Gabriela Virginia Moreira

Dieta hiperlipídica e envelhecimento modificam a sensibilidade à insulina e a expressão das proteinas relacionadas à via intracelular da insulina em hipotálamo de camundongos fêmeas

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciência Biomédicas – Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO
2011

Gabriela Virginia Moreira

Dieta hiperlipídica e envelhecimento modificam a sensibilidade à insulina e a expressão das proteinas relacionadas à via intracelular da insulina em hipotálamo de camundongos fêmeas

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciência Biomédicas – Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana.
Orientadora: Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

Versão corrigida. Versão original encontra-se no Setor de Comunicação do ICB.

SÃO PAULO
2011

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

© reprodução total

Moreira, Gabriela Virginia.
Dieta hiperlipídica e envelhecimento modificam a sensibilidade à insulina e a expressão das proteínas relacionadas à via intracelular da insulina em hipotálamo de camundongos fêmea / Gabriela Virginia Moreira. -- São Paulo, 2011.

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: Investigação da regulação da transmissão de sinal da insulina em tecidos alvo.

Versão do título para o inglês: High-fat diet and aging impair insulin sensibility and intracellular insulin signaling proteins in hypothalamus of female mice

Descritores: 1. Receptor de insulina 2. Substrato dos receptores de insulina 3. P13K/AKT1 4. Hipotálamo 5. Músculo esquelético 6. Obesidade 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/SBIB0219/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gabriela Virginia Moreira.

Título da Dissertação: Dieta hiperlipídica e envelhecimento modificam a sensibilidade à insulina e a expressão das proteínas relacionadas à via intracelular da insulina em hipotálamo de camundongos fêmea.

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 ...../...../.....,

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

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

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

Presidente: Assinatura: .....
Nome completo: .....
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 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **119** nas fls. **75** 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 dieta hiperlipidica sobre a expressão das proteínas relaciondas a via intracelular da insulina em hipotálamo de camundongos fêmea nas fases de diestro e proestro** do qual participou(aram) o(s) alunos **Gabriela Virginia Moreira,** 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 EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **25.08.09,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 26 de agosto de 2009.

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

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA – ICB/USP

A Deus por sempre guiar e proteger meus caminhos. Aos meus pais, Rita e Carlos, que sempre aconselharam e apoiaram minhas escolhas pessoais e profissionais. A atenção que vocês me dão é incorporada como força para conquistar cada sonho. Obrigada.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários das secretarias do departamento e do programa de pós-graduação e aos técnicos do biotério e dos laboratórios do Departamento de Fisiologia e Biofísica, por toda a assistência e pela convivência.

À minha família (pais, irmão, padrasto, namorado, avós e amigos), que mesmo não entendendo muito bem o que faço, sempre me apoiaram e incentivaram a buscar meus sonhos e desejos. O apoio e carinho de vocês são essenciais em minha vida. Amo vocês.

Aos grandes amigos e colegas de trabalho que pude encontrar no laboratório. Especialmente a Teca, Felipe, Karina, Mario e João Paulo pela ajuda experimental, intelectual e muitas vezes pessoal. Obrigada pela amizade e dedicação!

Ao laboratório do Profº Drº Angelo Rafael Carpinelli, pelo auxílio técnico com as dosagens de insulina.

A minha orientadora Carla R. O. Carvalho, por acreditar em meu potencial e capacidade. Não saberia como agradecer toda a compreensão nos momentos de dificuldades técnicas, por toda a assistência cientifica pelo seu exemplo de dedicação, caráter e amabilidade.

A CAPES e FAPESP por acreditar e apoiar financeiramente o trabalho.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

MOREIRA, G.V. **Dieta hiperlipídica e envelhecimento modificam a sensibilidade à insulina e a expressão das proteinas relacionadas à via intracelular da insulina em hipotálamo de camundongos fêmeas.** 2011, 58 f Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Apesar da freqüente associação entre hiperinsulinemia e anormalidades no sistema reprodutor feminino, o mecanismo celular que liga a ação da insulina a alterações ovarianas ainda não é completamente conhecido. Utilizamos camundongos fêmeas da linhagem C57Bl6 em duas condições: envelhecimento (10 meses) e obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DHL). Os controles foram camundongos de 4 meses de idade alimentados com ração padrão. Nos animais com 10 meses de idade foi evidenciado maior acúmulo de tecido adiposo subcutâneo e retroperitonial, enquanto no grupo DHL houve aumento dos três depósitos gordurosos subcutâneo, retroperitoneal e perigonadal. Ambos os grupos apresentaram redução da sensibilidade à insulina e intolerância à glicose. Os animais alimentados com a DHL apresentaram reduzido número de corpos lúteos em comparação aos controles, precedido de alteração do padrão estral com aumento na frequência de detecção da fase de diestro e diminuição de proestro. Essas modificações foram acompanhadas de aumento da expressão das proteínas IR e PI3K no hipotálamo e de PI3K, AKT1 e citocina IL-6 em músculo gastrocnêmio. Por outro lado, nos animais com 10 meses de idade foi detectada redução na expressão do IR e de TNFα em hipotálamo, sem modificações das proteínas estudadas no tecido muscular estudado. Os dados obtidos nos permitem confirmar que o envelhecer e a alimentação hiperlipídica e hipercalórica em fêmeas cursam com redução da sensibilidade à insulina, intolerância à glicose e apresentam uma regulação tecido específica da expressão do receptor de insulina e da via PI3K/AKT. A redução da expressão do IR e da PI3K hipotalâmicas nos animais com obesidade induzida pela DHL pode contribuir para o mecanismo celular da redução do potencial de fertilidade desses animais.

Palavras-chave: Receptor de insulina. Substratos do receptor de insulina. PI3K/AKT1. Hipotálamo. Músculo gastrocnêmio. Obesidade.

ABSTRACT

MOREIRA, G.V. **High-fat diet and aging impair insulin sensibility and intracellular insulin signaling proteins in hypothalamus of female mice.** 2011. 58 p. Dissertation (Master Degree in Human Physiology) Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2012.

Despite the frequent association between hyperinsulinemia and abnormalities of female reproductive system, the cellular mechanism that links insulin to ovarian changes is not fully understood. Female C57Bl6 mice were analyzed under two conditions: aging and diet induced obesity (DIO). The control group was 4mo mice fed a rodent chow. The10mo mice had higher adipose depots in subcutaneous and retroperitoneal, while the DIO mice had increased adipose depots also in the periovarian fat pad. Both experimental groups had impaired insulin sensitivity and glucose intolerance. The DIO female mice had impaired estrous cycles followed by reduced detectable corpora lutea. These changes were accompanied by enhanced protein expression of insulin receptor and PI3K in the hypothalamus and PI3K/AKT and IL6 in the skeletal muscle. Furthermore, the aged 10mo mice had reduced protein expression of IR and TNFα in the hypothalamus, and no detectable change in the skeletal muscle. These data confirm that female aging and DIO mice develop insulin resistance, glucose intolerance, and a tissue specific regulation of IR and PI3K/AKT protein levels. The reduced hypothalamic IR and PI3K protein levels may play a role in the cellular mechanism of reduced fertile potential in the DIO female mice.

Key words: Insulin receptor. IRS. PI3K/AKT1. Hypothalamus. Skeletal muscle. Obesity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação das vias de sinalização da insulina. 15

Figura 2: Curva de variação hormonal de ratas durante as fases do ciclo estral. 19

Figura 3: Esfregaço vaginal de ratas Wistar para determinação da fase do ciclo estral..... 19

Figura 4: Evolução ponderal dos camundongos com 4m controles e DHL..... 28

Figura 5: Análise do ciclo estral: freqüência das três fases do ciclo estral 30

Figura 6: Análise do ciclo estral antes e após estimulo olfatório com urina de machos C57BL6..... 31

Figura 7: Contagem de corpos lúteos 32

Figura 8: Concentração de insulina sérica. 32

Figura 9: Teste de tolerância à glicose..... 33

Figura 10: Índice de decaimento da glicose..... 34

Figura 11: Efeito da DHL sobre a expressão proteica de IR, IRS-1, IRS-2, PI3K e AKT-1 em hipotálamo de camundongos fêmeas C57Bl6. 35

Figura 12: Efeito da DHL sobre a expressão proteica de IR, IRS-1, IRS-2, PI3K e AKT-1 em músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeas C57Bl6. 36

Figura 13: Efeito da DHL sobre a expressão proteica das citocinas pró-inflamatórias TNFα e IL-6 em hipotálamo e músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeas C57Bl6 37

Figura 14: Efeito da idade sobre a expressão proteica de IR, IRS-1, IRS-2, PI3K e AKT1 em hipotálamo de animais com 4m e 10m de vida..... 39

Figura 15: Efeito da idade sobre a expressão proteica de IR, IRS-1, IRS-2, PI3K e AKT1 em músculo gastrocnêmico de animais com 4m e 10m de vida. 40

Figura 16: Expressão protéica das citocinas pró-inflamatórias TNFα e IL-6 em músculo gastrocnêmio e hipotálamo de animais com 4 e 10 meses de vida. 41

Tabela 1: Peso inicial, Peso final, Comprimento Naso-anal, Índice de Massa Corpórea (IMC), Gorduras Retroperitonial (RP), Subcutânea (SUB) e Perigonadal (PG).....29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **13**

2 OBJETIVO **21**

3 MATERIAIS E MÉTODOS **22**

3.1 Materiais 22

3.2 Animais 22

3.3 Ciclo estral e Contagem de corpos lúteos 23

3.4 Insulinemia 24

3.5 Testes de tolerância à insulina curto e de teste de tolerância à glicose 24

3.6 Extração dos tecidos e eletroforese em gel de SDS 25

3.7 “Immunoblotting” 25

3.8 Análise estatística 26

4 RESULTADOS **28**

4.1 Parâmetros zoométricos 28

4.2 Caracterização do ciclo estral e Contagem do número de corpos lúteos 30

4.3 Insulinemia 32

4.4 Testes de tolerância à glicose e constante de decaimento de glicose 33

4.5 Expressões das proteínas IR, IRS-1, IRS-2, PI3K e AKT-1 e interleucinas IL6 e TNFα em hipotálamos e músculos gastrocnêmios de camundongos fêmeas alimentados com dieta hiperlipídica (DHL) 34

4.6 Expressões das proteínas IR, IRS-1, IRS-2, PI3K e AKT-1 e interleucinas IL6 e TNFα em hipotálamos e músculos de gastrocnêmio de camundongos fêmeas com 10 meses de idade (10m). 38

5 DISCUSSÃO **42**

6 CONCLUSÃO **50**

REFERÊNCIAS* **51**

ANEXO 1 expressão proteica nas fases de estro e diestro ..... **57[57]**

1 INTRODUÇÃO

A insulina é o hormônio mais importante para a manutenção da homeostase glicídica na condição pós-alimentar. Atua principalmente em três tecidos para esse fim: adiposo, músculo esquelético e hepático. Sua principal ação metabólica pode ser resumida como pró-anabólica e anti-catabólica ou seja, promove a captação de glicose, a glicogênese, a lipogênese e a síntese proteica em praticamente todas as células e inibe a produção hepática de glicose, cetogênese e a lipólise (ZECCHIN et al., 2004). A sua ausência torna a vida inviável devido ao imenso transtorno no pH sanguíneo e consequentemente do meio interno, devido a geração de ácidos metabólicos desproporcional a capacidade de tamponamento dos mesmos.

A sinalização intracelular da insulina inicia-se com sua ligação a um receptor de membrana (IR) especifico com atividade tirosina quinase, que é formado por duas subunidades α e duas subunidades β, sendo a subunidade α extracelular contendo o sitio de ligação da insulina e a subunidade β uma proteína transmembrana responsável pela transmissão do sinal. A ligação do hormônio à subunidade α resulta em ativação da capacidade quinase, autofosforilação da subunidade β e fosforilação dos substratos à substratos intracelulares específicos. Enquanto a fosforilação em resíduos de tirosina (Tyr) ativa o receptor, a fosforilação em resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr) o inativa (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; PATTI; KAHN, 1998).

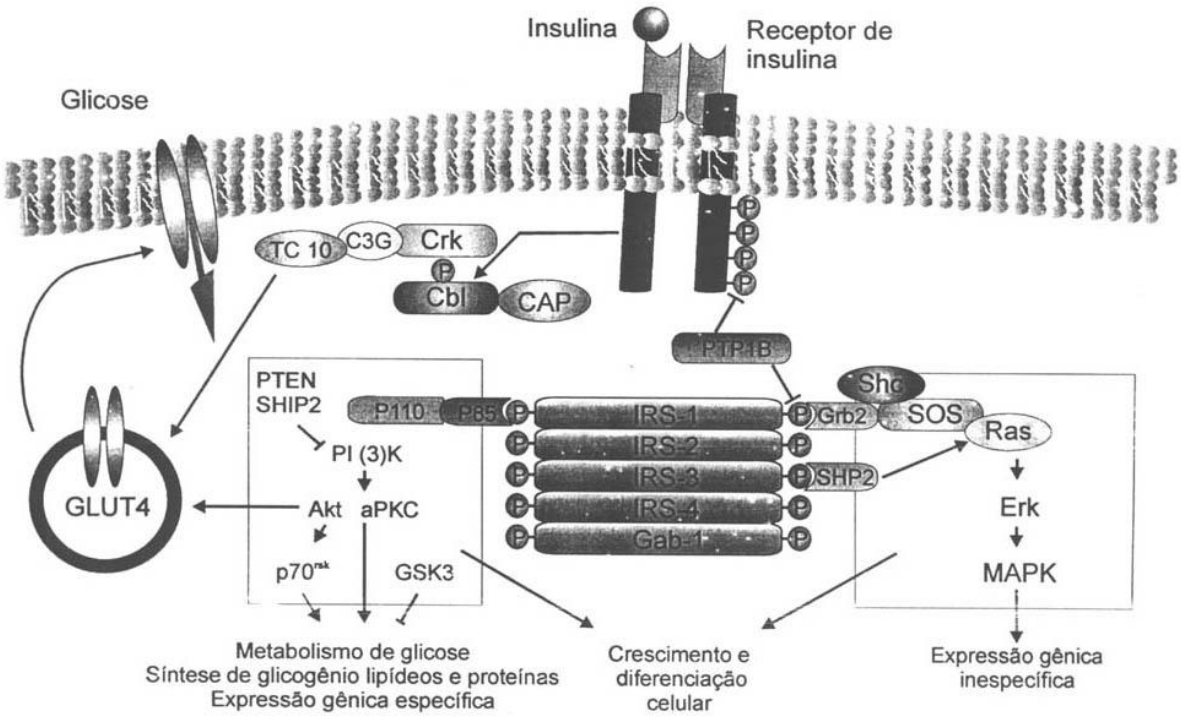
Os receptores de insulina foram identificados em inúmeros tipos celulares de mamíferos, variando suas concentrações desde 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 em células adiposas e hepáticas (WHITE; KAHN, 1994). Assim, além dos três tecidos alvos clássicos para as ações da insulina há vários outros como, por exemplo: SNC/hipotálamo, ovários, ossos e hemácias.

O primeiro substrato endógeno identificado foi o IRS-1 (substrato 1 do receptor de insulina). A fosforilação em resíduos tirosina das proteínas IRS permitem a associação dessas com outras proteínas que contém os denominados domínios com homologia a proteína Src, SH2 e SH3, tais como a subunidade regulatória de 85KDa da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-K) e a fosfatase fosfotirosina (SHP2) (CHEATHAM; KAHN, 1995; SALTIEL; KAHN, 2001). Para alguns autores, os substratos IRS-1, IRS-2, IRS-3 e IRS-4, são os mais específicos da via de sinalização da insulina. Entretanto, há evidências que as diferentes isoformas de IRS apresentam especificidade em diferentes tecidos (VIRKAMAKI; UEKI;

KAHN, 1999; UENO et al., 2000). No hipotálamo, os IRS-1, IRS-2 e IRS-4 são substratos encontrados em diversos núcleos (CARVALHEIRA et al., 2003; NUMAN; RUSSELL, 1999; PARDINI et al., 2006). Camundongos *knouckout* para IRS-1 e IRS-2 apresentam resistência à insulina; porém o primeiro modelo mostra retardo no crescimento na vida intra-uterina e pós-natal (TAMEMOTO et al., 1994) enquanto que o segundo modelo apresenta retardo do crescimento de somente alguns órgãos como o cérebro, retina e na massa total de ilhotas pancreáticas β levando ao desenvolvimento do diabetes tipo 2 (WHITERS et al., 1998).

