

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**

CARLOS HENRIQUE ZANELLO TALARICO

**Efeitos da progesterona no metabolismo energético e resistência à  
insulina na menopausa**

VERSÃO CORRIGIDA

RIBEIRÃO PRETO

2023

CARLOS HENRIQUE ZANELLO TALARICO

**Efeitos da progesterona no metabolismo energético e resistência à insulina  
na menopausa**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Gabriel Camporez

VERSÃO CORRIGIDA

RIBEIRÃO PRETO

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Talarico, Carlos Henrique Zanello

Efeitos da progesterona no metabolismo energético e resistência à insulina na menopausa. Ribeirão Preto, 2023.

70 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Camporez, João Paulo Gabriel.

1.Síndrome metabólica. 2. Estradiol. 3. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.

**CARLOS HENRIQUE ZANELLO TALARICO. Efeitos da progesterona no metabolismo energético e resistência à insulina na menopausa.** Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. João Paulo Gabriel Camporez Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Julgamento \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

*Às duas pessoa que mais amo:*

*A minha mãe e meu pai que são modelos de  
resistência e amor diante os desafios da vida.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Paulo Gabriel Camporez que contribuiu para realização deste trabalho, pela dedicação e empenho de forma impecável, por tudo aquilo que pude aprender com ele sobre Fisiologia e por ter contribuído imensamente para o meu crescimento pessoal e profissional.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio recebido, viabilizando a realização deste trabalho através da bolsa de Mestrado processo 2020/16160-0, bem como o respeito que eles demonstram em relação ao pesquisador. Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Brasil (CAPES) também pelo apoio recebido de acordo com processo 88887.605585/2021-00.

À toda sociedade brasileira, a quem meu trabalho é inteiramente destinado e que permite uma educação pública e ciência de qualidade neste país.

Aos integrantes e pesquisadores do laboratório Alessandra Cruz, Felipe Garcia, Guilherme Fancio, Marina Badoco, Carolina Dias, Layanne Cabral, José Turino e Marina Holanda e principalmente pelas minhas duas grandes amigas Ester dos Santos Alves e Jessica Matos, que propiciaram grandes discussões científicas, suporte técnico e agradáveis tardes de café.

Agradeço ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP pela abertura e viabilidade deste projeto.

À todos os meus amigos que durante meu mestrado me possibilitaram substrato psicológico para realização deste trabalho. À Julia Lopes Gonzalez minha amiga desde o início de todas as etapas da universidade durante todas as situações. À Richard Pacheco, Rodrigo Campos Cardoso, Flávio Simões, Rafaela Ponciano, Bruno Vieira e Giovana Zagatto que de certa forma me incentivaram e estiveram ao meu lado durante realização deste trabalho.

Agradeço a minha família pelo suporte durante a realização de toda minha graduação e pós-graduação do imenso apoio que eles me deram para continuar. Agradeço aos meus irmãos Kelly, Humberto, Diego, Luldinéia, Bruna, Carmelita e Shara, meus cunhados Fábio, Rogério e Daiane como também meus amados sobrinhos Bruno, Ísis e Maria Júlia pelo amor, carinho e dedicação. Agradeço ao meu filho animal Ínácio, o gato mais companheiro de todos.

Agradeço profundamente aos meus pais Marinéia Ap. Zanello Talarico e Claudio Talarico, a quem dedico essa dissertação.

*...from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being, evolved. - Charles Darwin*

## RESUMO

TALARICO, C. H. Z. **Efeitos da progesterona no metabolismo energético e resistência à insulina na menopausa.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia) apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O consumo de dieta rica em gorduras contribui amplamente para o desenvolvimento da síndrome metabólica, que inclui, dislipidemia aterogênica, pressão arterial elevada, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus do tipo 2. Geralmente o fator central dessa síndrome é o desenvolvimento da resistência à insulina associado a obesidade. É possível observar que essas complicações metabólicas são menos prevalentes em mulheres jovens do que em homens na mesma idade ou mulheres na pós-menopausa. Diversos mecanismos são atualmente considerados como causadores da resistência a insulina, como metabolismo anormal de lipídios, acúmulo ectópico do mesmo, disfunção mitocondrial, além de inflamação e estresse de retículo endoplasmático. Além disso, outra complicação associada a doenças metabólicas é a Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica. Nas últimas décadas, estudos clínicos e experimentais revelaram que o estradiol (mais potente estrogênio) contribui enormemente para a homeostase glicêmica, provavelmente via a isoforma alfa de seu receptor. De fato, a redução da concentração de estradiol durante a menopausa é associada com o aumento de gordura visceral e, por sua vez, doenças metabólicas como resistência à insulina, diabetes e doenças cardiovasculares. O mesmo fenótipo é observado em roedores fêmeas que passam por ovariectomia, tendo esse fenótipo revertido após o tratamento hormonal com estradiol. Entretanto, o mesmo consenso não existe em mulheres durante a menopausa que fazem reposição com progesterona ou conjugada de estradiol e progesterona, já que, enquanto alguns trabalhos demonstram os efeitos benéficos da reposição hormonal conjugada durante esse período, outros trabalhos foram incapazes de observar tais benefícios. Tendo como base o observado nos estudos clínicos com mulheres na menopausa e sabendo que a maior parte dos tratamentos de reposição hormonal é feita com os hormônios estradiol e progesterona em conjunto, o objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos da progesterona sobre o metabolismo energético e resistência à insulina em um modelo experimental de menopausa (camundongos fêmeas ovariectomizadas) alimentadas com dieta rica em gordura. A avaliação foi feita por meio do efeito da progesterona na tolerância à glicose e pelo de teste de tolerância à glicose, por análise do acúmulo de lipídeos no fígado e músculo esquelético e análise da expressão gênica e proteica de marcadores inflamatórios e de síntese de lipídeos. Nossos resultados revelaram que em uma dieta hiperlipídica, a reposição de progesterona sozinha não parece exercer influências sob a homeostase da glicose e/ou agir no acúmulo ectópico de lipídeos. A reposição hormonal conjugada de estradiol e progesterona mostrou um indicativo de melhora nos teste de tolerância à glicose, na avaliação dos níveis plasmáticos de insulina e redução do acúmulo de lipídeos ectópicos semelhantes a reposição apenas com estradiol. Contudo, a progesterona demonstrou exercer efeito sobre o metabolismo da glicose e sensibilidade à insulina em uma dieta padrão, revelando que a progesterona pode neutralizar os efeitos protetores de estradiol e levar a uma menor tolerância à glicose e reduzir a sensibilidade à insulina sob esse regime. Acreditamos que esses resultados ajudarão ampliar o conhecimento sobre a reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa associada a Síndrome Metabólica e o desenvolvimento da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.

