Jorge Vinícius Cestari Felix

**Estudo das vias intracelulares de sinalização
da insulina e da angiotensina-II no hipotálamo
de ratas grávidas e lactantes**

Tese apresentada ao Departamento de
Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

Jorge Vinícius Cestari Felix

**Estudo das vias intracelulares de sinalização da
insulina e da angiotensina-II no hipotálamo de ratas
grávidas e lactantes**

Tese apresentada ao Departamento de
Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador(a): Prof^a Dr^a Silvana A. Bordin

Versão original

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Felix, Jorge Vinícius Cestari.

Estudo das vias intracelulares de sinalização da insulina e da angiotensina-II no hipotálamo de ratas grávidas e lactantes / Jorge Vinícius Cestari Felix. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Mecanismos moleculares de sinalização da insulina no hipotálamo e o cross-talk com a angiotensina-II, na gravidez.

Versão do título para o inglês: Study of the intracellular signaling pathways of insulin and angiotensin-II in the hypothalamus of pregnant and lactating rats.

1. Gravidez 2. Lactação 3. Insulina 4. Angiotensina-II 5. Hipotálamo 6. Homeostasia Glicêmica I. Silva, Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB084/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Jorge Vinícius Cestari Felix.

Título da Tese: Estudo das vias intracelulares de sinalização da insulina e da angiotensina-II no hipotálamo de ratas grávidas e lactantes.

Orientador(a): Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep: 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.009.08

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 063/06/CEEA, datado de 02.06.06 e por solicitação da Profa. Dra. SILVANA A BORDIN SILVA, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno JORGE VINÍCIUS CESTARI FELIX ao projeto de pesquisa **"Cooperação entre as vias JAK-STAT e o receptor de glicocorticóide na regulação da expressão gênica de ilhotas pancreáticas"**, uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 07 de março de 2008.

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

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me apoiaram
e que criaram na minha vida pessoal as condições
necessárias que permitiram a sua realização.
Em especial à minha esposa Morgana, pelo apoio e incentivo
incondicional e constante para minha formação
e crescimento pessoal e profissional.
À minha mãe Therezinha que sempre me apoiou em tudo.
Ao meu pai Jorge Felix (em memória).
Tenho certeza que ficaria orgulhoso!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a Silvana, pela oportunidade, amizade e paciência.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Trindade da Biocel - UFPR pela importante colaboração e auxílio, na realização da imunofluorescência, sem o qual o desenvolvimento deste trabalho teria sido impossível. Muito obrigado! Acima de tudo por sua amizade e pela simpatia com que sempre me recebeu em seu laboratório!

Ao Prof. Dr. Maurílio José Soares – FIOCRUZ – Curitiba, pelo auxílio na aquisição das imagens em microscópio confocal.

Aos professores do Departamento de Enfermagem da UFPR que me incentivaram e apoiaram nesta grande empreitada.

Aos alunos do Prof. Edvaldo: Lucas, Victor, Stelle, Gustavo, Rafael e Francine. Muito obrigado pelo auxílio de vocês.

Ao pessoal da *golden age* do laboratório da Silvana: Zé Edgar, Camilo, Carla, Fernando, Tati Storm, Luciana, Gabriel, Ana et al. Muito obrigado por tudo. Este trabalho tem um pouquinho de cada um de vocês! Saudades de vocês...

Ao Mário, pelo auxílio na realização de alguns experimentos importantes.

Ao Lucas pelo auxílio com os experimentos de ingestão alimentar. Valeu!

A Adriana Leite pelo auxílio num dos momentos mais críticos de todo esse processo.

Obrigado pelo apoio e empenho!

A todos os amigos do ICB que fizeram parte dessa história e que me lembrarei com carinho.

Ao Zé Luís, ao Adilson e à Teka, pelo apoio técnico e pela amizade de vocês.

A todos os professores do ICB, que de alguma maneira contribuíram para meu aprendizado de Fisiologia e para meu crescimento científico e intelectual.

A todos os funcionários do ICB e em especial ao José Maria pelo suporte na secretaria da Pós-Graduação.

A toda minha família que sempre me incentivou em tudo, em especial a Tati, Mazé, Beto e Bruno.

A minha irmã Lula que me deu meu primeiro livro de Fisiologia ainda na Faculdade. Tenho certeza que você não imaginou onde isso iria parar...

A minha mãe Therezinha a quem devo antes de tudo a vida e que sempre me apoiou e acreditou em mim... Muito obrigado mãe!

A minha esposa Morgana que a cada dia me incentivou, apoiou e acreditou em mim, mesmo quando eu mesmo não acreditava! Que suportou minha ausência (e principalmente meu mau-humor) em todos os momentos em que precisei me dedicar integralmente a este trabalho. Sem o seu apoio tudo isso teria sido impossível! Obrigado por tudo! Te amo!

*Só temos consciência do belo,
Quando conhecemos o feio.
Só temos consciência do bom,
Quando conhecemos o mau.
Porquanto, o Ser e o Existir,
Se engendram mutuamente.
O fácil e o difícil se completam.
O grande e o pequeno são complementares.
O alto e o baixo formam um todo.
O som e o silêncio formam a harmonia.
O passado e o futuro geram o tempo.
Eis porque o sábio age
Pelo não agir.
E ensina sem falar.
Aceita tudo o que lhe acontece.
Produce tudo e não fica com nada.
O sábio tudo realiza – e nada considera seu.
Tudo faz – e não se apega a sua obra.
Não se prende aos frutos da sua atividade.
Termina a sua obra e está sempre no princípio.
E por isto a sua obra prospera.*

Atribuído a LAO-TSE, Século VI a.C.

RESUMO

FELIX, J. V. C. **Estudo das vias intracelulares de sinalização da insulina e da angiotensina-II no hipotálamo de ratas grávidas e lactantes.** 2012. 115 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A gestação é um período em que a fêmea é transitoriamente submetida a uma série de alterações em todo o organismo, resultando num quadro semelhante à síndrome metabólica, mas que são cuidadosamente reguladas de modo a fornecer o suprimento adequado de substratos para a mãe e para o feto. A gravidez caracteriza-se como modelo fisiológico e temporalmente definido de resistência à insulina. Já durante a lactação, observa-se hipersensibilidade sistêmica à ação da insulina. A ativação de vias de sinalização da insulina no cérebro, em particular no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), tem importante papel na regulação da homeostasia glicêmica. Já está bem estabelecido que a Ang-II é capaz de induzir a fosforilação em serina do IR e do IRS. No entanto, ainda não foi esclarecido se ocorrem alterações na via de sinalização da insulina em áreas do sistema nervoso central (SNC) responsáveis pelo controle da homeostasia glicêmica, como é o caso do ARC, do núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH) e do núcleo paraventricular (PVN) durante a gestação, que poderia contribuir para o quadro de resistência à insulina nesta situação. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão das proteínas de sinalização intracelular da insulina IRS1-2, PI3K (p85 α , p55 α , p50 α), AKT, p-Ser⁴⁷³AKT e dos receptores IR, e AT1a no hipotálamo total e no ARC, VMH e PVN na gravidez e na lactação. Investigou-se também o possível *cross-talk* da via de sinalização da insulina e da Angiotensina-II (Ang-II) no hipotálamo. Observou-se a redução da expressão do IRS-2, da AKT e da p-Ser⁴⁷³AKT, concomitante com o aumento da expressão das subunidades regulatórias p85 α , p55 α , p50 α da PI3K e do receptor AT1a no hipotálamo na gravidez. No ARC, VMH e PVN observou-se co-localização da p85 α e do receptor AT1a, bem como aumento da expressão de ambos nessas regiões, nas ratas grávidas. O tratamento crônico com antagonista AT1 (losartan) produziu, nas grávidas redução significativa da expressão deste receptor, sem causar alteração na expressão da p85 α . A disfunção das vias da Ang-II e da insulina em graus variados pode levar a duas condições patológicas de alta prevalência e que muitas vezes são concomitantes: diabetes mellitus e hipertensão arterial. A melhor compreensão das alterações hipotalâmicas nas vias de sinalização da insulina e da Ang-II, bem como a caracterização molecular dessa interação, tanto nas situações

fisiológicas (por exemplo na gravidez) como nas situações patológicas, poderá revelar alvos para futuras intervenções terapêuticas para diversas condições clínicas como a obesidade, o diabetes, a hipertensão arterial, a pré-eclâmpsia/eclâmpsia, etc...

Palavras-chave: Gravidez. Lactação. Insulina. Angiotensina-II. Hipotálamo. Resistência à Insulina. Homeostasia Glicêmica.

ABSTRACT

FELIX, J. V. C. **Study of the intracellular signaling pathways of insulin and angiotensin-II in the hypothalamus of pregnant and lactating rats.** 2012. 115 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Pregnancy is a period in which the female is temporarily exposed to a series of changes throughout the body, resulting in a condition similar to the metabolic syndrome, but that are carefully regulated to provide an adequate supply of substrates for the mother and the fetus. Pregnancy is characterized as defined in time and a physiological model of insulin resistance. Although during lactation, there is a systemic hypersensitivity to insulin. Activation of the insulin signaling pathways in the brain, particularly in the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC), plays an important role in glucose homeostasis. It is well established that angiotensin II (Ang-II) cross-talking to the insuling signaling pathway is capable of inducing serine phosphorylation of IR and IRS. However, it is not clear whether there are changes in the insulin signaling pathway in areas of the central nervous system (CNS) responsible for homeostasis and glycemic control, such as the ARC, the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) and the paraventricular nucleus (PVN) during pregnancy, which could contribute to the symptoms of insulin resistance in this situation. The objective of this study was to evaluate the expression of intracellular insulin signaling proteins such as IRS1-2, PI3K (p85 α , p55 α , p50 α), AKT, p-Ser⁴⁷³AKT and the expression of IR and AT1a receptors in the hypothalamus, and also specifically in the ARC, VMH and PVN during pregnancy and lactation. We also investigated the possible cross-talk of the insulin and Ang II signaling pathways within the hypothalamus. There was a reduction in IRS-2, AKT and p-Ser⁴⁷³AKT expression concomitant with increased expression of regulatory subunits p85 α , p55 α , PI3K p50 α and AT1a receptor in the hypothalamus in late pregnant rats. In the ARC, VMH and PVN it was observed co-localization of p85 α and AT1a receptor, and increased expression of both in these regions in pregnant rats. Chronic treatment with AT1 antagonist (losartan) produced a significant reduced expression of this receptor, without causing any changes in the expression of p85 α . The dysfunction of the Ang-II and insulin pathways can lead in different degrees to two conditions of high prevalence and often concomitant diseases such as diabetes mellitus and hypertension. A better understanding of the hypothalamic changes in insulin signaling pathways, the cross-talk with Ang-II and the molecular characterization of

this interaction both in physiological (for example in pregnancy) and pathological situations may provide targets for future therapeutic intervention for various clinical conditions such as obesity, diabetes, hypertension, pre-eclampsia/eclampsia, etc...

Keywords: Pregnancy. Lactation. Insulin. Angiotensin-II. Hypothalamus. Insulin Resistance. Glucose Homeostasis.

LISTA DE ABREVIATURAS

5- HT: serotonina

AgRP: agouti-related peptide

Ang-I: angiotensina-I

Ang-II: angiotensina-II

Ang-III: angiotensina-III

Ang-IV: angiotensina-IV

Ang-(1-7): angiotensina 1-7

AP: área postrema

ARC: núcleo arqueado do hipotálamo

AT-1: receptor do tipo 1 da angiotensina-II

AT-2: receptor do tipo 2 da angiotensina-II

CART: cocaine amphetamine related transcript

CRH: hormônio liberador de corticotrofina

DAG: diacilglicerol

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

DMH: núcleo hipotalâmico dorsomedial

DMV: núcleo dorsal motor do vago

ECA: enzima conversora de angiotensina

ECA-2: enzima conversora-2 de angiotensina

ER: receptor de estrógeno

ER- α : receptor de estrógeno- α

FOXO1: Forkhead box O1 – fator de transcrição

GH: hormônio do crescimento

GLUT- 4: transportador de glicose-4

HA: hipertensão arterial

ICV: via intracerebroventricular

IP3: trifosfato de inositol

IR: receptor da insulina

ERK: extracellular signal – regulated kinase

IRS: substrato do receptor da insulina
IRS1: substrato do receptor da insulina-1
IRS2: substrato do receptor da insulina-2
IRS3: substrato do receptor da insulina-3
IRS4: substrato do receptor da insulina-4
JAK-2: janus kinase-2
LepR: receptor da leptina
MAPK: mitogen – activated protein kinase
MasR: receptor Mas da Ang 1 – 7
ME: eminência mediana
MnPO: núcleo pré-óptico mediano
NPY: neuropeptídeo-Y
NTS: núcleo do trato solitário
OVLT: órgão vascular da lâmina terminal
p110: subunidade catalítica da PI3K
p50 α : subunidade regulatória p50 α da PI3K
p55 α : subunidade regulatória p55 α da PI3K
p85 α : subunidade regulatória p85 α da PI3K
PA: pressão arterial
PEG: produção endógena de glicose
PHG: produção hepática de glicose
PI3K: fosfatidilinositol 3- Kinase
PIP2: fosfatidilinositol bifosfato
PKB ou AKT: proteína kinase-B
PLC- γ : fosfolipase C-gama
PLC- β : fosfolipase C-beta
POMC: proopiomelanocortina
PRL: prolactina
PRLR: receptor de prolactina
PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo
REN: renina

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

Ser: serina

SFO: órgão subfornical

SH2: Src homology

SHR: ratos espontaneamente hipertensos

SNC: sistema nervoso central

SOCS-3: supressor of cytokin signaling-3

SRA: sistema renina- angiotensina

Src: Src homology collagen

STAT-3: signal transducer and activator- of transcription 3

t-PA: ativador de plasminogênio tecidual

TSH: tireotrofina ou hormônio tireo-estimulante

Tyr: tirosina

V1: receptor V1 da vasopressina

VMH: núcleo hipotalâmico ventromedial

VMHc: núcleo hipotalâmico ventromedial porção central

VMHdm: núcleo hipotalâmico ventromedial porção dorsomedial

VMHvl: núcleo hipotalâmico ventromedial porção ventrolateral

VP: vasopressina

α -MSH : hormônio estimulador de α -melanócito

LISTA DE FIGURAS

Esquema 1- Representação esquemática da ação central da insulina no hipotálamo e a circuitaria neural envolvida no controle da produção de glicose pelo fígado.....	24
Figura 1- Expressão/conteúdo do receptor de insulina (IR) no hipotálamo.....	45
Figura 2- Expressão/conteúdo do substrato do receptor de insulina-1 (IRS1) no hipotálamo.....	46
Figura 3- Expressão do substrato do receptor de insulina-2 (IRS-2) no hipotálamo.....	47
Figura 4- Expressão da subunidade P85 α da PI3K no hipotálamo.....	48
Figura 5- Expressão da subunidade P55 α da PI3K no hipotálamo.....	48
Figura 6- Expressão da subunidade P50 α da PI3K no hipotálamo.....	49
Figura 7- Expressão da AKT total no hipotálamo.....	50
Figura 8- Fosforilação em Serina (p-Ser ⁴⁷³) da AKT-1,2,3 no hipotálamo.....	50
Figura 9- Expressão/conteúdo do receptor AT1a da ANG-II no hipotálamo.....	51
Figura 10- Efeito do tratamento crônico com Losartan (10mg/kg/dia, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão/conteúdo do receptor AT1a da ANG-II no hipotálamo.....	52
Figura 11- Efeito do tratamento crônico com Losartan (10mg/kg/dia, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão/conteúdo da subunidade P85 α da PI3K no hipotálamo.....	53
Figura 12- Efeito do tratamento crônico com Losartan (10mg/kg/dia, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão/conteúdo da subunidade P55 α da PI3K no hipotálamo.....	54
Figura 13- Efeito do tratamento crônico com Losartan (10mg/kg/dia, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão/conteúdo da subunidade P50 α da PI3K no hipotálamo.....	55
Figura 14- Efeito do tratamento crônico com Losartan (10mg/kg/dia, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão/conteúdo da AKT total no hipotálamo.....	55
Figura 15- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência observadas no núcleo arqueado do hipotálamo no grupo controle tratado com veículo.....	57
Figura 16- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência observadas no núcleo arqueado do hipotálamo no grupo controle tratado com losartan.....	58

Figura 17- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência observadas no núcleo arqueado do hipotálamo, nas grávidas (G19) tratadas com veículo.....	59
Figura 18- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência observadas no núcleo arqueado do hipotálamo, nas grávidas (G19) tratadas com losartan.....	60
Figura 19- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência, observadas no núcleo hipotalâmico ventromedial porção dorsomedial, no grupo controle tratado com veículo.....	61
Figura 20- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência, observadas no núcleo hipotalâmico ventromedial porção dorsomedial, no grupo controle tratado com losartan.....	62
Figura 21- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência, observadas no núcleo hipotalâmico ventromedial porção dorsomedial, nas grávidas (G19) tratadas com veículo.....	63
Figura 22- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência, observadas no núcleo hipotalâmico ventromedial porção dorsomedial, nas grávidas (G19) tratadas com losartan.....	64
Figura 23- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan sobre a expressão do receptor AT1a no ARC.....	66
Figura 24- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan sobre a expressão do receptor AT1a no VMHdm.....	67
Figura 25- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan sobre a expressão da subunidade p85 α no ARC.....	69
Figura 26- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan sobre a expressão da subunidade p85 α no VMHdm.....	70
Figura 27- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan sobre a co-localização da subunidade p85 α e do receptor AT1a no ARC.....	72
Figura 28- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan sobre a co-localização da subunidade p85 α e do receptor AT1a no VMHdm.....	73
Figura 29- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência observadas no núcleo paraventricular do hipotálamo, no grupo controle tratado com veículo.....	75
Figura 30- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência observadas no núcleo paraventricular do hipotálamo, no grupo controle tratado com losartan.....	76

Figura 31- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência observadas no núcleo paraventricular do hipotálamo, no grupo grávidas tratadas com veículo.....	77
Figura 32- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência observadas no núcleo paraventricular do hipotálamo, no grupo grávidas tratadas com losartan.....	78
Figura 33- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan sobre a expressão do receptor AT1a no PVN.....	80
Figura 34- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan sobre a expressão da subunidade p85 α no PVN.....	81
Figura 35- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan sobre a co-localização da subunidade p85 α e do receptor AT1a no PVN.....	82
Figura 36- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan ou veículo sobre a evolução do peso corporal.....	85
Figura 37- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan ou veículo sobre a evolução da ingestão alimentar.....	87
Figura 38- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan ou veículo sobre o consumo de alimento, expresso na razão consumo (g)/peso (kg).....	88

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 O cérebro como órgão sensível a insulina.....	22
1.2 Mecanismos moleculares de sinalização da insulina.....	24
1.3 Mecanismos moleculares de sinalização da insulina no cérebro.....	26
1.4 Resistência à insulina: <i>cross-talk</i> da via de sinalização da insulina com outras vias hormonais.....	27
1.5 O sistema renina-angiotensina cerebral.....	30
1.6 Homeostasia glicêmica na gestação e lactação: a gravidez como modelo de resistência à insulina.....	31
2 JUSTIFICATIVA.....	34
3 OBJETIVOS.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Animais.....	39
4.2 Isolamento do tecido e Western blot.....	40
4.3 Imunofluorescência.....	41
4.4 Avaliação da ingestão alimentar e do peso dos animais.....	42
4.5 Análise estatística.....	42
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Avaliação da expressão hipotalâmica das proteínas da via de sinalização da insulina e do AT1a na gravidez e na lactação.....	45
5.2 Efeito do tratamento crônico com losartan sobre a expressão de AKT, PI3K e AT1a no hipotálamo, na gravidez.....	52
5.3 Imunofluorescência.....	56
5.4 Avaliação do peso e da ingestão alimentar.....	85
6 DISCUSSÃO.....	89
7 CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS.....	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 O cérebro como órgão sensível a insulina

A primeira evidência de que o sistema nervoso central (SNC) estaria envolvido no controle glicêmico foi demonstrada por Claude Bernard em 1849. Ele reportou a *Société de Biologie* os achados de que lesões no hipotálamo eram capazes de provocar hiperglicemia tanto em coelhos como em cachorros (BERNARD, 1854 apud CONTI, 2002)¹. Desde então, entender como o cérebro atua no controle do metabolismo hepático tornou-se um grande desafio. O papel da insulina na homeostasia energética foi sugerido há mais de 30 anos atrás, quando se demonstrou que injeções intracerebroventriculares (ICV) de insulina regulavam a ingestão alimentar e a adiposidade em babuínos (WOODS et al., 1979). Estudos um pouco mais recentes mostraram que o cérebro produz uma profunda estimulação do sistema nervoso autônomo em resposta à insulina, levando a alterações metabólicas e cardiovasculares (DAVIS et al., 1997). O papel específico do hipotálamo no controle da produção endógena de glicose hepática (PHG) foi primeiramente sugerido a partir da observação de que microinjeções de insulina no núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH) levavam à redução da concentração plasmática de glicose e, ainda, que este efeito requeria a inervação hepato-vagal intacta (SZABO et al., 1983).

A insulina secretada pelas células β -pancreáticas tem como ação primária a diminuição rápida dos níveis plasmáticos de glicose. Este efeito é decorrente da promoção de um maior uso de glicose pelos diversos tecidos do organismo, bem como pela supressão de sua produção endógena. A inibição da PHG pela insulina é mediada tanto por sua ação direta nos hepatócitos (SINDELAR et al., 1997, 1998), como pela ativação de vias extra-hepáticas de sinalização de insulina que, por sua vez, inibem a produção de glicose via mediadores neurais e/ou hormonais (LEWIS et al., 1997; OBICI et al., 2002). A ativação de vias de sinalização da insulina no cérebro, em particular no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), tem importante papel na regulação da homeostasia glicêmica. Mesmo na ausência de níveis elevados de insulina sistêmicos, a ativação das vias de sinalização no ARC é suficiente para produzir a diminuição da concentração plasmática de glicose, devido a uma significativa redução da produção hepática de glicose (OBICI et al., 2002).