Após ativação do IR, subsequente fosforilação dos IRS e associação a subunidade p85 da PI3-K, ocorre a ativação da subunidade catalítica (p110) (FOLLI et al., 1992). A subsequente ativação da PI3-K medeia várias, senão todas as ações metabólicas, da insulina inclusive na regulação da glicogênese e da ingestão alimentar (CARVALHEIRA et al., 2003; CHEATHAM; KAHN, 1995; SARDINHA et al., 2006; VELLOSO; ARAÚJO; DE SOUZA, 2008). O compartimento de ação intracelular da PI3-K é peri membrana citoplasmática. Nesse local a PI3-K ativada fosforila o anel inositol dos fosfatidil inositóis de membrana na posição D-3. Disso resulta especialmente o 3, 4, 5 fosfatidil inositol trifosfato, PIP_3. O PIP_3 se liga a domínios *plekcstrin* (PH) de proteínas intracelulares ativando-as, as denominadas cinases dependentes de fosfoinositóis (PDKs). As PDK1 e 2 ativam a proteína cinase B (PKB) ou Akt e as isoformas atípicas da PKC (ζ e λ) (CHEATHAM; KAHN, 1995; KHAN; PESSIN, 2002). A partir da ativação da Akt/PKB a via de sinalização pode seguir diversos caminhos por meio da fosforilação de outras cinases. Proteínas localizadas a jusante à Akt são: o fator transcricional FOXO; a fosfodiesterase 3B (PDE3B) que atua inibindo a lipólise; a cinase do glicogênio sintase (GSK3) que estimula a glicogênese; a mTOR (*mammalian target of rapamycin*) que regula a síntese protéica e a cinase de fosfoinositídeos, PIK que participa da reorganização do citoesqueleto e com isso interfere na captação de glicose (TANIGUSHI; EMANNUELLI; KAHN, 2006; SHEPHERD, 2005) (Figura 1).

Figura 1: Representação das vias de sinalização da insulina.



FONTE: Modificado de CARVALHEIRA et al., 2002.

Ação da insulina desde a ligação da insulina ao seu receptor de membrana (IR), os fenômenos bioquímicos relacionados à atividade tirosina-quinase do receptor e os efeitos biológicos finais de cada via.

A resistência à insulina é uma condição em que concentrações fisiológicas de insulina não são suficientes para induzir o efeito metabólico sobre a homeostase glicidica. Como consequência pode haver hiperinsulinemia compensatória até hiperglicemia franca (CESARETTI; KOHLMANN JUNIOR, 2006).

Apesar da existência de condições fisiológicas e condições associadas a doenças que apresentam resistência à insulina e aumentam a chance de desenvolvimento de diabete melito (DM) tipo 2, os mecanismos celulares relacionados a gênese da resistência à insulina e hiperinsulinemia ainda não foram totalmente elucidados. Destacam-se duas situações: o envelhecimento e a obesidade.

O tecido adiposo tem um papel central na secreção de inúmeros mediadores químicos que modulam o apetite, a ação da insulina e mesmo respostas inflamatórias. Dentre estes mediadores estão os ácidos graxos livres e as adipocinas, como leptina, adiponectina,

resistina, vistadina e citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e a interleucina 6 (IL-6) (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006).

Com o desenvolvimento da obesidade, ocorre aumento dos ácidos graxos livres provenientes da lipólise dos adipócitos e o desenvolvimento de um estado inflamatório no tecido adiposo (GUILHERME et al., 2008; HABER et al., 2001). A ineficiência do tecido adiposo em metabolizar os ácidos graxos livres em excesso faz com que estes compostos sejam estocados nos músculos esqueléticos e no fígado, induzindo a presença de gordura ectópica nesses tecidos/órgãos. Esses, em desequilíbrio de metabólitos de ácidos graxos, passam a liberar diacilglicerol, acetil-CoA e ceramidas que podem ativar cascatas de quinases envolvidas com a fosforilação em resíduos serina do IRS-1, que por sua vez reduz a subsequente ativação da PI3-K, resultando em interferência no transporte de glicose e gerando a resistência à insulina (ZECCHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004). Além disso, a ativação de vias intracelulares relacionadas às citocinas TNF-α e IL-1β, em células musculares, hepáticas e no tecido adiposo culminam com a modulação negativa da via de sinalização da insulina (BASTARD et al., 2006; HOTAMISLIGIL, 2003).

Com o envelhecimento há desenvolvimento de resistência à insulina associado a aumento da adiposidade e das citocinas (TNF-α, IL-1β e IL-6) circulantes (BRUUNSGAARD; PEDERSEN, M.; PEDERSEN, B. K., 2001). Através de tomografia computadorizada foi demonstrado que após os 30 anos de idade há gradual diminuição da densidade muscular e aumento gordura intramuscular; e esta condição é mais acentuada em mulheres do que em homens (EVANS, 1997).

Outra condição que apresenta associação com resistência a insulina é a SOPC (síndrome dos ovários policísticos), um distúrbio endócrino feminino que afeta 5 a 10% das mulheres em idade fértil (FRANKS, 1995). As manifestações endócrinas desta síndrome incluem produção aumentada de hormônios androgênicos pelos ovários e adrenais, aumento dos níveis de hormônio luteinizante (LH), anovulação com oligomenorréia, presença de cistos ovarianos, obesidade e infertilidade (KANDARAKI, E.; CRISTAKOU; KANDARAKI,E.D., 2009; XITA; TSATSOULIS, 2009).

Estudos têm demonstrado que a resistência á insulina está presente em mulheres com SOPC independente do peso corpóreo; porém mulheres obesas com SOPC apresentam uma carga adicional de resistência frente à adiposidade em excesso. Ademais, essas mulheres

obesas possuidoras do distúrbio têm um risco aumentado de 25 a 35% de desenvolverem diabetes tipo 2 ou intolerância a glicose até os 30 anos de idade (NESTLER, 1998).

A hiperinsulinemia compensatória causada pela resistência à insulina desempenha um papel patogênico na SOPC por ser capaz de estimular a produção ovariana de testosterona, reduzir os níveis circulantes de SHBG (globulina transportadora de hormônios sexuais) e inibir a ovulação (PANIDIS et al., 1999; LEGRO et al., 2005). Há evidências experimentais demonstrando que a hiperinsulinemia induzida por doses crescentes de insulina associada ou não à gonadotrofina coriônica (hCG) produz o aparecimento de cistos ovarianos e aumento de esteróides gonadais em ratas não prenhes (PORETSKY; CLEMONS; BOGOVICH, 1992) e com modificação estrutural das células foliculares (AKAMINE et al., 2010); em células isoladas potencializa a esteroidogênese (SHORES et al., 2000), chegando a concentrações similares às encontradas em casos de SOPC (GREISOEN; LEDET; OVESEN, 2001). Quando os níveis plasmáticos de insulina são diminuídos por administração de fármacos como a metformina ou diazóxido, ocorre decaimento das concentrações de testosterona livre e conseqüente melhora da função ovariana (NESTLER, 1998).

Há várias evidências demonstrando que animais tratados com dieta hiperlipídica mimetizam achados clínicos de obesidade e resistência à insulina e apresentam a ativação de diversas serinas quinases que interferem com a fosforilação do IRS-1 em resíduos tirosina (DE SOUZA et al., 2005; VELLOSO; ARAÚJO; DE SOUZA, 2008).

A linhagem de camundongos C57BL6 também desenvolve fenótipo e características metabólicas que chegam a hiperinsulinemia e até a condição de DM quando alimentados com dieta hiperlipídica (GALLOU-KABANI et al., 2007). Estudos que envolvam o trato reprodutor feminino e a obesidade induzida por dieta hiperlipidica podem ser acompanhados por meio de técnicas de observação do ciclo estral e pelo tratamento com dieta hiperlipídica, já que os mecanismos endócrinos envolvidos no ciclo estral de roedores assemelham-se muito ao ciclo menstrual das mulheres.

Camundongos fêmeas são poliestrais, ou seja, apresentam ciclos regulares e sucessivos, que duram de quatro a cinco dias, são dependentes dos hormônios sexuais gonadais (LONG; EVANS, 1922) e são constituídos por quatro fases distintas denominadas de proestro, estro, metaestro ou diestro I e diestro ou diestro II.

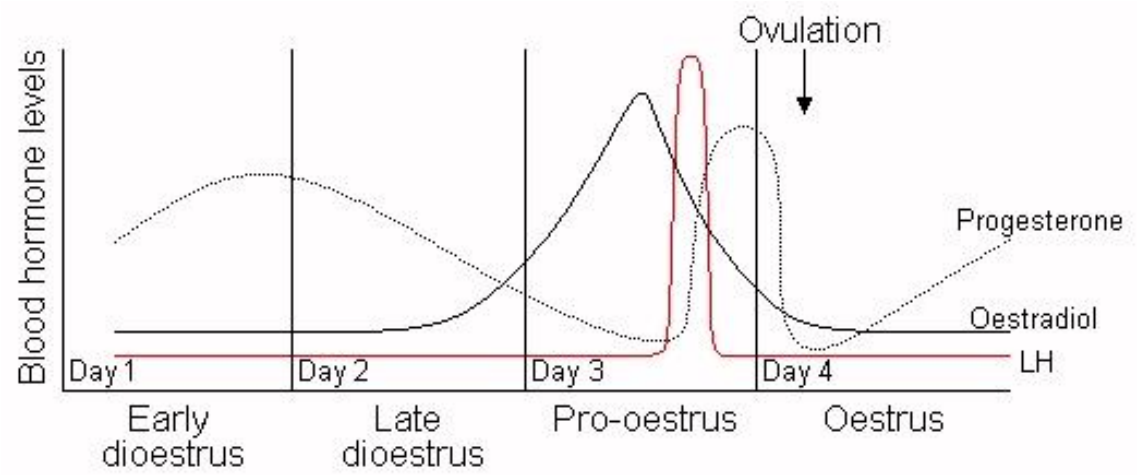
A primeira fase do ciclo estral é definida como proestro que apresenta elevadas concentrações sanguíneas de estrogênios e lavado vaginal contendo células epiteliais

nucleadas e algumas células cornificadas. Esta fase dura de 12 a 14 horas. É seguida por alteração no epitélio vaginal com células queratinizadas, caracterizando a fase de estro, cuja duração corresponde ao período de 25 a 27 horas. Nessa fase ocorre o pico de secreção de LH que precede a ovulação ao final. As fases seguintes são caracterizadas pela ação da progesterona. O metaestro pode ser diferenciado no lavado vaginal por conter leucócitos em abundância, vistos em grumos ou separados com presença de células nucleadas e cornificadas em menor quantidade que a observada na fase anterior. O metaestro dura de 6 a 8 horas. A última fase corresponde ao diestro e é a mais longa com duração de 55 a 57 horas. O diestro apresenta predominância de leucócitos, embora em menor quantidade do que a fase precedente, além de poucas células nucleadas e cornificadas (LONG; EVANS, 1922; MANDL, 1951; MEZIANE et al., 2007) (Figura 2 e 3).

A cada ciclo são recrutados em média 300 folículos, no entanto, somente 12 progridem seu desenvolvimento por serem os dominantes enquanto os demais seguem o rumo da degeneração ou atresia folicular. Nesta fase ocorre aumento progressivo dos níveis de estradiol. A ovulação só ocorrerá entre a noite do proestro e a manhã do estro, no período que compreende entre 21h00 e 03h00, precedido pelo pico de LH (KNOBIL; NEIL, 1994), (Figura 2). Após a ovulação as células foliculares remanescentes dos folículos rotos se transformam, aumentam a esteroidogênese de progesterona e são denominados corpos lúteos. Assim, a observação do corpo lúteo tem servido de ferramenta à confirmação do ciclo estral por até três ciclos anteriores consecutivos, uma vez que cada corpo lúteo pode demorar de 14 a 15 dias para degenerar completamente (LONG e EVANS, 1922; WESTWOOD, 2008 apud ANDREWS e OJEDA, 1981[1]).

[1] Apud ANDREWS,W. W.; OJEDA, S. R. A detailed analysis of the serum LH secretory profiles of conscious free-moving female rats during the time of puberty. **Endocrinology** v.109,p. 2032-2039, 1981.

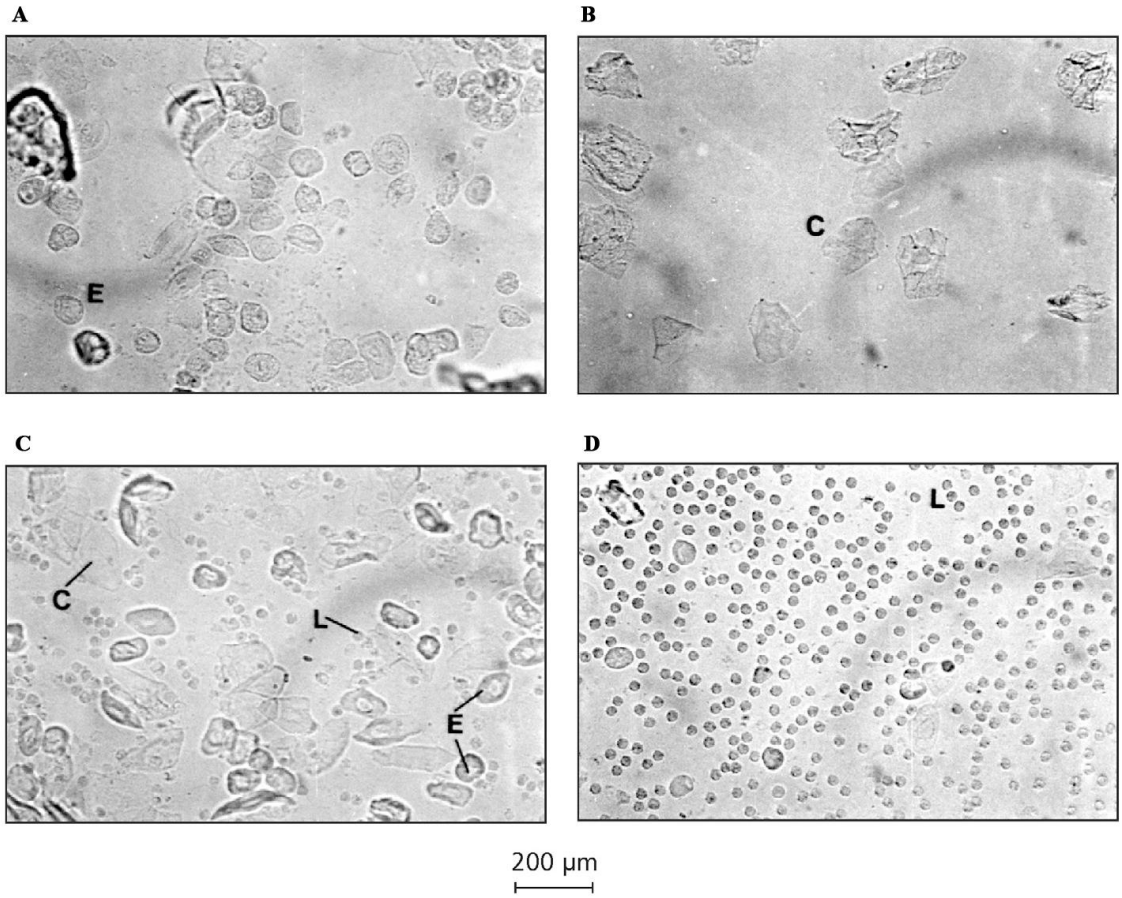
Figura 2: Curva de variação hormonal medida no plasma sanguíneo de ratas durante as fases do ciclo estral.



FONTE: Adaptado de PINTO, 2007.

Estão representados no gráfico as variações de progesterona, estradiol e LH.

Figura 3: Esfregaço vaginal de ratas Wistar para determinação da fase do ciclo estral.



FONTE: Adaptado de MARCONDES, 2002.

Fase de proestro (A), estro (B), metaestro (C) e diestro (D). Na figura estão marcadas as células encontradas nas diferentes fases: Leucócitos (L), Epiteliais (E) e Cornificadas (C). Os esfregaços

vaginais foram observados em microscópio comum, sem o uso da lente condensadora e objetiva de 40 x. A proporção dos três tipos de células foi utilizada para a determinação das fases do ciclo estral.

Estudos realizados em nosso laboratório com dieta hiperlipídica rica em gordura animal, por 4 e 6 meses induziu resistência à insulina com hiperinsulinemia e obesidade em ratas Wistar (AKAMINE et al., 2010). Essas ratas mantiveram um padrão cíclico estral semelhante às ratas controles, porém as ratas alimentadas com dieta hiperlipidica por 4 meses apresentaram aumento na fase de proestro em relação às controles. Ademais, apresentaram uma modificação no aspecto morfológico dos ovários com incremento na presença de folículos lúteos, redução na presença de folículos ovarianos císticos e presença de células do estroma com aspecto luteinizado. Essas modificações foram acompanhadas de concentrações séricas dos hormônios gonadais e das gonadotrofinas hipofisárias semelhantes entre ratas controles e resistentes durante o diestro. Além dessas alterações morfológicas, foram detectadas modificações em elementos da via intracelular da insulina no ovário e tecido adiposo das ratas. No ovário foi detectado redução da via IRS/PI3-K/AKT, incrementos do fator transcricional FOXO, da proteína JNK e das citocinas IL-1β e TNF-α. No tecido adiposo, de modo semelhante ao detectado no ovário houve redução da via IRS/PI3-K, com aumento das proteínas p70S6K e JNK e da citocina IL-1β.