**Palavras-chave:** 1. Síndrome metabólica; 2. Estradiol; 3. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica



## ABSTRACT

TALARICO, C. H. Z. **Effects of progesterone on energy metabolism and insulin resistance in menopause.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia) apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

High-fat diet largely contributes to the development of the metabolic syndrome, which includes atherogenic dyslipidemia, high blood pressure, cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus, and the central factor of this syndrome is usually the development of insulin resistance associated with obesity. It is possible to observe that these metabolic complications are less prevalent in young women than in men of the same age or postmenopausal women. Several mechanisms are currently considered to cause insulin resistance, such as abnormal lipid metabolism, ectopic accumulation, mitochondrial dysfunction, in addition to inflammation and endoplasmic reticulum stress. In addition, another complication associated with metabolic diseases is Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In recent decades, clinical and experimental studies have revealed that estradiol (the more potent estrogen) contributes enormously to glycemic homeostasis, probably via the alpha isoform of its receptor. In fact, reduced estrogen levels during menopause are associated with increased visceral fat and, in turn, metabolic diseases such as insulin resistance, diabetes and cardiovascular disease. The same phenotype is observed in female rodents that undergo ovariectomy, with this phenotype reversed after hormonal treatment with estradiol. However, the same consensus does not exist in women during menopause, replacement with progesterone or conjugated estradiol and progesterone, since, while some studies demonstrate the beneficial effects of combined hormone replacement during this period, other studies were unable to observe such benefits. Based on what was observed in clinical studies with menopausal women and knowing that most hormone replacement treatments are performed with the hormones estradiol and progesterone together, the objective of this work was to investigate the effects of progesterone on energy metabolism and resistance to insulin in an experimental model of menopause (ovariectomized female mice) fed a high-fat diet. The specific objectives of the work were: a) To evaluate the effect of progesterone on glucose tolerance through a glucose tolerance test; b) Analyze the accumulation of lipids in the liver and skeletal muscle; c) Analyze gene and protein expression of inflammatory markers and lipid synthesis. Our results revealed that on a high-fat diet, progesterone replacement alone does not seem to influence glucose homeostasis and/or act on ectopic lipid accumulation. The conjugated hormone replacement of estradiol and progesterone showed an indication of improvement in the glucose tolerance test, in the evaluation of the plasma insulin levels and reduction of the accumulation of ectopic lipids similar to the replacement with estradiol alone. However, progesterone has been shown to have an effect on glucose metabolism and insulin sensitivity on a standard diet, revealing that progesterone can counteract the protective effects of estradiol and lead to impaired glucose tolerance and reduced insulin sensitivity under this regimen. We believe that these results will help expand knowledge about hormone replacement in postmenopausal women associated with Metabolic Syndrome and the development of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.

**Keywords:** 1. Metabolic syndrome; 2. Estradiol; 3. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Componentes da síndrome metabólica. ....	15
<b>Figura 2.</b> Espectro da DHGNA. ....	19
<b>Figura 3.</b> Aspectos do processo de envelhecimento. ....	24
<b>Figura 4.</b> Modelo animal padrão ouro em mimetizar os efeitos observados na menopausa ..	26
<b>Figura 5.</b> Linha do tempo dos procedimentos experimentais realizados. ....	32
<b>Figura 6.</b> Imagem qualitativa do útero em cada grupo experimental.. ....	37
<b>Figura 7.</b> Peso corporal inicial e final dos animais antes e depois de 6 semanas de HFD. ....	38
<b>Figura 8.</b> Teste de tolerância à glicose e avaliação de resistência periférica à insulina. ....	41
<b>Figura 9.</b> Teste de tolerância à insulina. ....	42
<b>Figura 10.</b> Perfil do conteúdo tecidual lipídico TAG. ....	43
<b>Figura 11.</b> Marcadores de síntese de lipídeos e <i>lipogênese De Novo</i> . ....	44
<b>Figura 12.</b> Mensuração das enzimas AST e ALT. ....	45
<b>Figura 13.</b> Expressão gênica de marcadores inflamatórios e fibrótico. ....	46
<b>Figura 14.</b> Análise GTT dieta padrão.. ....	50
<b>Figura 15.</b> Perfil do conteúdo tecidual lipídico TAG. ....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL, ácidos graxos livres

ALT, transaminase pirúvica

AST, transaminase oxalacética

AUC, área sob a curva (AUC)

CTE, cadeia de transporte de elétrons

DAG, diacilglicerol

DHGNA, doença chamada de Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica

DM2, diabetes mellitus do tipo 2

EHNA, esteato- hepatite não alcoólica

eIF2 $\alpha$ , *fator de iniciação da tradução em eucariotos 2 $\alpha$  coreção*

ER $\alpha$ , receptores de estradiol  $\alpha$

ER $\beta$ , receptores de estradiol  $\beta$

E2, Estradiol

FADH, dinucleótido de flavina-adenina

FASN, enzima de ácido graxo sintase

GTT, teste de tolerância à glicose

HDL, lipoproteína de alta densidade

HFD, dieta hipelipídica

i.p., injeção intraperitoneal

IRS-1, receptor de insulina do tipo 1

ITT, teste de tolerância à insulina

JNK, *c-Jun N Terminal quinase*

NADH, dinucleótido de nicotinamida e adenina

OVX, ovariectomia

PCR, reação em cadeia da polimerase PCR

PERK, proteína quinase residente no retículo endoplasmático

PGC1 $\alpha$ , Coativador 1-alfa do Receptor gama Ativado por Proliferador de Peroxissoma