¹ BERNARD, C. Leçons de physiologie expérimentale appliquées à la médecine. Paris: Baillière et Fils, 1854

Por outro lado, o bloqueio da ação da insulina no ARC, seja pela utilização de oligonucleotídeos antisense dirigidos ao receptor de insulina ou pela inibição farmacológica da ativação da phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), levam a diminuição da capacidade da insulina de suprimir a PHG (OBICI et al., 2002). Estas observações sugerem que a ação hipotalâmica da insulina é necessária para que a insulina sistêmica exerça total efeito inibitório sobre a PHG. Além disso, foi demonstrado que as ações centrais da insulina requerem a completa atividade da cascata de sinalização do hormônio, envolvendo a ativação do receptor da insulina (IR), do substrato do receptor da insulina (IRS), e da PI3K (OBICI et al., 2002; POCAI et al., 2005).

No ARC, a insulina pode alterar a liberação e biossíntese de alguns neuropeptídeos, como α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) e neuropeptídeo Y (NPY) (SCHARTZ et al., 1992). Além disto, pode ativar os canais de K^+ sensíveis a ATP (K^+_{ATP}) (SPANSWICK et al., 2000) o que, *per se*, pode ser capaz de reduzir a concentração plasmática de glicose através da inibição hepática da gliconeogênese (POCAI et al., 2005). O ARC envia projeções, para o núcleo dorsal motor do vago (DMV), na região dorsal do bulbo, que leva as informações centrais, via projeções eferentes, para o fígado, através do nervo vago. A vagotomia seletiva do ramo hepático leva à perda de 50% do efeito inibitório da insulina sobre a produção de glicose (POCAI et al., 2005). Em conjunto, esses dados sugerem fortemente que a diminuição da PHG pela ação central da insulina no ARC é mediada pela ativação de canais de K^+_{ATP} .

A ação da insulina no hipotálamo leva, portanto, à redução da PHG. A insulina circulante suprime agudamente a produção de glicose através de sua ação direta no fígado e também, através de seu transporte (não-consensual) pela barreira hemato-encefálica, via ativação de circuitos neurais no ARC. A ativação da via IRS/PI3K pela insulina, seguida da ativação de canais K^+_{ATP} são etapas necessárias para a transmissão de sinais neurais eferentes para o fígado. A sinalização hipotalâmica pela insulina é transmitida por sinapses ao núcleo dorsal motor do vago (DMV) no bulbo de onde a informação chegará ao fígado através de fibras eferentes vagais (PRODI; OBICI, 2006) [Esquema 1].

Esquema 1- Representação esquemática da ação central da insulina no hipotálamo e a circuitaria neural envolvida no controle da produção de glicose pelo fígado.

FONTE: Prodi; Obici (2006).

1.2 Mecanismos moleculares de sinalização da insulina

A insulina é um hormônio peptídico de 51 aminoácidos, sintetizado e secretado pelas células β -pancreáticas em resposta a elevação plasmática dos níveis de glicose. Esse hormônio controla funções energéticas vitais, *i.e.*, o metabolismo da glicose, de proteínas e de lipídios. As ações biológicas da insulina são mediadas por receptores de membrana celular, que apresentam atividade tirosina quinase intrínseca. O receptor da insulina (IR) é uma proteína heterotetramérica formada por duas subunidades α extracelulares, dispostas simetricamente e que se ligam, cada uma delas, por pontes de dissulfeto a uma subunidade β transmembrânica, com domínio intracelular, que possui atividade tirosina quinase intrínseca (SALTIEL; KAHN, 2001).

A ligação da insulina a subunidade α do receptor induz a autofosforilação da subunidade β . A ativação do IR leva a fosforilação de substratos intracelulares incluindo a família dos

substratos do receptor da insulina (IRS1-4), *Src homology collagen* (Src) e *Janus kinase-2* (JAK-2), que por sua vez servem como proteínas de ancoramento capazes de ativar diferentes vias de sinalização (MYER; WHITE, 2002; SAAD et al., 1996; SALTIEL; KAHN, 2001; TANIGUSHI; EMANUELLI; KAHN, 2006; VELLOSO et al., 1998). Duas principais vias são ativadas. A via da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)/*extracellular signal-regulated kinase* (ERK), que regula a expressão gênica e o crescimento celular, e a via da *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)/AKT, que está preferencialmente envolvida na maioria das ações metabólicas da insulina (MYERS; WHITE, 2002; SALTIEL; KAHN, 2001; TANIGUSHI; EMANUELLI; KAHN, 2006). A PI3K é um heterodímero composto de subunidades regulatórias e catalíticas. A maioria dos tecidos expressa duas formas das subunidades regulatórias, p85 α e p85 β e duas formas das subunidades catalíticas, p110 α e p110 β (SHEPHERD; WITHERS; SIDDLE, 1998). A ativação da PI3K estimulada pela insulina é iniciada quando proteínas IRS são fosforiladas em múltiplos resíduos de tirosina (Tyr), decorrentes da ativação do IR. Após a fosforilação em Tyr, os IRS funcionam como proteínas de ancoramento para moléculas contendo domínio *Src homology* (SH2), incluindo a PI3K. A interação entre os IRS e a PI3K ocorre através da subunidade regulatória p85 da enzima, e resulta no aumento da atividade catalítica da subunidade p110. A PI3K é essencial para diversos processos metabólicos induzidos pela insulina, principalmente através da ativação da proteína quinase B (PKB), também chamada de AKT. A AKT atua como um intermediário multifacetado entre os sinais advindos da ativação do IR, e os sinais a serem transmitidos à jusante até os efetores biológicos (SALE; SALE, 2008; SALTIEL; KAHN, 2001).

A adequada sinalização através da PI3K depende criticamente do adequado balanço estequiométrico entre as subunidades regulatórias e catalíticas. Foi demonstrado que quando a subunidade regulatória p85 é mais abundante do que a subunidade catalítica p110, ocorre uma piora na efetividade da via de sinalização devido à competição entre o monômero p85 e o dímero p85-p110 (UEKI et al., 2002). Por outro lado, a redução da expressão da subunidade regulatória p85 α modula o balanço molecular entre esta e a subunidade catalítica p110, levando ao aumento da fosforilação e atividade da AKT, resultando em melhora da sensibilidade à insulina (MAUVAIS-JARVIS et al., 2001).

1.3 Mecanismos moleculares de sinalização da insulina no cérebro

Assim como nos tecidos periféricos, a insulina atua no cérebro através de seu receptor IR ativando a via IRS/PI3K/AKT, bem como a via da MAPK/ERK (NISWENDER; BASKIN; SWARTZ, 2004; PLUM; BELGARDT; BRUNING, 2006). A sinalização pela PI3K é criticamente importante na mediação dos efeitos da sinalização da insulina no hipotálamo na regulação da PHG (OBICI et al., 2002). Além da insulina, a leptina também age no ARC, regulando a ingestão alimentar e o gasto energético (HALAAS et al., 1995; SCHARTZ et al., 2000). De fato, a obesidade está fortemente relacionada à resistência insulínica, e observa-se marcante melhora na sensibilidade à insulina em ratos após a administração central de leptina (HALAAS et al., 1997).

Diversas linhas de evidências sugerem que as ações centrais da leptina, assim como da insulina, regulam o balanço energético e a homeostasia glicêmica através de vias neurais que, ao menos em parte, se sobrepõem. A ligação da leptina ao seu receptor (LepR) leva à ativação da cascata de sinalização envolvendo a Janus kinase-2 (JAK-2) e a *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) (BATES; MYERS, 2004; BJORBAEK et al., 1997). Estudos um pouco mais recentes sugerem ainda que a leptina, assim como a insulina, ativa a via IRS-PI3K (NISWENDER et al., 2001, 2003). A ação da leptina no ARC leva a estimulação de neurônios produtores de proopiomelanocortina (POMC), e a inibição de neurônios positivos para o neuropeptídeo Y (NPY)/*agouti-related peptide* (AgRP) (NPY/AgRP positive neurons). Os efeitos centrais da leptina no fluxo hepático de glicose podem ser divididos naqueles que são mediados pela ativação da via da melanocortina, que causa aumento da gliconeogênese, e aqueles que são melanocortina-independentes, que levam a redução da glicogenólise (GUTIERRES-JUAREZ; OBICI; ROSSETTI, 2004).

As vias neurais e moleculares da sinalização da leptina, envolvendo o circuito do hipotálamo até sua conexão com o fígado, ainda não foram totalmente esclarecidas. Tanto a leptina quanto a insulina ativam a PI3K no hipotálamo, e esta via de sinalização tem sido considerada importante tanto no controle do comportamento de ingestão alimentar quanto no controle da homeostasia glicêmica (NISWENDER et al., 2003; OBICI et al., 2002). A ativação da PI3K induz tanto efeitos de membrana, como efeitos genômicos (CARVALHEIRA et al., 2001; HARVEY et al., 2000; NISWENDER; SCHWARTZ, 2003; PORTE; BASKIN; SCHWARTZ,

2005). A insulina no hipotálamo se liga a seus receptores tanto em neurônios POMC/CART como em neurônios NPY/AgRP, ativando, em ambos, a via IRS/PI3K/AKT. A AKT ativada fosforila e inativa a proteína *forkhead Box O1* (FOXO1). Em neurônios POMC isto leva ao aumento da expressão da POMC, enquanto que em neurônios AgRP, produz uma diminuição da transcrição de AgRP mediada pela FOXO1 (PLUM; BELGARDT; BRUNING, 2006).

1.4 Resistência à insulina: *cross-talk* da via de sinalização da insulina com outras vias hormonais

A resistência a insulina é definida como uma resposta biológica menor do que a esperada a uma dada concentração do hormônio. É uma condição clínica muito prevalente, e comumente observada na obesidade, no diabetes mellitus tipo 2 (DM2), na hipertensão arterial (HA), na síndrome metabólica, em quadros infecciosos, dentre outros (KAHN; FLIER, 2000; PESSIN; SALTIEL, 2000; REAVEN, 2004). A hiperinsulinemia compensatória pode ser observada na maioria dessas situações, como uma ação esperada do organismo em resposta a resistência às ações da insulina. Cabe aqui destacar que, quando consideramos mecanismos complexos em que o organismo se reajusta de forma a manter a homeostasia, é importante levar em conta os diversos fatores que se inter-relacionam para causar essas alterações. Em relação a resistência à insulina, devemos levar em consideração toda a complexidade de ações metabólicas e de crescimento deste hormônio, e ainda o fato de que a resistência à insulina *per se*, pode afetar essas funções de forma heterogênea (WANG; GOALSTONE; DRAZNIN, 2004). Além disso, a insulina interage com diversos outros hormônios, como, por exemplo, a angiotensina-II (Ang-II), a adrenalina, o hormônio do crescimento (GH), a leptina, a serotonina (5-HT), entre outros, que podem ainda modular os efeitos finais da ação da insulina (HSIUNG et al., 2003; MALBON, 2004; MULLER, 2002).

Em particular, o entendimento da interação entre as vias de sinalização de insulina e Ang-II têm despertado grande interesse de diversos grupos de pesquisadores, devido à frequente associação clínica entre o DM2 e a HA. O DM2 representa uma das principais desordens metabólicas, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. Caracteriza-se pela resistência à insulina e hiperglicemia, sendo que, devido a sua comum associação com a HA, nefropatias e doenças cardiovasculares, o sistema renina-angiotensina (SRA), tem sido considerado como

elemento-chave na fisiopatologia desses distúrbios (GIACCHETTI et al., 2005; SAVOIA et al., 2006).

O SRA classicamente exerce importante papel na fisiologia cardiovascular e neuroendócrina, na homeostasia e regulação dos fluídos corporais e na regulação da pressão arterial (PA). A Ang-II, principal hormônio efetor do sistema, causa vasoconstrição direta através de seus receptores do tipo1 (AT-1) presentes nos vasos, e indiretamente aumentando o tônus simpático vascular e a liberação de vasopressina (VP) que também produz vasoconstrição via receptor V1 (MICHELINI, 1999, 2004). Cronicamente, a Ang-II regula a PA também por facilitar a reabsorção renal de sódio e água mediada por receptores AT-1 no rim, por estimular a síntese e liberação de aldosterona pelo córtex das adrenais (HALL et al., 1984) e por estimular centralmente a sede, ação essa da Ang-II plasmática nos órgãos circunventriculares, desprovidos de barreira hemato-encefálica (HERBERT et al., 1992; MCKINLEY, 1990, 1997).

A cascata enzimática clássica em que a Ang-II é produzida inicia-se com a liberação de renina (REN, uma aspartil protease) pelas células justaglomerulares renais, que cliva o angiotensinogênio (proteína plasmática produzida pelo fígado) para formar o decapeptídeo angiotensina-I (Ang-I). A Ang-I, por sua vez, sofre clivagem pela enzima conversora de angiotensina (ECA), uma dipeptidil carboxipeptidase produzida na borda em escova do endotélio de todos os vasos, produzindo o octapeptídeo Ang-II, um dos componentes fisiologicamente ativos mais importantes do sistema. Mais recentemente, descreveu-se um novo componente do sistema, a Ang-(1-7), um heptapeptídeo formado pela clivagem da Ang-I por endopeptidases e pela ECA-2. O efeitos da Ang-(1-7) são decorrentes de sua ligação com um receptor específico *Mas* (MasR), e se contrapõe aos da Ang-II, induzindo vasodilatação, diurese, natriurese e ainda inibindo o crescimento celular e a liberação de noradrenalina (FERRARIO et al., 1997; FERRARIO; TRASK; JESSUP, 2005; GIRONACCI et al., 2004; SANTOS et al., 2003, 2005).

As ações da Ang-II resultam de sua ligação a receptores específicos do tipo1 e 2 (AT-1 e AT-2), classificados por suas afinidades diferentes a vários antagonistas não peptídicos (TIMMERMANS et al., 1993). Esses receptores de membrana pertencem à superfamília de receptores ligados à proteína G, embora as vias utilizadas sejam diferentes e os efeitos aparentemente antagônicos. Por exemplo, os receptores AT-1 medeiam vasoconstrição, enquanto os receptores AT-2 parecem mediar resposta vasodilatadora (EGUSHI; INAGAMI, 2000; SAYESHI; BERNSTEIN, 2001).

Estudos farmacológicos utilizando antagonistas específicos demonstraram que a maior parte dos efeitos fisiológicos da Ang-II é mediada pelos receptores AT-1 (EGUSHI; INAGAMI, 2000). Dois subtipos do receptor AT-1 foram identificados em diversas espécies, o AT-1a e o AT-1b, embora em humanos seja geralmente aceito que exista apenas um tipo de receptor AT-1 da Ang-II (KONISHI et al., 1994). A ativação dos receptores AT-1, via proteína G, ativa a fosfolipase C- β (PLC- β) que hidrolisa o fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), para gerar o trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ abre canais de cálcio (Ca²⁺) do retículo endoplasmático, levando ao aumento da concentração intracelular deste íon. Adicionalmente, íons Ca²⁺ também entram na célula pela abertura de canais específicos na membrana celular. O Ca²⁺ liga-se a calmodulina e o complexo Ca²⁺/calmodulina ativa diversas enzimas intracelulares, como ATPases e quinases, que contribuem para resposta celular (LEE; SEVERSON, 1994; TIMMERMANS et al., 1993). Em adição às diversas respostas imediatas, a estimulação dos receptores AT-1 também provoca o crescimento celular, especialmente da musculatura vascular e cardíaca (BHAT et al., 1994). Uma série de tirosinas-quinases podem ser ativadas a partir da ativação do AT-1, desde tipos não receptores (Src, Fyn, Yes, Pyk2, FAK, e JAK2) até receptores (de EGF e PDGF). Essas tirosinas-quinases regulam vias efetoras intracelulares, incluindo a PLC-gama, Ras-Raf-MAPK (MEK-ERK) e as STATS. (MARRERO et al., 1998; VENEMA et al., 1998). Estudos realizados tanto *in vivo* quanto em culturas de células mostram que a Ang-II é capaz de inibir a sinalização da insulina através da via da PI3K (SAAD; VELLOSO; CARVALHO, 1995; VELLOSO et al., 1996). Este efeito é mediado, possivelmente, através da ativação do receptor AT1, já que o tratamento com antagonistas desse receptor é capaz de prevenir esse fenômeno (CARVALHO et al., 1997).

Diversos estudos têm demonstrado que a Ang-II tem importante papel no desenvolvimento tanto da HA essencial como da resistência à insulina (NATALI; FERRANNINI, 2004). Estudos em culturas de células de músculo liso de ratos mostraram que a Ang-II induz a fosforilação em serina tanto de IR quanto de IRS-1 (FOLLI et al., 1997). Tanto a redução da fosforilação em tirosina como o aumento da fosforilação em serina da sub-unidade β do receptor de insulina e do IRS-1 foram propostos como mecanismos moleculares de resistência à insulina (MOTHE; VAN OBBERGHEN, 1996; SYKIOTIS; PAPAVALASSILIOU, 2001; TANTI et al., 1994). Ademais, o tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e com antagonistas do receptor AT-1 tem se mostrado efetivo em reduzir os níveis de pressão arterial e produzir a

melhora da sensibilidade à insulina em indivíduos hipertensos e resistentes à insulina (FELDMAN, 2000; SCHEEN, 2004).

1.5 O sistema renina-angiotensina cerebral

Diversos estudos têm demonstrado a existência de um SRA tecidual em que angiotensinas são geradas localmente no próprio tecido. Todos os componentes do SRA foram encontrados no cérebro, no coração, nos vasos, no tecido adiposo, nas gônadas, no pâncreas, na placenta, nos rins e em outros tecidos (BADER et al., 2001; ENGELI; NEGREL; SHARMA, 2000; MORIMOTO et al., 2002; MCKINLEY et al., 2003; NIELSEN; SCHAUSER; POULSEN, 2000; SERNIA, 2001). No cérebro, a síntese de angiotensinogênio ocorre em praticamente todas as áreas, sendo uma das proteínas mais abundantes no líquido cérebro-espinhal (HILGENFELD, 1984; LYNCH; HAWELU-JOHNSON; GUYENET, 1987). A maior proporção da síntese de angiotensinogênio no cérebro se dá em células gliais (DESCHEPPER, 1990; STORNETTA et al., 1988). Estudos realizados em animais transgênicos, em que a produção de angiotensinogênio pelas células gliais foi impedida, demonstraram redução de mais de 90% dos níveis de angiotensinogênio cerebral nestes animais, indicando que os astrócitos são sua maior fonte (SCHINKE et al., 1999). Foi sugerido ainda ser a síntese de angiotensinogênio em áreas específicas o passo limitante para ativação do sistema, assim como a liberação de renina é o passo limitante para a ativação do SRA clássico, periférico.

Desde a década de 80, existem evidências da presença de renina (REN) no SNC, mas em concentrações muito baixas (DZAU et al., 1986). Estudos recentes com animais transgênicos demonstraram que a REN no cérebro participaria de vias de sinalização autócrinas e intrácrinas, cujas funções não estão suficientemente elucidadas (LAVOIE; SIGMUND, 2003; LAVOIE et al., 2004). Centralmente, outras enzimas como a cathepsina D (principalmente), a tonina e o ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) se demonstraram ativos na conversão do angiotensinogênio em Ang-I (LAVOIE; SIGMUND, 2003; MCKINLEY et al., 2003). A enzima conversora de angiotensina (ECA) é extensamente localizada no SNC, com altas concentrações detectadas nos órgãos circunventriculares tais como o órgão subfornical, (SFO), o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), a área postrema (AP) e a eminência mediana (ME) (SAAVEDRA; CHEVILLARD, 1982). Nessas regiões, a Ang-I proveniente da circulação periférica é convertida

a Ang-II exercendo sua função localmente ao se ligar aos receptores ali presentes (MCKINLEY et al., 1997; THURNHORST; FITTS; SIMPSON, 1989). Também em outras regiões cerebrais “protegidas” pela barreira hemato-encefálica (núcleo caudado, putâmen, substância nigra pars reticularis, NTS, DMV e núcleo pré-óptico mediano (MnPO), entre outros, a ECA está presente em alta concentração mediando a produção local de Ang-II (CHAI; MCKINLEY; MENDELSON, 1987; CHAI; MENDELSON; PAXINOS, 1989b; ROGERSON et al., 1995; SAAVEDRA; CHEVILLARD, 1982). A Ang-II cerebral pode ainda ser clivada pela aminopeptidase A, uma zinco metalopeptidase, que retira o N-terminal do resíduo aspartil da Ang-II formando o heptapeptídeo angiotensina III (Ang-III), o qual pode ainda ser degradado ao hexapeptídeo angiotensina IV (Ang-IV) pela aminopeptidase N (REUX et al., 1999b). Os receptores da Ang-II, também podem ser encontrados em diversas áreas cerebrais e da medula espinhal (ALLEN et al., 2000; LENKEI et al., 1997). O receptor AT1 está fortemente presente nos neurônios do ARC, onde estimula a liberação de dopamina em resposta a Ang-II, o que leva à redução da liberação de prolactina (PRL) (JOHREN et al., 1997).

A hiperatividade do SRA cerebral tem sido fortemente correlacionada ao desenvolvimento e manutenção da HA em diversos modelos experimentais, como os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), ratos hipertensos DOCA-sal e animais transgênicos (AVERILL et al., 1996; BASSO et al., 1981; GANTEN et al., 1983). No entanto, são poucos os trabalhos na literatura sobre os possíveis efeitos do *cross-talk* da Ang-II sobre a via de sinalização de insulina em áreas centrais responsáveis pelo controle da homeostasia glicêmica, como é o caso do ARC, do VMH e do PVN (neurônios de segunda ordem) no hipotálamo. Possíveis alterações centrais nessas vias de sinalização poderiam contribuir para a resistência às ações da insulina.