Assim, considerando que o hipotálamo exerce um importante controle sobre a fertilidade dos mamíferos e que sua ação é regulada por fatores nutricionais, sazonais, etários e hormonais (DAFTARY; GORE, 2005; HILL; ELMQUIST; ELIAS, 2008), levantamos a hipótese de que em condições que apresentam resistência à insulina e obesidade como o envelhecimento natural e a imposição da dieta hiperlipídica deva haver regulação específica na expressão das proteínas envolvidas nas etapas iniciais da ação insulínica em hipotálamo de camundongos fêmeas.

2 OBJETIVO

Avaliar a presença de modulação na expressão das proteínas iniciais da via intracelular da ação insulínica em hipotálamo de camundongos fêmeas, obesas, alimentadas com dieta hiperlipídica e animais mais velhos. Para tanto foram avaliados:

a) Parâmetros zoométricos dos modelos experimentais;

b) Intolerância a glicose pelo teste de tolerância a glicose (GTT);

c) Constante de decaimento da glicose (K_{ITT}) para mensuração da sensibilidade à insulina;

d) Padrão do ciclo estral pela citologia vaginal e o número de folículos lúteos ovarianos;

e) Expressão proteica da subunidade β do IR, IRS-1, IRS-2, subunidade regulatória de 85kDa da PI 3-K e AKT-1 no hipotálamo e músculo gastrocnêmio das fêmeas;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os reagentes e os aparelhos utilizados para eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram da *Bio-Rad* (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina, ditiotreitol (DTT), albumina e poli-lisina foram fornecidos pela *Sigma Chemical Co.* (*St. Louis, MO*) e insulina regular pela Lilly. A insulina marcada (^{125}I), a membrana de nitrocelulose, e os kits para detecção por quimioluminescência foram fornecidos pela *Amersham (UK).* Os anticorpos anti-receptor de insulina subunidade B, anti-IRS-2, anti- Akt-1, anti-TNFα, foram da *Santa Cruz Biotechnology* (*Santa Cruz, CA*) e os anticorpos anti-p85 (PI3-K), anti- IRS-1 e anti-Akt-1 foram da *Upstate Biotechnology Inc.* (USA) e o anticorpo anti-IL-6 foi da Abcam® (Cambridge, USA).

3.2 Animais

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram mantidas em número máximo de 5 animais por gaiolas, em sala com temperatura controlada a 25 ± 2 ºC com acesso *ad libitum* a ração para roedores (Nuvilab®; Nuvital Nutrientes S/A, Brasil) e a água. Foram mantidas em fotoperíodo de 12hs de claro e 12hs de escuro (luzes são acessas as 6:00 a.m.). Em conformidade às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Protocolo n°119, fls.75 do livro 02). Os animais foram divididos em três grupos como se segue:

a) **Grupo 1**: fêmeas com 4 meses controles - (**4m**);

b) **Grupo 2**: fêmeas que foram alimentadas com dieta hiperlipídica por um período de 3 meses a partir da quarta semana de vida - (**DHL**);

c) **Grupo 3**: fêmeas com 10 meses de vida - (**10m**).

A dieta controle consistiu de ração comercial para roedores (Nuvilab® - CR-1), contendo 19% de proteína, 56% de carboidrato, 3,5% de lipídeos, 5% de celulose e 4,5% de vitaminas e minerais, fornecendo 3,2 kcal/Kg de ração. A composição da dieta hiperlipídica peletizada correspondeu a 20% de proteína (caseína), 36% de carboidrato, 34,5% de lipídeos, 5% de celulose e 4,5% de vitaminas e minerais, fornecendo 5,3 kcal/Kg de ração (Rhoster®, Araçoiaba da Serra, SP). Para os grupos 4m e DHL o peso corporal foi monitorado semanalmente. Ao final do período da dieta e ao completarem 10 meses de vida os animais anestesiados foram submetidos aos testes de tolerância à glicose e à insulina curto em dias diferentes. Para a coleta dos tecidos os animais foram submetidos à narcose com mistura de 70% de gás carbônico e 30% de oxigênio e em seguida decapitados.

Ao final do protocolo experimental, foi aferido o peso corporal (g) e o comprimento naso-anal (cm), utilizados para calcular o Índice de Massa Corporal (**IMC=g.cm^{-2}**). Os depósitos de tecido adiposo subcutâneo, retroperitoneal e perigonadal também foram pesados e apresentados como porcentagem em relação ao peso final.

3.3 Ciclo estral e Contagem de corpos lúteos

A coleta do lavado vaginal foi realizada todas as manhãs entre 8h30 e 9h30, com o auxilio de uma pipeta de 10 µl e solução fisiológica (NaCl 0,9%). O fluido vaginal coletado foi disposto sobre lâminas de vidro e o ciclo estral foi determinado por observação ao microscópio óptico com lente objetiva de 40x. A determinação da fase estral se deu pela identificação e proporção de células epiteliais, cornificadas e leucócitos encontradas (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). O exame celular dessa secreção permite diferenciar as fases do ciclo estral em proestro, estro, metaestro e diestro (FREEMAN, 1994).

Os ovários foram coletados inteiros, distribuídos sobre uma placa de Petri contendo solução fisiológica e observados imediatamente em lupa comum para contagem dos corpos lúteos e avaliação macroscópica de alterações morfológicas eventuais.

3.4 Insulinemia

As amostras de sangue foram coletadas pelo tronco do animal, centrifugadas a 1.000 rpm por 3 minutos a 4 ºC e estocados a -70 ºC. Em momento apropriado, foi feita a determinação dos níveis séricos de insulina plasmática. O procedimento seguiu o principio básico do radioimunoensaio (RIE) onde há competição entre o antígeno radioativo e o não radioativo por um número fixo de sítios de ligação aos anticorpos. A quantidade de ^{125}I-insulina ligada ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração de insulina presente na amostra sérica. O complexo insulina-anticorpo marcado formado foi precipitado em polietilenoglicol (PM 6000) e dosado em contador do tipo gama (PerkinElmer, Turku, Finlândia). As análises foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Ângelo Rafael Carpinelli – ICB/USP.

3.5 Testes de tolerância à insulina (ITT) curto e à glicose (GTT)

Os testes foram realizados pela manhã, após jejum noturno de 12 a 14 horas. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg de peso do animal) e ao se confirmar o efeito do anestésico através da observação da falta de reflexo caudal ao estímulo de pressão, foi coletada uma gota de sangue após secção da cauda para mensuração da glicemia basal. Em seguida, receberam injeção intraperitoneal de solução de insulina regular diluída em salina (0,75mU/g de peso de animal), para a realização do teste de tolerância à insulina curto e subsequente cálculo da constante de decaimento da glicose (K_{itt}), ou solução contendo glicose (1mg/g de peso corporal), para a realização do teste de tolerância à glicose (ZHAO et al., 2011).

A partir da injeção houve coleta seriada de amostras de sangue da cauda em tempos definidos para cada teste realizado. Após o K_{itt}, foram coletadas alíquotas nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção intraperitoneal de insulina. Para a infusão de glicose foram coletadas alíquotas nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Todas as alíquotas tiveram suas glicemias mensuradas utilizando-se fitas reativas (Roche®) e aparato de leitura das fitas (Accu-chek Active Roche, Mannheim, Alemanha).

A constante de decaimento da glicose (K_{itt}) foi calculada pela fórmula $0,693/t_{½}$, onde $t_{½}$ é o tempo de meia vida da glicose plasmática calculada pela inclinação da curva obtida durante a fase linear de decaimento da glicose plasmática detectada nos tempos 5 a 30 minutos após infusão de insulina (BONORA et al., 2000). Quanto mais rápida e intensa for a queda da glicose, maior a sensibilidade a insulina (GELONEZE; TAMBASCIA, 2006).

3.6 Extração dos tecidos e eletroforese em gel de SDS

Hipotálamos e músculos gastrocnêmios foram retirados e homogeneizados em tampão contendo Triton-X-100 1%, Tris 100mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml utilizando Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, USA). O tecido muscular foi utilizado por ser um dos tecidos mais importantes para efeito sobre a homeostase glicídica da insulina.

Os extratos teciduais foram centrifugados a 12.000 rpm a 4 °C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após centrifugação, os sobrenadantes das amostras tiveram seu conteúdo protéico quantificado utilizando o reagente de Bradford (BioRad, USA) e receberam tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970), acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 4:1 (V:V) e 50 a 100μg de proteínas totais submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%, 8% e 6,5%) no aparelho para minigel. Em cada gel havia um marcador de peso molecular com valores estabelecidos.

3.7 “Immunoblotting”

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, por meio de um aparelho também da *BioRad* por 2 h a 120 V, como descrito por Towbin et al.(1992), e em banho de gelo. O tampão foi acrescido de SDS 0,1% para melhorar a dissolução de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico® 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) em temperatura ambiente por 2 horas sob leve agitação.

Estas membranas foram incubadas com anticorpos específicos em solução bloqueadora (com 3% de BSA ao invés de leite) durante a noite a temperatura de 4 ^{o}C sob leve agitação e subsequentemente lavadas com esta mesma solução sem leite ou BSA, por 30 minutos. Após lavagem, as membranas, foram incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase por uma hora a temperatura ambiente seguida de solução para detecção por quimioluminescência como descrito no protocolo do kit comercial. A emissão de luz foi detectada e captada pelo sistema de detecção MCHEMIBIS (*Bio-Imaging Systems Ltd*., Jerusalem, Israel) e as intensidades das bandas na revelação foram determinadas através da leitura por densitometria óptica das imagens utilizando-se o programa *Image J 1.43u (National Institutes of Health, USA)*. Os resultados foram normalizados pela coloração das membranas com solução de Ponceau 1% de 3 a 4 minutos, seguida por uma breve lavagem com água destilada até que as bandas se tornassem visíveis. As membranas foram colocadas em uma superfície plástica transparente e digitalizadas (XEROX WORKCENTRE 3119 - Xerox Comércio e Indústria LTDA, Rio de Janeiro-RJ, Brasil) para que a analise densitometrica fosse realizada por meio da seleção de pelo menos 90% da membrana; já que a solução de Ponceau não marca uma só proteína especifica, mas permite verificar a qualidade e a quantidade de proteína aplicada em cada membrana conforme sugerido por Romero-Calvo (2010).

3.8 Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio do programa *GraphPad Prism versão 5.01*® (*GraphPad Software*, La Jolla-CA, USA). O tamanho amostral mínimo por grupo para cada parâmetro analisado foi definido através do *n* suficiente para realização da análise da distribuição das amostras através do "D'Agostino and Pearson omnibus normality test" recomendado pelo programa GraphPad Prism versão 5.01®. Todas as amostras apresentaram distribuição normal e foram submetidas a análise estatística de *teste t*, a análise de variância por um fator (1way ANOVA) ou análise de variância por dois fatores (2way ANOVA). Quando o teste apresenta diferença significativa foi seguido do teste *post-hoc* de Tukey (Tukey's Multiple Comparison Test) ($p<0,05$). Os resultados apresentados foram expressos como média ± desvio padrão (M ± DP) e posteriormente representados em porcentagens de

variação em relação aos controles (Grupo 4 meses - controle), aos quais foi atribuído o valor de 100% às condições em que isto se aplicava.

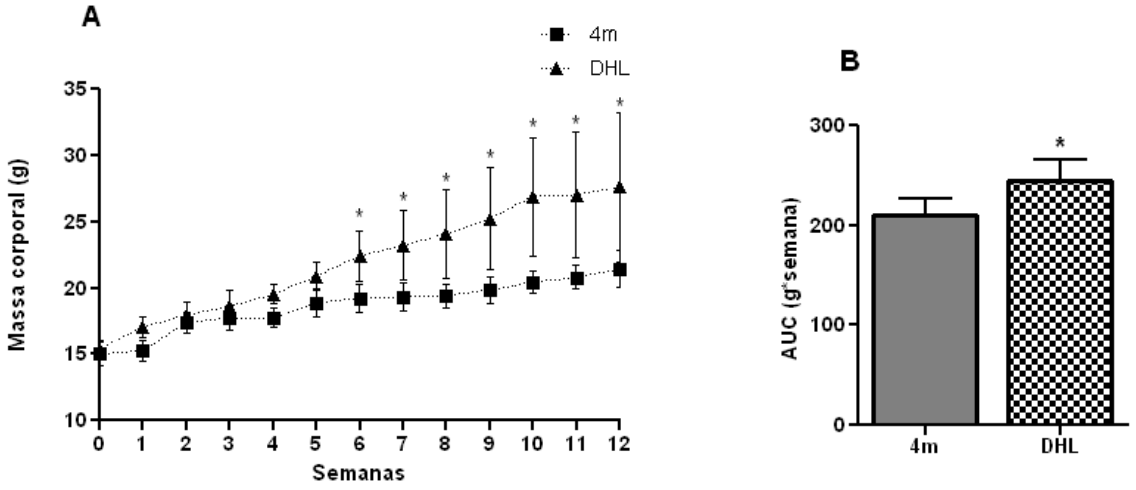
4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros zoométricos

Para o grupo controle (4m) e que receberam dieta hiperlipídica (DHL), suas massas corporais foram mensuradas inicialmente para homogeneização dos grupos e em seguida foram separados aleatoriamente nos dois grupos identificados. A massa corpórea dos animais com 10 meses de vida foi mensurada no dia do experimento final.

A evolução ponderal dos animais do grupo 4m e do grupo DHL foi monitorada semanalmente a partir do primeiro dia de oferta da dieta hiperlipídica (Figura 4A). O grupo DHL começou a ganhar mais massa corporal do que o controle a partir da 6º semana de ingestão da dieta modificada; $p<0,05$. Essa diferença na evolução ponderal é também identificada no gráfico contendo a área sob a curva (AUC) (Figura 4B), com aumento de 16,7% em relação aos controles (245 ± 21 e 210 ± 16, respectivamente, $p<0,05$).

Figura 4: Evolução ponderal dos camundongos com 4m controles e DHL.



FONTE: MOREIRA, 2011.

O gráfico A reproduz a evolução ponderal a partir do primeiro dia de oferta de dieta hiperlipídica por 12 semanas consecutivas. A partir da 6º semana de ingestão o grupo DHL (n:12) passa a apresentar ganho de massa consideravelmente maior que seu grupo controle (n:09) (teste 2way ANOVA e Bonferroni posttests). O gráfico B confirma, por meio da análise de AUC, a diferença de ganho de

massa entre os grupos experimentais ao longo das 12 semanas. Valores representados pela média ± desvio padrão. * <0,05.

No dia do sacrifício foi obtida a massa corporal final, o comprimento naso-anal e a massa das gorduras: retroperitonial (RP), subcutânea (SUB) e perigonadal (PG). A massa das gorduras foi calculada sob a massa total de cada respectivo animal ($g.g^{-1}$). Para o calculo do IMC foi utilizado o peso final e o comprimento naso-anal de cada animal (NOVELLI, 2007). Na Tabela 1 podemos observar que no grupo DHL houve aumentos nos pesos finais e IMC de 29% e 35%, respectivamente em comparação aos controles. Ademais, os coxins gordurosos apresentaram no mínino o dobro daquele mensurado nos controles (321%, 251% e 217% respectivamente para RP, SUB e PG, considerando o controle 100%; $p<0,05$).

A massa corporal dos animais com 10 meses de idade foi 14% maior do que a dos controles de 4 meses. A análise da massa dos diferentes territórios de gordura mostrou que o coxim RP e SUB, apresentaram um aumento de 86% e 49% maiores do que o mensurado no grupo 4m. O coxim gorduroso PG do grupo 10m manteve-se semelhante ao controle 4m.

Tabela 1: Peso inicial, Peso final, Comprimento Naso-anal, Índice de Massa Corpórea (IMC), Gorduras Retroperitonial (RP), Subcutânea (SUB) e Perigonadal (PG).

