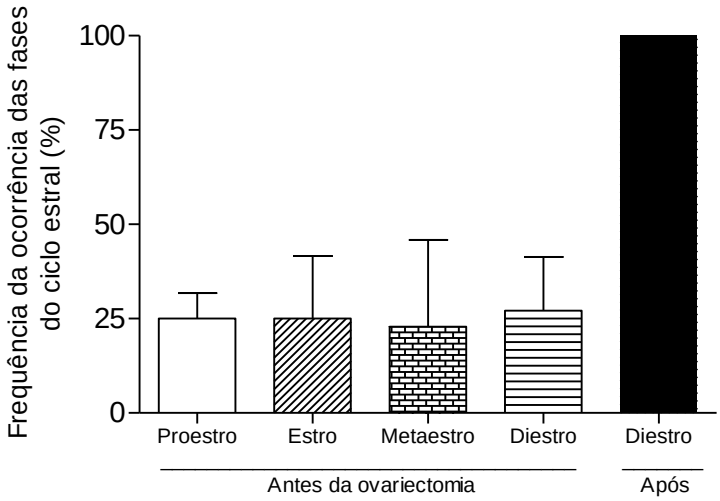
Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care. 2004 May;27(5):1047-53.

Wolf OT, Kirschbaum C. Actions of dehydroepiandrosterone and its sulfate in the central nervous system: effects on cognition and emotion in animals and humans. Brain Res Brain Res Rev. 1999 Nov;30(3):264-88.

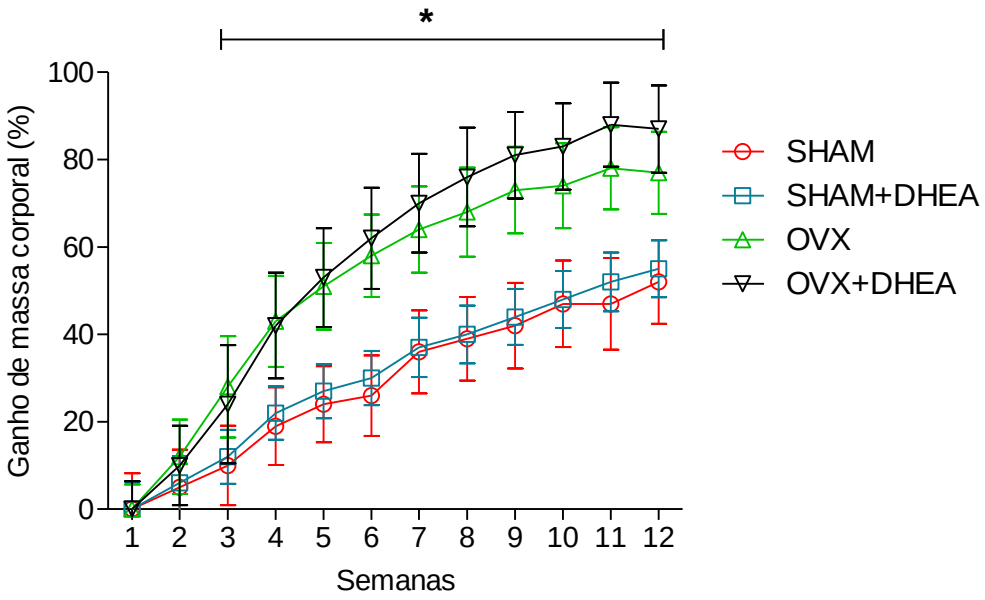
Zhu L, Martinez MN, Emfinger CH, Palmisano BT, Stafford JM. Estrogen signaling prevents diet-induced hepatic insulin resistance in male mice with obesity. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2014 May 15;306(10):E1188-97.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Representação gráfica do percentual (%) da frequência de ocorrência de cada fase do ciclo estral antes e após a ooforectomia ao longo de 4 dias



APÊNDICE B – Percentual (%) de ganho de peso dos animais durante o período experimental