1.6 Homeostasia glicêmica na gestação e lactação: a gravidez como modelo de resistência à insulina

A gestação é um período em que a fêmea é transitoriamente submetida a uma série de alterações em todo o organismo, que resultam num quadro semelhante à síndrome metabólica, mas que são cuidadosamente reguladas de modo a fornecer o suprimento adequado de substratos para a mãe e para o feto. Há, durante a gravidez, um importante redirecionamento da utilização de glicose, na medida em que se observa uma alta taxa de utilização de glicose pelo *conceptus*

(LETURQUE et al., 1986). Quando levados em consideração todos os tecidos responsivos à insulina, a captação de glicose pelo organismo materno diminui de 40 a 60% durante uma gravidez normal, tanto em humanos quanto em roedores (HORNES, 1985; ROSSI et al., 1993). Sabe-se que os aumentos das concentrações plasmáticas materna de esteróides sexuais, PRL, lactogênio placentário e corticoesteróides estão relacionados ao quadro de resistência à insulina na gravidez (MASHARANI; KARAN, 2001). A gravidez caracteriza-se, portanto, como modelo fisiológico e temporalmente definido de resistência à insulina. Em ratos, mostrou-se que, periféricamente, esta resistência às ações da insulina ocorre em músculos compostos por fibras glicolíticas e no tecido adiposo, e caracteriza-se pela redução da fosforilação em tirosina do IRS e do IRS-1 (SAAD et al., 1997), bem como pelo aumento da fosforilação em serina (GONZALEZ et al., 2003). Já está bem estabelecido que a Ang-II é capaz de induzir a fosforilação em serina do IR e do IRS (FOLLI et al., 1997). No entanto, ainda não foi esclarecido se ocorrem alterações na via de sinalização da insulina em áreas do SNC responsáveis pelo controle da homeostasia glicêmica, como é o caso do núcleo arqueado (ARC) e do núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH) durante a gestação, que poderia contribuir para o quadro de resistência à insulina nesta situação.

Além disso, alterações cardiovasculares também podem ser observadas na gravidez, tais como aumento da frequência cardíaca e do volume sanguíneo, diminuição da sensibilidade vascular a vasoconstritores endógenos, e a redução da resistência periférica total e, conseqüentemente, da pressão arterial (LINDHEIMER; KATZ, 1992). É sabido que durante a gravidez normal, assim como observado na hipertensão, também ocorre periféricamente uma hiperatividade do SRA, havendo aumentos na concentração plasmática e da atividade da REN e dos níveis circulantes de Ang-II, ainda que, neste caso, a resposta vascular a esta esteja diminuída (SHAH, 2006).

Apesar de todas estas alterações, na gestação normal não ocorre aumento da pressão arterial. Diversas linhas de evidência sugerem que alterações no delicado equilíbrio do SRA na gravidez estão envolvidas na fisiopatologia da pré-eclâmpsia e da eclâmpsia (LI et al., 2000; SHAH, 2006). No entanto, não há trabalhos na literatura que avaliem, centralmente, possíveis alterações no SRA durante a gravidez.

Logo após o parto, apesar da alteração instantânea do consumo de glicose devido à ausência da placenta e do feto, a homeostasia glicêmica é mantida. Durante a lactação, observa-se

hipersensibilidade sistêmica à ação da insulina (BURNOL et al., 1983), embora a resistência à sua ação se mantenha em territórios como o tecido adiposo e músculos esqueléticos compostos por fibras glicolíticas (BURNOL et al., 1987). Perifericamente, o aumento da sensibilidade à insulina ocorre a partir do terceiro dia após o parto (ANHE et al., 2007). Há um aumento da captação máxima de glicose induzida pela insulina nas fibras oxidativas do músculo soleus. Esse efeito correlacionou-se com o aumento da expressão do transportador de glicose-4 (GLUT-4). Além disso, o aumento da expressão e fosforilação em Tyr do IR, do IRS-2 e sua associação com a PI3K refletiram a melhora na efetividade da via de sinalização da insulina no músculo soleus mostrando o importante papel deste tecido na manutenção da homeostasia glicêmica na lactação (ANHE et al., 2007). A lactação é caracterizada por mudanças dramáticas no eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (MURATA et al., 1991). Em ratos, o estímulo de sucção aumenta a PRL plasmática, principalmente na primeira metade da lactação, atingindo seu pico no sétimo dia (TAYA; SASAMOTO, 1981); este efeito é devido, ao menos em parte, à supressão da atividade neural dopaminérgica no ARC (DEMAREST et al., 1983; DEMAREST; MOORE; RIEGLE, 1985; HOFFMAN et al., 1994). A Ang-II parece ter duplo efeito sobre a secreção de PRL (MYERS; STEELE, 1989). De fato, na hipófise anterior, a Ang-II estimula diretamente a secreção de PRL pelo lactotrofo (AGUILERA; HYDE; CATT, 1982; STEELE; NEGRO-VILAR; MCCANN, 1981), enquanto no ARC exerce um efeito inibitório (AGUILERA; HYDE; CATT, 1982; MYERS; STEELE, 1989; STEELE; MCCANN; NEGRO-VILAR, 1982). Em ratas, após o décimo dia de lactação observa-se significativa redução da expressão de receptores AT-1 da Ang-II e do RNAm de Angiotensinogênio no ARC, quando comparadas com fêmeas no *diestrus* (SPETH et al., 1999; SPETH; SMITH; GROVE, 2001). Isto sugere que a habilidade da Ang-II cerebral em inibir a liberação de PRL está diminuída em ratas lactantes. No entanto, em relação à gravidez, não há trabalhos na literatura mostrando o papel do SRA central. Ainda, não há relato sobre o *cross-talk* entre as vias de sinalização da insulina e da Ang-II em áreas hipotalâmicas responsáveis pelo controle da homeostasia glicêmica que poderiam contribuir para o quadro de resistência à insulina gestacional.

2 JUSTIFICATIVA

Visto que a gestação é uma condição fisiológica de resistência à insulina e que a Ang-II participa do desenvolvimento deste fenômeno em outros tecidos/condições, é possível que as ações centrais da Ang-II na gestação e lactação também estejam relacionadas ao controle da homeostasia glicêmica mediada pelas ações centrais da insulina.

Assim, torna-se razoável propor que alterações do SRA, da via de sinalização da insulina e o *cross-talk* entre elas no SNC poderiam contribuir para o quadro de resistência insulínica na gravidez. O melhor entendimento dessas vias, centralmente, pode vir a contribuir para a prevenção e/ou tratamento de condições clínicas importantes como o desenvolvimento do diabetes gestacional e da pré-eclâmpsia/eclâmpsia.

3 OBJETIVOS

Com a finalidade de identificar os possíveis efeitos da gravidez e da lactação sobre as vias de sinalização da insulina e da Ang-II no hipotálamo, e a interação entre elas, o presente trabalho tem como objetivos:

3.1 Avaliar e comparar em ratas controles, grávidas e lactantes a expressão e/ou fosforilação de proteínas intracelulares destas vias, tais como: IRS-1, IRS-2, PI3K(p85 α , P55 α , P50 α), p-Ser⁴⁷³ AKT(1,2,3), e a expressão dos receptores IR e AT1a em hipotálamo total isolado.

3.2 Avaliar e comparar entre os grupos a expressão dessas mesmas proteínas em áreas específicas do hipotálamo, tais como o núcleo arqueado (ARC) e hipotálamo ventromedial (VHM), responsáveis pelo controle da homeostasia glicêmica, bem como o núcleo paraventricular (PVN), importante núcleo de modulação cardiovascular e de controle da homeostasia glicêmica.

3.3 Avaliar e comparar no hipotálamo (total e nos núcleos citados anteriormente) de ratas grávidas o efeito do tratamento crônico com losartan (antagonista AT1a) sobre a expressão do receptor AT1 e da PI3K.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar controle (virgens), grávidas e lactantes, separadas para cruzamento a partir dos 3 meses de idade, fornecidas pelo Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (SP), alimentadas com ração padronizada para roedores Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes S.A.), água *ad libitum* e mantidas em ciclo claro/escuro de 12:12 horas e temperatura ambiente de 23 °C. A verificação do ciclo estral das ratas foi realizada por esfregaço vaginal, por pelo menos duas semanas antes do acasalamento. As ratas com ciclo normal e regular foram então mantidas na proporção de 2 fêmeas por macho por gaiola por um período de 5 dias. Após as 48 horas seguintes, foi realizado lavado vaginal para verificação da presença de espermatozóides (indicativo do 1º dia de gestação).

Após o parto, as ratas foram mantidas na proporção de uma mãe por oito filhotes lactentes até no máximo 8 dias após o nascimento. As ratas foram utilizadas para os experimentos no 19º dia de gestação (G19), no 3º e no 8º dias de lactação (respectivamente L3, L8).

Para avaliação do *cross-talk* entre as vias da insulina e Ang-II, na gravidez realizamos num grupo, separadamente, o tratamento crônico com losartan (antagonista AT1) na dose de 10mg/kg/dia por 5 dias, através de gavagem. As ratas foram submetidas ao cruzamento, conforme descrito acima, e separadas em quatro grupos experimentais. Ratas controle que receberam veículo (CTL + VE), controle tratadas com losartan (CTL+LOS), grávidas com 19 dias que receberam veículo (G19+VE) e finalmente grávidas tratadas com losartan (G19+LOS). O veículo utilizado foi água de beber no mesmo volume que seria administrado o losartan, através da gavagem, isto com o intuito de submeter os animais à igual condição de estresse. O tratamento foi iniciado no 14º dia de gestação e terminou no 19º dia, quando os animais foram eutanasiados.

Foram observados os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Declaração CEEA.009.08 (07/03/08) em adendo ao Certificado 063/06/CEEAA de 02/06/06.

4.2 Isolamento do tecido e Western blot

Ao final do protocolo experimental, os animais foram anestesiados com CO₂, eutanasiados por decapitação e o hipotálamo rapidamente dissecado e retirado. As amostras foram imediatamente homogeneizadas com o uso de um Polytron em tampão de extração (1% de dodecil sulfato de sódio, 100 mM de Tris [pH 7,4], 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA e 10 mM de ortovanadato de sódio), incubadas por 10 minutos a 96 °C e em seguida centrifugadas para a remoção do material insolúvel (10.000 x g por 10 minutos a 4 °C). Parte do sobrenadante foi utilizada para determinação do conteúdo protéico por espectrofotometria com reagente Bradford (Biorad, CA, USA); o restante foi diluído em tampão Laemmli (1:5 v/v) contendo ditiotretitol 100 mM, incubados por 10 minutos a 96°C. Quantidades iguais de proteína das diferentes amostras foram submetidas à separação eletroforética em gel de poliacrilamida 6 - 10% (%T) com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em aparelho para minigel (Mini Protean III, Bio-Rad, CA, USA). Após a separação eletroforética no gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Biorad, CA, USA). As membranas foram incubadas em solução bloqueadora contendo 5% (g/mL) de leite desnatado em solução basal (10 mM de Tris, 150 mM de NaCl e 0,02% de Tween) por 2 horas a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por 4 horas a temperatura ambiente em solução basal com 3% de albumina de soro bovino (BSA) com os seguintes anticorpos: anti AT1a, anti IR, anti IRS-1, anti IRS-2 (Santa Cruz Biotechnology, USA) e AKT1,2,3, anti-p(Ser473) AKT e PI3-kinase (p85 α , p55 α e p50 α) (Upstate Biotechnology, USA). Após a marcação com anticorpo primário, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário apropriado (anti-*mouse* ou anti-*rabbit*) conjugado à peroxidase (Amershan Pharmacia, UK) em solução basal com 1% de leite desnatado. Após 3 lavagens de 10 minutos da membrana, foram adicionados os reagentes de detecção do kit de quimioluminescência (ECL, Amershan Pharmacia, UK). As membranas foram, então, expostas durante tempos variados a filmes de raios-X. Depois de revelados, esses filmes foram submetidos à análise de densitometria óptica pelo software Scion Image (Scioncorp, NIH, USA).

4.3 Imunofluorescência

Os animais foram anestesiados (Ketamina, Xilazina e Acepromazina 0,7: 0,2: 0,1v/v, 0,08 ml/100g peso, i.m) e perfundidos via ventrículo esquerdo com PBS 0.1M, pH 7,4 ou solução salina tamponada, seguida do fixador (paraformaldeído 4% em tampão fosfato a 0,1 M ~300 ml por 40-50 min). A perfusão (bomba peristáltica, ~10 ml/min), sob pressão, foi realizada em níveis semelhantes aos registrados nos animais conscientes. Em seguida, foi removido o cérebro, e pós-fixado em paraformaldeído 4%+sacarose 20% (2 dias) e paraformaldeído 4%+sacarose 30% (2 dias) e a seguir bloqueado (hipotálamo) e armazenado em freezer -80 °C, até a realização dos experimentos.

Cortes sequenciais do hipotálamo (Bregma -1.32 a -3.12), de 30 µm (Leica, CM 305), abrangendo os núcleos de interesse (ARC, VMH e PVN) foram coletados ordenadamente em diferentes 'poços' de placa de cultura (Falcon 3047) contendo PBS a 0.1M, pH 7,4 (método *free floating*). Os tecidos foram lavados com PBS 0,1M (2x), seguida de 1x PBS + 0,1M de Glicina (para bloquear os radicais aldeídos livres) e mais 2x PBS 0,1M. Após a lavagem, os cortes foram incubados com PBS 0,1M + *Bovin Serum Albumin* (BSA) 1% + Saponina 0,1% por 10 minutos para bloqueio e permeabilização da membrana celular. Os tecidos foram então incubados para dupla marcação, com anticorpo primário policlonal anti-AT1a IgG produzido em cabra (SC-1173-G) + anticorpo primário anti-p85α IgG produzido em coelho (SC-423) diluídos 1:50 em PBS 0,1M + 0,1% saponina + 1% BSA, *overnight* em câmara fria (4 °C), sob agitação branda.

Após seguiu-se nova lavagem dos tecidos, com PBS 0,1M + 1% BSA + 0,01% saponina (2x), seguida de 3 lavagens com PBS 0,1M + 0,01% saponina. Os cortes foram então incubados com anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em camundongo, conjugado com AlexaFluor 488, na diluição de 1:200 em solução de PBS 0.1M + saponina 0,1% por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação branda. Após nova lavagem do tecido (4x PBS + 0,01% saponina), os tecidos foram incubados com anticorpo secundário anti-IgG de cabra produzido em burro, conjugado com AlexaFluor 647 na diluição de 1:200 + DAPI na diluição de 1:1000 em PBS 0,1M + saponina 0,1% por mais 2 horas em temperatura ambiente, sob agitação branda. Os tecidos foram finalmente lavados (6x) em PBS 0,1M + saponina 0,01%. As lâminas previamente lavadas e preparadas com Poli-L-Lisina foram usadas para montagem dos tecidos. Após ser

realizada a montagem das lâminas e colocação da lamínula com meio de montagem *anti-fade* Vect Shield (Vector Labs Burlingame CA), as lâminas foram seladas nas laterais com esmalte incolor e colocadas em caixa plástica escura, embrulhada em papel alumínio e guardadas em geladeira (4 °C) até a aquisição das imagens. Foram realizados experimentos-controle omitindo-se os anticorpos primários, de modo a verificar a especificidade da imunomarcação. Além disso, realizamos também marcações simples para verificar o padrão de marcação de cada um dos anticorpos primários antes de realizarmos a dupla-marcação. As imagens de imunofluorescência foram adquiridas e capturadas em microscópio confocal (Leica SP5) em objetiva de 20x e 63x (óleo) com parâmetros idênticos para todos os grupos de forma a permitir a comparação entre eles. As imagens/fotomicrografias de imunofluorescência foram analisadas no software livre Image J (NIH, USA), para quantificação da imunorreatividade.

4.4 Avaliação da Ingestão Alimentar e do Peso dos Animais

O cruzamento dos animais, bem como o tratamento crônico com losartan ou veículo foi realizado como descrito acima no item 4.1. A avaliação da ingestão alimentar e do peso foi realizada nos grupos CTL+VE, CTL+LOS, G19+VE e G19+LOS, no primeiro dia de gestação (G1), bem como no décimo quarto (G14), início do tratamento com losartan ou veículo, e finalmente no décimo nono dia de gestação (G19). Os animais foram alocados em gaiola individual com água *ad libitum* e com uma quantidade conhecida de ração (por exemplo 30 gramas). Após 24 horas a ração remanescente era pesada para verificação da quantidade de alimento ingerida. A ingestão hídrica e as eliminações não foram avaliadas.

4.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA de uma via ou duas vias quando apropriado), seguido de pós-teste de Tukey. O software GraphPad Prism 5 foi utilizado para análise dos dados

e confecção dos gráficos. Em todos os resultados apresentados adotou-se 5% como limite de significância estatística ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da expressão hipotalâmica das proteínas da via de sinalização da insulina e do AT1a, na gravidez e na lactação

As condições de gravidez (G19) e de lactação, tanto no terceiro (L3) como no oitavo dias (L8), não produziram alterações significativas na expressão/conteúdo do receptor da insulina (IR) no hipotálamo, quando comparadas com as ratas controle (Figura 1).

Figura 1- Expressão/conteúdo do receptor de insulina (IR) no hipotálamo.

A- Immunoblotting (IB) com anticorpo anti-IR. **B-** Gráfico da expressão de IR, (n = 5). Ratas controle (CTL), grávidas (G19) e lactantes no 3º e no 8º dias, L3 e L8, respectivamente. As barras representam as médias $\pm$ EPM, ANOVA.

FONTE: Felix (2012)

A Figura 2 demonstra a expressão/conteúdo do substrato do receptor da insulina-1 (IRS-1) no hipotálamo. Observa-se que tanto na gravidez quanto na lactação (L3 e L8), não houve alterações significativas na expressão desta proteína. No entanto, observa-se que ao mesmo tempo, houve uma redução significativa da expressão de IRS-2 hipotalâmico na gravidez (1.6 ± 0.13 vezes vs controle, $p < 0.01$), condição esta que foi rapidamente revertida já no início da lactação (L3) e mantida em L8 (Figura 3).

Figura 2- Expressão/conteúdo do substrato do receptor de insulina-1 (IRS1) no hipotálamo.

A- Immunoblotting (IB) com anticorpo anti-IRS-1. **B-** Gráfico da expressão de IRS-1, (n = 4). Ratas controle (CTL), grávidas (G19) e lactantes no 3º e no 8º dias, L3 e L8, respectivamente. As barras representam as médias $\pm$ EPM, ANOVA.

FONTE: Felix (2012)

A gravidez foi acompanhada de aumento significativo na expressão das subunidades regulatórias da PI3K, respectivamente, P85 α (2.9 ± 0.34 vezes; $p < 0.001$ vs controle), P55 α (1.55 ± 0.23 vezes; $p < 0.05$ vs controle) e P50 α (1.6 ± 0.30 vezes $p < 0.05$ vs controle). Não foram observadas alterações significativas destas proteínas na lactação, em L3 e L8 (Figuras 4, 5 e 6, respectivamente).

Figura 3- Expressão do substrato do receptor de insulina-2 (IRS-2) no hipotálamo.

A- Immunoblotting (IB) com anticorpo anti-IRS-2. **B-** Gráfico da expressão de IRS-2. Ratas controle (CTL, n=14), grávidas (G19, n=12) e lactantes no 3º e no 8º dias, L3 (n=5) e L8 (n=4), respectivamente. As barras representam as médias $\pm$ EPM. ANOVA,* $P < 0.01$ vs controle. FONTE: Felix (2012)

A ausência de alterações na expressão da p85 α e da p55 α logo no início da lactação indica que este fenômeno é rapidamente revertido. No entanto, a expressão da subunidade p50 α em L3 e L8 foi significativamente menor do que a do grupo controle (1873 ± 411 em L3 e 1706 ± 314 em L8 vs 5386 ± 738 no CTL, $p < 0,05$, Figura 6)

Figura 4- Expressão da subunidade P85 α da PI3K no hipotálamo.

A- Immunoblotting (IB) com anticorpo anti-pam PI3K(p85 α ,55 α ,50 α). **B-** Gráfico da expressão de PI3K (p85 α). Ratas controle (n= 14), grávidas (G19, n=6) e lactantes no 3º e no 8º dias, L3 (n=4) e L8 (n=7), respectivamente. As barras representam as médias $\pm$ EPM. ANOVA * $P < 0.001$ vs controle.

FONTE: Felix (2012)

Figura 5- Expressão da subunidade P55 α da PI3K no hipotálamo.

A- Immunoblotting (IB) com anticorpo anti-pam PI3K (p85,55,50). **B-** Gráfico da expressão de PI3K (p55 α). Ratas controle CTL, n= 14), grávidas (G19, n=6) e lactantes no 3º e no 8º dias, L3 (n=4) e L8 (n=7), respectivamente. As barras representam as médias $\pm$ EPM. ANOVA* $P < 0.05$ vs controle.

FONTE: Felix (2012)

Figura 6- Expressão da subunidade P50 α da PI3K no hipotálamo.

A- Immunoblotting (IB) com anticorpo anti-pam PI3K (p85,55,50). **B-** Gráfico da expressão de PI3K(p50 α). Ratas controle (CTL, n= 14), grávidas (G19, n=6) e lactantes no 3º e no 8º dias, L3 (n=4) e L8 (n=7), respectivamente. As barras representam as médias $\pm$ EPM. ANOVA * $P < 0.05$ G19 vs CTL; + $P < 0.05$ vs controle.

FONTE: Felix (2012)

Observou-se redução significativa da expressão da AKT total na gravidez (G19: $1,7 \pm 0,2$ vezes; $p < 0.05$ vs controle), condição esta que foi revertida, novamente, logo após o início da lactação, não havendo alterações significativas nas L3 e L8 quando comparadas ao grupo controle (Figura 7). A avaliação da fosforilação da AKT em resíduos de Serina 473 (p-Ser⁴⁷³AKT (1,2,3), mostrou que na gravidez ocorre não apenas a redução da AKT total (Figura 7), mas também uma significativa redução ($1,5 \pm 0,13$ vezes; $p < 0.05$ vs controle) da fosforilação da p-Ser⁴⁷³AKT (1,2,3), refletindo possivelmente na redução de sua atividade (Figura 8).

Figura 7- Expressão da AKT total no hipotálamo.

A- Immunoblotting (IB) com anticorpo anti-AKT (1,2,3). **B-** Gráfico da expressão de AKT (1,2,3). Ratas controle (CTL, n= 6), grávidas (G19, n=9) e lactantes no 3º e no 8º dias, L3 (n=3) e L8 (n=3), respectivamente. As barras representam as médias $\pm$ EPM. ANOVA * $P < 0.05$ vs controle.
FONTE: Felix (2012)

Figura 8- Fosforilação em Serina (p-Ser⁴⁷³) da AKT-1,2,3 no hipotálamo.