	Grupos		
	4m	**DHL**	**10m**
Parâmetros			
Peso inicial (g)	15.90 ± 1.37 (14)	16.55 ± 1.13 (11)	-
Peso final (g)	21.41 ± 1.37 (14)	27.62 ± 5.62* (14)	24.48 ± 1.81* (10)
Naso-anal (cm)	9.25 ± 0.29 (14)	9.36 ± 0.63 (11)	-
IMC (g/cm^2)	0.26 ± 0.02 (14)	0.35 ± 0.05* (11)	-
Retroperitoneal ($g*g^{-1}$)	0.14 ± 0.08 (18)	0.45 ± 0.28* (19)	0.26 ± 0.13* (15)
Subcutânea ($g*g^{-1}$)	0.51 ± 0.25 (19)	1.28 ± 0.55* (19)	0.76 ± 0.30* (15)
Perigonadal ($g*g^{-1}$)	0.47 ± 0.27 (17)	1.02 ± 0.75* (19)	0.54 ± 0.33 (15)

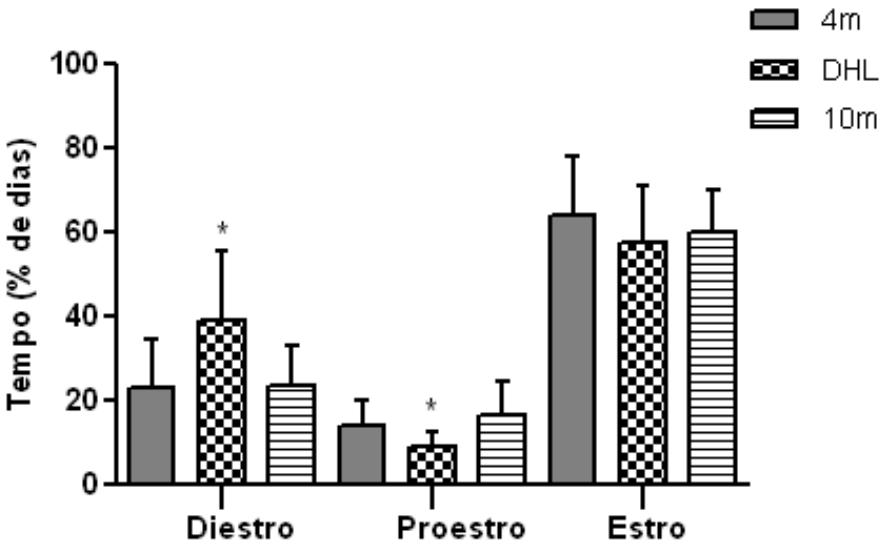
Valores representados pela média ± desvio padrão. Número de amostras está entre parênteses.
*Valores com diferenças significativas em relação ao grupo controle (4m), p<0.05
FONTE: MOREIRA, 2011.

4.2 Caracterização do ciclo estral e Contagem do número de corpos lúteos

Durante a realização da analise do ciclo estral dos grupos 4m e DHL, observamos que o acompanhamento do ciclo a partir de dois e três meses de vida não apresentou padrão cíclico. Diante disto, analisamos o ciclo estral somente no período das três últimas semanas de vida nas quais foram considerados os animais com a presença das três fases do ciclo (proestro, estro e diestro).

A Figura 5 representa a freqüência de cada fase estral para os três grupos. O grupo controle (4m) apresentou 94% de fêmeas com detecção das três fases, assim como os animais com 10 meses de idade. No grupo DHL foram detectados 37% de animais com até duas fases detectadas e foi observada redução da freqüência de proestro e aumento de diestro (Figura 5).

Figura 5: Análise do ciclo estral: freqüência das três fases (proestro, estro e diestro) do ciclo estral em um período de três semanas.



FONTE: MOREIRA, 2011.

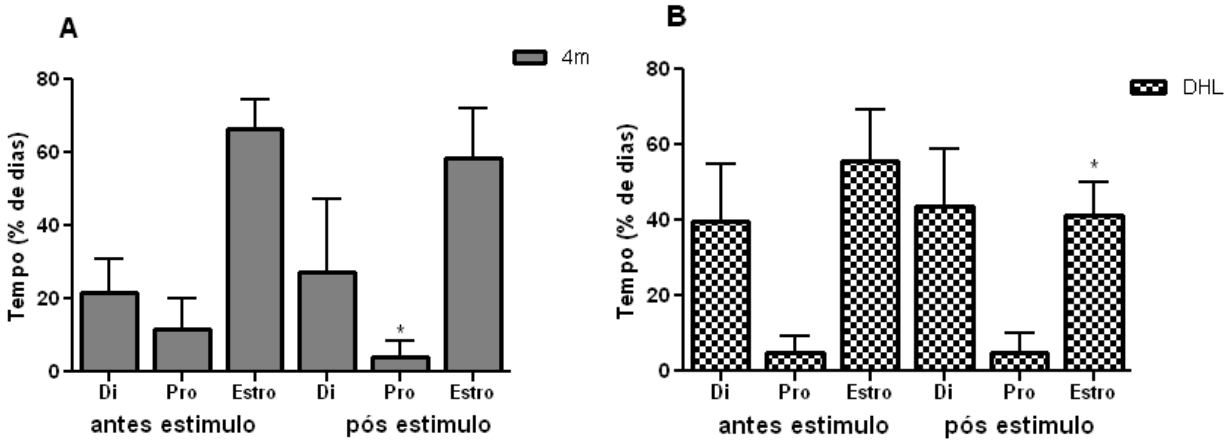
Total de animais amostrados: 4m(n:33), DHL(n:12) e 10m(n:34). Valores representados pela média ± desvio padrão.*p<0,05, comparação feita com a respectiva fase do grupo controle.

Diante da ausência de um padrão cíclico conforme descrito na literatura, onde o diestro é a fase de maior duração em relação às outras fases do ciclo, foi usado o estímulo de Whitten. Esse estímulo é olfativo dado pela urina de machos férteis da mesma espécie, a fim de induzir a regulação do ciclo estral (MEZIANE et al., 2007). Para isso, separamos a maravalha de caixas que continham cinco camundongos machos em idade fértil e colocamos

nas caixas das fêmeas controles e das alimentadas com dieta hiperlipidica. Após 24 horas começamos a coleta do lavado vaginal para avaliação do ciclo estral conforme descrito anteriormente por mais 10 dias.

O resultado do experimento descrito pode ser observado na Figura 6. Para o grupo controle houve redução da detecção de fase de proestro após o estímulo com maravalha úmida de urina de machos (Figura 6A), enquanto que no grupo DHL foi detectada diminuição da fase de estro (Figura 6B).

Figura 6: Análise do ciclo estral antes e após estimulo olfatório com urina de machos C57BL6, freqüência das três fases (proestro, estro e diestro) do ciclo em um período de 2 semanas.

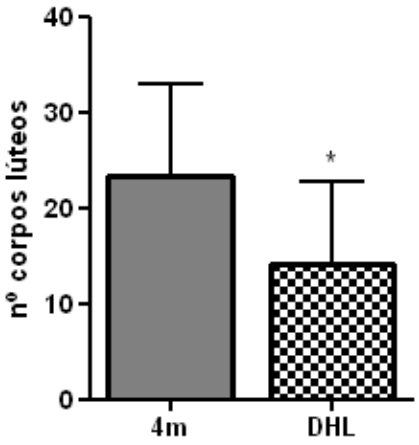


FONTE: MOREIRA, 2011.

O gráfico A mostra a duração das fases antes e após estimulo em camundongos fêmeas C57BL6 controles (4m). O gráfico B mostra a duração das fases antes e após estimulo em camundongos fêmeas C57BL6 tratados cm dieta hiperlipidica (DHL). Total de animais amostrados: 4m(n:11) e DHL(n:11). Valores representados pela média ± desvio padrão.*p<0,05 comparando-se a respectiva fase antes e após o estímulo.

A avaliação dos ovários a fresco de ambos os grupos mostrou que o tratamento com dieta hiperlipídica levou a uma redução do número total de corpos lúteos em relação ao controle (4m = 23 ± 9 e DHL = 14 ± 8; *p=0,0012*) (Figura 7).

Figura 7: Contagem de corpos lúteos através da observação a fresco de ovários de animais com 4 meses de vida tratados ou não com dieta hiperlipidica.



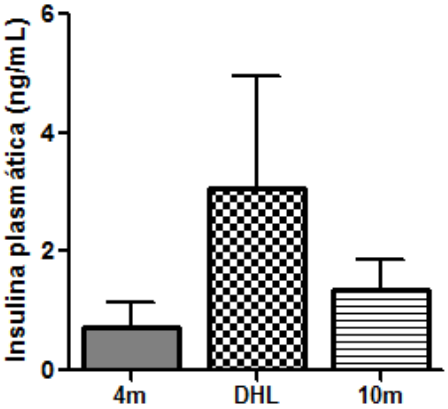
FONTE: MOREIRA, 2011.

Total de ovários amostrados: 4m(n:26) e DHL(n:22). Valores representados pela média ± desvio padrão.*p<0,05.

4.3 Insulinemia

Após coleta de sangue conforme descrito na seção de Materiais e Métodos, a insulina plasmática foi mensurada (Figura 8). Foi detectada concentração de insulina sanguínea nos grupos DHL em comparação às controles, 3,05 ± 1,9 *versus* 0,73 ± 0,4 ng/mL, *p=0,054*, respectivamente. O grupo envelhecido apresentou insulinemia estatisticamente semelhante às controles (1,34 ± 0,52 ng/mL; *p=0,098*).

Figura 8: Concentração de insulina sérica.



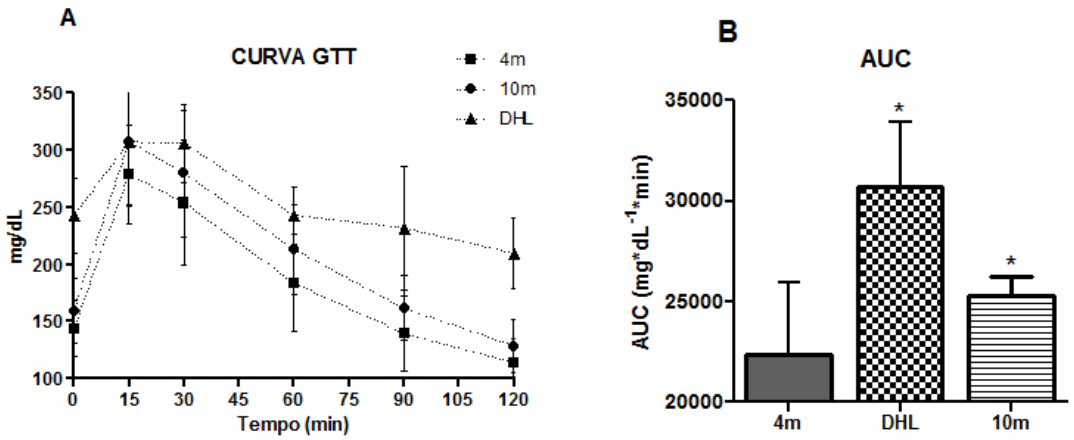
FONTE: MOREIRA, 2011.

As amostras de sangue foram coletadas do tronco após a decapitação, o soro separado por centrifugação e armazenado em freezer a -70° C até a determinação por RIE. Total de animais amostrados: 4m(n:4), DHL(n:4) e 10m(n:6). Valores representados pela média ± desvio padrão.

4.4 Testes de tolerância à glicose e constante de decaimento de glicose

O teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado em animais submetidos a jejum prévio de 12 a 14horas e anestesiados. A glicemia basal do grupo DHL (242 ± 32mg/dL) mostrou-se maior do que seu controle (144 ± 25mg/dL), $p<0.05$. Enquanto a do grupo 10m (159 ± 29mg/dL) foi semelhante ao controle. A dieta hiperlipídica e a idade de 10 meses influenciaram na resposta ao teste quando comparadas com o grupo controle (4m) (Figura 9). A diferença entre as curvas está representada no gráfico das áreas sob a curva, AUC (4m= 2236 ± 270; DHL= 3068 ± 1428 e 10m= 2526 ± 962, p<0,05) (Figura 9B).

Figura 9: Teste de tolerância à glicose realizado após jejum noturno de 12 a 14 horas, em animais anestesiados controles 4m, alimentados com DHL e 10m.



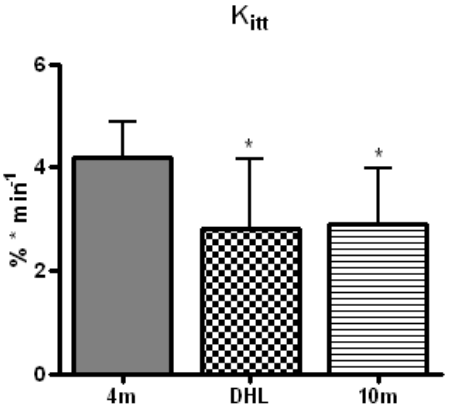
FONTE: MOREIRA, 2011.

Foi mensurada a glicemia no tempo 0 (basal) e aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após injeção intraperitoneal de glicose. O gráfico A mostra a curva glicêmica ao longo do tempo. O gráfico B apresenta a AUC correspondente às curvas glicêmicas. Valores representados pela média ± desvio padrão.*p<0,05 comparando-se com grupo controle.

Para a avaliação da sensibilidade à insulina foi feito um teste de tolerância à insulina curto (ITT de 30') em animais submetidos a jejum prévio de 12 a 14horas. Neste teste, a taxa

de decaimento de glicose, K_{itt}, é avaliada ao longo de 30 minutos após a injeção de insulina intraperitoneal. O teste mostrou que tanto o grupo DHL quanto o grupo 10m possuem menor sensibilidade a insulina em relação aos controles (4m= 4.18 ± 0.18%.min^{-1}; DHL= 2.8 ± 0,55%.min^{-1} e 10m= 2,9 ± 0,23%.min^{-1}; *p<0.05*) (Figura 10).

Figura 10: Índice de decaimento da glicose, K_{itt},dos grupos 4m, DHL e 10m calculada a partir das glicemias coletadas no teste de tolerância a insulina curto realizado após jejum noturno de 12 a 14 horas.



FONTE: MOREIRA, 2011.

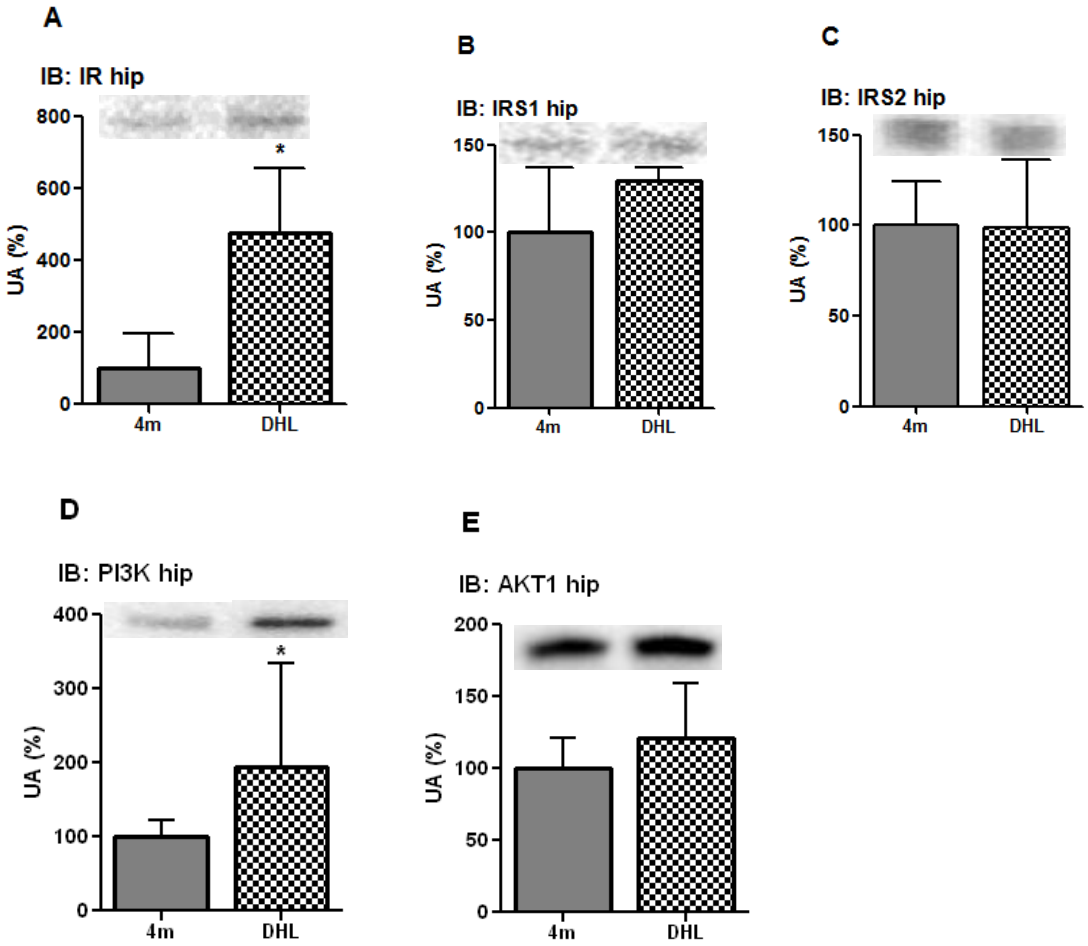
A glicemia foi mensurada no tempo 0 (basal) e aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após injeção intraperitoneal de insulina regular. Valores representados pela média ± desvio padrão de 15 animais controles (4m), 6 com DHL e 22 com 10 meses. * p<0.05, comparando-se com grupo controle.