PGMRc1, Receptor de progesterona componente de membrana 1

PR, receptor de progesterona

P4, progesterona

RE, retículo endoplasmático

ROS, espécies reativas de oxigênio

SD, dieta padrão

SM, síndrome metabólica

SREBP1c, proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol-1c

TAG, triacilglicerídeos

TD-NMR, ressonância por time domain nuclear magnética

TGF-  $\beta$ , fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ )

TNFalfa, fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1	Síndrome metabólica	14
1.2	Doença hepática gordurosa não alcoólica	18
1.3	Hormônios esteróides E2 e P4 na DHGNA	21
1.4	Modelo animal de menopausa, SM e DHGNA	24
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
2.1	Hipótese	29
2.2	Objetivo geral	29
2.3	Objetivos específicos	29
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
3.1	Animais	31
3.2	Cirurgia de ovariectomia e reposição hormonal	31
3.3	Dieta hiperlipídica	32
3.4	Teste de tolerância a glicose e insulina	32
3.5	Conteúdo tecidual de lipídeos e análise AST/ALT	33
3.6	Western blot	33
3.6	Avaliação da expressão gênica – reação em cadeia da polimerase (PCR)	34
3.7	Análise da composição corporal por time domain nuclear magnética (TD-NMR)	35
3.8	Análise dos resultados	35
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
4.1	Caracterização do modelo animal proposto e avaliação do peso corporal	37
4.2	Avaliação do teste de tolerância a glicose e resistência periférica à insulina	38
4.3	Conteúdo tecidual de lipídeos	42
4.4	Análise AST e ALT	44
4.5	Avaliação do perfil inflamatório	45
4.6	Análise dos efeitos de P4 em uma dieta padrão	46
4.7	Análise do conteúdo de lipídeos em dieta padrão	50
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
5.1	Efeito da reposição hormonal de E2 e P4 no peso corporal	53
5.2	Acúmulo de lipídeos e inflamação no modelo animal de menopausa e DHGNA	55
5.3	Obesidade, a relação entre a tolerância à glicose e resistência à insulina	56
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>61</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

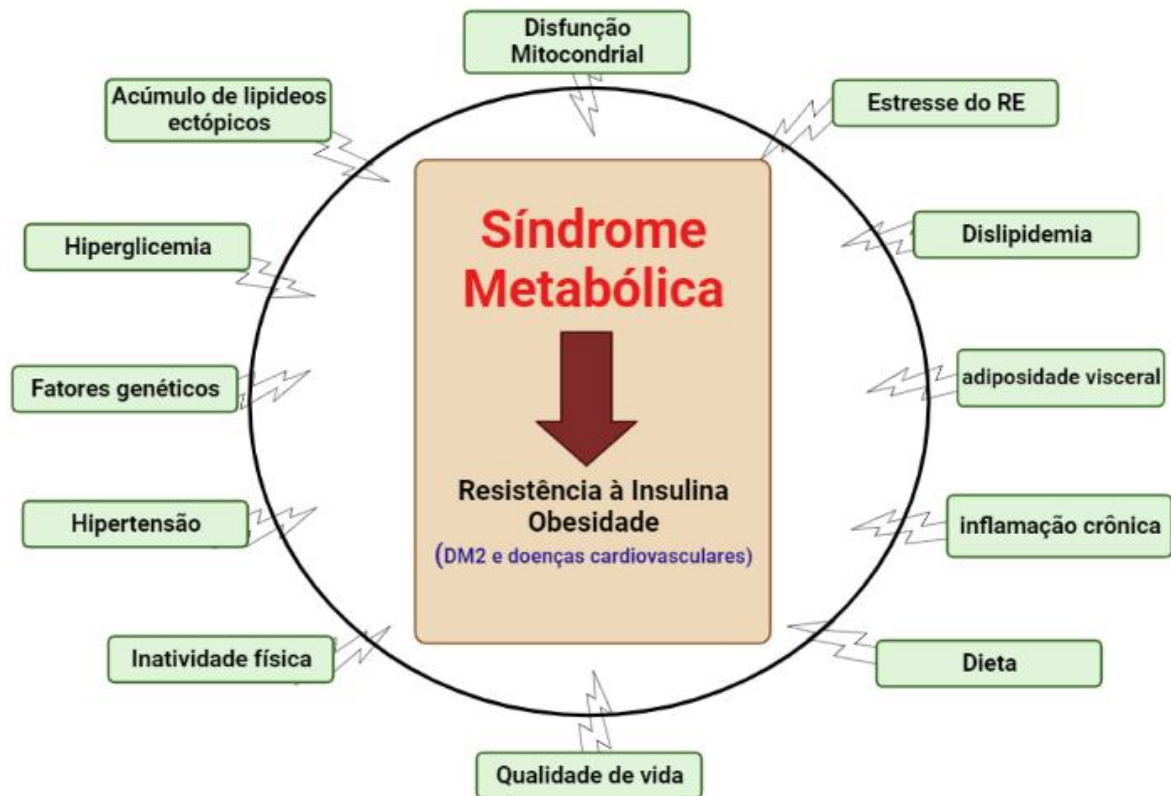
## 1.1 Síndrome metabólica

A síndrome metabólica (SM) pode ser caracterizada por um estado fisiopatológico complexo, que se origina de diversos desequilíbrios associados a ingestão calórica e do gasto energético, mas também é afetada por fatores genéticos/epigenéticos, da predominância do sedentarismo sobre a atividade física e outros fatores como a qualidade e composição alimentar, composição da microbiota intestinal e qualidade de vida (SAKLAYEN, 2018). SM pode ser descrita como um agrupamento de condições metabólicas que ocorrem juntas e promovem o desenvolvimento de distúrbios fisiológicos e fisiopatológicos como dislipidemia aterogênica (triglicerídeos séricos elevados, redução de lipoproteína de alta densidade (HDL) e aumento de colesterol), pressão arterial elevada, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) (GRUNDY, 2016; SAKLAYEN, 2018). Geralmente o fator central dessa síndrome é o desenvolvimento da resistência à insulina associado a obesidade (GRUNDY, 2016; SAKLAYEN, 2018).