A- Immunoblotting com anticorpo anti-p-Ser⁴⁷³ AKT-1,2,3. **B-** Gráfico da expressão de p-Ser⁴⁷³ AKT-1,2,3. Ratas controle (CTL, n=7) e grávidas (G19, n=5). As barras representam as médias $\pm$ EPM. teste T * $P < 0.05$ vs controle.
FONTE: Felix (2012)

A gravidez também foi acompanhada de aumento significativo na expressão do receptor AT1a da Angiotensina-II no hipotálamo (G19: 2.13 ± 0.27 vezes vs controle; $p < 0.05$), novamente sem alterações observadas nas L3 e L8 (Figura 9). Esse aumento observado na gravidez reflete uma possível hiperatividade do sistema renina-angiotensina cerebral nesta condição.

Figura 9- Expressão/conteúdo do receptor AT1a da ANG-II no hipotálamo.

A- Immunoblotting (IB) com anticorpo anti-AT1a. **B-** Gráfico da expressão de AT1a. Ratas controle (CTL, n= 4), grávidas (G19, n=5) e lactantes no 3º e no 8º dias, L3 (n=3) e L8 (n=3), respectivamente. As barras representam as médias $\pm$ EPM. ANOVA * $P < 0.05$ vs controle.

FONTE: Felix (2012)

5.2 Efeito do Tratamento Crônico com Losartan sobre a expressão de AKT, PI3K e AT1a no hipotálamo, na gravidez

Figura 10- Efeito do tratamento crônico com Losartan (10mg/kg/dia, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão/conteúdo do receptor AT1a da ANG-II no hipotálamo.

A- *Immunoblotting* com anticorpo anti-AT1a. **B-** Gráfico da expressão de AT1a. Ratas controle tratadas com veículo (n= 4) e com losartan (n=3), e grávidas (G19) tratadas com veículo (n=7) e com losartan (n=3). As barras representam as médias $\pm$ EPM. ANOVA* $P < 0.01$ vs controle + veículo; $+P < 0.05$ vs G19 + veículo.

FONTE: Felix (2012)

O tratamento crônico com losartan foi capaz de reverter o aumento da expressão do receptor AT1a no hipotálamo, observado na gravidez. O efeito do antagonismo AT1a produziu nas grávidas uma significativa redução da expressão deste receptor no hipotálamo (1.6 ± 0.12 vezes vs controle; $p < 0.05$), levando-a praticamente aos valores basais. Esta redução, fez com que não houvesse diferença estatisticamente significativa entre as grávidas tratadas com losartan e o grupo controle (Figura 10).

Em seqüência, avaliamos o efeito do tratamento crônico com losartan sobre a expressão das subunidades regulatórias da PI3K no hipotálamo durante a gravidez. Observamos que o tratamento com antagonista AT1, não produziu quaisquer alterações significativas na expressão/conteúdo das subunidades p85 α , p55 α e p50 α tanto no grupo controle (5077 ± 242

[CTL+Los] vs 4830 ± 763 [CTL+Veh]) como nas grávidas tratadas com losartan (7160 ± 951 [G19+Los] vs 7444 ± 334 [G19+Veh]). As expressões dessas subunidades permaneceram elevadas na gravidez, quando comparadas às ratas controle (7444 ± 334 vs 4830 ± 763) (Figuras 11, 12 e 13, respectivamente).

Figura 11- Efeito do tratamento crônico com Losartan (10mg/kg/dia, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão/conteúdo da subunidade P85 α da PI3K no hipotálamo.

A- Immunoblotting (IB) com anticorpo anti-pam PI3K(p85 α ,55 α ,50 α). **B-** Gráfico da expressão de PI3K (p85 α). Ratas controle tratadas com veículo (n= 3) e com losartan (n=5), e grávidas (G19) tratadas com veículo (n=5) e com losartan (n=5). As barras representam as médias $\pm$ EPM. ANOVA * $P < 0.05$ vs controle.

FONTE: Felix (2012)

Figura 12- Efeito do tratamento crônico com Losartan (10mg/kg/dia, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão/conteúdo da subunidade P55 α da PI3K no hipotálamo.

A- Immunoblotting (IB) com anticorpo anti-pam PI3K(p85 α ,55 α ,50 α). **B-** Gráfico da expressão de PI3K (p55 α). Ratas controle tratadas com veículo (n= 3) e com losartan (n=5), e grávidas (G19) tratadas com veículo (n=5) e com losartan (n=5). As barras representam as médias $\pm$ EPM. ANOVA * $P < 0.05$ vs controle.

FONTE: Felix (2012)

Com relação à expressão da AKT total no hipotálamo, após o tratamento crônico com losartan, não houve alterações significativas tanto no grupo controle (8268 $\pm$ 268 [CTL+Los] vs 8276 $\pm$ 341 [CTL+Veh]) como nas grávidas tratadas (5113 $\pm$ 502 [G19+Los] vs 5120 $\pm$ 640 [G19+Veh]). A expressão/conteúdo da AKT total no hipotálamo permaneceu significativamente reduzida nas grávidas, quando comparadas com o grupo controle (5120 $\pm$ 640 vs 8276 $\pm$ 341, $p < 0.001$, Figura 14).

Figura 13- Efeito do tratamento crônico com Losartan (10mg/kg/dia, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão/conteúdo da subunidade P50 α da PI3K no hipotálamo.

A- Immunoblotting (IB) com anticorpo anti-pam PI3K(p85 α ,55 α ,50 α). **B-** Gráfico da expressão de PI3K (p50 α). Ratas controle tratadas com veículo (n= 3) e com losartan (n=5), e grávidas (G19) tratadas com veículo (n=5) e com losartan (n=5). As barras representam as médias $\pm$ EPM. ANOVA * $P < 0.05$ vs controle.

FONTE: Felix (2012)

Figura 14- Efeito do tratamento crônico com Losartan (10mg/kg/dia, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão/conteúdo da AKT total no hipotálamo.

A- Immunoblotting (IB) com anticorpo anti-AKT (1,2,3). **B-** Gráfico da expressão de AKT (1,2,3). Ratas controle tratadas com veículo (n= 5) e com losartan (n=5), e grávidas (G19) tratadas com veículo (n=5) e com losartan (n=4). As barras representam as médias $\pm$ EPM, ANOVA. * $P < 0.001$ vs controle.

FONTE: Felix (2012)

5.3 Imunofluorescência

Utilizamos a imunofluorescência para avaliar especificamente no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) e no núcleo hipotâmico ventromedial (VMH) a expressão do receptor AT1a da Ang-II, bem como a subunidade regulatória p85 α da PI3K nos grupos controle e grávidas tratadas cronicamente com veículo ou losartan (10mg/kg por 5 dias via gavagem).

A Figura 15 mostra as fotomicrografias representativas do padrão de marcação de imunofluorescência, encontrado no ARC, para o receptor AT1a (Figura 15: A1), bem como para a subunidade regulatória p85 α (Figura 15: A2) e a co-localização (merge) de ambas (Figura 15: A3), no grupo controle tratado cronicamente com veículo. Na figura 15: B1, B2 e B3, observam-se essas mesmas marcações (AT1, p85 α e merge, respectivamente) sobrepostas ao núcleo dos neurônios em azul, marcados com DAPI. É possível verificar que há uma expressão basal bastante significativa tanto do receptor AT1 quanto da p85 α no ARC do grupo controle, e ainda que essas proteínas se co-localizam em neurônios nesta região (Figura 15: A3; B3). As Figuras 16, 17 e 18, ilustram o padrão de marcação dessas mesmas proteínas, observadas no ARC dos grupos controle tratado com losartan, grávida (G19) tratadas com veículo ou G19 tratada com losartan, respectivamente.

As Figuras 19, 20, 21 e 22 mostram as fotomicrografias representativas da imunomarcação encontrada no núcleo hipotalâmico ventromedial porção dorsomedial (VHMdm) para o receptor AT1a e para subunidade p85 α da PI3K, bem como a colocação de ambas, respectivamente nos grupos controle tratados com veículo, ou com losartan, e nas grávidas tratadas com veículo ou losartan.

Figura 15- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência observadas no núcleo arqueado do hipotálamo no grupo **controle tratado com veículo**.

A1- Imunomarcacão do receptor AT1a da Ang-II (em vermelho). **A2-** Imunomarcacão da subunidade p85 α da PI3K (em verde). **A3-** Co-localizacão de ambas (em amarelo). **B1-** AT1a em vermelho + DAPI em azul evidenciando o núcleo dos neurônios. **B2-** p85 α (verde) + DAPI (azul). **B3-** Co-localizacão (em amarelo) AT1a + p85 α + DAPI (em azul). **C1-** Marcacão com DAPI, evidenciando o núcleo dos neurônios. Aumento de 630x (objetiva 63x-óleo). 3V: terceiro ventrículo; ARC: núcleo arqueado; ME: eminência mediana. Barra branca: 75 μ m. Localizacão: Bregma - 2.64.

FONTE: Felix (2012)

Figura 16- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência observadas no núcleo arqueado do hipotálamo no grupo **controle tratado com losartan**.

A1- Imunomarcacão do receptor AT1a da Ang-II (em vermelho). **A2-** Imunomarcacão da subunidade p85 α da PI3K (em verde). **A3-** Co-localizacão de ambas (em amarelo). **B1-** AT1a em vermelho + DAPI em azul evidenciando o núcleo dos neurônios. **B2-** p85 α (verde) + DAPI (azul). **B3-** Co-localizacão (em amarelo) AT1a + p85 α + DAPI (em azul). **C1-** Marcacão com DAPI, evidenciando o núcleo dos neurônios. Aumento de 630x (objetiva 63x-óleo). 3V: terceiro ventrículo; ARC: núcleo arqueado; ME: eminência mediana. Barra branca: 75 μ m. Localizacão: Bregma - 2.64.

FONTE: Felix (2012)

Figura 17- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência observadas no núcleo arqueado do hipotálamo, nas grávidas (G19) tratadas com veículo.

A1- Imunomarcacão do receptor AT1a da Ang-II (em vermelho). **A2-** Imunomarcacão da subunidade p85α da PI3K (em verde). **A3.** Co-localizacão de ambas (em amarelo). **B1-** AT1a em vermelho + DAPI em azul evidenciando o núcleo dos neurônios. **B2-** p85α (verde) + DAPI (azul). **B3-** Co-localizacão (em amarelo) AT1a + p85α + DAPI (em azul). **C1-** Marcacão com DAPI, evidenciando o núcleo dos neurônios. Aumento de 630x (objetiva 63x-óleo). 3V: terceiro ventrículo; ARC: núcleo arqueado; ME: eminência mediana. Barra branca: 75μm. Localizacão: Bregma - 2.64.
 FONTE: Felix (2012)

Figura 18- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência observadas no núcleo arqueado do hipotálamo, nas grávidas (G19) tratadas com losartan.

A1- Imunomarcação do receptor AT1a da Ang-II (em vermelho). **A2-** Imunomarcação da subunidade p85α da PI3K (em verde). **A3-** Co-localização de ambas (em amarelo). **B1-** AT1a em vermelho + DAPI em azul evidenciando o núcleo dos neurônios. **B2-** p85α (verde) + DAPI (azul). **B3-** Co-localização (em amarelo) AT1a + p85α + DAPI (em azul). **C1-** Marcação com DAPI, evidenciando o núcleo dos neurônios. Aumento de 630x (objetiva 63x-óleo). 3V: terceiro ventrículo; ARC: núcleo arqueado; ME: eminência mediana. Barra branca: 75μm. Localização: Bregma - 2.64.

FONTE: Felix (2012)

Figura 19- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência, observadas no núcleo hipotalâmico ventromedial porção dorsomedial, no **grupo controle tratado com veículo**.

A1- Imunomarcacão do receptor AT1a da Ang-II (em vermelho). **A2-** Imunomarcacão da subunidade p85α da PI3K (em verde). **A3-** Co-localização de ambas (em amarelo). **B1-** AT1a em vermelho + DAPI em azul evidenciando o núcleo dos neurônios. **B2-** p85α (verde) + DAPI (azul). **B3-** Co-localização (em amarelo) AT1a + p85α + DAPI (em azul). **C1-** Marcação com DAPI, evidenciando o núcleo dos neurônios. Aumento de 630x (objetiva 63x-óleo). **D-** Marcação com DAPI, evidenciando o núcleo dos neurônios em aumento de 200x (objetiva 20x). 3V: terceiro ventrículo; ARC: núcleo arqueado; VMHdm (hipotálamo ventromedial porção dorsomedial), ME: eminência mediana. Barra branca em C: 75μm. Localização: Bregma - 2.76.

FONTE: Felix (2012)

Figura 20- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência, observadas no núcleo hipotalâmico ventromedial porção dorsomedial, no **grupo controle tratado com losartan**.

A1- Imunomarcção do receptor AT1a da Ang-II (em vermelho). **A2-** Imunomarcção da subunidade p85α da PI3K (em verde). **A3-** Co-localização de ambas (em amarelo). **B1-** AT1a em vermelho + DAPI em azul evidenciando o núcleo dos neurônios. **B2-** p85α (verde) + DAPI (azul). **B3-** Co-localização (em amarelo) AT1a + p85α + DAPI (em azul). **C1-** Marcação com DAPI, evidenciando o núcleo dos neurônios. Aumento de 630x (objetiva 63x-óleo). Barra branca em C: 75μm. Localização: Bregma - 2.76.
 FONTE: Felix (2012)

Figura 21- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência, observadas no núcleo hipotalâmico ventromedial porção dorsomedial, nas **grávidas (G19) tratadas com veículo**.

A1- Imunomarcacão do receptor AT1a da Ang-II (em vermelho). **A2-** Imunomarcacão da subunidade p85 α da PI3K (em verde). **A3-** Co-localizacão de ambas (em amarelo). **B1-** AT1a em vermelho + DAPI em azul evidenciando o núcleo dos neurônios. **B2-** p85 α (verde) + DAPI (azul). **B3-** Co-localizacão (em amarelo) AT1a + p85 α + DAPI (em azul). **C1-** Marcacão com DAPI, evidenciando o núcleo dos neurônios. Aumento de 630x (objetiva 63x-óleo). Barra branca em C: 75 μ m. Localizacão: Bregma - 2.76.
 FONTE: Felix (2012)

Figura 22- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência, observadas no núcleo hipotalâmico ventromedial porção dorsomedial, nas **grávidas (G19) tratadas com losartan**.

A1- Imunomarcacão do receptor AT1a da Ang-II (em vermelho). **A2-** Imunomarcacão da subunidade p85 α da PI3K (em verde). **A3-** Co-localizacão de ambas (em amarelo). **B1-** AT1a em vermelho + DAPI em azul evidenciando o núcleo dos neurônios. **B2-** p85 α (verde) + DAPI (azul). **B3-** Co-localizacão (em amarelo) AT1a + p85 α + DAPI (em azul). **C1-** Marcacão com DAPI, evidenciando o núcleo dos neurônios. Aumento de 630x (objetiva 63x-óleo). Barra branca em C: 75 μ m. Localizacão: Bregma - 2.76.
 FONTE: Felix (2012)

A gravidez foi, de fato, acompanhada de aumento significativo (de 1,72 vezes) na expressão do receptor AT1a ($12,66 \pm 1.1$ vs 7.22 ± 1.43 , $p < 0.05$) no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC, Figura 23). Observou-se também, aumento significativo na expressão do AT1a, embora menos expressivo (0,6 vezes) no hipotálamo ventromedial porção dorsomedial (VMHdm) das grávidas quando comparadas ao grupo controle ($8,3 \pm 0,6$ vs $5,0 \pm 1,0$; $p < 0.05$; Figura 24). Ainda que este aumento tenha sido qualitativamente visível e perceptível nas grávidas (Figura 21), quando quantificado, mostrou-se um tanto quanto discreto, embora significativo (Figura 24).

O tratamento crônico com losartan produziu uma significativa redução da expressão do receptor AT1a no ARC das ratas grávidas quando comparada ao tratamento com veículo ($7,65 \pm 1.21$ vs $12,66 \pm 1.1$, $p < 0.05$; Figura 23). Essa redução fez com que não houvesse diferença significativa entre as grávidas tratadas com losartan e o grupo controle tratado com esta mesma droga ($7,5 \pm 1.6$ vs $7,7 \pm 1,1$; Figura 23). No grupo controle, o tratamento com losartan não produziu alterações significativas quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo ($7,7 \pm 1,1$ vs $7,2 \pm 1.5$; Figura 23).

Da mesma forma, observamos no VMHdm uma significativa redução na expressão do receptor AT1a nas grávidas após o tratamento crônico com losartan, quando comparadas ao tratamento com veículo ($5,2 \pm 0.7$ vs $8,3 \pm 0.6$, $p < 0.05$; Figura 24). E ainda, no grupo controle, novamente, não foi observado diferença significativa na expressão do AT1a no VMHdm após o tratamento com losartan ($5,5 \pm 0,74$ vs $5,0 \pm 1,0$; Figura 24).

O tratamento com losartan normalizou/preveniu o aumento da expressão do receptor AT1a tanto no ARC, como no VMHdm durante a gravidez (Figura 23 e 24, respectivamente).

Figura 23- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão do receptor AT1a no ARC.

A- Fotomicrografias ilustrativas da imunomarcação/expressão do receptor AT1a no ARC nos 4 grupos experimentais, aumento de 630 vezes (objetiva 63x a óleo). **B-** Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão do receptor AT1a no ARC em ratas controle tratadas com veículo (CTL+VE, n=3), ou com losartan (CTL+LOS, n=3), grávidas tratadas com veículo (G19+VE, n=3) ou com losartan (G19+LOS, n=3). Média ±EPM. ANOVA *p <0.05 vs CTL+VE; + p<0.05 vs G19+VE.

FONTE: Felix (2012)

Figura 24- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão do receptor AT1a no VMHdm.

A- Fotomicrografias ilustrativas da imunomarcção/expressão do receptor AT1a no VMHdm nos 4 grupos experimentais, aumento de 630 vezes (objetiva 63x a óleo). **B-** Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão do receptor AT1a no VMHdm em ratas controle tratadas com veículo (CTL+VE, n=3), ou com losartan (CTL+LOS, n=3), grávidas tratadas com veículo (G19+VE, n=3) ou com losartan (G19+LOS, n=3). Média ±EPM. ANOVA *p <0.05 vs CTL+VE; + p<0.05 vs G19+VE.

FONTE: Felix (2012)

Ao avaliarmos a subunidade regulatória p85 α da PI3K, verificamos que há durante a gravidez um aumento bastante significativo (5,48 vezes) de sua expressão no ARC quando comparado com o grupo controle ($15,9 \pm 2,3$ vs $2,9 \pm 1,0$; $p < 0.001$; Figura 25). Esse aumento, embora ligeiramente mais discreto, também foi bastante significativo (3,7 vezes) no VMHdm durante a gravidez ($9,7 \pm 2,3$ vs $2,6 \pm 0,7$; $p < 0.05$; Figura 26).

Quando avaliamos a expressão da p85 α , na gravidez, após o tratamento crônico com losartan, verificamos que, de fato, este não produziu quaisquer alterações significativas no ARC deste grupo quando comparado às grávidas tratadas somente com veículo ($15,9 \pm 2,3$ vs $13,8 \pm 1,8$; Figura 25), bem como também não foram observadas alterações no grupo controle ($3,9 \pm 0,5$ vs $2,9 \pm 1,0$; Figura 25).

Semelhante ao observado no ARC, o tratamento crônico com losartan não produziu qualquer alteração significativa na expressão da p85 α no VMHdm, tanto no grupo controle ($3,3 \pm 0,3$ vs $2,6 \pm 0,7$) como nas grávidas ($9,7 \pm 2,3$ vs $8,8 \pm 1,3$) quando comparados aos seus respectivos grupos tratados somente com veículo (Figura 26).

As Figuras 27 e 28, mostram a quantificação da co-localização da expressão do AT1a e da p85 α no ARC e no VMHdm, respectivamente, comparando-as entre os quatro grupos experimentais. Observa-se que, mesmo no grupo controle tratado com veículo, onde espera-se uma expressão basal tanto do AT1a quanto da p85 α , há uma co-localização dessas proteínas tanto no ARC (2,0% de área) como no VMHdm (1,4% de área) (Figuras 27 e 28, respectivamente).

Figura 25- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão da subunidade p85 α no ARC.

A- Fotomicrografias ilustrativas da imunomarcação/expressão da subunidade p85 α no ARC nos 4 grupos experimentais, aumento de 630 vezes (objetiva 63x a óleo). **B-** Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão da subunidade p85 α no ARC em ratas controle tratadas com veículo (CTL+VE, n=3), ou com losartan (CTL+LOS, n=3), grávidas tratadas com veículo (G19+VE, n=3) ou com losartan (G19+LOS, n=3). Média $\pm$ EPM. ANOVA *p <0.001 vs CTL+VE; +p<0.01 vs CTL+LOS.

FONTE: Felix (2012)

Figura 26- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão da subunidade p85 α no VMHdm.

A- Fotomicrografias ilustrativas da imunomarcção/expressão da subunidade p85 α no VMHdm nos 4 grupos experimentais, aumento de 630 vezes (objetiva 63x a óleo). **B-** Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão da subunidade p85 α no VMHdm em ratas controle tratadas com veículo (CTL+VE, n=3), ou com losartan (CTL+LOS, n=3), grávidas tratadas com veículo (G19+VE, n=3) ou com losartan (G19+LOS, n=3). Média $\pm$ EPM. ANOVA *p < 0.05 vs CTL+VE; +p < 0.05 vs CTL+LOS.

FONTE: Felix (2012)

Observou-se nas grávidas, aumento significativo na co-localização do AT1a e da p85 α , no ARC ($3,6 \pm 0,18$ vs $2,1 \pm 0,35$; $p < 0.01$) e no VMHdm ($4,1 \pm 0,6$ vs $1,4 \pm 0,43$; $p < 0.05$; Figuras 27 e 28, respectivamente).