4.5 Expressões das proteínas IR, IRS-1, IRS-2, PI3K e AKT-1 e interleucinas IL6 e TNFα em hipotálamos e músculos gastrocnêmios de camundongos fêmeas alimentados com dieta hiperlipídica (DHL)

A expressão proteica hipotalâmica da subunidade β do IR (Figura 11A), do IRS-1 (Figura 11B), do IRS-2 (Figura 11C), da subunidade de 85 kDa da PI3K (Figura 11D) e da AKT-1 (Figura 11E) foram analisadas para o grupo tratado com DHL em relação ao seu controle 4m. A dieta hiperlipídica induziu aumento de aproximadamente cinco vezes para a expressão de IR (4m= 100 ± 96% e DHL= 475 ± 183%; *p=0,018*) e de aproximadamente duas vezes sobre a expressão protéica da subunidade regulatória da PI3K em relação ao controle (4m= 100 ± 22% e DHL= 195 ± 139%; *p=0,0374*). A expressão das proteínas IRS-1, IRS-2 e AKT-1 não foi alterada (4m= 100 ± 37% e DHL= 129 ± 7%; 4m= 100 ± 24% e

DHL= 99 ± 37%; 4m= 100 ± 21% e DHL= 121 ± 37%), entretanto uma tendência ao aumento na expressão total de IRS-1 foi observada (*p= 0,083*).

Figura 11: Efeito da DHL sobre a expressão proteica de IR, IRS-1, IRS-2, PI3K e AKT-1 em hipotálamo de camundongos fêmeas C57Bl6.



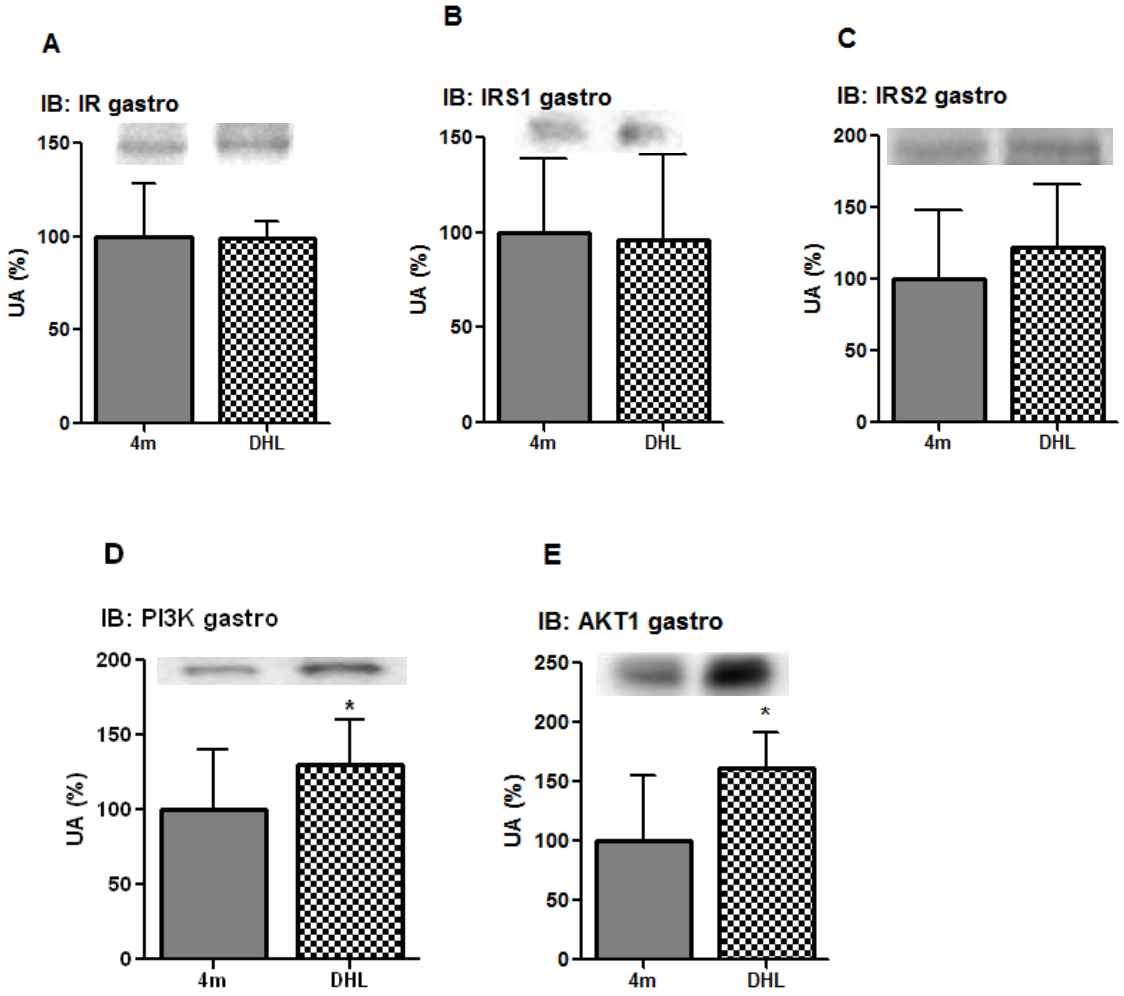
FONTE: MOREIRA, 2011.

Os hipotálamos foram extraídos e processados conforme descrito nos materiais e métodos e submetidos a *immunobloting* típico com anticorpo especifico. O gráfico A representa a média da expressão protéica da subunidade β do IR, amostras de 3 animais do grupo 4m e de 5 do grupo DHL. O gráfico B representa a média da expressão protéica da IRS-1, com de 8 animais do grupo 4m e de 6 do grupo DHL. O gráfico C representa a média da expressão protéica da IRS-2, com 10 animais do grupo 4m e 11 do grupo DHL. O gráfico D representa a média da expressão protéica da subunidade de 85 kDa da PI3K, com 11 animais do grupo 4m e 11 do grupo DHL. O gráfico E representa a média da expressão protéica da AKT-1, com 12 animais do grupo 4m e 11 do grupo DHL. Valores representados pela média ± desvio padrão *$p<0,05$.

A figura 12 mostra a expressão proteica da subunidade β do IR (Figura 12A), IRS-1 (Figura 12B), IRS-2 (Figura 12C), da subunidade p85 da PI3K (Figura 12D) e AKT-1 (Figura 12E) em músculo gastrocnêmio do grupo tratado com DHL e seus respectivos controles 4m.

Assim como no hipotálamo, porém em menor intensidade, o tratamento com DHL resultou em aumento de 30% na expressão proteica da PI3K (4m= 100 ± 40% e DHL= 130 ± 30%; *p=0,032*). Foi detectado também aumento na expressão proteica da AKT-1 frente ao tratamento com DHL para 160% em relação ao controle (4m= 100 ± 55% e DHL= 161 ± 30%; *p=0,044*).

Figura 12: Efeito da DHL sobre a expressão proteica de IR, IRS-1, IRS-2, PI3K e AKT-1 em músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeas C57Bl6.



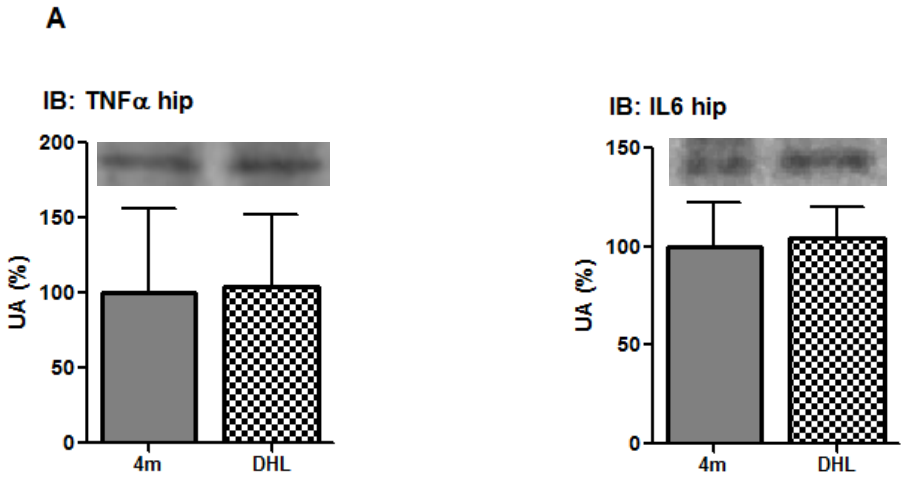
FONTE: MOREIRA, 2011.

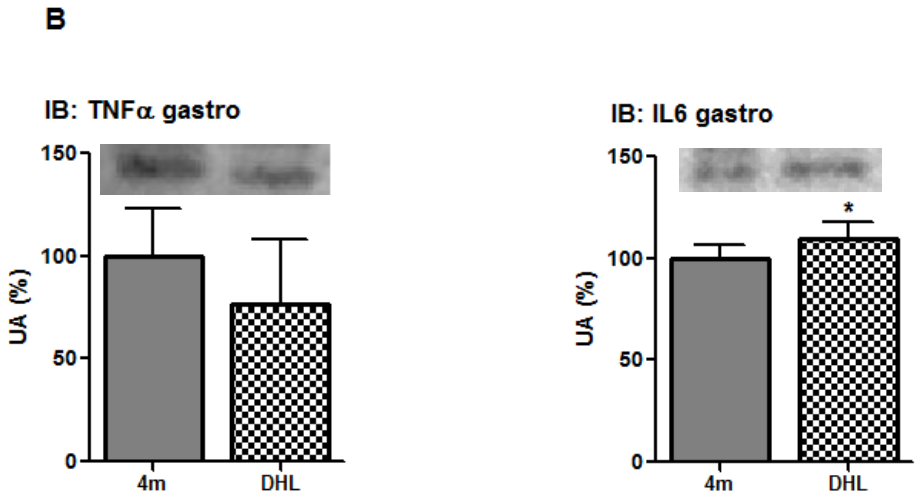
Os músculos gastrocnêmicos foram extraídos e processados conforme descrito nos materiais e métodos e submetidos a *immunobloting* típico com anticorpo especifico. O gráfico A representa a média da expressão proteica da subunidade β do IR, com 4 animais do grupo 4m e 4 do grupo DHL. O gráfico B representa a média da expressão protéica da IRS-1, com 9 animais do grupo 4m e 10 do grupo DHL. O gráfico C representa a média da expressão protéica da IRS-2, com 4 animais do grupo 4m e 4 do grupo DHL. O gráfico D representa a média da expressão proteica da subunidade de 85 kDa da

PI3K, com 15 animais do grupo 4m e 14 do grupo DHL. O gráfico E representa a média da expressão protéica da AKT-1, com 5 animais do grupo 4m e 6 do grupo DHL. Valores representados pela média ± desvio padrão. *$p<0,05$.

A expressão total das citocinas pró-inflamatórias TNFα e IL-6 estão representadas na figura 13. No hipotálamo houve manutenção da expressão proteica de ambas citocinas quando comparadas àquela dos animais controles (Painel 15A). Por outro lado, no músculo gastrocnêmio foi detectado aumento na expressão da IL-6 no grupo dieta hiperlipídica (4m= 100 ± 7% e DHL= 110 ± 8%; $p=0,032$), enquanto a expressão da TNFα não foi modificada (Painel 15B).

Figura 13: Efeito da DHL sobre a expressão proteica das citocinas pró-inflamatórias TNFα e IL-6 em hipotálamo e músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeas C57Bl6





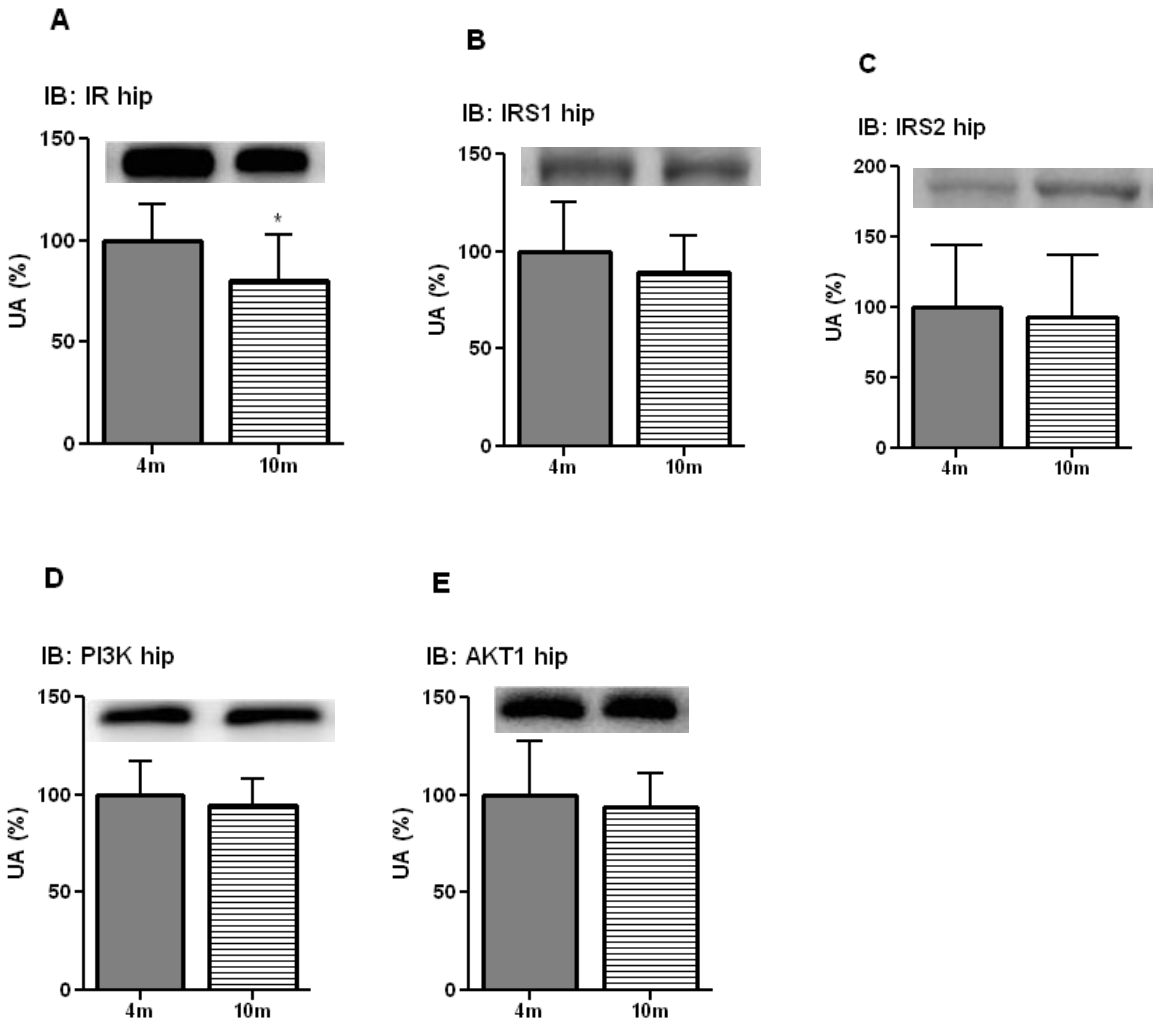
FONTE: MOREIRA, 2011.

Os tecidos foram extraídos e processados conforme descrito nos materiais e métodos e submetidos a *immunobloting* típico com anticorpo especifico. Os gráficos do painel A representam a média da expressão proteica das citocinas no hipotálamo (4m – n:4 e DHL – n:5). Os gráficos do painel B representam a média da expressão proteica das citocinas no músculo gastrocnêmio (4m – n:6 e DHL – n:8). Valores representados pela média ± desvio padrão. *$p<0,05$.

4.6 Expressões das proteínas IR, IRS-1, IRS-2, PI3K e AKT-1 e interleucinas IL6 e TNFα em hipotálamos e músculos de gastrocnêmio de camundongos fêmeas com 10 meses de idade (10m).

A expressão proteica hipotalâmica do IR (Figura 14A), IRS-1 (Figura 14B), IRS-2 (Figura 14C), subunidade de 85 kDa da PI3K (Figura 14D) e AKT-1 (Figura14E) foi analisada no grupo com 10 meses e comparada ao 4m. A idade influenciou na diminuição em 20% da expressão proteica da subunidade β do IR (4m= 100 ± 18% e 10m= 80 ± 22%; $p=0,006$).

Figura 14: Efeito da idade sobre a expressão proteica de IR, IRS-1, IRS-2, PI3K e AKT1 em hipotálamo de animais com 4m e 10m de vida.