Os dados globais sobre a SM são considerados difíceis de serem medidos e as estimativas de prevalência variam com base nos critérios utilizados para a definição de SM (SAKLAYEN, 2018). Porém de acordo com Lusic et al (2008), como a SM é cerca de três vezes mais comum que o diabetes, estima-se que a prevalência global pode ser cerca de um quarto da população mundial (aproximadamente 1 bilhão de pessoas) (LUSIC; ATTIE & REUE, 2008). No Brasil foi registrado uma prevalência de SM de 29,6-33% na população adulta, podendo chegar a quase 40% na população acima dos 60 anos (OLIVEIRA, et al., 2020; DE SIQUEIRA VALADARES, et al., 2022). A SM tem sua maior incidência, na população brasileira, principalmente em mulheres, indivíduos com baixa escolaridade e idosos, mas não apenas no Brasil, como em diversos países no mundo (RANASINGHE, et al., 2017; MOREIRA, et al., 2018; OLIVEIRA, et al., 2020; DE SIQUEIRA VALADARES, et al., 2022). De acordo com o plano de ações estratégicas para o enfrentamento de doenças crônicas do Ministério da Saúde brasileiro destaca que três doenças crônicas associadas a SM como o DM2, doenças do coração e acidente vascular encefálico impactaram a renda familiar e levaram a perda econômica brasileira de US\$ 4,18 bilhões entre os anos de 2006 a 2015 (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Durante as últimas três décadas, a prevalência da SM aumentou (LUSIC; ATTIE & REUE, 2008) mas a compreensão da biologia da síndrome também foi ampliada e atualmente diversos mecanismos biológicos são considerados causadores da resistência à insulina na SM. Dentre os mecanismos propostos estão o estresse de retículo endoplasmático (HOTAMISLIGIL

2010), a inflamação (ASRIH & JORNAYVAZ, 2013), a disfunção mitocondrial (JELENIK & RODEN, 2012), além do metabolismo anormal de lipídios (LOOMBA, FRIEDMAN & SHULMAN, 2021) e acúmulo ectópico do mesmo (SAMUEL, PETERSEN & SHULMAN, 2010) (Figura 1).



**Figura 1.** Componentes da síndrome metabólica. Apresentação esquemática dos componentes da SM que ocorrem juntos e promovem o desenvolvimento de distúrbios fisiológicos e fisiopatológicos tendo como o fator central o desenvolvimento da resistência à insulina associado a obesidade levando a quadros de DM2 e doenças cardiovasculares (esquema produzido na plataforma Biorender.com e modificado de ABOONABI, MEYER & SINGH; 2019).

Uma das respostas celulares ao excesso de nutrientes é a ativação de enzimas associadas ao estresse de retículo endoplasmático (estresse de RE). Alguns marcadores relacionados ao estresse de RE foram primeiramente associados a obesidade e resistência à insulina no estudo com camundongos obesos *ob/ob* que aumentaram a fosforilação do *fator de iniciação da tradução em eucariotos 2α* (eIF2α) e da *proteína quinase residente no retículo endoplasmático* (PERK) (ativados durante estresse do retículo) e a *c-Jun N Terminal quinase* (JNK) (resposta a



jusante com funções propostas na regulação metabólica) no fígado (OZCAN, et al., 2004). Além disso, também foi observado que a indução química do estresse do RE levou a uma redução da sinalização da insulina associada com o aumento da fosforilação de JNK (LEE, et al., 2003). Esses achados têm sido repetidamente observados em fígados de camundongos (NAKATANI, et al., 2005) fígados de humanos (KUMASHIRO, et al., 2011) e tecido adiposo de roedores (GREGOR, et al., 2009), sendo, portanto, uma via importante de estudo em modelos de resistência à insulina induzida pelo consumo de dieta rica em gordura.

Outro mecanismo comumente associado a complicações metabólicas tem sido a inflamação de baixo grau e crônica. Em pacientes diabéticos e obesos que possuem elevação crônica de citocinas (BUNOUT et al., 1996; VISSER et al., 1999) foi sugerido que a ativação patológica do sistema imune inato poderia causar resistência à insulina (ASRIH & JORNAYVAZ, 2013). Estudos subsequentes em modelos de roedores obesos de resistência à insulina demonstraram um aumento da concentração do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNFalfa) no tecido adiposo (HOTAMISLIGIL, SHARGILL & SPIEGELMAN, 1993). Além disso, a expressão de TNFalfa no tecido adiposo de humanos obesos aumentada foi associada com resistência à insulina e, interessantemente, a expressão foi reduzida com a perda de peso (HOTAMISLIGIL et al., 1995; KERN et al., 1995). Outros estudos demonstraram que o defeito na sinalização da insulina podia ser atribuído a fosforilação do Receptor de Insulina do tipo 1 (IRS-1) em serina (resíduo 307) pela ativação da JNK1, fornecendo uma ligação mecanicista entre inflamação e resistência à insulina (HOTAMISLIGIL et al., 1996). Além disso, a falta de TNFalfa em camundongos protegeu esses animais contra a resistência à insulina induzida por obesidade (UYSAL et al., 1997) e a ablação do receptor de TNFalfa especificamente no fígado reduziu a resistência hepática a insulina nesses animais (BLUEMEL et al., 2020). Esses resultados sugerem que a resposta inflamatória a obesidade pode desempenhar um papel importante em seus efeitos nocivos, tornando crucial o entendimento dos mecanismos moleculares que conectam a obesidade e resistência à insulina ao excesso de ingestão calórica.