Devido ao fato do tratamento crônico com losartan ter produzido, nas grávidas redução significativa na expressão do AT1a no ARC e no VMHdm (Figuras 23 e 24), observou-se, conseqüentemente, redução na co-localização (AT1a+ p85 α) tanto no ARC ($2,0 \pm 0,10$ [G19+LOS] vs $3,6 \pm 0,18$ [G19+VE]; $p < 0.01$; Figura 27), como no VMHdm ($2,2 \pm 0,20$ [G19+LOS] vs $4,1 \pm 0,6$ [G19+VE]; $p < 0.05$; Figura 28) de ratas grávidas tratadas com losartan. Não foram observadas alterações significativas na co-localização AT1a + p85 α no ARC e no VMHdm do grupo controle tratado com losartan (Figuras 27 e 28, respectivamente).

Figura 27- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a co-localização da subunidade p85 α e do receptor AT1a no ARC.

A- Fotomicrografias ilustrativas da co-localização da subunidade p85 α e do receptor AT1a, no ARC nos 4 grupos experimentais, aumento de 630 vezes (objetiva 63x a óleo). **B-** Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a co-localização dessas proteínas no ARC em ratas controle tratadas com veículo (CTL+VE, n=3), ou com losartan (CTL+LOS, n=3), grávidas tratadas com veículo (G19+VE, n=3) ou com losartan (G19+LOS, n=3). Média $\pm$ EPM. ANOVA *p < 0.01 vs CTL+VE; +p < 0.05 vs G19+VE.

FONTE: Felix (2012)

Figura 28- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a co-localização da subunidade p85 α e do receptor AT1a no VMHdm.

A. Fotomicrografias ilustrativas da co-localização da subunidade p85 α e do receptor AT1a, no VMHdm nos 4 grupos experimentais, aumento de 630 vezes (objetiva 63x a óleo). **B.** Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a co-localização dessas proteínas no VMHdm em ratas controle tratadas com veículo (CTL+VE, n=3), ou com losartan (CTL+LOS, n=3), grávidas tratadas com veículo (G19+VE, n=3) ou com losartan (G19+LOS, n=3). Média $\pm$ EPM. ANOVA *p < 0.05 vs CTL+VE; +p < 0.05 vs G19+VE. FONTE: Felix (2012)

Avaliamos também pela imunofluorescência, especificamente no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) a expressão do receptor AT1a da Ang-II, bem como da subunidade regulatória p85 α da PI3K nos grupos controle e grávidas tratadas cronicamente com veículo ou losartan.

A Figura 29 mostra as fotomicrografias representativas do padrão de marcação de imunofluorescência, encontrado no PVN, para o receptor AT1a (Figura 29: A1), bem como para a subunidade regulatória p85 α (Figura 29: A2) e a co-localização (merge) de ambas (Figura 29: A3), no grupo controle tratado cronicamente com veículo. Na figura 29: B1, B2 e B3, observam-se essas mesmas marcações (AT1, p85 α e merge, respectivamente) sobrepostas ao núcleo dos neurônios em azul, marcados com DAPI. É possível verificar que assim como observamos anteriormente no ARC e no VMHdm, há também uma expressão basal bastante significativa tanto do receptor AT1a quanto da p85 α no PVN do grupo controle, e ainda que essas proteínas novamente se co-localizam em neurônios nesta região (Figura 29: A3; C).

As Figuras 30, 31 e 32, ilustram o padrão de marcação dessas mesmas proteínas, observadas no PVN dos grupos controle tratado com losartan, grávidas (G19) tratadas com veículo ou G19 tratadas com losartan, respectivamente. A quantificação da imunomarcação do AT1a, da subunidade regulatória p85 α e a co-localização (merge) de ambas no PVN nos quatro grupos experimentais, podem ser observadas nas figuras 33, 34 e 35, respectivamente.

Figura 29- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência observadas no núcleo paraventricular do hipotálamo, no grupo **controle tratado com veículo**.

A1- Imunomarcacão do receptor AT1a da Ang-II (em vermelho). **A2-** Imunomarcacão da subunidade p85 α da PI3K (em verde). **A3-** Co-localizacão de ambas (em amarelo). **B1-** AT1a em vermelho + DAPI em azul evidenciando o núcleo dos neurônios. **B2-** p85 α (verde) + DAPI (azul). **B3-** Co-localizacão (em amarelo) AT1a + p85 α + DAPI (em azul). **C1-** Marcacão com DAPI, evidenciando o núcleo dos neurônios. Aumento de 200x (objetiva 20x). 3V: terceiro ventrículo; PVN: núcleo paraventricular; Barra branca: 250 μ m. Localizacão: Bregma - 1.72.

FONTE: Felix (2012)

Figura 30- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência observadas no núcleo paraventricular do hipotálamo, no grupo **controle tratado com losartan**.

A1. Imunomarcção do receptor AT1a da Ang-II (em vermelho). **A2.** Imunomarcção da subunidade p85α da PI3K (em verde). **A3.** Co-localização de ambas (em amarelo). **B1.** AT1a em vermelho + DAPI em azul evidenciando o núcleo dos neurônios. **B2.** p85α (verde) + DAPI (azul). **B3.** Co-localização (em amarelo) AT1a + p85α + DAPI (em azul). **C1.** Marcação com DAPI, evidenciando o núcleo dos neurônios. Aumento de 200x (objetiva 20x). 3V: terceiro ventrículo; PVN: núcleo paraventricular; Barra branca: 250μm. Localização: Bregma - 1.72.
 FONTE: Felix (2012)

Figura 31- Fotomicrografias representativas da imunofluorescência observadas no núcleo paraventricular do hipotálamo, no grupo **grávidas (G19) tratadas com veículo**.

A1- Imunomarcção do receptor AT1a da Ang-II (em vermelho). **A2-** Imunomarcção da subunidade p85α da PI3K (em verde). **A3-** Co-localização de ambas (em amarelo). **B1-** AT1a em vermelho + DAPI em azul evidenciando o núcleo dos neurônios. **B2-** p85α (verde) + DAPI (azul). **B3-** Co-localização (em amarelo) AT1a + p85α + DAPI (em azul). **C1-** Marcação com DAPI, evidenciando o núcleo dos neurônios. Aumento de 200x (objetiva 20x). 3V: terceiro ventrículo; PVN: núcleo paraventricular; Barra branca: 250µm. Localização: Bregma - 1.72.

FONTE: Felix (2012)

FONTE: Felix (2012)

Assim como observado anteriormente no ARC e no VMHdm, a gravidez foi novamente caracterizada por um aumento bastante significativo (de 3,8 vezes) na expressão do receptor AT1a ($10,49 \pm 3,79$ vs $2,76 \pm 0,95$, $p < 0.05$) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN, Figuras 31 e 33). O tratamento crônico com losartan produziu uma redução significativa da expressão do receptor AT1a no PVN das ratas grávidas quando comparada ao tratamento com veículo ($4,083 \pm 1,32$ vs $10,49 \pm 1,32$, $p < 0.05$; Figura 33). Essa redução fez com que, mais uma vez, não houvesse diferença significativa entre as grávidas tratadas com losartan e o grupo controle tratado com esta mesma droga ($4,083 \pm 1,32$ vs $2,17 \pm 0,49$; Figura 33). No grupo controle, o tratamento com losartan não produziu alterações significativas quando comparado ao tratamento apenas com veículo ($2,017 \pm 0,49$ vs $2,74 \pm 0,95$; Figura 33).

Ao avaliarmos a expressão da subunidade regulatória p85 α da PI3K no PVN, verificamos que há durante a gravidez um aumento significativo (2,7 vezes) de sua expressão quando comparado com o grupo controle ($18,02 \pm 5,47$ vs $6,7 \pm 1,66$; $p < 0.05$; Figura 34). Quando avaliamos a expressão da p85 α , na gravidez, após o tratamento crônico com losartan, verificamos que, mais uma vez, este não produziu quaisquer alterações significativas no PVN deste grupo quando comparado às grávidas tratadas somente com veículo ($19,69 \pm 2,04$ vs $18,02 \pm 5,47$; Figura 34), bem como também não foram observadas alterações no grupo controle ($5,74 \pm 1,1$ vs $6,70 \pm 1,66$; Figura 34).

Figura 33- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão do receptor AT1a no PVN.

A- Fotomicrografias ilustrativas da imunomarcação/expressão do receptor AT1a no PVN nos 4 grupos experimentais, aumento de 200 vezes (objetiva 20x). **B-** Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão do receptor AT1a no PVN em ratas controle tratadas com veículo (CTL+VE, n=3), ou com losartan (CTL+LOS, n=3), grávidas tratadas com veículo (G19+VE, n=3) ou com losartan (G19+LOS, n=3). Média $\pm$ EPM. ANOVA *p < 0.05 vs CTL+VE; + p < 0.05 vs G19+VE.

FONTE: Felix (2012)

Figura 34- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão da subunidade p85 α no PVN.

A. Fotomicrografias ilustrativas da imunomarcção/expressão da subunidade p85 α no PVN nos 4 grupos experimentais, aumento de 200 vezes (objetiva 20x). **B.** Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a expressão da subunidade p85 α no PVN em ratas controle tratadas com veículo (CTL+VE, n=3), ou com losartan (CTL+LOS, n=3), grávidas tratadas com veículo (G19+VE, n=3) ou com losartan (G19+LOS, n=3). Média $\pm$ EPM. ANOVA *p < 0.05 vs CTL+VE; + p < 0.05 vs CTL+LOS.

FONTE: Felix (2012)

Figura 35- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a co-localização da subunidade p85 α e do receptor AT1a no PVN.

A- Fotomicrografias ilustrativas da co-localização da subunidade p85 α e do receptor AT1a, no PVN nos 4 grupos experimentais, aumento de 200 vezes (objetiva 20x). **B-** Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) sobre a co-localização dessas proteínas no PVN em ratos controle tratados com veículo (CTL+VE, n=3), ou com losartan (CTL+LOS, n=3), grávidas tratadas com veículo (G19+VE, n=3) ou com losartan (G19+LOS, n=3). Média $\pm$ EPM. ANOVA *p <0.001 vs CTL+VE; +p<0.05 vs G19+VE; **p<0.05 vs CTL+LOS.

FONTE: Felix (2012)

A Figura 35 mostra a quantificação da co-localização da expressão do AT1a e da p85 α no PVN, comparando-as entre os quatro grupos experimentais. Observamos aumento significativo (2,64 vezes) da co-localização do AT1a e da p85 α no PVN na gravidez ($4,13 \pm 0,22$ vs $1,56 \pm 0,18$, $p < 0,001$). O tratamento crônico com losartan produziu nas grávidas redução da co-localização do AT1a e da p85 α no PVN ($2,9 \pm 0,27$ vs $4,13 \pm 0,22$, $p < 0,05$; Figura 35). No entanto, verificamos que apesar da redução significativa da co-localização do AT1a e da p85 α no PVN das grávidas tratadas com losartan, esta permaneceu ainda significativamente mais elevada quando comparada ao grupo controle tratado com a mesma droga ($2,9 \pm 0,27$ vs $1,48 \pm 0,23$, $p < 0,05$, Figura 35).

A Tabela 1 mostra conjuntamente os dados da expressão do AT1a, p85 α e sua co-localização (merge) no ARC, no VMHdm e no PVN, apresentados anteriormente nas figuras 23 a 28 e 33 a 35. A expressão dessas proteínas, bem como sua co-localização também foi avaliada na eminência mediana (ME), onde pode-se observar que os efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan foram semelhantes aos observados nas regiões descritas anteriormente. Assim observamos aumento significativo da expressão do AT1a e da p85 α na ME das grávidas, com redução na expressão da primeira e manutenção do aumento da segunda, após tratamento com losartan (Tabela 1). Também foi possível observar que existe co-localização dessas proteínas na ME, que foi reduzida nas grávidas tratadas com losartan (Tabela 1).

Tabela 1- Expressão do AT1, da p85 α e a co-localização de ambas no ARC, VMHdm, PVN e na ME nos quatro grupos experimentais.

	CTL+VE	CTL+LOS	G19+VE	G19+LOS
AT1a				
ARC	7,2 $\pm$ 1,43	7,7 $\pm$ 1,1	12,66 $\pm$ 1,1 [*]	7,65 $\pm$ 1,21 ⁺
VMHdm	5,0 $\pm$ 1,0	5,5 $\pm$ 0,74	8,3 $\pm$ 0,6 [*]	5,2 $\pm$ 0,7 ⁺
PVN	2,7 $\pm$ 0,95	2,0 $\pm$ 0,49	10,4 $\pm$ 3,7 [*]	4,08 $\pm$ 1,3 ⁺
ME	20 $\pm$ 1,6	21,6 $\pm$ 0,2	40,6 $\pm$ 4 [*]	19,8 $\pm$ 2 ⁺
p85α				
ARC	2,9 $\pm$ 1,0	3,9 $\pm$ 0,5	15,9 $\pm$ 2,3 ^{##}	13,8 $\pm$ 1,8 [#]
VMHdm	2,6 $\pm$ 0,7	3,3 $\pm$ 0,3	9,7 $\pm$ 2,3 [*]	8,8 $\pm$ 1,3 ^{*+}
PVN	6,7 $\pm$ 1,6	5,7 $\pm$ 1,1	18,02 $\pm$ 5,4 [*]	19,6 $\pm$ 2,04 ^{*+}
ME	19,5 $\pm$ 1,0	22,3 $\pm$ 1,6	43,8 $\pm$ 4,6 [*]	37,7 $\pm$ 10,5 ^{*+}
Merge				
ARC	2,0 $\pm$ 0,35	1,97 $\pm$ 0,15	3,6 $\pm$ 0,18 ^{##+}	2,0 $\pm$ 0,10 ⁺
VMHdm	1,4 $\pm$ 0,43	1,3 $\pm$ 0,36	4,1 $\pm$ 0,6 [*]	2,2 $\pm$ 0,20 ⁺
PVN	1,5 $\pm$ 0,18	1,48 $\pm$ 0,23	4,13 $\pm$ 0,22 ^{##}	2,9 $\pm$ 0,27 ^{+**}
ME	11 $\pm$ 0,08	11,5 $\pm$ 1,9	23 $\pm$ 2,0 [*]	15 $\pm$ 4,8 ⁺

Grupos controle tratados com veículo (CTL+VE, n=3) ou com losartan (CTL+LOS, n=3) e grávidas tratadas com veículo (G19+VE, n=3) ou com losartan (G19+LOS, n=3). ARC: núcleo arqueado; VMHdm: hipotálamo ventromedial porção dorsomedial; PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; ME: eminência mediana. Médias $\pm$ EPM. ANOVA. ^{*}p<0.05 vs CTL+VE; ⁺p<0.05 vs G19+VE; ^{##}p<0.001 vs CTL+VE; [#]p<0.01 vs G19+VE; ^{*+}p<0.05 vs CTL+LOS; ^{##+}p<0.01 vs CTL+VE; ^{**}p<0.05 vs CTL+LOS. FONTE: Felix (2012)

5.4. Avaliação do Peso e da Ingestão alimentar

Avaliamos a evolução do peso corporal nas grávidas tratadas com veículo ou com losartan. O peso dos animais foi aferido no dia zero (início do protocolo), no décimo quarto dia (início do tratamento com veículo ou losartan) e no final da gravidez/tratamento (décimo nono dia). Verifica-se que com o decorrer da gravidez ocorre um ganho de peso progressivo em ambos os grupos, atingindo níveis de significância no 14º dia ($275 \pm 5,4$ [G+VE, 14º dia]) vs $256 \pm 4,5$ [G+VE, dia zero], $p < 0,05$; $297,5 \pm 5,5$ [G+LOS, 14º dia] vs $280 \pm 6,1$ [G+LOS, dia zero], $p < 0,05$; Figura 36 A).

Figura 36- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) ou veículo sobre a evolução do peso corporal.

A- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) ou veículo sobre a evolução do peso corporal nas grávidas tratadas com veículo (G+VE, n=4) ou com losartan (G+LOS, n=6). **B-** Comparação do ganho de peso corporal durante todo o protocolo experimental (dia 19 – dia zero) nas grávidas tratadas com veículo (G+VE, n=4) ou com losartan (G+LOS, n=6). + $p < 0,001$ (G+LOS, dia 14 vs dia zero); * $p < 0,05$ (G+VE, dia 14 vs dia zero); ++ $p < 0,0001$ (G+LOS, dia 19 vs dia zero); ** $p < 0,0002$ (G+VE, dia 19 vs dia zero); # $p < 0,05$ vs G+VE.

FONTE: Felix (2012)

No décimo nono dia, podemos observar um ganho de peso ainda maior em ambos os grupos quando comparado ao início do protocolo ($334,5 \pm 56,7$ [G+VE, 19º dia]) vs $256 \pm 4,5$ [G+VE, dia zero], $p < 0,0002$; $353, \pm 11,6$ [G+LOS, 19º dia] vs $280 \pm 6,1$ [G+LOS, dia zero], $p < 0,0001$; Figura 36 A). Ainda que desde o início do protocolo o grupo G+LOS tenha apresentado peso maior do que o grupo G+VE ($280 \pm 6,1$ vs $256 \pm 4,5$, $p < 0,05$), diferença essa que se manteve até o final do protocolo, o ganho de peso foi similar em ambos os grupos ($80 \pm 8,6$ vs $78 \pm 5,8$), de modo que o tratamento crônico com losartan não produziu alterações significativas com relação ao ganho de peso na gravidez (Figura 36 B).

Observamos no grupo G+VE, aumento progressivo na ingestão alimentar, atingindo valores significativamente maiores no décimo quarto dia ($25,7 \pm 1,7$ vs $21,7 \pm 0,35$, $p < 0,05$) e ainda mais elevados no décimo nono dia, ao final da gestação ($30 \pm 1,4$ vs $21,7 \pm 0,35$, $p < 0,05$; Figura 37 A), quando comparados ao dia zero/início do protocolo. No grupo G+LOS houve aumento progressivo na ingestão alimentar semelhante ao observado no grupo G+VE até o décimo quarto dia ($26,7 \pm 1,4$ vs $22,6 \pm 1,2$, $p < 0,05$). A partir de então, com o início do tratamento crônico com losartan observamos redução significativa na ingestão alimentar (quando comparada ao grupo G+VE), que continuou progressivamente até atingir a redução máxima ao final do protocolo, no décimo nono dia ($24,5 \pm 1,9$ vs $30 \pm 1,4$, $p < 0,05$; Figuras 37A e 37 B). O consumo de alimento foi significativamente menor nas ratas grávidas tratadas com losartan ao final do protocolo, quando comparado às ratas grávidas tratadas somente com veículo ($24,5 \pm 1,9$ vs $30 \pm 1,4$, $p < 0,05$; Figura 37 A e 37 B).

Figura 37- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) ou veículo sobre evolução da ingestão alimentar.

A- Efeitos da gravidez e do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) ou veículo sobre evolução da ingestão alimentar nas grávidas tratadas com veículo (G+VE, n=4) ou com losartan (G+LOS, n=6). **B-** Efeito do tratamento crônico com losartan sobre a ingestão alimentar (consumo) nas grávidas tratadas com veículo (G19+VE, n=4) ou com losartan (G19+LOS, n=6). * $p < 0.05$ vs G19+VE.

FONTE: Felix (2012)

Ao avaliarmos a ingestão alimentar ou consumo de alimento expresso na razão consumo (g)/peso (kg), verificamos que não houve diferença significativa entre os grupos G+VE e G+LOS no início da gestação e no décimo quarto dia, Figuras 38 A e 38 B, respectivamente. No entanto, ao final do tratamento crônico com losartan (décimo nono dia), observamos redução significativa na razão consumo (g)/peso (kg) quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo ($0,0712 \pm 0,004$ vs $0,0895 \pm 0,003$, $p < 0,05$; Figura 38 C).

Figura 38- Efeito do tratamento crônico com losartan ou veículo sobre o consumo de alimento, expresso na razão consumo (g)/peso (kg).

A- Efeito do tratamento crônico com losartan ou veículo sobre o consumo de alimento, expresso na razão consumo (g)/peso (kg) nas grávidas tratadas com veículo (G+VE, n=4) ou com losartan (G+LOS, n=6) no dia zero/início da gestação. **B-** Idem A, no décimo quarto dia/início do tratamento crônico com losartan (10mg/kg, por 5 dias, via gavagem) ou veículo. **C-** Idem A, no décimo nono dia, final do tratamento/protocolo. *p<0,05 vs G19+VE.

FONTE: Felix (2012)

6 DISCUSSÃO

A insulina age no sistema nervoso central através de seu receptor IR, ativando a via de sinalização IRS/PI3K/AKT (NISWENDER; SWARTZ, 2003; PLUM; BELGARDT; BRUNNING, 2006). Esta via, operando no hipotálamo é também ativada pela leptina, está implicada na regulação da ingestão alimentar, e possui grande importância no *cross-talk* com a via de sinalização da insulina no controle da homeostasia energética (NISWENDER; SWARTZ, 2003; NISWENDER; BASKIN; SWARTZ, 2004). O hipotálamo possui importante papel tanto no controle do balanço energético, como no balanço glicêmico. A ação eficiente da insulina no SNC é necessária para a regulação da homeostasia glicêmica. Um intacto mecanismo hipotalâmico de sinalização de insulina é necessário para a total inibição sistêmica da produção endógena de glicose pelo fígado (PHG) (PRODI; OBICI, 2006).

O bloqueio da ação da insulina no ARC através de anticorpos contra insulina, ou a redução das ações da insulina através de oligonucleotídeos antisense contra o IR, ou ainda a inibição farmacológica das ações da PI3K levam a uma diminuição na habilidade da insulina circulante em produzir a inibição da PHG (PRODI; OBICI, 2006). Nossos resultados demonstraram pela primeira vez que na gravidez tardia, modelo fisiológico de resistência à insulina, ocorre a diminuição da expressão do IRS-2 no hipotálamo total, sem alterações observadas na expressão do IR e do IRS-1. A redução da expressão do IRS-2 tem sido um dos mecanismos moleculares propostos de resistência às ações da insulina. A diminuição da expressão do IRS-2 no hipotálamo resulta no aumento da ingestão alimentar e da massa corporal, levando a resistência à insulina e finalmente ao Diabetes (LIN et al., 2004).