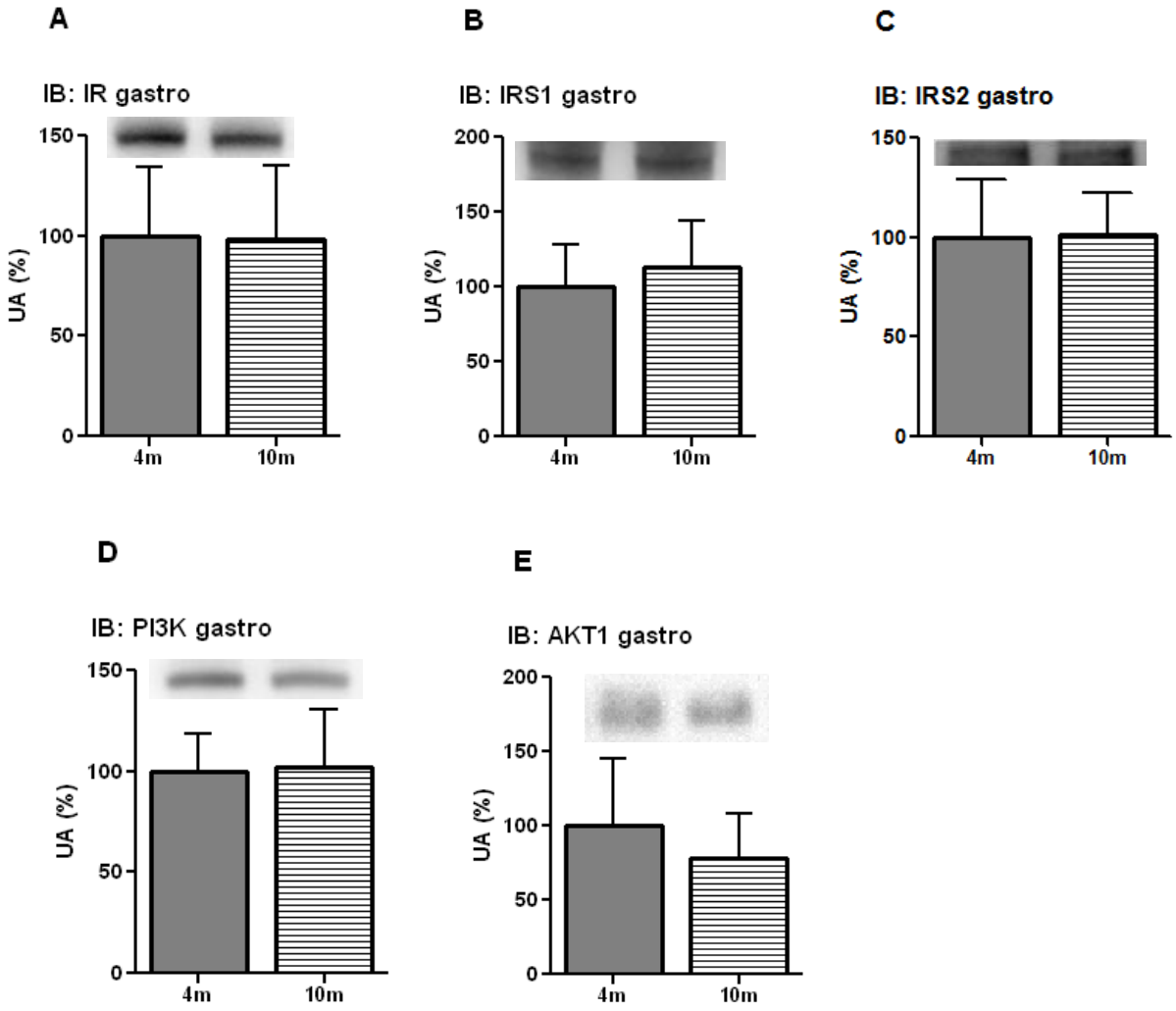
FONTE: MOREIRA, 2011.

Os hipotálamos foram extraídos e processados conforme descrito nos materiais e métodos e submetidos a *immunobloting* típico com anticorpo especifico. O gráfico A representa a média da expressão proteica da IR, com 15 animais do grupo 4m e 25 do grupo 10m. O gráfico B representa a média da expressão proteica da IRS-1, com 17 animais do grupo 4m e 29 do grupo 10m. O gráfico C representa a média da expressão proteica da IRS-2, com 8 animais do grupo 4m e 15 do grupo 10m. O gráfico D representa a média da expressão proteica da subunidade de 85 kDa da PI3K, com 15 animais do grupo 4m e 25 do grupo 10m. O gráfico E representa a média da expressão proteica da AKT-1, com 17 animais do grupo 4m e 29 do grupo 10m. Valores representados pela média ± desvio padrão. *$p<0,05$.

A figura 15 mostra a expressão protéica das proteínas IR (Figura 15A), IRS-1 (Figura 15B), IRS-2 (Figura 15C), subunidade de 85 kDa da PI3K (Figura 15D) e AKT-1 (Figura 15E) em músculo gastrocnêmio de animais com 10m e seus respectivos controles 4m. A idade

não modificou nenhuma dessas proteínas, embora tenha apresentado uma tendência à redução da expressão de AKT-1 (4m= 100 ± 45% e 10m= 78 ± 31%; *p=0,080*).

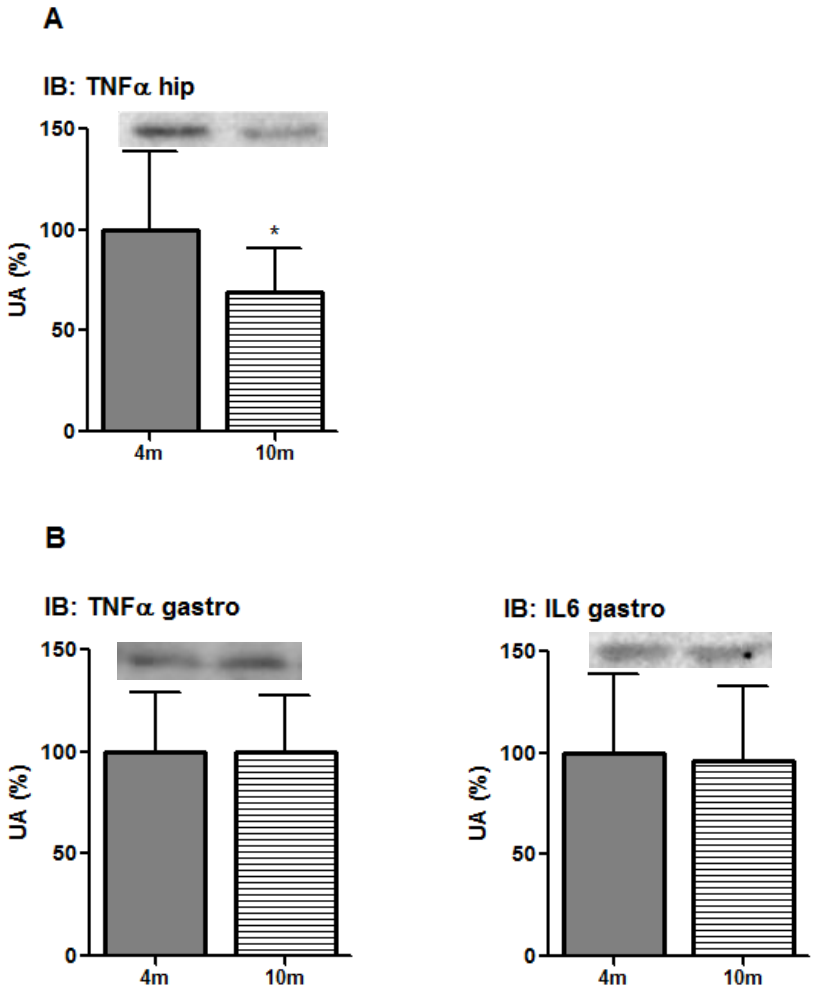
Figura 15: Efeito da idade sobre a expressão proteica de IR, IRS-1, IRS-2, PI3K e AKT1 em músculo gastrocnêmico de animais com 4m e 10m de vida.



FONTE: MOREIRA, 2011. Os músculos gastrocnêmicos foram extraídos e processados conforme descrito nos materiais e métodos e submetidos a *immunobloting* típico com anticorpo especifico. O gráfico A representa a média da expressão proteica da IR, com 21 animais do grupo 4m e 31 do grupo 10m. O gráfico B representa a média da expressão proteica da IRS-1, com 21 animais do grupo 4m e 31 do grupo 10m. O gráfico C representa a média da expressão proteica da IRS-2, com 8 animais do grupo 4m e 15 do grupo 10m. O gráfico D representa a média da expressão proteica da subunidade de 85 kDa da PI3K, com 21 animais do grupo 4m e 30 do grupo 10m. O gráfico E representa a média da expressão proteica da AKT1, com 14 animais do grupo 4m e 24 do grupo 10m. Valores representados pela média ± desvio padrão. *p<0,05.

A expressão total das citocinas pró-inflamatórias TNFα e IL-6 estão representadas na figura 16. Os animais com 10 meses de idade apresentaram redução na expressão hipotalâmica de TNFα para 69% em relação ao controle (4m= 100 ± 39% e 10m= 69 ± 22%; *p=0,022;* Fig. 16A). Por outro lado, não foi detectada diferença na expressão proteica de ambas citocinas no tecido muscular das fêmeas com 4 e 10 meses de vida (Fig. 16B e C).

Figura 16: Expressão protéica das citocinas pró-inflamatórias TNFα e IL-6 em músculo gastrocnêmio e hipotálamo de animais com 4 e 10 meses de vida.



FONTE: MOREIRA, 2011.

Os tecidos foram extraídos e processados conforme descrito nos materiais e métodos e submetidos a *immunobloting* típico com anticorpo especifico. O gráfico A representa a média da expressão protéica das citocinas no hipotálamo (4m – n:4 e DHL – n:5). O gráfico B representa a média da expressão protéica das citocinas no músculo gastrocnêmio (4m – n:6 e DHL – n:8). Valores representados pela média ± desvio padrão. *$p<0,05$.

5 DISCUSSÃO

O atual aumento da prevalência da obesidade e doenças associadas como o diabete tipo 2 e a síndrome metabólica tem chamado a atenção para o efeito desta sobre o sistema reprodutivo. A infertilidade e a secreção de LH estão geralmente associadas com a hiperinsulinemia. Para determinar se a resistência à insulina associada à obesidade exerce influência sobre o sistema reprodutor, avaliamos dois modelos experimentais: Camundongos fêmeas C57BL6 envelhecidos naturalmente e alimentados com Dieta Hiperlipídica (DHL).

A maior parte dos estudos relacionados a envelhecimento e tratamento com dieta hiperlipidica se restringem a camundongos machos. O presente estudo relata os parâmetros zoométricos de ambos os modelos experimentais em camundongos fêmeas da linhagem C57BL6. Como parte da investigação inicial de modelos animais que podem desenvolver resistência à insulina avaliamos a evolução ponderal em animais alimentados por 3 semanas com dieta hiperlipídica.

O desenvolvimento do quadro de obesidade em camundongos fêmeas da linhagem C57BL6 foi nítido, onde pudemos observar ganho de peso em relação aos controles após 6 semanas de ingestão da dieta hiperlipidica. O IMC foi utilizado como um indicativo de obesidade onde quanto maior o índice, maior o grau da obesidade e quando comparado ao Índice de Lee, o mesmo se mostra mais preciso e eficiente na mensuração de trabalhos que envolvam modelos de animais obesos (NOVELLI, 2007). O. Valores acima de $0.3g/cm^2$ já são considerados obesos (NOVELLI, 2007). O ganho de peso em camundongos dessa linhagem não é conseqüência de somente uma ingestão calórica maior, mas sim de redução na taxa metabólica desses animais (WINZELL; AHRÉN, 2004).

Ratos com 12 a 14 meses de idade têm sido utilizados como modelos de obesidade e resistência à insulina e em processo de envelhecimento por apresentarem maior adiposidade quando comparados a animais mais jovens (NISHIMURA et al., 1988), o mesmo foi comprovado em nosso modelo.

O comprimento naso-anal não foi alterado, o que mostra que o aumento de peso final realmente não ocorre em conseqüência de um crescimento da massa óssea desses animais, mas deve-se pelo aumento dos coxins gordurosos subcutâneos, retroperitoniais e perigonadais nos dois modelos experimentais.

A gordura visceral, em particular, tem um papel importante na regulação da sensibilidade à insulina sistêmica através da modulação de armazenamento de gordura nos adipócitos e da produção de citocinas como leptina e TNF-α. A leptina parece desempenhar um papel importante na regulação da gordura corporal total após a retirada da gordura subcutânea, atuando como um sinal de retroalimentação para mantutenção da gordura corporal total. Concentrações circulantes de leptina tendem a refletir a quantidade total de gordura corporal em humanos e animais, assim se ocorre diminuição de gordura subcutânea também ocorre diminuição da concentração de leptina, este seria um sinal desencadeando respostas compensatórias (ISHIKAWA et al., 2006). Em camundongos machos com 12 meses de idade, da mesma linhagem, apresentam prejuízo na sinalização da leptina pelo ganho de peso nessa fase. Estes déficits incluem um metabolismo mais lento e menos seletivo às respostas da leptina e mesmo que estes animais sejam tratados com uma dieta de restrição calórica não ocorre melhora das respostas metabólicas nessa fase (JACOBSON, 2002).

A insulina também preenche os critérios necessários para a função de sinal aferente de adiposidade, pois circula em níveis relativamente proporcionais a massa adiposa e atua no sistema nervoso central onde possui receptores em áreas envolvidas no controle da ingestão alimentar. A insulina é captada pelo tecido cerebral, passa pela barreira hematoencefálica e age como um sinal anorexígeno, induzindo hipofagia e perda de peso. Assim como a leptina, a insulina atua estimulando neurônios do núcleo arqueado como a POMC/CART (anorexígenos) e inibindo NPY/AgRP (orexígenos) (ARAÚJO, TORSONI, VELLOSO, 2010; VELLOSO et al., 2008).

Em modelos animais de obesidade, o fenômeno de resistência hipotalâmica à ação de hormônios como a leptina e a insulina, tem sido bem caracterizado. Ao que tudo indica, nestes animais ocorre uma íntima associação entre a resistência a esses hormônios no sistema nervoso central e a gênese da obesidade (VELLOSO, 2006).

Estudos com camundongos da linhagem C57BL6 mostraram intolerância a glicose e resistência a insulina após tratamento com dieta hiperlipidica durante 5 meses (GALLOU-KABANI et al., 2007), enquanto que nossos estudos comprovam que tanto a intolerância a glicose quanto a resistência a insulina já estão presentes a partir de 3 meses de tratamento com DHL a 35% de gorduras. Discordando do estudo citado anteriormente, nossa pesquisa aponta para um evidente quadro de diabete tipo 2 em fêmeas C57BL6, enquanto que Gallou-Kabani et al. (2007) mostraram que somente os machos dessa linhagem manifestaram diabetes tipo 2

e as fêmeas apresentaram um fenótipo semelhante aos machos porém menos pronunciado com resistência a insulina clara e moderada intolerância a glicose.

A insulinemia após os 3 meses da DHL apresentou uma forte tendência estatística a estar maior do que o grupo controle, no entanto, nossa limitação foi o baixo número de amostras para esse ensaio. Segundo Gallou-Kabani et al. (2007) mesmo após 5 meses de DHL camundongos fêmeas tanto da linhagem C57BL6 quanto da A/J permaneceram normoinsulinêmicas, enquanto que nos machos de ambas as linhagens apresentaram hiperinsulinêmia.

No presente trabalho, o efeito do envelhecimento sobre a homeostase da glicose mostrou glicose sanguínea e insulina plasmática de jejum semelhantes aos controles, mas com intolerância a glicose e resistência à insulina. Camundongos fêmeas C57BL6 envelhecidas tornam-se menos tolerantes a glicose pela diminuição da sensibilidade à insulina no fígado e no tecido adiposo em comparação com machos da mesma espécie; comprovando que o gênero possui influência sobre o metabolismo da glicose (GOREN; KULKARNI; KAHN, 2004).

O metabolismo energético e a reprodução são funções que se encontram intimamente ligadas, onde adequados estoques de substratos energéticos são requisitos para o desenvolvimento da puberdade e continua capacidade reprodutiva em seres humanos adultos e ratos (BRUNING et al., 2000).

Mudanças citológicas que ocorrem no trato reprodutivo de ratas, como no epitélio vaginal, estão relacionadas às secreções hormonais. Pelo estudo desse ciclo e de suas alterações citológicas podemos determinar, com boa margem de segurança, o tipo de hormônio ovariano que está sendo liberado.

Em nossos estudos da caracterização do ciclo estral optamos por classificar as fases em proestro, estro e diestro, sendo a fase metaestro inserida com a fase de diestro. O ciclo estral do grupo 4m e DHL foi monitorado a partir do 2º mês de vida dos animais, considerando-se que a puberdade em ratas ocorre após 4 semanas de vida com a liberação pulsátil do LH que permite a maturação dos ovários (WESTWOOD, 2008 apud ANDREWS e OJEDA, 1981[2]).

O grupo com 10 meses de idade apresentou comportamento cíclico muito parecido com os controles, sugerindo que a referente idade estudada não apresente características de

[2] Apud ANDREWS,W. W.; OJEDA, S. R. A detailed analysis of the serum LH secretory profiles of conscious free-moving female rats during the time of puberty. **Endocrinology** v.109,p. 2032-2039, 1981.

animais envelhecidos onde seria esperado um aumento na fase de diestro pela perda do padrão estral, dando conseqüência a uma fase pré-menopausa. Entretanto, o grupo tratado com DHL apresentou aumento na fase de diestro e diminuição da fase proestro quando comparadas com as respectivas fases de seus controles. Esse resultado pode ser confirmado pela redução de corpos lúteos no grupo DHL, mostrando que realmente ocorre diminuição na ovulação. Segundo Akamine et al.(2010), a resistência a insulina e a hiperinsulemia ocorrem em conjunto com um prejuízo na sinalização da insulina no ovário de ratas com obesidade induzida, promovendo alterações morfológicas nos ovários e aumento na fase de diestro. Observamos que houve o prolongamento na fase de estro nos três grupos experimentais contrastando com o que é descrito na literatura onde a incidência do diestro é maior (MANDL, 1951; MARCONDES; BIACHI; TANNO, 2002).