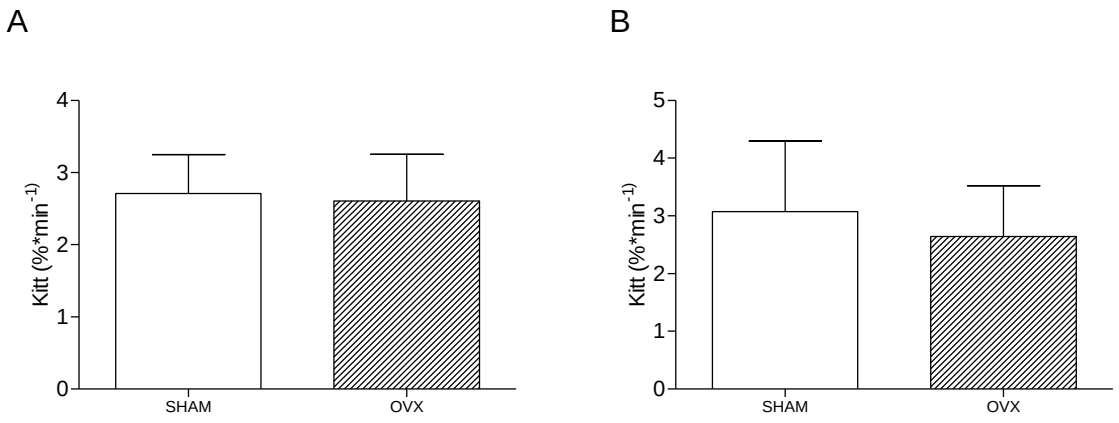


APÊNDICE C – Efeito da ovariectomia bilateral sobre a média do consumo de alimento, ingestão hídrica e calórica e percentual de preferência pela ração hipercalórica/hiperlipídica 5 e 9 semanas após a castração

	5ª semana		9ª semana		Interação
	SHAM	OVX	SHAM	OVX	
Consumo de alimento (g/dia)	12,1±1,8	14,0±2,6	13,2±2,2	13,1±2,1	NS
Ingestão energética (kcal/dia)	64,9±9,5	74,7±14,0	70,5±11,6	70,1±11,2	NS
Preferência pela ração (%)	34,7±5,1	39,9±7,5	37,6±6,2	37,5±6,0	NS
Ingestão hídrica (mL/dia)	23,5±6,1	25,5±7,5	27,0±8,7	21,1±5,4	p=0,0475

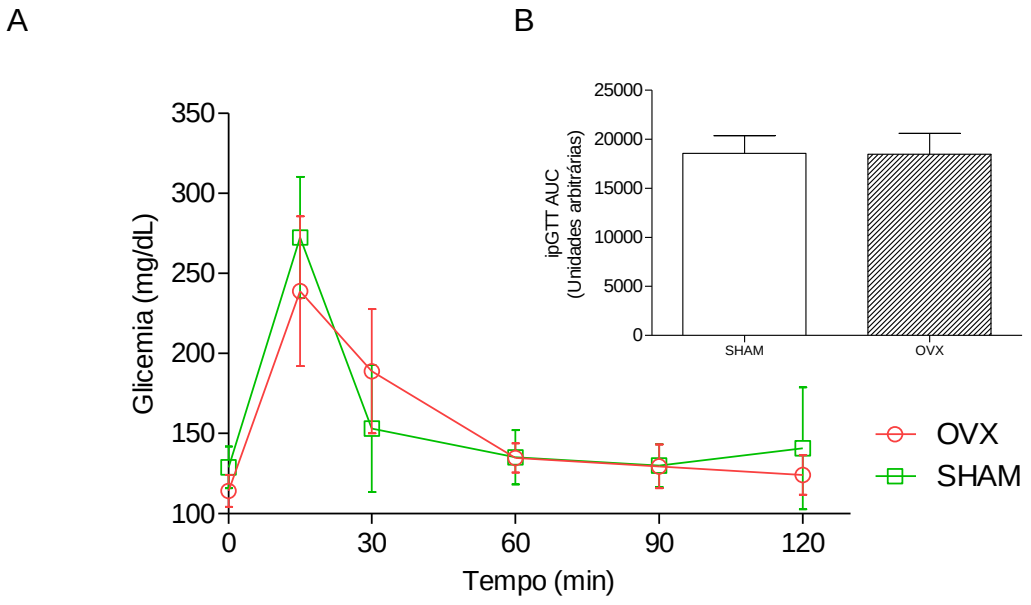
Nota: Os dados foram representados pela média ± DPM. O tamanho amostral variou entre 10 e 20 animais. 2Way ANOVA, Bonferroni.
Abreviaturas:
NS: estatisticamente não significativo
Ingestão energética = média do consumo de ração x energia metabolizável da dieta
Percentual de preferência (%) = (quantidade ingerida da dieta x 100) / 40 g da dieta ofertada

APÊNDICE D – Constante de desaparecimento da glicose (K_{ITT}) mensurado nas ratas após 5 e 9 semanas de ooforectomia



Após restrição alimentar de 6 h, os animais acordados receberam uma carga de insulina ip (0,75U/kg de peso corporal). A glicose foi determinada por meio de glicosímetro em amostras de sangue retiradas da cauda nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a administração de insulina. (A) K_{ITT} correspondente a 5ª semana e (B) 9ª semana após a ooforectomia. As barras representam a média ± DPM, n=9-16. Teste t de Student.