O IRS-2 é extensamente localizado no hipotálamo e sua expressão foi claramente demonstrada anteriormente em diversos núcleos tais como o ARC, VMH (dorsomedial, central e ventrolateral) e PVN (PARDINI et al., 2006). Das quatro isoformas dos IRS (1-4), apenas o IRS-2 tem sido implicado no controle neural da homeostasia energética (WITHERS, 2001). A deleção específica do IRS-2 neuronal em camundongos leva a um fenótipo de animais obesos e hiperfágicos, o que estabelece um papel crucial desta proteína nos mecanismos centrais envolvidos no controle da homeostasia energética (CHOUDHURY et al., 2005). Há durante a gravidez um aumento da ingestão alimentar e alterações nos mecanismos de controle, onde é gerada uma situação de balanço energético positivo (GRATTAN; LADYMAN; AUGUSTINE, 2007; LADYMAN, 2008). Essas modificações são consideradas adaptativas e tem a função de

preparar o organismo materno para as demandas metabólicas necessárias ao desenvolvimento fetal e à lactação subsequente.

A hiperfagia observada na gravidez é causada por diversas alterações hormonais observadas nesta condição. Dentre elas, o desenvolvimento da resistência hipotalâmica às ações anorexígenas da leptina tem sido a mais extensamente descrita e estudada (LADYMAN; AUGUSTINE; GRATAN, 2010). No entanto, o papel da via de sinalização da insulina no hipotálamo durante a gravidez tem sido menos estudado, embora acredite-se que a resistência a leptina possa contribuir também para o estado de resistência à insulina na gravidez (LADYMAN; AUGUSTINE; GRATAN, 2010). A redução da expressão hipotalâmica de IRS-2 na gravidez aqui demonstrada sugere uma possível contribuição desta proteína na hiperfagia nesta condição, bem como uma possível piora/menor efetividade da via de sinalização da insulina.

Além disso, observamos também na gravidez (19 dias em ratas, correspondendo ao terceiro trimestre em humanos), aumento da expressão das subunidades regulatórias (p85 α , p55 α e p50 α) da PI3K no hipotálamo, o que implicaria numa menor atividade da subunidade catalítica (p110) da PI3K. Em concordância, houve subsequente redução da expressão da AKT total e da fosforilação da AKT em resíduo de serina (p-Ser⁴⁷³AKT), necessária para sua ativação. Diversos estudos demonstraram que o aumento da subunidade P85 α é um potente regulador negativo da via de sinalização da insulina, periféricamente, e tem importante papel na resistência insulínica (BARBOUR et al., 2004, 2005; MAUVAIS-JARVIS et al., 2002).

A produção de glicose hepática está aumentada durante a gravidez normal e a resistência periférica à insulina ocorre na maioria dos tecidos maternos, enquanto que a captação de glicose na placenta e nos tecidos fetais é elevada (NOLAN et al., 1994; RYAN et al., 1985). Tendo em vista que o intacto mecanismo hipotalâmico de sinalização de insulina através da via IRS/PI3K/AKT é necessário para efetiva inibição sistêmica da PHG (PRODI; OBICI, 2006), nossos resultados sugerem fortemente que além dos mecanismos periféricos que levam à resistência insulínica durante a gravidez, o aumento da expressão da subunidade p85 α da PI3K, especificamente no ARC e no VMHdm, também deve contribuir efetivamente para este quadro, através de uma menor inibição da PHG, aumentando assim a disponibilidade de glicose circulante para o *conceptus*. É interessante notar que a concentração plasmática de glicose na gravidez normal encontra-se até 39% abaixo dos valores basais encontrados nos animais controle, mesmo com a captação de glicose reduzida nos tecidos periféricos. No entanto a PHG está

aumentada (cerca de 21%) e a normoglicemia (ou até mesmo hipoglicemia) é mantida devido ao maior consumo de glicose pela placenta e pelo feto (NOLAN et al., 1994).

A eficaz ativação da PI3K no ARC já foi demonstrada necessária, como elemento-chave para que a insulina exerça seu efeito anorexígeno (NISWENDER et al., 2001). Nesse sentido e baseado em nossas observações de aumento da subunidade regulatória p85 α da PI3K no ARC, refletindo possivelmente em menor ativação da PI3K, podemos também supor que este fato esteja contribuindo para um menor efeito anorexígeno da insulina na gravidez, levando ao aumento do apetite e da ingestão alimentar observado nesta condição.

Diversos estudos demonstraram que a Angiotensina-II (Ang-II) desempenha um papel fundamental no desenvolvimento tanto da hipertensão arterial quanto no da resistência à insulina (NATALI; FERRANNINI, 2004). Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* descreveram que a Ang-II é capaz de inibir a sinalização da insulina através da via PI3K, possivelmente através do receptor AT1 visto que o tratamento com antagonistas desse receptor mostrou-se capaz de prevenir esse fenômeno (CARVALHO et al., 1997; SAAD; VELLOSO; CARVALHO, 1995; SHEEN, 2004; VELLOSO et al., 1996). De fato, a Ang-II através de sua ação no receptor AT1a modula negativamente a via de sinalização da insulina em múltiplos níveis (CARVALHEIRA et al., 2003; CALEGARI et al., 2005; VELLOSO et al., 2006). A Ang-II estimula a fosforilação em serina do IR, IRS-1, IRS-2 e da subunidade regulatória p85 da PI3K, modulando negativamente a sinalização da insulina (FOLLI et al., 1997). Além disso, a Ang-II no hipotálamo também induz a fosforilação da JAK-2 e o recrutamento e ativação do STAT-5b, que medeia a expressão do *Supressor of Cytokine Signaling-3* (SOCS-3) (CALEGARI et al., 2003; TORSONI et al., 2004). A SOCS-3 interage com as proteínas da via de sinalização da insulina, inibindo a fosforilação em tirosina do IRS-1 e do IRS-2 e a fosforilação em serina (Ser⁴⁷³) da AKT (CALEGARI et al., 2005).

Estudos demonstraram em modelos de hipertensão animal (SHR), que sabidamente possuem hiperatividade do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) cerebral, aumento da subunidade regulatória p85 α da PI3K no hipotálamo mediado pelas ações da Ang-II no receptor AT1a, sendo que o tratamento com captopril normalizou esta condição (VEERASINGHAM et al., 2005). Embora o SRA periférico esteja generalizadamente ativado (hiperatividade: aumento da renina, do angiotensinogênio e da Ang-II, exceto da ECA) na gravidez (HERSE et al., 2008; IRANI; XIA, 2008), nossos resultados demonstraram pela primeira vez, no tocante ao nosso

conhecimento, que centralmente este sistema também está hiperativado. Demonstramos durante a gravidez um aumento significativo da expressão do receptor AT1a no hipotálamo. Nossos experimentos de imunofluorescência confirmaram esses achados e demonstraram ainda que este aumento ocorre tanto no ARC como no VMHdm, no PVN e na ME. Com base no que foi exposto anteriormente, passamos a trabalhar com a hipótese de que este aumento da expressão do receptor AT1 no hipotálamo, e mais especificamente nas áreas responsáveis pelo controle da homeostasia glicêmica (ARC, VMH e PVN), poderia contribuir para a piora da eficiência na via IRS/PI3K/AKT e, conseqüentemente, para o quadro de resistência insulínica observado na gravidez. Através da imunofluorescência demonstramos que há tanto no ARC como no VMHdm e no PVN, uma significativa co-localização da expressão do receptor AT1a e da subunidade regulatória p85 α da PI3K, e ainda que esta co-localização está aumentada na gravidez devido ao aumento da expressão de ambas, o que reforçou nossa hipótese.

Trabalhos anteriores demonstraram que após o décimo dia de lactação de ratas, observa-se significativa redução da expressão de receptores AT-1 da Ang-II e do RNAm de Angiotensinogênio no ARC, quando comparadas com fêmeas no *diestrus* (SPETH et al., 1999; SPETH; SMITH; GROVE, 2001). Nossos resultados não demonstraram essas alterações na lactação, mas devemos ressaltar que utilizamos lactantes no terceiro e oitavo dias, e extrato de proteínas totais do hipotálamo como um todo, sendo que as alterações descritas anteriormente ocorreram em núcleos específicos do hipotálamo, com ausência de alterações em diversos outros. Com relação às proteínas da via de sinalização da insulina aqui estudadas, não observamos alterações na lactação, o que indicam que logo após o parto este fenômeno é rapidamente revertido. Assim, optamos por concentrar nossos esforços em investigar as alterações observadas na gravidez.

É importante ressaltarmos que, na gravidez, o tratamento crônico com losartan (antagonista AT1a) foi capaz de reverter/prevenir o aumento da expressão deste receptor no hipotálamo total, e mais especificamente no ARC, no VMHdm, no PVN e na ME. A partir daí, procuramos avaliar o efeito deste tratamento na expressão das proteínas da via de sinalização da insulina, para verificarmos o *cross-talk* entre as vias, onde o aumento da atividade do SRA no hipotálamo poderia ser responsável, ao menos em parte, pelas alterações observadas na via IRS/PI3K/AKT. Ou ainda, se neste caso, o antagonismo AT1a seria capaz de reverter essas alterações. No entanto, nossos resultados demonstraram que o tratamento crônico com losartan

não produziu quaisquer alterações na expressão das subunidades regulatórias (p85 α , p55 α e p50 α) da PI3K e na expressão da AKT total no hipotálamo. Da mesma forma, quando avaliamos especificamente a expressão da p85 α no ARC, no VMHdm e no PVN, o tratamento com losartan, apesar de ter reduzido significativamente nas grávidas a expressão do receptor AT1a nessas regiões, não teve efeito algum sobre a expressão da subunidade p85 α da PI3K, que permaneceu elevada. Assim, de modo oposto à nossa hipótese, nossos resultados demonstraram que a hiperatividade do SRA hipotalâmico na gravidez, não é diretamente responsável pelas alterações centrais observadas na via de sinalização da insulina nesta situação, visto que o tratamento com antagonista AT1a não produziu qualquer efeito nas proteínas da via de sinalização da insulina aqui estudadas. Deste modo, passamos a questionar quais poderiam ser os fatores que causariam alterações na via de sinalização da insulina hipotalâmica, na gravidez.

Sabe-se que as concentrações plasmáticas materna de esteróides sexuais (estrógeno e progesterona), prolactina (PRL), lactogênio placentário e corticosteróides estão bastante elevados durante a gravidez e estão relacionados às alterações periféricas na captação de glicose (resistência à insulina) (MASCHARANI; KARAN, 2001). Trabalhos do nosso laboratório demonstraram que o tratamento com PRL produz alterações da expressão de diversos genes relacionados à sinalização intracelular, transcrição gênica e síntese protéica tanto “in vitro” (BORDIN et al., 2004) quanto ‘in vivo’ durante a gestação (AMARAL et al., 2004). Evidências sugerem que o estabelecimento da placenta e associação de elevados níveis circulantes de PRL e de lactogênio placentário contribuem para resistência hipotalâmica à leptina e para o aumento do apetite/ingestão alimentar (LADYMAN; AUGUSTINE; GRATAN, 2010).

O hipotálamo é o centro crítico para regulação e integração de diversas funções autonômicas, endócrinas e comportamentais (KANDEL et al., 2000). Muitas dessas funções são afetadas/moduladas pelo estrógeno, e em especial e de nosso interesse, aquelas relacionadas com o controle da homeostasia energética/glicêmica e da ingestão alimentar (MILEWICZ et al., 2001; STEARNS et al., 2002). Os níveis plasmáticos de estrógenos mostraram-se diminuídos na situação de balanço energético negativo (BRONSON, 1986) e a deficiência de estrógeno ou perda da função de seu receptor (ER) levam ao aumento da ingestão alimentar e da adiposidade tanto em roedores como em humanos (HEINE et al., 2000; SMITH et al., 1994). A ovariectomia resulta em aumento da ingestão alimentar e no ganho de peso, e o tratamento de reposição com estrógeno reverte estes efeitos, inibindo fortemente a ingestão alimentar (ASARIAN; GEARY,

2002, 2006). A ablação do receptor de estrógeno alpha ($ER\alpha$) no cérebro resulta em obesidade severa e síndrome metabólica (MUSATOV et al., 2007). A administração central de estrógeno tem efeito anorexígeno, demonstrando que, de fato o estrógeno age no cérebro, participando da regulação da ingestão alimentar (GAO et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado que o estrógeno exerce um efeito semelhante ao da leptina (leptin-like) modulando a densidade das sinapses de neurônios POMC (GAO et al., 2007). O fato do estrógeno estar paradoxalmente elevado na gravidez onde há aumento do apetite pode significar que haja centralmente uma situação de resistência aos efeitos deste hormônio.

Trabalhos demonstraram que os efeitos da sinalização da PI3K cerebral e hipotalâmica são mediados pelo estrógeno (MALYALA, et al., 2008; MANELLA; BRINTON, 2006). O tratamento agudo com estrógeno em ratas ovariectomizadas produz aumento na expressão da $p55\gamma$, no VMHdm, ARC e PVN, sendo que a expressão da $p85\alpha$ também foi significativamente aumentada no VMHdm, com forte tendência ao aumento no ARC e no PVN, embora não tenha atingido níveis de significância (MALYALA et al., 2008). Este mesmo trabalho demonstrou que, quanto aos níveis de expressão basal, a $p85\alpha$ é mais expressa no ARC do que no VMH. Nossos resultados também confirmaram esse achado, onde observamos em valores absolutos (e principalmente qualitativamente) expressão basal ligeiramente maior da $p85\alpha$ no ARC do que no VMHdm. No entanto, demonstramos na gravidez que a expressão da $p85\alpha$ está de fato aumentada tanto no ARC como no VMHdm e no PVN e que o tratamento crônico com losartan não produziu qualquer efeito nessa expressão.

Do que foi exposto anteriormente, pode-se supor que o estrógeno, que sabidamente está aumentado na gravidez, poderia ser um dos fatores determinantes dessas alterações observadas por nós na expressão da $p85\alpha$ no ARC, no VMHdm e no PVN. Outro trabalho recente também demonstrou que a progesterona e seus metabólitos aumentam a expressão da subunidade regulatória $p85\alpha$ e também, em menor intensidade, da subunidade catalítica $p110$ em diversas regiões cerebrais tais como o cerebelo, hipocampo e especialmente no hipotálamo (GUERRA-ARAIZA et al., 2009).

O ARC faz conexões recíprocas com diversos núcleos hipotalâmicos, incluindo o PVN, VMH e DMH (BERTHOUD, 2002, 2007) sendo que em todas essas regiões foi demonstrada a expressão do $ER\alpha$ (WAREMBOURG; LEROY, 2004). O ARC possui diversas populações de neurônios, incluindo os que expressam NPY/AgRP, cuja ativação tem efeito orexigênico,

estimulando fortemente a ingestão alimentar; e os neurônios que expressam POMC/CART, que quando ativados induzem resposta anorexígena (FUNAHASHI et al., 2003). Os neurônios do ARC são alvos para as ações da leptina e da insulina (PORTE; BASKIN; SCHWARTZ, 2002, 2005). A administração intracerebroventricular de inibidores da PI3K bloqueiam as ações anorexígenas da leptina e da insulina sobre a ingestão alimentar e demonstram a importância do hipotálamo, e principalmente dos núcleos específicos como o ARC e o VMH em mediar essas ações (NISWENDER et al., 2001; NISWENDER; SCHWARTZ, 2003). Uma das limitações do nosso estudo foi o fato de não termos identificado em quais populações específicas de neurônios do ARC ocorrem essas alterações observadas por nós. Infelizmente pela falta de anticorpos primários, não foi possível detectar se estas ocorriam primariamente nos neurônios POMC/CART, nos neurônios NPY/AgRP, ou em ambos.

O VMH foi uma das primeiras áreas do hipotálamo identificadas com importante papel no controle do peso corporal. Baseado na observação de que lesões desse núcleo resultam em obesidade severa, foi inicialmente proposto que o VMH seria o “centro de saciedade” do cérebro (ELMQUIST; ELIAS; SAPER, 1999). Embora o exato papel da via da PI3K no VMH ainda não tenha sido totalmente esclarecido, a presença de receptores da insulina (NUMAN; RUSSELL, 1999) e da leptina (HUBSCHLE et al., 2001), bem como de neurônios sensíveis à glicose (KANG et al., 2004; SONG et al., 2001, 2005) nessa região sugerem que a sinalização pela via PI3K deve ser importante em mediar diversas funções incluindo o comportamento sexual, afetivo e a ingestão alimentar (BORSZCZ, 2006; DAVIDOWA; LI; PLAGEMANN, 2002; KOW et al., 1994). O $ER\alpha$ é altamente expresso no VMH porção ventrolateral (VMHvl) (TURCOTTE; BLAUSTEIN, 1999). De fato, esta região parece estar mais envolvida com o comportamento sexual do que com a ingestão alimentar, visto que lesões específicas no VMHvl inibem o comportamento de lordose em ratos (EMERY; MOSS, 1984; PFAFF; SAKUMA, 1979). Por outro lado, os receptores da leptina são mais expressos na porção dorsomedial (VMHdm) e excluídos do VMHvl (MCCLELLAN; PARKER; TOBET, 2006). O fato da PI3K ser um importante componente da via de sinalização tanto da leptina como da insulina sugere que as alterações na expressão da $p85\alpha$ no VMHdm demonstradas por nós devem realmente ser importantes em modular as ações da leptina e da insulina nesta região.

O PVN também é um importante núcleo hipotalâmico envolvido no controle da homeostasia energética. Ele serve de alvo primário para leptina, e expressa o receptor LepR tanto

em neurônios parvicelulares como em neurônios magnocelulares, incluindo os neurônios ocitocinérgicos e também aqueles que expressam hormônio liberador de corticotropina (CRH) e hormônio liberador de tireotropina (TSH) (HAKANSSON et al., 1998). Além disso, o PVN recebe conexões dos neurônios de primeira ordem do ARC, mais especificamente neurônios POMC e AgRP, que expressam altos níveis de receptores MC4 (MC4R) e NPY (NPYR), respectivamente (COWLEY et al., 1999; KISHI et al., 2003; MOUNTJOY et al., 1994). Interessantemente, a deficiência de ocitocina (OT) também causa obesidade (CAMERINO, 2009). A liberação central de OT é aumentada pelo α -MSH (SABATIER et al., 2003) e a administração central de OT induz a efeitos anorexígenos semelhantes aos do α -MSH (ARLETTI; BENELLI; BERTOLINI, 1989). De fato, a administração central de antagonistas do receptor de OT (OTR) bloqueia o efeito da leptina sobre a ingestão alimentar (BLEVINS; SCHATZ; BASKIN, 2004). Ao menos em parte, a resistência à leptina durante a gravidez é causada pela perda da resposta ao α -MSH, presumidamente no PVN (COWLEY et al., 1999; MOUNTJOY et al., 1994; WIRTH et al., 2001; ZANG; FELDER, 2004).

Os receptores de prolactina (PRLR) são expressos nos neurônios ocitocinérgicos no PVN (KOKAY et al., 2006) e a PRL reduz agudamente a frequência de disparos desses neurônios. Microinjeções de PRL especificamente no PVN aumentam o apetite e a ingestão alimentar (SAUVE; WOODSIDE, 2000). Desta forma é possível que prolactinemia elevada na gravidez possa atuar como um antagonista funcional da ação do α -MSH no PVN, resultando em resistência secundária à leptina. Há também evidências de que a PRL atuando centralmente contribui para hiperfagia observada na lactação (WOODSIDE, 2007). O aumento da expressão de NPY no DMH (mas não no ARC) induzida pela PRL durante a lactação parece aumentar os sinais orexígenos para o PVN (CHEN; SMITH, 2007; LI; CHEN; SMITH, 1999).

A administração central de Ang-II sabidamente inibe a ingestão alimentar e estimula a ingestão hídrica (PORTER; POTRATZ, 2004). De maneira inversa, a inibição do SRA no cérebro por oligonucleotídeos anti-sense contra angiotensinogênio nas células gliais resulta no aumento da ingestão energética (KASPER et al., 2005). Trabalho recente demonstrou que ratos tratados com captopril tiveram uma ingestão alimentar significativamente menor, mesmo com o aumento na expressão do NPY no ARC desses animais, e tiveram uma melhora no teste de tolerância à glicose, quando comparados com os animais controle que receberam alimentação à vontade (KLOET et al., 2009). O tratamento agudo ou crônico com antagonista AT1a, irbesartan,

melhora/diminui a resistência à insulina em ratos Zucker obesos, ao menos em parte devido ao aumento da expressão do transportador de glicose-4 (GLUT-4) na musculatura esquelética, produzindo aumento no transporte de glicose nesses tecidos (HENRIKSEN et al., 2001).

A hiperatividade do SRA tem sido associada à obesidade, devido ao fato deste sistema estar envolvido no controle da homeostasia glicêmica, dando base para uma importante correlação entre a obesidade, o diabetes e a hipertensão arterial (BOUSTANY et al., 2004; SCHMIEDER et al., 2007). Nossos resultados demonstraram que o tratamento crônico com antagonista AT1a foi capaz de reduzir a expressão deste receptor tanto no ARC como no VMHdm e no PVN das ratas grávidas. O tratamento crônico com losartan produziu na gravidez, leve redução da ingestão alimentar e da razão consumo (g)/peso (kg) sem causar alteração significativa no ganho de peso desses animais. Trabalho anterior demonstrou não haver diferença significativa na ingestão de sódio e água entre as ratas grávidas tratadas com losartan e as tratadas com veículo, sugerindo que o receptor AT1 não está diretamente envolvido com o aumento da ingestão de água e sódio observados na gravidez (BUTLER et al., 2002). No entanto, este mesmo trabalho não investigou se o tratamento com esta mesma droga durante a gestação causaria alterações na ingestão alimentar.

Já é conhecido que, periféricamente, na placenta e na decídua, ocorrem alterações na expressão do receptor AT1 na pré-eclâmpsia (HERSE et al., 2008; IRANI; XIA, 2008). Um possível desequilíbrio no SRA, representado aqui pelo aumento da expressão do receptor AT1a no hipotálamo durante a gravidez, também poderia contribuir para o desenvolvimento de condições clínicas importantes e bastante prevalentes na gravidez, como é o caso da eclâmpsia/pré-eclâmpsia. Os mecanismos pelos quais os componentes desse sistema interagem, na gravidez normal e anormal ainda não estão inteiramente compreendidos e novos estudos serão necessários para elucidar essas questões.