Long e Evans, em 1922 relataram sobre animais que apresentam um estado de cornificação vaginal contínua, ou seja, um prolongamento espontâneo da fase estro. Segundo Lu et al.(1980) esta fase de estro prolongado decorre do envelhecimento por volta dos 10 aos 12 meses de vida, mas em outros grupos de estudo, o mesmo comportamento quanto ao ciclo estral, foi observado que fêmeas virgens estão apresentando estro prolongado mais cedo se comparadas com as fêmeas que são pareadas com machos (MATT, 1987 apud LA POLT, 1986 [3]).

Matt et al. (1987) observaram que ao parear as fêmeas em estro contínuo com machos férteis, as mesmas apresentaram comportamento lordótico e aumento na liberação de LH quando comparadas a fêmeas com ciclo regulares. Meziane et al.(2007) mostrou que após estimulo de Whitten, no qual um macho é colocado na mesma caixa das fêmeas sendo separado por uma grade, os camundongos fêmea apresentaram aumento na fase de prostro em até 36 horas após a retirada do macho. O estímulo específico pelo qual a exposição ao macho provoca um aumento na liberação de LH em fêmeas com estro prolongado não é conhecido.

Em nosso estudo, mesmo após estimulo de Whitten, os animais continuaram a apresentar a mesma frequência do ciclo estral, porém as fêmeas com 4 meses de idade mostraram diminuição na fase de proestro enquanto que as fêmeas com 4 meses de idade tratadas com DHL apresentaram diminuição na fase de estro.

---

[3] Apud LA POLT P.S., *et al.*, The relation of ovarian steroid levels in young female rats to subsequent estrous cycicity and reproductive function during aging. Biol Reprod, v.35, p.1131-1139, 1986.

Podemos sugerir que concomitante as alterações encontradas nos camundongos tratados com DHL, haverá diminuição de períodos férteis, resultando em perda da capacidade reprodutiva das fêmeas que consumiram DHL em relação as que não consumiram. A tendência no aumento da insulina plasmática apresentada pelo grupo DHL pode não ter sido observada pelo baixo numero amostral, porém sugerimos que haja correlação entre menor numero de ovulações e aumento da insulina plasmática. Assim, resolvemos estudar a via de sinalização no hipotálamo desses animais, sugerindo que haja uma possível modulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

Na avaliação das proteínas da via de sinalização da insulina no hipotálamo, observamos que o tratamento por 12 semanas de DHL promoveu aumento do receptor de insulina (IR) e da PI3K, apresentando tendência estatística ao aumento na expressão total de IRS-1. Banas et al., (2008) avaliaram animais em consumo agudo de dieta por 1 semana e em consumo crônico por 6 semanas e observaram aumento na expressão de IR, IRS-1 e IRS-2 no hipotálamo de ratos com consumo agudo de dieta, enquanto o tratamento crônico com dieta promoveu aumento da insulinemia. Aqueles resultados indicam que o excesso de dieta hiperlipidica por um curto período de tempo ativa mecanismos centrais compensatórios, com o prolongamento da ingestão dessa dieta aqueles mecanismos adaptativos tornam-se menos eficientes e pode ocasionar resistência à insulina, conforme observado em nosso estudo.

Estudos realizados com camundongos fêmeas que não expressam receptor de insulina (IR) em seus neurônios (NIRKO mice), demonstraram alteração na fertilidade com poucos folículos antrais e corpos lúteos devido a redução da liberação de LH (BRUNING et al., 2000), além de apresentarem hiperglicemia e falência na atividade secretora de células β pancreáticas (SATIEL; PESSIN, 2002). A insulina também é capaz de estimular a secreção de GnRH *in vivo* e a administração de insulina intracerebroventricular (icv) restabelece o comportamento reprodutivo de ratos diabéticos (BURCELIN et al., 2003; KOVACS, et al., 2003). Estudos *in vitro* com linhagens celulares imortalizadas produtoras de GnRH indicam que a insulina regula a expressão desse hormônio através da via das MAPK (SALVI et al., 2006). No entanto, em nossa avaliação feita no hipotálamo de camundongos com 10 meses de idade ocorre redução na expressão total de IR. Nossos resultados podem somente ser avaliados quanto à expressão protéica total já que não avaliamos a ativação da via.

Outra proteína que se mostra importante para a regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadas é a PI3-K, onde p85αKO de neurônios GnRH *in vivo* promoveu redução dos níveis

séricos de testosterona e no número de espermatozóides, sugerindo que a sinalização da PI3K compreende um dos fatores que modulam as diferenças sexuais na regulação neuroendócrina da secreção de GnRH (ACOSTA-MARTÍNEZ et al., 2009). Considerando que a PI3K pode ser ativada pela testosterona (BARON et al., 2004) e que uma das características da SOPC é o hiperandrogenismo (PANIDIS et al., 1999), poderíamos especular que o aumento hipotalâmico da expressão da PI3K em nosso modelo de DHL poderia ser por este fenômeno.

Há muito se observava que animais experimentais com diabetes *mellitus* e/ou com obesidade ao desenvolverem quadros infecciosos ou inflamatórios apresentam significativo comprometimento da ação da insulina (MCCOWEN et al., 2001). Segundo De Souza et al., (2005) animais tratados com dieta hiperlipidica apresentam um aumento da expressão de proteínas de resposta inflamatória no hipotálamo, entre elas: TNF-α, IL-1β e IL-6. Na presença de níveis elevados destas citocinas, neurônios do hipotálamo apresentam ativação de vias intracelulares envolvidas com a resposta a sinais inflamatórios. Proteínas com atividade serina quinase presentes nessas vias catalisam a fosforilação em serina de importantes participantes da via de sinalização da insulina o que leva a uma resistência molecular à ação desse hormônio no hipotálamo de animais alimentados com dieta hiperlipídica. Embora a TNFα seja um importante mediador da resistência à insulina em modelos de animais obesos, devido o aumento da expressão no tecido adiposo, nosso ensaio não apontou diferença na expressão protéica das citocinas estudadas em fêmeas alimentadas com DHL, enquanto que no envelhecimento houve redução da expressão da TNFα.

Pacientes que possuem endometriose apresentam elevados níveis sanguíneos de IL-6, o que pode levar à infertilidade (UMEZAWA et al., 2008). O reforço do tecido adiposo branco aumenta a produção de fatores relacionados com as células imunes, citocinas e ácidos graxos livres, o que poderia contribuir para a instalação de infertilidade na condição de obesos (SCHÄFFLER; SCHOLMERICH; SALZBERGER, 2007). No presente estudo, a expressão da IL-6 aumentou no musculo gastrocnêmio do grupo com DHL, sugerindo que a redução na sinalização da insulina após 12 semanas de dieta hiperlipídica contribua com a infertilidade de mulheres obesas.

Um aspecto importante envolve o papel do tecido muscular esquelético, particularmente na depuração metabólica da glicose no estado alimentado. Esse tecido participa de modo central na remoção da glicose sanguínea advinda do processo digestório, resultando no equilíbrio adequado da glicemia durante os processos de alimentação e jejum.

Com o aumento da glicemia conseqüente ao processo digestório, há liberação de insulina e sua atuação envolverá o aumento da captação desse nutriente nos tecidos muscular e adiposo (KANDARIAN; JACKMAN, 2006). Vale sempre a pena lembrar que do ponto de vista quantitativo o tecido muscular tem primazia em relação ao adiposo nesse contexto. Assim, o tecido muscular esquelético é um alvo importante nos estudos que envolvem resistência à ação da insulina.

Ratos Wistar machos com 20 meses de idade apresentam alterações da ação da insulina em músculo pela redução da expressão IRS-1 (CARVALHO et al., 1996) e pela redução do grau de fosforilação do IRS-2 em associação com a PI3K (CARVALHO et al., 2000).

Nos animais tratados com DHL ocorreu aumento na expressão da PI3K/AKT. A maior expressão da subunidade p85 da PI3K pode justificar uma menor resposta à insulina. Animais transgênicos demonstram que o desequilíbrio entre as subunidades catalítica e regulatória podem modificar a atividade dessa enzima quando estimulada pela insulina, já que para o funcionamento adequado da PI3K é necessário um balanço entre as frações livres da p85 e outra fração é um complexo entre a p85-p110. Caso ocorra modificações da expressão da p85 acontece deslocamento desse balanço em favor de uma das duas frações pelo acoplamento a sítios de ligação nos IRSs. (UEKI et al., 2003; TERAUCHI et al., 1999). Barbour et al. (2005) destacam que um aumento na expressão da p85 causa um potente papel regulador negativo sobre a sinalização da insulina em músculo esquelético de ratos, além de induzir resistência a insulina.

Seguindo a via de sinalização da insulina, a AKT1 exerce importante papel na estimulação de proteínas envolvidas na síntese protéica ou regulando a captação de glicose (CHEN et al., 2001; TANIGUSHI; EMANUELLI; KAHN, 2006). No caso do nosso projeto sugerimos que a maior concentração de AKT1 no músculo gastrocnêmico de camundongos fêmeas com DHL está associada ao aumento da expressão da PI3K, enquanto que no envelhecimento ocorre tendência estatística de redução na expressão da mesma que pode ser associada a uma discreta perda de massa muscular característica do envelhecimento.

Quando relacionamos as proteínas da via de sinalização de insulina com duas distintas fases do ciclo estral, estro e diestro, por ora os resultados obtidos mostram que o ciclo estral não parece influenciar a expressão de nenhuma das proteínas analisadas nos animais tratados com DHL. No envelhecimento foi detectada um aumento da expressão de IRS-1 na fase de

diestro em músculo gastrocnêmio, porém ainda não sabemos explicar este resultado (ANEXO).

Tortoriello; Mcminn; Chua (2007) mostraram que a linhagem de camundongos DBA/2J se tornaram inférteis depois de consumir uma dieta com 35% de gordura, enquanto camundongos C57BL6 exibiram fertilidade normal.

Estudos com camundongos *knockout* IR na hipófise (PitIRKO) indicam um papel direto para a sinalização de insulina nos gonadotrofos. Quando os animais controles se tornaram obesos com dieta hiperlipidica, eles mostraram perfis metabólicos e reprodutivos semelhantes às mulheres com hiperinsulinemia e SOPC, mas nos animais obesos PitIRKO houve melhora na função reprodutiva (NANDI et al., 2010). Isso demonstra que a sinalização da insulina na hipófise esta relacionada à gênese da infertilidade induzida por obesidade.

6 CONCLUSÃO

O tratamento com dieta hiperlipídica e a condição de envelhecimento induziu modificações metabólicas, no trato reprodutor e nas etapas da sinalização intracelular da insulina que levaram à resistência a insulina e intolerância a glicose.

- Houve aumento no peso corporal total devido ao aumento dos coxins gordurosos estudados.
- Ocorreu perda do padrão estral com aumento na freqüência na fase de diestro e diminuição da fase de proestro no grupo tratado com DHL.
- Aumento na via IR/IRS1/PI3K no hipotálamo e da via PI3K/AKT1 e citocina IL-6 em músculo gastrocnêmio de animais com DHL.
- Redução hipotalâmica do IR e TNFα em fêmeas com 10 meses de idade.
- Não há interferência na via de sinalização da insulina quando comparadas com distintas fases do ciclo estral.

Nossos resultados confirmam que a expressão total do receptor de insulina participa da modulação dos controles hipotalâmicos do apetite e da função reprodutora em camundongos fêmeas da linhagem C57BL6. No entanto é preciso considerar que os efeitos descritos podem sofrer ação de outros mediadores como a leptina, neuropeptideos e ativação proteica da via intracelular da insulina.

REFERÊNCIAS*

ACOSTA-MARTÍNEZ, M.; LUO, J.; ELIAS, C.; WOLFE, A.; LEVINE, J. E. Male Biased Effects of GnRH Neuron-Specific Deletion of the PI3K Regulatory Subunit p85α on the Reproductive Axis. **Endocrinology,** v. 150, p. 4203-4212, 2009.

AKAMINE, E. H.; MARCAL, A. C.; CAMPOREZ, J. P.; HOSHIDA, M. S.; CAPERUTO, L. C.; BEVILACQUA, E.; CARVALHO, C. R. O. Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. **Endocrinology**, v. 206, p. 65-74, 2010.

ARAÚJO, E. P.; TORSONI, M. A.; VELLOSO, L. A. Hypothalamic inflammation and obesity. **Vitam. Horm**., v. 82, p. 129-143, 2010.

BANAS, S. M. A dietary fat excess alters metabolic and neuroendocrine responses before the onset of metabolic diseases. Cell Mol. **Neurobiol**., v. 29,p. 157-168, 2009.

BARBOUR, L. A.; RAHMAN, S.M.; GUREVICH, I.; LEITNER, J.W.; FISCHER, S.J. ROPER, M. D.; KNOTTS, T. A,; VO, Y.; MCCURDY, C. E,; YAKAR, S.; LEROITH, D.; KAHN, C. R,; CANTLEY, L. C.; FRIEDMAN, J. E.; DRAZNIN, B.; Increased p85 is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces *in vivo* insulin resistance associated with growth hormone excess. **J.Biol.Chem.**, v. 280, p. 37489–37494, 2005.

BARON, S.; MANIN, M.; BEAUDOIN, C.; LEOTOING, L.; COMMUNAL, Y.; VEYSSIERE, G.; MOREL, L. Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. **J. Biol. Chem.,** v. 279, p. 14579-14586, 2004.

BASTARD, J. P.; MAACHI, M.; LAGATHU, C.; KIM, M. J.; CARON, M.; VIDAL, H.; CAPEAU, J.; FEVE, B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **Eur. Cytokine Netw.**, v.17, p. 4-12, Mar. 2006.

BONORA, E.; TARGHER, G.; ALBERICHE, M.; BONADONNA, R. C.; SAGGIANI, F.; ZENERE, M. B.; MONAUNI, T.; MUGGEO, M. Homeostasis Model Assessment Closely Mirrors the Glucose Clamp Technique in the Assessment of Insulin Sensitivity. **Diabetes Care**, v. 23, p. 57-63, 2000.

BRUNING, J. C.; GAUTAM, D.; BURKS, D. J.; GILLETTE, J.; SCHUBERT, M.; ORBAN, P. C.; KLEIN, R.; KRONE, W.; MÜLLER-WIELAND, D.; KAHN, C. R.Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. **Science**, v. 289, p. 2122–2125, 2000.

BRUUNSGAARD, H.; PEDERSEN, M.; PEDERSEN, B. K. Aging and proinflammatory cytokines. **Curr. Opin. Hematol**, v.8, p.131-136, 2001.

BURCELIN, R.; *et al.* Gonadotropin-releasing hormone secretion from hypothalamic neurons: stimulation by insulin and potentiation by leptin. **Endocrinology**, v.144, p.4484-4491, 2003.

CARVALHEIRA, J. B. C. RIBEIRO, E. B.; ARAÚJO, E. P.; GUIMARÃES, R. B.; TELLES, M. M.; TORSONI, M.; GONTIJO, J. A.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. **Diabetologia**, v.46, p. 1629-1640, 2003.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.46, p. 419-425, 2002.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CARVALHO, C. R.; MAEDA, L.; BRENELLI, S. L.; SAAD, M. J.Tissue-specific regulation of IRS-2/PI 3-kinase association in aged rats. **Biol. Chem.**, v. 381, p. 75-78, 2000.

CARVALHO, C. R.; BRENELLI, S. L.; SILVA, A. C.; NUNES, A. L.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J.. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. **Endocrinology**, v. 137, p. 151-159, 1996.

CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN JUNIOR, O. Modelos experimentais de Resistencia a insulin e obesidade: Lições aprendidas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, 2006.

CHEATHAM, B; KAHN, C. R. Insulin Action and the Insulin Signaling Network. **Endocr. Rev.,** v. 16, p. 117-142, 1995.

CHEN, W. S.; XU, P. Z.; GOTTLOB, K.; CHEN, M. L.; SOKOL, K.; SHIYANOVA, T.; RONINSON, I.; WENG, W.; SUZUKI, R.; TOBE, K.; KADOWAKI, T.; HAY, N. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the AKT1 gene. **Genes Dev**,, v. 15, p. 2203-2208, 2001.

DAFTARY, S. S.; GORE, A. C. IGF-1 in the Brain as a Regulator of Reproductive Neuroendocrine Function. **Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 230, p. 292-306, 2005.

DE SOUZA, C. T.; ARAUJO, E. P.; BORDIN, S.; ASHIMINE, R.; ZOLLNER, R. L.;, BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Consuption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, p. 4192-4199, 2005.

EVANS, W. Functional and metabolic consequences of sarcopenia. **Am. Soc. Nutr. Sci.**., v. 127, p. 998S–1003S, 1997.