APÊNDICE E – Teste de tolerância à glicose (ipGTT) de animais após 9 semanas de castração



Após restrição alimentar de 6 h, os animais acordados receberam uma solução de glicose 20% (2,0 g/kg de peso corporal) na cavidade intraperitoneal. A glicose foi determinada por meio de glicosímetro em amostras de sangue retiradas da cauda nos tempos 0 (basal), 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da carga de glicose. (A) Curva glicemia e (B) análise da área total sob a curva (AUC) da glicemia gerada após o teste. As barras representam a média ± DPM, n=15. Teste t de Student.

APÊNDICE F – Expressão proteica e grau de fosforilação de proteínas envolvidas nas etapas intracelulares iniciais da ação insulínica no fígado de ratas tratadas com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia normalizadas com Ponceau

	SHAM	SHAM+DHEA	OVX	OVX+DHEA
IRβ	0,53±0,20	0,44±0,09	0,51±0,14	0,56±0,23
IRS1	0,25±0,16	0,24±0,18	0,49±0,15	0,49±0,18
PI3K	0,49±0,17	0,42±0,12	0,57±0,14	0,51±0,18
AKT1/2/3	0,55±0,21	0,39±0,12	0,39±0,05	0,31±0,08
p^{Ser307}IRS1	0,71±0,12	0,64±0,08	1,22±0,32	1,51±0,32

	SHAM		SHAM+DHEA		OVX		OVX+DHEA	
Insulina	-	+	-	+	-	+	-	+
pp95	576±305	2083±446	586±208	1512±239	531±163	2235±406	454±117	1810±296
p^{Ser473}AKT	0,08±0,09	0,51±0,23	0,08±0,08	0,27±0,08	0,18±0,13	0,59±0,20	0,21±0,08	0,60±0,05

Nota: Valores absolutos das leituras das densitometrias ópticas já normalizadas por Ponceau e que foram transformados em percentagem (%) de Unidades Arbitrárias. Os dados foram expressos pela média ± DPM. N=6-8 e 3-4, para expressão proteica e para avaliação do grau de fosforilação, respectivamente.

APÊNDICE G – Expressão proteica e grau de fosforilação de proteínas envolvidas nas etapas intracelulares iniciais da ação insulínica no músculo gastrocnêmio de ratas tratadas com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia normalizadas com Ponceau

	SHAM	SHAM+DHEA	OVX	OVX+DHEA
IRβ	0,52±0,16	0,60±0,21	0,38±0,15	0,38±0,15
IRS1	0,38±0,13	0,35±0,13	0,29±0,14	0,23±0,12
PI3K	0,56±0,16	0,58±0,07	0,59±0,06	0,64±0,16
AKT1/2/3	0,50±0,15	0,50±0,09	0,44±0,12	0,39±0,13
p^{Ser307}-IRS1	1,18±0,35	0,95±0,56	1,30±0,63	1,17±0,25

	SHAM		SHAM+DHEA		OVX		OVX+DHEA	
Insulina	-	+	-	+	-	+	-	+
pp95	1391±180	2203±176	1232±131	2062±124	1179±260	1895±319	624±26	1233±135
pp185	1061±418	1994±193	842±241	1737±198	632±475	1049±281	688±156	910±448
p^{Ser473}AKT	0,25±0,18	0,60±0,12	0,23±0,05	0,55±0,19	0,24±0,12	0,51±0,12	0,16±0,05	0,47±0,04

Nota: Valores absolutos das leituras das densitometrias ópticas já normalizadas por Ponceau e que foram transformados em percentagem (%) de Unidades Arbitrárias. Os dados foram expressos pela média ± DPM. N=6-8 e 3-4, para expressão proteica e para avaliação do grau de fosforilação, respectivamente.