A interação entre os diversos mecanismos de sinalização intracelular é de fundamental importância para a regulação das mais variadas funções e adaptações fisiológicas que ocorrem no organismo. O estudo aprofundado desses mecanismos contribui para a compreensão dos processos fisiológicos celulares, bem como para o entendimento de diversas patologias que podem ocorrer devido à hipo ou hiperatividade dessas vias e sistemas em situações específicas.

7 CONCLUSÕES

Algumas observações originais foram advindas deste trabalho. O aumento da expressão do AT1a e das subunidades regulatórias da PI3K, concomitante com a redução da do IRS-2 e da p-Ser⁴⁷³AKT, no hipotálamo, durante a gravidez, foram ambas demonstradas pela primeira vez. O aumento da expressão da p85 α e do AT1a no ARC, no VMHdm e no PVN na gravidez tardia também não haviam sido descritos anteriormente. A disfunção das vias da Ang-II e da insulina em graus variados pode levar a duas condições patológicas de alta prevalência e que muitas vezes são concomitantes: diabetes mellitus e hipertensão arterial. Se por um lado, o *cross-talk* entre estas duas vias de sinalização parece contribuir para a associação clínica entre o diabetes e a hipertensão, a caracterização molecular dessa interação, tanto nas situações fisiológicas (por exemplo na gravidez) como nas situações patológicas, poderá revelar alvos para futuras intervenções terapêuticas para diversas condições clínicas como a obesidade, o diabetes, a hipertensão arterial, a pré-eclâmpsia/eclâmpsia, etc.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

AGUILERA, G.; HYDE, C. L.; CATT, K. J. Angiotensin II receptors and prolactin release in pituitary lactototrophs. **Endocrinology**, v. 111, p. 1045-1050, 1982.

AIR, E. L.; STROWSKI, M. Z.; BENOIT, S. C.; CONARELLO, S. L.; SALITURO, G. M.; GUAN, X. M.; LIU, K.; WOODS, S. C.; ZHANG, B. B.; Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. **Nat. Med.**, v. 8, p. 179-183, 2002.

ALLEN, A. M.; OLDFIELD, B. J.; GILES, M. E.; PAXINOS, G.; MCKINLEY, M. J.; MENDELSON, F. A. O. Localization of angiotensin receptors in the nervous system. In: QUIRON, R.; BJORKLUND, A.; HOKFELT, T. (Ed.). **Handbook of chemical neuroanatomy**, Amsterdam: Elsevier, 2000. v. 16, p. 79-124.

AMARAL, M. E. C.; CUNHA, D. A.; ANHE, G. F.; UENO, M.; CARNEIRO, E. M.; VELLOSO, L. A.; BORDIN, S.; BOSCHERO, A. C. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-Kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. **Journal of Endocrinology**, v. 183, p. 469-476, 2004.

ANHE, G. F.; HIRABARA, S. M.; TURRER, T. C.; CAPERUTO, L. C.; ANHE, F. F.; RIBEIRO, L. M.; MARÇAL, A. C.; CARVALHO, C. R. O.; CURI, R.; MACHADO, U. F.; BORDIN, S. Postpartum glycemic homeostasis in early lactating rats is accompanied by transient and specific increase of soleus insulin response through IRS2/AKT pathway. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 292, p. R2225-R2233, 2007.

ARLETTI, R.; BENELLI, A.; BERTOLINI, A. Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. **Peptides**, v. 10, p. 89-93, 1989.

ASARIAN, L.; GEARY, N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. **Horm. Behav.**, v. 42, p.461-471, 2002.

ASARIAN, L.; GEARY, N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 361, p. 1251-1263, 2006.

* De acordo com:

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

AVERILL, D. B.; MATSUMURA, K.; GANTEN, D.; FERRARIO, C. M. **Hypertension**, v. 27, p. 591-597, 1996.

BADER, M.; PETERS, J.; BALTATU, O.; MULLER, D. N.; LUFT, F. C.; GANTEN, D. Tissue renin-angiotensin systems: new insites from experimental animal models in hypertension research. **J. Mol. Med.**, v. 79, p. 76-102, 2001.

BARBOUR L. A; RAHMAN, S. M.; GUREVICH, I.; LEITNER, J. W.; FISHER, 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 α is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 45, p. 37489-37494, 2005.

BARBOUR L. A; SHAO, J.; QUIAO, L.; LEITNER, W.; ANDERSON, M.; FRIEDMAN, J. E.; DRAZNIN, B. Human placental growth hormone increases expression of the P85 regulatory unity of phosphatidylinositol 3-kinase and triggers severe insulin resistance in skeletal muscle. **Endocrinology**, v. 145, p. 1144-1150, 2004.

BASSO, N.; RUIZ, P.; MANGIARUA, E.; TAQUINI, A. C. Renin-like activity in the rat brain during the development of DOC-salt hypertension. **Hypertension**, v. 3, p. II14-17, 1981.

BATES, S. H.; MYERS, M. G. The role of leptin–STAT3 signaling in neuroendocrine function: an integrative perspective. **J. Mol. Med.**, v. 82, p. 12–20, 2004.

BERTHOUD, H. R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. **Neurosc. Biobehav. Rev.**, v. 26, p. 393-428, 2002.

BERTHOUD, H. R. Interactions between the “cognitive” and “metabolic” brain in the control of food intake. **Physiol. Behav.**, v. 91, p. 486-498, 2007.

BLEVINS, J. E.; SCHATZ, M. W.; BASKIN, D. G. Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 287, p. R87-96, 2004.

BORDIN, S.; AMARAL, M. E.; ANHE, G. F.; DELGHINGARO-AUGUSTO, V.; CUNHA, D. A.; NICOLETTI-CARVALHO, J. E.; BOSCHERO, A. C. Prolactin-modulated gene expression profiles in pancreatic islets from adult female rats. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 220, p. 41-50, 2004.

BOUSTANY, C. M.; BHARADWAJ, K.; DAUGHERTY, A.; BROWN, D. R.; RANDALL, D. C.; CASSIS, L. A. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 287, p. R943–R949, 2004.

BORSZCZ, G. S. Contribution of the ventromedial hypothalamus to generation of the affective dimension of pain. **Pain**, v. 123, p. 155-168, 2006.

BHAT, G. J.; THEKKUMKARA, T. J.; THOMAS, W. G.; CONRAD, K. M.; BAKER, K. M. Angiotensin II stimulates *sis*-inducing factor-like DNA binding activity. Evidence that the AT_{1A} receptor activates transcription factor Stat91 and/or a related protein. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 31443-31449, 1994.

BJORBAEK, C.; UOTANI, S.; DA SILVA B.; FLIER, J. S. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 32686–32695, 1997.

BRONSON, F. H. Food-restricted, prepuberal, female rats: Rapid recovery of luteizing hormone pulsing with excess food, and full recovery of pubertal developing with gonadotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, v. 118, p. 2483-2787, 1986.

BURNOL, A. F.; FERRE, P.; LETURQUE, A.; GIRARD, J. Effect of insulin on in vivo glucose utilization in individual tissues of anesthetized lactating rats. **Am. J. Physiol.**, v. 252, p. E183-E188, 1987.

BURNOL, A.F.; LETURQUE, A.; FERRE, P.; GIRARD, J. Glucose metabolism during lactation in the rat: quantitative and regulatory aspects. **Am. J. Physiol.**, v. 245, p. E351-E358, 1983.

BUTLER, D. G.; PAK, S. H.; MIDGELY, A.; NEMAT, B. AT(1) receptor blockade with losartan during gestation in Wistar rats leads to an increase in thirst and sodium appetite in their adult female offspring. **Regul. Pept.**, v. 105, n. 1, p. 47-57, 2002.

CALEGARI, V. C.; BEZERRA, R. M.; TORSONI, M. A.; TORSONI, A. S.; FRANKINI, K. G.; SAAD, M. J. VELLOSO, L. A. Suppressor of cytokine signaling is induced by angiotensin II in the heart and isolated cardiomyocytes, and participates of desensitization. **Endocrinology**, v. 144, n. 10, p. 4586-4596, 2003.

CALEGARI, V. C.; ALVES, M.; PICARDI, P. K.; INOUE, R. Y.; FRANKINI, K. G.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Suppressor of cytokine signaling-3 provides a novel interface in the cross-talk between angiotensin II and insulin signaling systems. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 579-588, 2005.

CAMERINO, C. Low sympathetic tone and obese phenotype in oxytocin-deficient mice. **Obesity**, v. 17, p. 980-984, 2009.

CARVALHEIRA, J. B.; SILOTO, R. M.; IGNACCHITTI, I.; BRENELLI, S. L.; CARVALHO, C. R.; LEITE, A.; VELLOSO, L. A.; GONTIJO, J. A.; SAAD, M. J. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. **FEBS. Lett.**, v. 500, p. 119-124, 2001.

CARVALHEIRA, J. B.; CALEGARI, V. C.; ZECCHIN, H. G.; NADRUZ, W. JR.; GUIMARAES, R. B.; RIBEIRO, E. B.; FRANKINI, K. G.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. The crosstalk between angiotensin and insulin differentially affects phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase-mediated signaling in rat heart: implications for insulin resistance. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5604-5614, 2003.

CARVALHO, C. R.; THIRONE, A. C.; GONTIJO, J. A.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. Effect of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action. **Diabetes**, v. 46, p. 1950-1957, 1997.

CONTI, F. Claude Bernard's Des Fonctions du Cervau: an ante litteram manifesto of the neurosciences? **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 3, p. 979-985, 2002.

COWLEY, M. A.; PRONCHUK, N.; FAN, W.; DINULESCU, D. M.; COLMERS, W. F.; CONE, R. D. Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. **Neuron**, v. 24, p. 155-163, 1999.

CHAI, S. Y.; MCKINLEY, M. J.; MENDELSON, F. A. O. Distribution of angiotensin converting enzyme in sheep hypothalamus and medulla oblongata visualized by in vitro autoradiography. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 9, p. 449-460, 1987a.

CHAI, S. Y.; MENDELSON, F. A. O.; PAXINOS, G. Angiotensin converting enzyme in rat brain visualized by in vitro autoradiography. **Neuroscience**, v. 20, p. 615-627, 1989b.

CHEN, P.; SMITH, M. S. Regulation of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression during lactation: role of prolactin. **Endocrinology**, v. 145, p. 823-829, 2004.

CHOUDHURY, A. I.; HEFFRON, H.; SMITH, M. A.; AL-QASSAB, H.; XU, A. W.; SELMAN, C.; SIMMGEN, M.; CLEMENTS, M.; CLARET, M.; MOOSAJEE, V.; BELL, J. D.; SPEAKMAN, J. R.; BATTERHAM, R. L.; BARSH, G. S.; ASHFORD, M. L.; WITHERS, D. J. The role of insulin receptor substrate 2 in hypothalamic and beta cell function. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 941-950, 2005.

DAVIS, S. N.; DUNHAN, B.; WALMSLEY K.; SHAVERS, C.; NEAL, D.; WILLIAMS, P.; CHERRINGTON, A. D. Brain of the conscious dog is sensitive to physiological changes in circulating insulin. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. 567-575, 1997.

DAVIDOWA, H.; LI, Y.; PLAGEMANN, A. Differential response to NPY of PVH and dopamine-responsive VMH neurons in overweight rats. **Neuroreport**, v. 13, p. 1523-1527, 2002.

DEMAREST, K. T.; MCKAY, D. W.; RIEGLE, G. D.; MOORE, K. E. Biochemical indices of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity during lactation: a lack of response to prolactin. **Neuroendocrinology**, v. 36, p. 130-137, 1983.

DEMAREST, K. T.; MOORE, K. E.; RIEGLE, E. D. Acute restraint stress decreases tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity: evidence for a differential response in male versus female rats. **Neuroendocrinology**, v. 41, p. 504-510, 1985.

DESCHEPPER, C. F.; FLAXMAN, M. Glucocorticoid regulation of rat diencephalon angiotensinogen production. **Endocrinology**, v. 126, p. 963-970, 1990.

DZAU, V. L.; INGELFINGER, J.; PRATT, R. E. ELLISON, K. E. Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains. **Hypertension**, v. 8, p. 544-548, 1986.

EGUSHI, S.; INAGAMI, T. Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase. **Regul. Pept.**, v. 91, p. 13-20, 2000.

ELMQUIST, J. K.; ELIAS, C. F.; SAPER, C. B. From lesions to leptin: hypothalamic control of body weight and food intake. **Neuron**, v. 22, p. 221-232, 1999.

EMERY, D. E.; MOSS, R. L. Lesions confined to the ventromedial hypothalamus decrease the frequency of coital contacts in female rats. **Horm. Behav.**, v. 18, p. 313-329, 1984.

ENGELI, S.; NEGREL, R.; SHARMA, A. M. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. **Hypertension**, v. 35, p. 1270-1277, 2000.

FELDMAN, R. ACE inhibitors versus AT1 blockers in the treatment of hypertension and syndrome X. **Can. J. Cardiol.**, v. 16, p. 41E-44E, 2000.

FERRARIO, C. M.; CHAPPEL, M. C.; TALLANT, E. A.; BROSNIHAN, K. B.; DIZ, D. L. Counterregulatory actions of Angiotensin – (1-7). **Hypertension**, v. 30, p. 535-541, 1997.

FERRARIO, C. M.; TRASK, A. J.; JESSUP, J. A. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 289, p. H2281-H2290, 2005.

FOLLI, F.; KAHN, C. R.; HANSEN, H.; BOUCHIE, J. L.; FEENER, E. P. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. **J. Clin. Invest.**, v. 100, p. 2158-69, 1997.

FUNAHASHI, H.; YAMADA, S.; KAGEYAMA, H.; TAKENOYA, F.; GUAN, J. L.; SHIODA, S. Co-existence of leptin and orexin-receptors in feeding-regulating neurons in the hypothalamic arcuate nucleus – a triple labeling study. **Peptides**, v. 24, p. 687-694, 2003.

GANTEN, D.; HERMAN, K.; BAYER, C.; UNGER, T.; LANG, R. E. Angiotensin synthesis in the brain and increased turnover in hypertensive rats. **Science**, v. 221, p. 869-871, 1983.

GAO, Q.; MEZEI, G.; NIE, Y.; RAO, Y.; CHOI, C. S.; BECHMANN, I.; LERANTH, C.; TORAN-ALLERAND, D.; PRIEST, C. A.; ROBERTS, J. L.; CAO, X. B.; MOBBS, C.; SHULMAN, G. I.; DIANO, S.; HORVATH, T. L. Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. **Exp. Eye. Res.**, v. 84, n. 3, p. 599-609, 2007.

GIACCHETTI, G.; SECHI, L. A.; RILLI, S.; CAREY, R. M. The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 16, p. 120-126, 2005.

GIRONACCI, M. M.; VALERA, M. S.; YUJNOVSKY, L.; PENA, C. Angiotensin-(1-7) inhibitory mechanism of norepinephrine release in hypertensive rats. **Hypertension**, v. 44, p. 783-787, 2004.

GONZALEZ, C.; ALONSO, A.; FERNANDEZ, R.; PATTERSON, A. M. Regulation of insulin receptor substrate-1 in the liver, skeletal muscle and adipose tissue of rats throughout pregnancy. **Gynecol. Endocrinol.**, v. 17, p. 187-197, 2003.

GRATTAN, D. R.; LADYMAN, S. R.; AUGUSTINE, R. A. Hormonal induction of leptin resistance during pregnancy. **Physiol. Behav.**, v. 91, p. 366-376, 2007.

GUERRA-ARAIZA, C.; AMORIN, M. A. R.; PINTO-ALMAZÁN, R.; GONZÁLEZ-ARENAS, A.; CAMPOS, M. G.; GARCIA-SEGURA, L. M. Regulation of the phosphoinositide-3 kinase signaling pathways by progesterone and its reduced metabolites in the rat brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, p. 470-481, 2009.

GUTIERREZ-JUAREZ, R.; OBICI, S.; ROSSETTI, L. Melanocortin-independent effects of leptin on hepatic glucose fluxes. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 49704–49715, 2004.

HAKANSSON, M. L.; BROWN, H.; GHILARDI, N.; SKODA, R. C.; MEISTER, B. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 559-572, 1998.

HALAAS, J. L.; BOOZER, C.; BLAIR-WEST, J.; FIDAHUSEIN, N.; DENTON, D. A.; FRIEDMAN, J. M. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 8878-8883, 1997.

HALAAS, J. L.; GAJIWALA, K. S.; MAFFEI, M.; COHEN, S. L.; CHAIT, B. T.; RABINOWITZ, D.; LALLONE, R. L.; BURLEY, S. K.; FRIEDMAN, J. M. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, v. 169, p. 546-546, 1995.

HALL, J. E.; GRANGER, J. P.; SMITH, Jr., M. J.; PREMEN, A. J. Role of renal hemodynamics and arterial pressure in aldosterone escape. **Hypertension**, v. 6, p. 1183-1192, 1984.

HARVEY, J.; MCKAY, N. G.; WALKER, K. S.; VAN DER KAAY, J.; DOWNES, C. P.; ASHFORD, M. L.; Essential role of phosphoinositide 3-kinase in leptin-induced K(ATP) channel activation in the rat CRI-G1 insulinoma cell line. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 4660-4669, 2000.

HEINE, P. A.; TAYLOR, J. A.; IWAMOTO, G. A.; LUBAHN, D. B.; COOKE, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 12729-12734, 2000.

HENRIKSEN, E. J.; JACOB, S.; KINNICK, T. R.; TEACHEY, M. K.; KREKLER, M. Selective angiotensin II receptor antagonism reduces insulin resistance in obese Zucker rats. **Hypertension**, v. 38, p. 884-890, 2001.

HERBERT, J.; FORSLING, M. L.; HOWES, S. R.; STACEY, P. M.; SHIERS, H. M. Regional expression of *c-fos* antigen in the basal forebrain following intraventricular infusions of angiotensin and its modulation by drinking either water or saline. **Neuroscience**, v. 51, p. 867-882, 1992.

HERSE, F.; STAFF, A. C.; HERING, L.; MULLER, D. N.; LUFT, F. C.; DECHEND, R. AT1-receptor autoantibodies and uteroplacental RAS in pregnancy and pre-eclampsia. **J. Mol. Med.**, v. 86, p. 697-703, 2008.

HILGENFELD, U. Angiotensinogen in rat cerebrospinal fluid. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 6, p. 1815-1824, 1984.

HSIUNG, S. C.; ADLESBERG, M.; ARANGO, V.; MANN, J. J.; TAMIR, H.; LIU, K. P. Attenuated 5-HT_{1A} receptor signaling in brains of suicide victims: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase, AKT and mitogen-activated protein kinase. **J. Neurochem.**, v. 87, p. 182-194, 2003.

HOFFMAN, G. E.; LI, W. W.; ABDUD, R.; LEE, W. S.; SMITH, M. Use of fos-related antigens (FRAS as markers) of neuronal activity: FRA changes in dopamine neurons during proestrus, pregnancy and lactation. **Brain. Res.**, v. 654, p. 207-215, 1994.

HORNES, P. J.; On the decrease of glucose tolerance in pregnancy. A review. **Diabetes Metab.**, v. 11, p. 310-315, 1985.

HUBSCHLE, T.; WATSON, A.; ROTH, J.; KLAUS, S.; MEYERHOF, W. Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 2413 – 2424, 2001.

IRANI, R. A.; XIA, Y. The functional role of the Renin-Angiotensin System in Pregnancy and Preeclampsia. **Placenta**, v. 29, n. 9, p. 763-771, 2008.

JOHREN, O.; SANVITO, G. L.; EDIGY, G.; SAAVEDRA, J. M. Angiotensin II AT(1A) receptor mRNA expression is induced by estrogen-progesterone in dopaminergic neurons of the female rat arcuate nucleus. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 8283-8292, 1997.

KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 106, p. 473-481, 2000.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. M.; JESSEL, T. M. (Ed). The autonomic nervous system and the hypothalamus. **Principle of neural science**. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 2000. p. 961-81.

KANG, L.; ROUTH, V. H.; KUZHIKANDATHIL, E. V.; GASPERS, L. D.; LEVIN, B. E. Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. **Diabetes**, v. 53, p. 549-559, 2004.

KASPER, S. O.; CARTER, C. S.; FERRARIO, C. M.; GANTEN, D.; FERDER, L. F.; SONNTAG, W. E.; GALLAGHER, P. E.; DIZ, D. I. Growth, metabolism, and blood pressure disturbances during aging in transgenic rats with altered brain renin-angiotensin systems. **Physiol. Genomics**, v. 23, p. 311-317, 2005.

KISHI, T.; ASCHKENASI, C. J.; LEE, C. E.; MOUNTJOY, K. G.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 457, p. 213-235, 2003.

KOKAY, I. C.; BULL, P. M.; DAVIS, R. L.; LUDWIG, M.; GRATTAN, D. R. Expression of the long form of the prolactin receptor in magnocellular oxytocin neurons. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 290, p. R1216-1225, 2006.

KLOET, A. D.; KRAUSE, E. G.; KIM, D.; SAKAI, R. R.; SEELEY, R. J.; WOODS, S. C. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition using captopril on energy balance and glucose homeostasis. **Endocrinology**, v. 150, n. 9, p. 4114-4123, 2009.

KONISHI, H.; KURODA, S.; INADA, Y.; FUJISAWA, Y. Novel subtype of human angiotensin II type 1 receptor: cDNA cloning and expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 199, p. 467-474, 1994.

KOW, L. M.; BROWN, H. E.; PFAFF, D. W. Activation of protein kinase C in the hypothalamic ventromedial nucleus or the midbrain central gray facilitates lordosis. **Brain. Res.**, v. 660, p. 241-248, 1994.

LADYMAN, S. R.; Leptin resistance during pregnancy in the rat. **J. Neuroendocrinol.**, v. 20, p. 269-277, 2008.

LADYMAN, S. R.; AUGUSTINE, R. A.; GRATAN, D. R. Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, p. 805-817, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1977.

LAVOIE, J. L.; CASSELL, M. D.; GROSS, K. W.; SIGMUND, C. D. Adjacent expression of renin and angiotensinogen in the rostral ventrolateral medulla using a dual-reporter transgenic model. **Hypertension**, v. 43, p. 1116-1119, 2004.