FRANKS, S. Polycystic ovary syndrome. **N Engl J Med**, v. 333, p. 853-861, 1995.

FREEMAN, M.E. The ovarian cycle of the rat. **Physiol. Reprod**., v. 45, p. 613-657, 1994.

FOLLI, F.; SAAD, M. J. A.; BACKER, J. M.; KAHN, C. R. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-cinase and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 22171-22177, 1992.

GALLOU-KABANI, C.; VIGÉ, A.; GROSS, M. S.; RABÈS, J. P.; BOILEAU, C.; LARUE-ACHAGIOTIS, C.; TOMÉ, D.; JAIS, J. P.; JUNIEN, C.C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. **Obesity**, v. 15, p. 1996-2005, 2007.

GELONEZE B., TAMBASCIA M. A. Avaliação laboratorial e diagnostico da resistência insulínica**. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol**., v. 50, p. 208-15, 2006.

GOREN, H. J.; KULKARNI, R. N.; KAHN, C. R. Glucose homeostasis and tissue transcript content of insulin signaling intermediates in four inbred strains of mice: c57bl/6, c57blks/6, dba/2, and 129x1. **Endocrinology**, v. 145, p. 3307–3323, 2004.

GREISOEN, S.; LEDET, T.; OVESEN, P. Effects of androstenedione, insulin and luteinizing hormone on steroidogenesis in human granulosa luteal cells. **Hum. Reprod.**, v. 16, p. 2061-2065, 2001.

GUILHERME, A.; VIRBASIUS, J.V.; PURI, V.; CZECH, M.P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat. Rev. Mo. Cell. Biol**., v. 9, p. 367-377, 2008.

HABER, E. P.; CURI, R.; CARVALHO, C. R. O.; CARPINELLI, A. R.Secreção da insulina: Efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**. v. 45, n.3, p.219-227, 2001.

HILL, J. W.; ELMQUIST, J. K.; ELIAS, C. F. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 294, p. 827-832, 2008.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory pathways and insulin action. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 27, p. 53-55, 2003.

ISHIKAWA, K.; TAKAHASHI, K.; BUJO, H.; HASHIMOTO, N.; YAGUI, K.; SAITO, Y.Subcutaneous Fat Modulates Insulin Sensitivity in Mice by Regulating TNF-a expression in Visceral Fat. **Horm. Metab. Res.,** v. 38, p. 631–638, 2006.

JACOBSON, L. Middle-aged C57BL/6 mice have impaired responses to leptin that are not improved by calorie restriction. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**,, v. 282, p. E786–E793, 2002.

KANDARAKI, E.; CRISTAKOU, C.; KANDARAKI, E. D. Metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome…and vice versa. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 53, n.2, p. 227 – 237, 2009.

KANDARIAN, S. C.; JACKMAN, R. W. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. **Muscle Nerve**, v. 33, p. 155-165, 2006.

KHAN, A. H.; PESSIN, J. E. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signaling pathways. **Diabetologia**, v. 45, p. 1475-1483, 2002.

KHAN, S. E.; HULL,R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, p. 840-846, 2006.

KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **The physiology of reproduction.** New York: Raven Press, p. 613-646, 1994.

KOVACS, P.; MORALES, J. C.; KARKANIAS, G. B. Central insulin acdminsitraion maintains reproductive behavior in diabetic female rats. **Neroendocrinology**, v. 78, p. 90-95, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEGRO, R. S.; GNATUK, C. L.; KUNSELMAN, A. R.; DUNAIF, A.Changes in glucose tolerance over time in women with polycistic ovary syndrome: a controlled study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 90, p. 3236-3242, 2005.

LONG, J. A.; EVANS, H. M. The oestrus cycle in the rat it's associated phenomena. **Men. Univ. California**, v. 6, p. 1-148, 1922.

LU, J. K. H.*;* DAMASSA, D. A.; GILMAN, D. P.; JUDD, H. L.; SAWYER, C. H., Differential patterns of gonadotropin responses to ovarian steroids and to LH-releasing hormone between constant-esti-Ous and pseudopregnant states in aging rats. **Biol. Reprod.**, v. 23, p. 345-351, 1980.

MANDL, A. M., The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. **J. Exp. Biol.** v. 28, p. 576-584, 1951.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.**, v. 62, p. 609-614, 2002.

MATT, D.W.; COQUELIN, A.; LU, J. K. , Neuroendocrine Control of Luteinizing Hormone Secretion and Reproductive Function in Spontaneously Persistent- Estrous Aging Rats. **Biol. Reprod.**, v. 37, p. 1198-1206, 1987.

MEZIANE, H.; OUAGAZZAL, A.M.; AUBERT, L.; WITRZYCH, M.; KREZEL, W.Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. **Genes, Brain Beh.**, v. 6, p. 192–200, 2007.

MCCOWEN, K.C.; MALHOTRA, A.; BISTRIAN, B.R. Stress-induced hyperglycemia. **Crit. Care Clin.**, v. 17, p. 107-124, 2001.

NANDI, A.; WANG, X.; ACCILI, D.; WOLGEMUTH, D. J. The effect of insulin signaling on female reproductive function independent of adiposity and hyperglycemia. **Endocrinology**, v. 151, p. 1863-1871, 2010.

NESTLER, J. E. Polycystic ovary syndrome: a disorder for the generalist. **Fertil. Steril.**, v. 70, p. 811-812, 1998.

NISHIMURA H., KUZUYA H., OKAMOTO M., YOSHIMASA Y., YAMADA K., IDA T., TAKEHI T., IMURA H. Change of insulin action with aging in conscious rats determined by euglycemic clamp. **Am. J. Physiol.**, v. 254, p. E92-98, 1988.

NOVELLI, E. L.; DINIZ, Y. S.; GALHARDI, C. M.; EBAID, G. M.; RODRIGUES, H. G.; MANI, F.; FERNANDES, A. A.; CICOGNA, A. C.; NOVELLI FILHO, J. L. , Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab. Anim.**, v. 41, p. 111-119, 2007.

NUMAN *S*, RUSSELL D. S. Discrete expression of insulin receptor substrate-4 *mRNA* in adult rat brain. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 72, p. 97-102, 1999.

PANIDIS, D. K.; ROUSSO, D. H.; MATALLIOTAKIS, I. M.; KOURTIS, A. I.; VLASSIS, G. D.; KOUMANTAKIS, E. E. Hyperinsulinemia does not influence androgens/estrogens ratio in patients with polycystic ovary syndrome. **Int. Fertil Women's Med.**, v. 44, p. 301-306, 1999.

PARDINI, A. W; NGUYEN, H. T.; FIGLEWICZ, D. P.; BASKIN, D. G.; WILLIAMS, D. L.; KIM, F.; SCHWARTZ, M. W. Distribution of insulin receptor substrate-2 in brain areas involved in energy homeostasis. **Brain Res.**, v. 1112, p. 169-178, 2006.

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

PINTO, C. M. H. **O ciclo estral de rata e efeitos da castração hormonal e da terapia hormonal substitutiva.** 2011. Disponivel em < www.cristina.prof.ufsc.br/v2/endocrino/rato_gonadas.ppt> acesso em: 01/11/2011.

PORETSKY, L.; CLEMONS, J.; BOGOVICH, K. Hyperinsulinemia and human chorionic gonadotropin synergistically promote the growth of ovarian follicular cysts in rats. **Metabolism**, v. 41, p. 903- 910, 1992.

ROMERO-CALVO, I.; OCÓN, B,; MARTÍNEZ-MOYA, P.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S.. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Anal. Biochem**., v. 401, p. 318-320, 2010.

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

SALTIEL, A.R.; PESSIN, J.E. Insulin signaling pathways in time and space. **Trends Cell Biol.**, v. 12, p. 65-71, 2002.

SALVI, R.; CASTILLO, E,; VOIROL, M. J.; GLAUSER, M.; REY, J. P.; GAILLARD, R. C.; VOLLENWEIDER, P.; PRALONG, F. P.. Gonadotropin-relaesing hormone-expressing neurons immortalized conditionally are activarted by insulin: implication of the mitogen-activated protein kinase pathway. **Endocrinology**, v. 147, p. 816-826, 2006.

SARDINHA, F. L. C.; TELLES, M. M.; ALBUQUERQUE, K. T.; OYAMA, L. M.; GUIMARÃES, P. A.; SANTOS, O. F.; RIBEIRO, E. B. Gender difference in the effect of intrauterine malnutrition on the central anorexigenic action of insulin in adult rats. **Nutrition**, v. 22, p. 1152-1161, 2006.

SCHAFFLER, A.; SCHOLMERICH, J.; SALZBERGER, B. Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. **Trends Immunol..**, v. 28, p. 393–399, 2007.

SHEPHERD, P. R. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin- sensitive tissues. **Acta. Physiol. Scand**, v. 183, p. 3-12, 2005.

SHORES, E. M.; PICTON, H. M.; HUNTER, M. G. Differential regulation of pig theca cell steroidogenesis by LH, insulin-like growth factor 1 and granulosa cells in serum-free culture. **J. Reprod. Fertil.**, v. 118, p. 211-219, 2000.

TAMEMOTO, H.; KADOWAKI, T.; TOBE, K.; YAGI, T.; SAKURA, H.; HAYAKAWA, T.; TERAUCHI, Y.; UEKI, K.; KABURAGI, Y.; SATOH, S.Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. **Nature**, v. 372, p. 182-186, 1994.

TANIGUSHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Review – critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 7, p. 85-93, Febr.2006.

TERAUCHI, Y.; TSUJI, Y.; SATOH, S.; MINOURA, H.; MURAKAMI, K.; OKUNO, A.; INUKAI, K.; ASANO, T.; KABURAGI, Y.; UEKI, K.; NAKAJIMA, H.;, HANAFUSA, T.; MATSUZAWA, Y.; SEKIHARA, H.; YIN, Y.; BARRETT, J. C.; ODA, H.; ISHIKAWA, T.; AKANUMA, Y.; KOMURO, I.; SUZUKI, M.; YAMAMURA, K.; KODAMA, T.; SUZUKI, H.; YAMAMURA, K.; KODAMA, T.; SUZUKI, H.; KOYASU, S.; AIZAWA, S.; TOBE, K.; FUKUI, Y.; YAZAKI, Y.; KADOWAKI, T.Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85αsubunit of phosphoinositide 3−kinase. **Nat. Genet.**, v. 21, p. 230-235, 1999.

TORTORIELLO, D. V.; MCMINN, J. E.; CHUA, S. C. Increased expression of hypothalamic leptin receptor and adiponectin accompany resistance to dietary-induced obesity and infertility in female C57BL/6J mice. **Int. J. Obes.**, v. 31 p. 395-402, 2007.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Biotechnology**, v. 24, p. 145-149, 1992.

UEKI, K.; FRUMAN, D. A.; YBALLE, C. M.; FASSHAUER, M.; *et al.*, Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 48453-66, 2003.

UENO, BEZERRA, R. M.; SILVA, M. S.; TAVARES, D. Q.; CARVALHO, C. R.; SAAD, M. J. .A high-fructose diet induces changes in pp185 phosphorylation in muscle and liver of rats. Bras. **J. Med. Biol.**, v.33, p. 1421-1427, 2000.

UMEZAWA, M.; SAKATA, C.; TANAKA, N.; KUDO, S.; TABATA, M.; TAKEDA, K.; IHARA, T.; SUGAMATA, M. Cytokine and chemokine expression in a rat endometriosis is similar to that in human endometriosis. **Cytokine**, v. 43, p. 105–109, 2008.

VELLOSO, L. A. O controle hipotalâmico da fome e da termogênese – implicações no desenvolvimento da obesidade. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, p. 165-176, 2006.

VELLOSO, L. A., ARAÚJO, E. P.; DE SOUZA, C. T. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, p. 189-193, 2008.

VIRKAMAKI, A.; UEKI, K.; KAHN, C. R. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 103, p. 931-943, 1999.

XITA, N.; TSATSOULIS, A. Review: fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, p. 1660–1666, 2009

WHITE, M. F.; KAHN, C .R. The insulin signaling system. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 1-4, 1994.

WHITERS, D.J.; GUTIERREZ, J. S.; TOWERY, H.; BURKS, D. J.; REN, J. M.; PREVIS, S.; ZHANG, Y.; BERNAL, D.; PONS, S.; SHULMAN, G. I.; BONNER-WEIR, S.; WHITE, M. F..Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**, v. 391, p. 900-904, 1998.

WINZELL, M. S.; AHRÉN, B. The hight-fat diet-fed mouse: A model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. S215-S219, 2004.

WESTWOOD, F. R. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. **Toxicol. Pathol.**, v. 36, p. 375-384, 2008.

ZHAO, R.; FUENTES-MATTEI, E.; VELAZQUEZ-TORRES, G.; SU, C. H.; CHEN, J.; LEE, M. H.; YEUNG, S. C.Exenatide improves glucocorticoid induced glucose intolerance in mice. **Diabetes, Metab. Syndr. Obes.**, v.4, p. 61–65, 2011.

ZECCHIN, H. G.; CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. **Rev. Soc. Cardiol.**, v. 14 , 2004.

ANEXO 1

As Tabelas 2 e 3 apresentam as médias das análises das densitometrias das bandas identificadas correspondentes ao IR, IRS-1, IRS-2, PI3K e AKT1 em músculo e hipotálamo separados por duas fases do ciclo estral, estro e diestro dos grupos 4m, DHL e 10m.

Tabela 2: Expressão das proteínas da via de sinalização da insulina em hipotálamo e músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeas em duas diferentes fases do ciclo estral: Diestro e Estro.

	Grupos			
	4m		**DHL**	
Proteínas	**Estro**	**Diestro**	**Estro**	**Diestro**
IR hipotálamo	100 ± 76 (2)	207 ± 0 (1)	271 ± 13 (2)	401 ± 162 (3)
IR gastrocnêmio	100 ± 26 (3)	146 ± 0 (1)	110 ± 12 (3)	113 ± 0 (1)
IRS-1 hipotálamo	100 ± 0 (1)	129 ± 49 (7)	162 ± 7 (3)	163 ± 12 (3)
IRS-1 gastrocnêmio	100 ± 33 (7)	56 ± 19 (2)	105 ± 38 (6)	60 ± 30 (4)
IRS-2 hipotálamo	100 ± 20 (4)	62 ± 41 (4)	76 ± 39 (10)	76 ± 29 (5)
IRS-2 gastrocnêmio	100 ± 27 (3)	32 ± 0 (1)	107 ± 42 (3)	84 ± 0 (1)
PI3K hipotálamo	100 ± 23 (4)	104 ± 22 (7)	191 ± 159 (5)	207± 142 (6)
PI3K gastrocnêmio	100 ± 35 (8)	105 ± 50 (7)	128 ± 36 (9)	142 ± 18 (5)
AKT-1 hipotálamo	100 ± 24 (5)	94 ± 20 (7)	120 ± 20 (5)	115 ± 48 (6)
AKT-1 gastrocnêmio	100 ± 47 (4)	157 ± 0 (1)	159 ± 29 (3)	170 ± 17 (3)

Valores representados pela média em porcentagem ± desvio padrão. O número de animais está entre parênteses.

* Valores com diferenças significativas quando comparados entre os quatro grupos, *p<0.05.*

Tabela 3: Expressão das proteínas da via de sinalização da insulina em hipotálamo e músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeas em duas diferentes fases do ciclo estral: Diestro e Estro.

	Grupos			
	4m		**10m**	
Proteínas	**Estro**	**Diestro**	**Estro**	**Diestro**
IR hipotálamo	100 ± 23 (6)	105 ± 16 (6)	81 ± 23 (13)	79 ± 23 (12)
IR gastrocnêmio	100 ± 30 (12)	97 ± 21 (7)	83 ± 33 (19)	110 ± 33 (12)
IRS-1 hipotálamo	100 ± 02 (2)	86 ± 28 (5)	84 ± 26 (11)	76 ± 18 (11)
IRS-1 gastrocnêmio	100 ± 32 (12)	134 ± 45 (7)	115 ± 43 (19)	147 ± 26* (12)
IRS-2 hipotálamo	100 ± 20 (4)	62 ± 41 (4)	76 ± 39 (10)	76 ± 29 (5)
IRS-2 gastrocnêmio	100 ± 27 (4)	131 ± 26 (4)	102 ± 20 (10)	108 ± 26 (5)
PI3K hipotálamo	100 ± 11 (6)	107 ± 28 (6)	96 ± 14 (13)	97 ± 13 (12)
PI3K gastrocnêmio	100 ± 23 (10)	125 ± 38 (9)	110 ± 47 (11)	137 ± 20 (7)
AKT-1 hipotálamo	100 ± 32 (8)	126 ± 25 (6)	110 ± 2 (16)	95 ± 22 (13)
AKT-1 gastrocnêmio	100 ± 54 (6)	107 ± 47 (6)	74 ± 36 (15)	89 ± 20 (9)

Valores representados pela média em porcentagem ± desvio padrão. O número de animais está entre parênteses.
*Valores com diferenças significativas quando comparados entre os quatro grupos, *$p<0.05$.*