APÊNDICE H – Expressão proteica e grau de fosforilação de proteínas envolvidas nas etapas intracelulares iniciais da ação insulínica no coração de ratas tratadas com veículo ou DHEA após 12 semanas de ooforectomia normalizadas com Ponceau

	SHAM	SHAM+DHEA	OVX	OVX+DHEA
IRβ	0,45±0,17	0,48±0,05	0,50±0,10	0,57±0,11
IRS1	0,54±0,15	0,37±0,20	0,31±0,15	0,31±0,21
PI3K	0,70±0,09	0,56±0,16	0,47±0,16	0,55±0,16
AKT1/2/3	0,46±0,11	0,45±0,18	0,42±0,14	0,44±0,17
SERCA2	0,39±0,23	0,30±0,14	0,34±0,13	0,28±0,07
p^{Ser307}IRS1	1,38±0,43	1,76±0,55	1,64±0,66	0,76±0,20

	SHAM		SHAM+DHEA		OVX		OVX+DHEA	
Insulina	-	+	-	+	-	+	-	+
pp95	760±83	1970±241	703±8	1674±694	934±152	1589±353	678±308	1566±282
pp185	595±70	2199±196	865±468	625±98	671±315	942±410	458±261	882±182
p^{Ser473}AKT	0,15±0,09	0,67±0,15	0,19±0,04	0,45±0,08	0,12±0,05	0,56±0,08	0,11±0,05	0,62±0,09

Nota: Valores absolutos das leituras das densitometrias ópticas já normalizadas por Ponceau e que foram transformados em percentagem (%) de Unidades Arbitrárias. Os dados foram expressos pela média ± DPM. N=6-8 e 3-4, para expressão proteica e para avaliação do grau de fosforilação, respectivamente.

APÊNDICE I - Tabela geral dos resultados obtidos

Variáveis	Castração	DHEA	Variáveis	Castração	DHEA
Peso corporal	↑	-	IRβ fígado	-	-
IMC e Índice de Lee	↑	-	IRβ músculo	↓	-
Naso-anal final	↑	-	IRβ coração	-	-
Consumo alimentar	↑	↑	IRS1 fígado	↑	-
Ingestão energética	↑	↑	IRS1 músculo	↓	-
Eficiência alimentar	↑	-	IRS1 coração	↓	-
% pref. pela ração	↑	↑	PI3K fígado	-	-
Ingestão hídrica	↓	↓	PI3K músculo	-	-
K_{ITT}	↓	↓	PI3K coração	↓	-
ipGTT	↓	-	AKT1/2/3 fígado	↓	↓
TA SC, PG e RP	↑	-	AKT1/2/3 músculo	-	-
Coração	-	-	AKT1/2/3 coração	-	-
Rins	-	-	SERCA2 coração	-	-
Útero	↓	-	pp95 fígado	-	↓
DHEA	↓	↑	pp95 músculo	-	-
Estradiol	↓	↑	pp95 coração	-	-
Insulina	-	-	pp185 músculo	↓	-
Glicemia	-	-	pp185 coração	↓	-
CT, HDL-c e LDL-c	-	-	p-IRS1 (Ser307) fígado	↑	-
VLDL-c	↓	-	p-IRS1 (Ser307) músculo	-	-
TAG	↓	-	p-IRS1 (Ser307) coração	-	-
Proteínas totais	-	-	p-AKT (Ser473) fígado	↑	-
Albumina	↓	-	p-AKT (Ser473) músculo	-	-
Uréia	↓	-	p-AKT (Ser473) coração	-	-
Creatinina	↓	↓			
ALT	-	-			
AST	-	-			

Nota: Os símbolos utilizados na tabela estão descritos abaixo.
(↑) – houve aumento; (↓) – houve redução; (-) – não modificou.

Abreviaturas:
IMC: índice de massa corporal
% pref. pela ração: percentual de preferência pela ração
K_{ITT}: constante de desaparecimento da glicose
ipGTT: teste de tolerância à glicose
TA SC, PG e RP: tecido adiposo subcutâneo, periuterino e retroperitoneal
DHEA: deidroepiandrosterona
CT: colesterol total
HDL-c: colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade)

LDL-c: colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade)
VLDL-c: colesterol VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade)
TAG: triacilglicerol
ALT: alanina aminotransferase
AST: aspartato aminotransferase
IRβ: subunidade β do receptor de insulina
IRS1: substrato 1 do receptor de insulina
IRS2: substrato 2 do receptor de insulina
PI3K: fosfatidilinositol 3-cinase
AKT1/2/3: proteína cinase B isoformas 1, 2 e 3
SERCA2: cálcio ATPase do retrículo endoplasmático isoforma 2
pp95: proteínas fosforiladas na região de 95 kDa
pp185: proteínas fosforiladas na região de 185 kDa
p-IRS1 (Ser307): fosforilação do IRS1 no resíduo serina 307
p-AKT (Ser473): fosforilação da AKT no resíduo serina 473