LAVOIE, J. L.; SIGMUND, C. D. Minireview: Overview of the renin-angiotensin system-an endocrine and paracrine system. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2179-2183, 2003.

LEE, M. W.; SEVERSON, D. L. Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. C659-678, 1994.

LENKEI, Z.; PALKOVITS, M.; CORVOL, P.; LLORENS-CORTES, C. Expression of angiotensin type-1 (AT₁) and type-2 (AT₂) receptor mRNAs in the adult rat brain: A functional neuroanatomical review. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 18, p. 383-439, 1997.

LETURQUE, A.; FERRE, P.; BURNOL, A. F.; KANDE, J.; MAULARD, P.; GIRARD, J. Glucose utilization rates and insulin sensitivity in vivo in tissues of virgin and pregnant rats. **Diabetes**, v. 35, p. 172-177, 1986.

LEWIS, G. F.; VRANIC, M.; HARLEY, P.; GIACCA, A. Fatty acids mediate the acute extrahepatic effects of insulin on hepatic glucose production in humans. **Diabetes**, v. 46, p. 1111-1119, 1997.

LI, C.; ANSARI R.; YU, Z.; SHAH, D. Definitive molecular evidence of renin–angiotensin system in human uterine decidual cells. **Hypertension**, v. 36, p. 159–164, 2000.

LI, C.; CHEN, P.; SMITH, M. S. Neuropeptide Y and tuberoinfundibular dopamine activities are altered during lactation: role of prolactin. **Endocrinology**, v. 140, p. 118-123, 1999.

LIN, X.; TAGUSHI, A.; PARK, S.; KUSHNER, J. A.; LI, F.; LI, Y.; WHITE, M. F. Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in beta cells and brain causes obesity and diabetes. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 908-916, 2004.

LINDHEIMER, M. D.; KATZ, A. I. Renal physiology and disease in pregnancy. In: SELDIN, D.W.; GIEBISH, G. (Ed.). **The kidney: Physiology and Pathophysiology**. New York: Raven Press, 1992. p. 3371-3432.

LINSEMAN, D. A.; BENJAMIN, C. W.; JONES, D. A. Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 12563-12568, 1995.

LYNCH, K. R.; HAWELU-JOHNSON, C. L.; GUYENET, P. G. Localization of brain angiotensinogen mRNA by hybridization histochemistry. **Brain Research**, v. 388, p. 148-158, 1987.

MCCLELLAN, K. M.; PARKER, K. L.; TOBET, S. Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 27, 193-209, 2006.

MALYALA, A.; ZHANG, C.; BRYANT, D. N.; KELLY, M. J.; RONNEKLEIV, O. K. PI3K Signaling effects in hypothalamic neurons mediated by estrogen. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 506, p. 895-911, 2008.

MANELLA, P.; BRINTON, R. D. Estrogen receptor protein interaction with phosphatidylinositol 3-kinase leads to activation of phosphorylated Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the same population of cortical neurons: a unified mechanism of estrogen action. **J. Neurosci.**, v. 26, p. 9439-9447, 2006.

MALBON, C. G. Insulin signaling: putting the 'G' in protein-protein interactions. **Biochem. J.**, v. 280, p. 11-12, 2004.

MARRERO, M. B.; VENEMA, V. J.; JU, H.; EATON, D. C.; VENEMA, R. C. Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 and SHP-2. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. C1216-c1223, 1998.

MASHARANI, U.; KARAN, J. H. Pancreatic Hormones & Diabetes Mellitus. In: GREENSPAN, F.S.; GARDNER, D.G. (Ed). **Basic & Clinical Endocrinology**. 6th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2001. p. 623-698.

MAUVAIS-JARVIS, M.; UEKI, K.; FRUMAN, D. A.; HIRSHMAN, M. F.; SAKAMOTO, K.; GOODYEAR, L. J.; IANNAcone, M.; ACCILI, D.; CANTLEY, L. C.; KAHN, R. Reduced expression of the murine P85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, p. 141-149, 2002.

MCKINLEY, M. J.; COLVILL, L. M.; GILES, M. E.; OLDFIELD, B. J. Distribution of *fos*-immunoreactivity in rat brain following a dipsogenic dose of captopril and effects of angiotensin receptor blockade. **Brain Research**, v. 747, p.43-51, 1997.

MCKINLEY, M. J.; MCALLEN, R. M.; MENDELSONHN, F. A. O.; ALLEN, A. M.; CHAI, S. Y.; OLDFIELD, B. J. Circumventricular organs: Neuroendocrine interfaces between the brain and hemal milieu. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 11, p. 91-127, 1990.

MCKINLEY, M. J.; ALBINTON, A. L.; ALLEN, A. M.; MATHAI, M. L.; MAY, C. N.; MCALLEN, R. M.; OLDFIELD, B. J.; MENDELSONHN, F. A. O.; CHAI, S. Y. The brain renin angiotensin system: location and physiological roles. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 35, p. 901-918, 2003.

MICHELINI, L. C. Regulação Neuroendócrina do Sistema Cardiovascular. In: ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A. C.; ELIAS, L. L. K.; CASTRO, M. (Ed.) **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 162-170.

MICHELINI, L. C.; FRANCHINI, K. G. Regulação a longo prazo da pressão arterial. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 489-495.

MILEWICZ, A.; TWOWSKA, U.; DEMISSIE, M. Menopausal obesity: myth or fact? **Climateric.**, v. 4, p. 273-283, 2001.

MORIMOTO, S.; SIGMIND, C. D. Angiotensin mutant mice: a focus on the brain renin-angiotensin system. **Neuropeptides**, v. 36, p. 194-200, 2002.

MOTHE, I.; VAN OBBERGHEN, E. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 11222-7, 1996.

MOUNTJOY, K. G.; MORTRUD, M. T.; LOW, M. J.; SIMERLY, R. B.; CONE, R. D. Localization of the melanocortin-4-receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. **Mol. Endocrinol.**, v. 8, p. 1298-1308, 1994.

MULLER, G. Dynamics of plasma membrane microdomains and crosstalk to the insulin cascade. **FEBS. Lett.**, v. 531, p. 81-87, 2002.

MURATA, T.; SAITO, S.; SHIOTA, K.; TAKAHASHI, M. Lactational anovulation in rats and its dependency on progesterone. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 196, p. 97-101, 1991.

MUSATOV, S.; CHEN, W.; PFAFF, D. W.; MOBBS, C. V.; YANG, X. J.; CLEGG, D. J.; KAPLITT, M. G.; OGAWA, S. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 7, p. 2501-2506, 2007.

MYERS Jr., M. G.; WHITE, M. F. The molecular basis of insulin action. In: GRUENBERD, G.; ZICK, Y. (Ed). **Insulin signaling: from cultured cells to animal models**. TAYLOR & FRANCIS, New York, 2002. p. 55-87.

MYERS, L. S.; STEELE, M. K. The brain renin-angiotensin system and prolactin secretion in female rats: influence of ovarian hormones. **J. Neuroendocrinol.**, v. 1, p. 299-303, 1989.

NATALI, A.; FERRANNINI, E. Hypertension, insulin resistance and the metabolic syndrome. **Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.**, v. 33, p. 417-429, 2004.

NIELSEN, A. H.; SCHAUSER, K. H.; POULSEN, K. The uteroplacental renin-angiotensin system. **Placenta**, v. 21, p. 468-477, 2000.

NISWENDER, K. D.; BASKIN, D. G.; SWARTZ, M. W. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 15, p. 362-369, 2004.

NISWENDER, K. D.; MORRISON, C. D.; CLEGG, D. J.; OLSON, R.; BASKIN, D. G.; MYERS Jr, M. G.; SEELEY, R. J.; SCHWARTZ, M. W. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. **Diabetes**, v. 52, p. 227-231, 2003.

NISWENDER, K. D.; MORTON, G. J.; STERNS, W. H.; RHODES, C. J. MYERS Jr, M. G.; SCHWARTZ, M. W. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. **Nature**, v. 413, p. 794-795, 2001.

NISWENDER, K. D.; SWARTZ, M. W. Insulin and Leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 24, p. 1-10, 2003.

NOLAN, C. J.; PROIETTO, J. The feto-placental glucose steal phenomenon is a major cause of maternal metabolic adaptation during late pregnancy in the rat. **Diabetologia**, v. 37, p. 976-984, 1994.

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.

OBICI, S.; ZHANG, B. B; KARKANIAS, G.; ROSSETI, L. Hypotalamic insulin signalin is required for inhibition of glucose production. **Nat. Med.**, v. 8, p. 1376-1382, 2002.

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

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

PFAFF, D. W.; SAKUMA, Y. Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. **J. Physiol.**, v. 288, p. 203-210, 1979.

PLUM, L; BELGARDT, B. F.; BRUNING, J. C. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. **J. Cin. Invest.**, v. 116, p. 1761-1766, 2006.

POCAI, A.; LAM, T. K.; GUTIERREZ-JUAREZ, R.; OBICI, S.; SCHARTZ, G. J.; BRYAN, J.; AGUILAR-BRYAN, L.; ROSSETI, L. Hypotalamic K (ATP) channels control hepatic glucose production. **Nature**, v. 434, p. 1026-1031, 2005.

PORTE JR, D.; BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. W. Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. **Diabetes**, v. 54, p. 1264-1276, 2005.

PORTE JR, D.; BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. W. Leptin and insulin action in the central nervous system. **Nutr. Rev.**, v. 60, p. S20-S29, 2002.

PORTER, J. P.; POTRATZ, K. R. Effect of intracerebroventricular angiotensin II on body weighth and food intake in adult rats. **Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 287, p. R422-428, 2004.

PRODI, E.; OBICI, S. Minirewiew: The brain as a molecular target for diabetic therapy. **Endocrinology**, v. 147, n. 6, p. 2664-2669, 2006

REAVEN, G. The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts and different goals. **Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.**, v. 33, p. 283-303, 2004.

REUX, A.; FOURNIE-ZALUSKI, M. C.; DAVID, C.; ZINI, S.; ROQUES, B. P.; CORVOL, P.; LLORENS-CORTES, C. Amino peptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 96, p. 13415-13420, 1999b.

ROGERSON, F. M.; SCHLAWE, I. PAXINOS, G.; CHAI, S. Y.; MCKINLEY, M. J.; MENDELSON, F. A. O. Localization of angiotensin converting enzyme by in vitro autoradiography in the rabbit brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 8, p. 227-243, 1995.

ROSSI, G.; SHERWIN, R. S.; PENZIAS, A. S.; LAPACZEWSKI, P.; JACOB, R. J.; SHULMAN, G. I.; DIAMOND, M. P. Temporal changes in insulin resistance and secretion in 24h-fasted conscious pregnant rats. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. E845-851, 1993.

RYAN, E. A.; O'SULLIVAN, M. J.; SKYLER, J. S. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. Studies with the euglycemic clamp technique. **Diabetes**, v. 34, p. 380-389, 1985.

SAAD, M. J.; MAEDA, L.; BRENELLI, S. L.; CARVALHO, C. R.; PAIVA, R. S.; VELLOSO, L. A.; Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. **Diabetologia**, v. 40, p. 179-186, 1997.

SAAD, M. J.; CARVALHO, C. R.; THIRONE, A. C.; VELLOSO, L. A. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 22100-22104, 1996.

SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A.; CARVALHO, C. R. Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. **Biochem. J.**, v. 310, p. 741-744, 1995.

SAAVEDRA, J. M.; CHEVILLARD, C. Angiotensin-converting enzyme is present in the subfornical organ and other circumventricular organs of the rat. **Neuroscience Letters**, v. 29, p. 123-127, 1982.

SABATIER, N.; CAQUINEI, C.; DAYANITHI, G.; BULL, P.; DOUGLAS, A. J.; GUAN, X. M.; JIANG, M.; VAN DER PLOEG, L.; LENG, G. Alpha-melanocyte-stimulating hormone stimulates oxytocin release from the dendrites of hypothalamic neurons while inhibiting oxytocin release from their terminals in the neurohypophysis. **J. Neurosci.**, v. 23, p. 10351-10358, 2003.

SALE, E.; SALE G. Protein kinase B: signaling roles and therapeutic targeting. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 68, p. 113-117, 2008.

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

SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; PINHEIRO, S. V.; SAMPAIO, W. O.; TOUYZ, R.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Angiotensin-(1-7) and its receptor as potential targets for new cardiovascular drugs. **Expert Opin. Invest. Drugs.**, v. 14, p. 1019-1031, 2005.

SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.;

MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTER, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G-protein-coupled receptor Mas. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 100, p. 8258-8263, 2003.

SAUVE, D.; WOODSIDE, B. Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. **Brain Res.**, v. 868, p. 306-314, 2000.

SAVOIA, C.; TOUYS, R. M.; ENDEMANN, D. H.; PU, Q.; KO, E. A.; DE CIUCEIS, C.; SCHIFFRIN, E. L. Angiotensin receptor blocker added to previous antihypertensive agents on arteries of diabetic hypertensive patients. **Hypertension**, v. 48, p. 271-277, 2006.

SAYESHI, P. P.; BERNSTEIN, K. E. Signal transduction mechanisms of the angiotensin II type AT (1)- receptor: looking beyond the heterotrimeric G protein paradigm. **J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, v. 2, p. 4-10, 2001.

SCHMIEDER, R. E.; HILGERS, K. F.; SCHLAICH, M. P.; SCHMIDT, B. M. W. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. **Lancet**, v. 369, p. 1208-1219, 2007.

SCHWARTZ, M. W.; SIPOLS, A. J.; MARKS, J. L.; SANACORA, G.; WHITE, J. D.; SCHEURINK, A.; KAHN, S. E.; BASKIN, D. G.; WOODS, S. C.; FIGLEWICZ, D. P. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. **Endocrinology**, v. 130, p. 3608-3616, 1992.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, J. R.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, p. 661-671, 2000.

SCHEEN, A. J. Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system. **Drugs**, v. 64, p. 2537-2565, 2004.

SHEPHERD, P. R.; WITHERS, D. J.; SIDDLE, K. Phosphoinositide 3- kinase: the key switch mechanism in insulin signaling. **Biochem. J.**, v. 333, p. 471-490, 1998.

SCHINKE, M.; BALTATU, O.; BOHM, M.; PETERS, J.; RASCHER, W.; BRICCA, G.; LIPPOLDT, A. Blood pressure reduction and diabetes insipidus in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v.96, p. 3975-3980, 1999.

SMITH E.P.; BOYD, J.; FRANK, G. R.; TAKAHASHI, H.; COHEN, R. M.; SPECKER, B.; WILLIAMS, T. C.; LUBAHN, D. B.; KORACH, K. S. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, n. 16, p. 1056-61, 1994.

SONG, Z.; ROUTH, V. H. Differential effects of glucose and lactate on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. **Diabetes**, v. 54, p. 15-22, 2005.

SONG, Z. T.; LEVIN, B. E.; MCARDLE, J. J.; BAKHOS, N.; ROUTH, V. H. Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. **Diabetes**, v. 50, p. 2673-2681, 2001.

STEARNS, V.; ULLMER, L.; LOPEZ, J. F. SMITH, Y.; ISAACS, C.; HAYES, D. F. Hot flushes. **Lancet**, v. 360, p. 1851-1861, 2002.

STORNETTA, R. L.; HAWELU-JOHNSON, C. L.; GUYENET, P. G.; LYNCH, K. R. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. **Science**, v. 242, p. 1444-1446, 1988.

SERNIA, C. A critical appraisal of the intrinsic pancreatic angiotensin generating system. **J. Pancreas**, v. 2, p. 50-55, 2001.

SHAH, D. M. The role of RAS in the pathogenesis of preeclampsia. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 8, p. 144-152, 2006.

SINDELAR, D. K.; CHU, A. C.; NEAL, D. W ; CHERRINGTON, A. D. Interaction of equal increments in arterial and portal vein insulin on hepatic glucose production in the dog. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. E972-E980, 1997.

SINDELAR, D. K.; CHU, A. C.; VENSON, P.; DONAHUE, E. P.; NEAL, D. W SINDELAR, D. K.; CHU, A. C.;CHERRINGTON, A. D. Basal hepatic glucose production is regulated by the portal vein insulin concentration. **Diabetes**, v. 47, p. 523-529, 1998.

SPANSWICK, D.; SMITH, M. A.; MIRSHAMI, S.; ROUTH, V. H.; ASHFORD, M. L. Insulin Activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. **Nat. Neurosci.**, v. 3, p. 757-758, 2000.

SPETH, R. C.; BARRY, W. T.; SMITH, M. S.; GROVE, K. L. A comparison of brain angiotensin II receptors during lactation and diestrus of the estrous cycle in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 277, p. R904-R909, 1999.

SPETH, R. C.; SMITH, M. S.; GROVE, K. L. Lactation decreases angiotensinogen mRNA expression in the midcaudal arcuate nucleus of the rat brain. **Am. J. Physiol.**, v. 280, p. R1169-R1176, 2001.

STEELE, M. K.; MCCANN, S. M.; NEGRO-VILAR, A Modulation by dopamine and estradiol of the central effects of angiotensin on anterior pituitary hormone release. **Endocrinology**, v. 111, p. 722-729, 1982.

STEELE, M. K.; NEGRO-VILAR, A.; MCCANN, S. M. Effect of angiotensin II on in vivo and in vitro release of anterior pituitary hormone in the female rat. **Endocrinology**, v. 109, p. 893-933, 1981.

SYKIOTIS, G. P.; PAPAVALASSILIOU, A. G. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance. **Mol. Endocrinol.**, v. 15, p. 1864-9, 2001.

SZABO, A. J.; IGUSHI, A.; BUELESON, P. D.; SZABO, O. Vagotomy or atropine blocks hypoglycemic effect of insulin injected into ventromedial hypothalamic nucleus. **Am. J. Physiol.**, v. 244, p. 467-71, 1983.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 7, p. 85-96, 2006.

TANTI, J. F.; GREMEAUX, T.; VAN OBBERGHEN, E.; LE MARCHAND-BRUS-TEL, Y. Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 6051-6057, 1994.

TAYA, K.; SASAMOTO, S. Changes in FSH, LH and prolactin secretion and ovarian follicular development during lactation in the rat. **Endocrinol. Jpn.**, v. 28, p. 187-196, 1981.

THURNHORST, R. L.; FITTS, D. A.; SIMPSON, J. B. Angiotensin converting enzyme in subfornical organs mediates captopril-induced drinking. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, p. 1302-1310, 1989.

TIMMERMANS, P. B.; WONG, P. C.; CHIU, A. T.; HERBLIN W. F.; BENFIELD, P.; CARINI, D. J.; LEE, R. J.; WEXLER R. R.; SAYE, J. A.; SMITH, R. D. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. **Pharmacological Review**, v. 45, p. 205-251, 1993.

TORSONI, M. A.; CARVALHEIRA, J. B.; CALEGARI, V. C.; BEZERRA, R. M.; SAAD, M. J.; GONTIJO, J. A.; VELLOSO, L. A. Angiotensin II (AngII) induces the expression of suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 in the rat hypothalamus – a mechanism for desensitization of AngII signaling. **J. Endocrinol.**, v. 181, n.1, p. 117-28, 2004.

TURCOTTE, J. C. BLAUSTEIN, J. D. Projections of the estrogen receptor-immunoreactive ventrolateral hypothalamus to other estrogen receptor-immunoreactive sites in female guinea pig brain. **Neuroendocrinology**, v. 69, p. 63-76, 1999.

UEKI, K.; FRUMAN, D. A.; BRACHMANN, S. M.; TSENG, Y.; CANTLEY, L. C.; KAHN, C. R. Molecular balance between regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, p. 965-977, 2002.

VEERASINGHAM, S. J.; YAMAZATO, M.; BERECEK, K. H.; WYSS, J. M.; RAIZADA, M. K. Increased PI3-kinase in presympathetic brain areas of the spontaneously hypertensive rat **Circ. Res.**, v. 96, p. 277-279, 2005.

VELLOSO, L. A.; CARVALHO, C. R.; ROJAS, F. A.; FOLLI, F.; SAAD, M. J. Insulin signaling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3 –kinase and the JAK2-growth related pathway. **Cardiovas. Res.**, v. 40, p. 96-102, 1998.

VELLOSO, L. A.; FOLLI, F.; PEREGO, L.; SAAD, M. J. The multi-faceted cross-talk between the insulin and angiotensin II signaling systems. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v. 22, p. 98-107, 2006.

VELLOSO, L. A.; FOLLI, F.; SUN, X. J.; WHITE, M. F.; SAAD, M. J.; KAHN, C. R. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 93, p. 12490-12495, 1996.

VENEMA, R. C.; VENEMA, V. J.; EATON, D. C.; MARRERO, M. B. Angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of signal transducers and activation of transcription 1 is regulated by Janus-activated kinase-2 and Fyn kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. **J. Biol. Chem.**, v. 13, n. 46, p. 30795-30800, 1998.

WANG, C. C.; GOALSTONE, M. L.; DRAZNIN, B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. **Diabetes**, v. 53, p. 2735-2740, 2004.

WARENBOURG, M.; LEROY, D. Comparative distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactivities in the forebrain and the mid brain of the female guinea pig. **Brain Res.**, v. 1002, p. 55-66, 2004.

WIRTH, M. M; OLSZEWSKI, P. K.; YU, C.; LEVINE, A. S.; GIRAUDO, S. Q. Paraventricular hypothalamic alpha-melanocyte-stimulating hormone and MTII reduce feeding without causing aversive effects. **Peptides**, v. 22, p. 129-134, 2001.

WITHERS, D. J. Insulin receptor substrate proteins and neuroendocrine function. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 29, p. 525-529, 2001.

WOODS, S. C.; LOTTER, E. C.; MACKAY, L. D.; PORTE, Jr. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight in baboons. **Nature**, v. 282, p. 503-505, 1979.

WOODSIDE, B. Prolactin and the hyperphagia of lactation. **Physiol. Behav.**, v. 91, p. 375-382, 2007.

ZANG, Z. H.; FELDER, R. B. Melanocortin receptors mediate the excitatory effects of blood-borne murine leptin on hypothalamic paraventricular neurons in rat. **Am. J. Physiol. Regul. Comp. Physiol.**, v. 286, R303-310, 2004.