A SM pode levar também a uma disfunção mitocondrial, o excesso de nutrientes acarreta a um aumento compensatório na oxidação de ácidos graxos mitocondriais, levando ao excesso de acetil coenzima A<sub>2</sub>, o que resulta em aumento da produção de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) e de dinucleótido de flavina-adenina (FADH) (PRASUN, 2020). Com isso, há um aumento do aporte de elétrons para a cadeia de transporte de elétrons (CTE) das mitocôndrias. Alguns desses elétrons conseguem sair da cadeia e geram espécies reativas de oxigênio (ROS) (SCHATZ, 1967; PRASUN, 2020) A produção excessiva de ROS

sobrecarrega os sistemas de defesa antioxidante, levando ao estresse oxidativo (MASSCHELIN, et al., 2020; PRASUN, 2020). No tecido adiposo, esse agravamento da geração de ROS pode levar à apoptose dos adipócitos (GALLOWAY, 2012). A apoptose dos adipócitos libera mediadores inflamatórios e ocasiona a progressão da inflamação local e sistêmica exacerbando a resistência à insulina (ALKHOUR, et al., 2010; PRASUN, 2020). Além dos adipócitos, a disfunção das mitocôndrias no músculo esquelético é um contribuinte significativo para a resistência à insulina (MONTGOMERY & TURNER, 2015). O aumento da disponibilidade de ácidos graxos livres (AGL) nos miócitos leva ao aumento da biogênese mitocondrial e a oxidação de AGL via ativação da via do *Coativador 1-alfa do Receptor gama Ativado por Proliferador de Peroxissoma* (PGC1 $\alpha$ ) (GARCIA-ROVES, 2007). A sobrecarga de substrato na mitocôndria dos miócitos contribui para o estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. O excesso de AGL está ligado ao acúmulo de lipídios bioativos como diacilglicerol (DAG) e ceramida que estão relacionados com o desenvolvimento da resistência à insulina (MONTGOMERY & TURNER, 2015; PETERSEN et al., 2016). A disfunção mitocondrial também desempenha um papel significativo na falência das células beta pancreáticas e apoptose dessas células agindo na progressão da resistência à insulina para DM2 (FEX, et al., 2018).

Por fim, o último mecanismo aqui citado e que será melhor relatado nesse trabalho, é o de metabolismo anormal de lipídios e acúmulo ectópico do mesmo. Uma dieta rica em gordura (HFD) contribui para SM associado a obesidade e a resistência à insulina, estimulando a deposição excessiva de gordura em tecidos não adiposos que não são adequados para o armazenamento de gordura, especialmente o fígado (LOOMBA, FRIEDMAN & SHULMAN, 2021). A SM, particularmente no desenvolvimento do DM2, está ligada a uma dislipidemia característica, e a grande maioria dos indivíduos obesos com DM2 e resistência à insulina apresenta acúmulo anormal de triglicerídeos em seus fígados, característica de uma doença chamada de Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA) (LOOMBA, FRIEDMAN & SHULMAN, 2021).

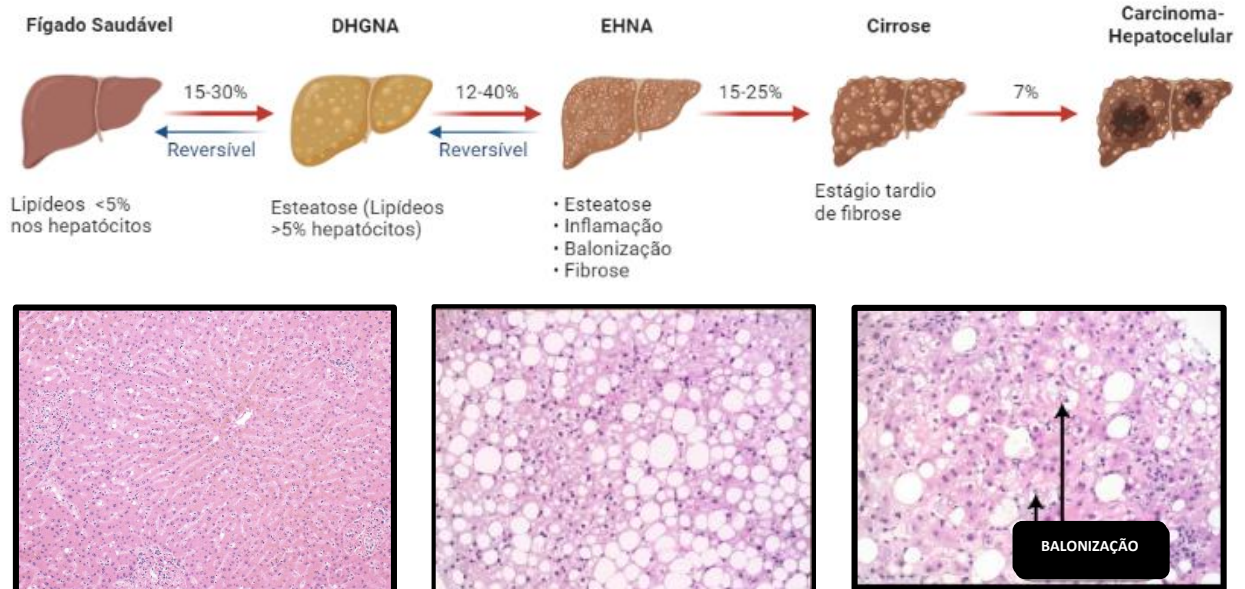
## 1.2 Doença hepática gordurosa não alcoólica

A DHGNA pode ser determinada como a manifestação hepática da SM e está comumente associada a fatores de risco metabólicos adjacentes a mesma (LOOMBA, FRIEDMAN & SHULMAN, 2021). DHGNA pode ser diagnosticada pelo uso de imageamento por uso da fração de gordura medida pela densidade de prótons derivada da ressonância magnética (MRI-PDF - um biomarcador de imagem que permite uma avaliação quantitativa precisa da gordura hepática em todo o fígado ou através de biópsia do fígado) (CAUSSY et al., 2018).

DHGNA começa com o acúmulo de triacilglicerídeos (TAG) no fígado e é definida como a presença de mais de 5% dos hepatócitos infiltrados com esteatose em indivíduos que consomem pouco ou nenhum álcool e sem causas secundárias de outras doenças hepáticas (BIRKENFELD & SHULMAN, 2014; LOOMBA, FRIEDMAN & SHULMAN, 2021). Essa doença se desenvolve quando o ritmo de síntese hepática de TAG, como resultado do aumento da captação de ácidos graxos e sua esterificação em TAG, assim como da via de *lipogênese de novo*, a partir do metabolismo de carboidratos e proteínas, excede o ritmo de catabolismo do TAG hepático por meio da oxidação de ácidos graxos ou a secreção de TAG em forma de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (BIRKENFELD & SHULMAN, 2014; LOOMBA, FRIEDMAN & SHULMAN, 2021).

A progressão de DHGNA pode levar a esteatose hepática que é geralmente reconhecida como uma doença benigna, mas que pode evoluir para esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). O diagnóstico de EHNA requer avaliação histológica quando há suspeita DHGNA. EHNA é tipicamente caracterizado, além da presença de esteatose, por inflamação lobular e balonização dos hepatócitos (quando o acúmulo de gotículas de lipídeos deslocam o núcleo da célula para periferia) e apresentar ou não fibrose perissinusoidal (KLEINER et al., 2005). EHNA pode ser precursora de doenças hepáticas mais graves, como por exemplo, cirrose e carcinoma hepatocelular (RAMAI et al., 2021) (Figura 2). Uma das grandes preocupações com a DHGNA é que o acúmulo de lipídeos hepáticos tem sido claramente ligado ao desenvolvimento de resistência hepática à insulina e DM2.

### Espectro - Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA)



**Figura 2.** Espectro da DHGNA. A progressão de DHGNA leva a EHNA que pode ser precursora de doenças hepáticas mais graves, como por exemplo, cirrose e carcinoma hepatocelular. As histologias mostram a evolução e as características típicas de cada progressão das doenças. Fígado saudável seguido de fígado com DHGNA, mostrando o acúmulo de lipídios com mais de 5% nos hepatócitos. Por fim, histologia de fígado com EHNA mostrando a balonização, característica típica da progressão da DHGNA. Esquema feito pelo autor na plataforma Biorender.com

Na DHGNA um dos mecanismos propostos associados à resistência à insulina é o acúmulo de DAG e ceramidas. DAG é o penúltimo intermediário na síntese de TAG e, geralmente, corresponde com a concentração de TAG no fígado e no músculo esquelético. Como consequência, a associação entre DHGNA/resistência hepática à insulina e conteúdo intramiocelular de lipídios/resistência muscular à insulina foi também associada entre conteúdo de DAG no tecido e resistência à insulina. A observação direta do conteúdo de DAG no fígado associado a resistência hepática à insulina foi demonstrada tanto em roedores (CAMPOREZ et al., 2013; CAMPOREZ et al., 2015) quanto em humanos (KUMASHIRO et al., 2011), da mesma forma que o conteúdo de DAG no músculo associado com a resistência muscular à insulina (CAMPOREZ et al., 2017). Como o DAG é um conhecido mediador lipídico bioativo, necessário para a ativação da proteína quinase C (PKC), foi dada atenção para um possível papel da atividade das PKCs na resistência à insulina (PETERSEN et al., 2016).

Outra espécie de lipídios que também tem sido constantemente associada a resistência à insulina é a ceramida. As ceramidas são uma espécie de esfingolipídios que estão associados a distúrbios do metabolismo de lipídios, particularmente no fígado, inibindo a oxidação de ácidos graxos e estimulando a sua captação. A produção de ceramidas ocorre no retículo endoplasmático por uma via biosintética que envolve quatro reações enzimáticas evolutivamente conservadas. Foi proposto que o aumento do conteúdo intracelular dessa espécie lipídica leva a inibição da enzima AKT, levando a redução da captação de glicose e redução do estoque de glicogênio (GALBO et al., 2011). Intervenções farmacêuticas ou animais geneticamente modificados que levam a redução da síntese de ceramidas ou aumento da sua degradação são geralmente associados a aumento da sensibilidade à insulina. Inibição da enzima Spt (enzima da via de síntese das ceramidas) ou animais *knockout* para essa enzima apresentam melhoras na sensibilidade à insulina quando alimentados com dieta rica em gorduras ou apresentam obesidade genética (camundongos *db/db*) (HOLLAND et al., 2007; DEKKER et al., 2013). Ainda, a superexpressão da enzima ceramidase ácida (enzima que degrada as ceramidas), tanto no tecido adiposo quanto no fígado, restaura a sensibilidade à insulina em camundongos alimentados com dieta rica em gorduras e reduz a esteatose hepática (XIA et al., 2015). Dessa forma, observamos que diversos estudos de intervenção em roedores e estudos de perfil em humanos revelam prováveis papéis das ceramidas e DAG na resistência à insulina hepática e muscular associada com o excessivo consumo de nutrientes. Possíveis terapias que levam a redução dessas espécies de lipídios podem ser uma promessa para o tratamento de distúrbios metabólicos associados com a obesidade.

A DHGNA é uma doença que afeta cerca de 30% dos adultos e até 10% das crianças em países desenvolvidos (COHEN et al., 2011) e em geral, a prevalência de DHGNA é maior em homens (39,7%) do que em mulheres (25,6%) em idade reprodutiva (DISTEFANO et al., 2020; RIAZI, et al., 2022). A América do Sul representa a segunda maior prevalência de DHGNA no mundo, com 30%, e um pouco atrás do Oriente Médio (RIAZI, et al., 2022) e apesar dos dados no Brasil serem escassos, há uma prevalência alta de sobrepeso e obesidade de 56,6% na população, prevendo uma prevalência de DHGNA também alta (RIAZI, et al., 2022).

Indivíduos de qualquer idade, incluindo crianças, podem desenvolver DHGNA, mas em mulheres na pós-menopausa, a prevalência da doença se torna semelhante ou supera a de homens da mesma idade. Embora a progressão de DHGNA seja exacerbada com o envelhecimento, que impacta negativamente nos processos metabólicos e inflamatórios, nas mulheres na pós-menopausa a DHGNA depende mais da falta dos hormônios endógenos estradiol (E2) e progesterona (P4) do que o envelhecimento *per se*. (DELLA TORRE, 2020).

Nas últimas décadas, dados provenientes tanto de estudos clínicos, bem como, de estudos experimentais, revelaram que, hormônios esteróides endógenos como o E2 (mais potente estrogênio) além de seu papel central no desenvolvimento sexual e reprodução, este hormônio contribui enormemente para a homeostase glicêmica (LOUET et al., 2004). Estudos clínicos sugerem a importância do E2 no metabolismo energético. A redução da concentração de estrogênio durante a menopausa é associada com o aumento de gordura visceral e, por sua vez, doenças metabólicas como resistência à insulina, DM2 e doenças cardiovasculares. Corroborando com isso, foi demonstrado que a sensibilidade à insulina é maior em mulheres antes da menopausa do que em homens (NUUTILA et al., 1995), e a terapia de reposição hormonal com estrogênio em mulheres após a menopausa reduziu o risco de desenvolvimento de DM2 (MARGOLIS et al., 2004).

Dessa maneira, estudos sobre o papel dos hormônios endógenos, dos padrões nutricionais e da relação entre terapia de reposição hormonal e DHGNA são assuntos emergentes e as relações entre esses fatores e os mecanismos subjacentes ao viés no risco de DHGNA na pós-menopausa permanecem incompletamente compreendidos.

### **1.3 Hormônios esteróides E2 e P4 na DHGNA**

Os hormônios esteróides E2 e P4 são hormônios que atuam como mensageiros químicos no organismo e regulam uma ampla variedade de processos fisiológicos, incluindo o desenvolvimento, reprodução, crescimento e metabolismo. E2 e P4 são hormônios derivados do colesterol por meio de uma série de reações catalisadas por enzimas (ANSELMO-FRANCI, SPRITZER & FRANCI, 2018). Modificações da estrutura e função, associado aos esteroides, podem ocorrer em muitos tecidos do corpo, como o cérebro e o fígado (ANSELMO-FRANCI, SPRITZER & FRANCI, 2018). No nível celular, esses hormônios esteróides medeiam efeitos fisiológicos por meio da ligação aos seus receptores, no qual, a maioria são receptores nucleares (também há receptores membranares e presentes no citoplasma). Após a ligação do ligante, a ativação do receptor ocorre através de diversas vias envolvendo ações genômicas ou não genômicas (PEDRAM, et al., 2002) ou seja, o receptor ativado pode se ligar diretamente aos elementos responsivos ao DNA nas regiões reguladoras desses genes (ações genômicas) ou pode influenciar diversas vias no citoplasma ou no núcleo da célula.

O E2 é a forma predominante de estrogênio circulante e é sintetizado principalmente pelos ovários e o córtex da adrenal (ANSELMO-FRANCI, SPRITZER & FRANCI, 2018). O E2 também pode ser produzido em menores quantidades por outros tecidos, incluindo tecido

adiposo, cerebral e ósseo (NELSON & BULUN, 2001; FUENTES & SILVEYRA,2019). Os receptores de E2 são denominados como  $\alpha$  e  $\beta$  (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) e são encontrados principalmente no núcleo. No entanto, a maioria dos efeitos metabólicos dos estrogênios são mediados pelo ER $\alpha$ , que está em maior proporção do que o ER $\beta$  em tecidos-chave para a regulação metabólica (FUENTES & SILVEYRA,2019).

Como o principal hormônio feminino, o E2 influencia principalmente o trato reprodutivo, seu desenvolvimento, maturação e função (NELSON & BULUN, 2001; FUENTES & SILVEYRA,2019). No entanto, a perda de E2, devido à menopausa tem efeitos que vão além da fisiologia reprodutiva. Evidências relataram que mulheres na pós-menopausa apresentam um risco aumentado de doença como o DM2, doenças cardiovasculares e hipertensão pois sua prevalência em mulheres na pós-menopausa é maior do que em mulheres na pré-menopausa (MEIRELLES, 2014; BALLESTRI, et al., 2017). Além disso, as mulheres após a menopausa têm um risco aumentado de intolerância à glicose, resistência à insulina, hiperlipidemia e acúmulo de gordura visceral (KAAJA, 2008; MEIRELLES, 2014; BALLESTRI, et al., 2017). Estudos clínicos vêm demonstrando que terapia de reposição de estrogênio em mulheres na pós-menopausa reduz a incidência de DM2 (MARGOLIS et al., 2004). Todas essas evidências estão intimamente relacionadas à DHGNA (DISTEFANO et al., 2020; RIAZI, et al., 2022).

Nos estudos experimentais, camundongos com deficiência de ER $\alpha$  apresentaram respostas deletérias com relação ao metabolismo lipídico, como diminuição da oxidação de ácidos graxos e aumento da *lipogênese de novo*, levando ao acúmulo lipídico elevado no fígado em comparação com camundongos controle (HEINE, et al., 2000; OKURA, et al., 2003; ZHU, et al., 2014; CHEN & MADAK-ERDOGAN, 2018; HART-UNGER, et al., 2017). Da mesma forma, o bloqueio a jusante de ER $\alpha$  contribuiu para maior acúmulo de gordura visceral e redução do gasto de energia em camundongos fêmeas (PALMISANO, ZHU & STAFFORD, 2017; CHEN & MADAK-ERDOGAN, 2018; YANG, ET AL., 2020). Em ratas e camundongos fêmeas ovariectomizadas (OVX) foi observado aumento do peso corporal associado ao aumento da massa gorda (ROGERS, et al., 2009; CAMPOREZ, et al., 2011; CAMPOREZ, et al., 2013). Além disso, camundongos knockout para aromatase exibiram aumento de peso corporal, massa gorda e hipertrofia de adipócitos em comparação com camundongos controle, confirmando o impacto da deficiência de estrogênio no acúmulo de gordura (JONES, et al., 2000). Também em camundongos fêmeas OVX, foi observado que a reposição de estrogênio melhora a sensibilidade à insulina e facilita a exportação mediada por VLDL de lipídios do

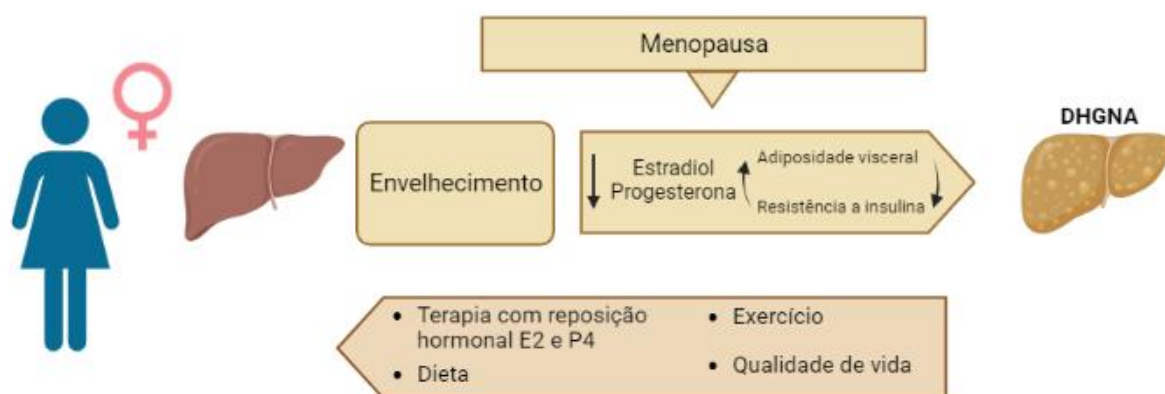
fígado, aumentando a produção hepática de VLDL (CAMPOREZ, et al., 2013; DELLA TORRE, 2020).

Os progestágenos também são uma classe de hormônios esteróides que se ligam ao receptor de P4 nuclear (PR) (GRIMM & HARTIG, 2016). Além deste, outros dois receptores de membrana de P4 putativos PGRMC (componente de membrana do receptor de P4) 1 e 2 são identificados em vários tecidos humanos, incluindo o fígado (CAHILL, 2007). A P4 é o principal e mais importante progestágeno no corpo e desempenha papéis essenciais tanto no sistema reprodutor feminino quanto no masculino (OETTEL & MUKHOPADHYAY, 2004). Porém, a literatura sobre os efeitos da P4 na homeostase metabólica são escassas e poucos estudos se debruçaram em compreender tais efeitos. Sabemos também, que a terapia combinada de estrogênio + progestágeno (LOBO, et al., 2016) é muito eficaz para controlar os efeitos da privação de estrogênio durante a menopausa. Como a proliferação excessiva de células endometriais leva à hiperplasia e câncer endometrial e pode resultar da terapia apenas com estrogênio, os progestágenos têm sido administrados de maneira contínua ou sequencialmente em combinação com estrogênio para inibir o crescimento endometrial indesejado (BOERRIGTER, et al., 1996).

Alguns estudos mostraram que níveis artificialmente elevados de hormônios esteróides E2 e P4, em mulheres que fazem a terapia de reposição hormonal combinada na pós-menopausa, afetam a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (GODSLAND et al., 1991, WATANABE et al., 1994). Achados experimentais de alguns autores (LETURQUE et al., 1987, CÓRDOBA et al., 1991, LINDHEIM et al., 1993, LINDHEIM et al., 1994) sugerem que a administração de P4 diminui a sensibilidade à ação da insulina. Entretanto outros estudos foram incapazes de observar melhora na sensibilidade à insulina com a terapia de reposição hormonal em mulheres na menopausa (CAGNACCI et al., 1992; O'SULLIVAN & HO, 1995).

Há muito tempo se conhece sobre os efeitos opostos e antagônicos de P4 em neutralizar os efeitos do E2 em variados sistemas e evidenciados em diversos estudos (ZHU, et al., 1999) e nos perguntamos se os progestágenos poderiam se opor aos efeitos protetores do E2 na homeostase metabólica. Além disso, em estudo com animais, foi observado que em ratas, o tratamento crônico com P4 levou a uma resistência hepática à insulina (NELSON et al., 1994). Dessa forma, diferenças na população estudada, tipo e via de tratamento, além do método de avaliação da sensibilidade à insulina, poderiam explicar a discrepância nos resultados obtidos sobre o metabolismo da glicose e sensibilidade à insulina após a terapia e reposição hormonal com P4 ou conjugada com E2 mais P4.





**Figura 3.** Aspectos do processo de envelhecimento. Redução dos hormônios endógenos, E2 e P4, aumento da adiposidade visceral e possível desenvolvimento de resistência à insulina. A seta de baixo representa algumas das possibilidades que podem ser associadas para uma melhora de risco aumentado de intolerância à glicose, resistência à insulina, hiperlipidemia e acúmulo de gordura visceral. Esquema feito pelo autor na plataforma Biorender.com

#### 1.4 Modelo animal de menopausa, SM e DHGNA

A menopausa é um componente inevitável do envelhecimento nas mulheres, é definida como a cessação permanente do ciclo menstrual devido à perda da função reprodutiva ovariana, ocorrendo espontaneamente por atresia folicular ou por outras condições, como a remoção dos ovários (DAVIS, et al., 2015). Como já mencionado, a transição para a menopausa leva a alterações metabólicas que favorecem o desenvolvimento da SM. Dessa maneira, o estabelecimento de um modelo animal que represente adequadamente a contribuição, principalmente da deficiência estrogênica na fisiopatologia da SM permitiu o avanço e o desenvolvimento de novas pesquisas e seguras estratégias terapêuticas para a SM durante a menopausa (MEDINA-CONTRERAS, et al., 2020).

Um bom modelo para SM deve apresentar as características clínicas que inclui a presença de pelo menos três dos seguintes fatores: obesidade abdominal, hiperglicemia de jejum, hipertensão, dislipidemia e resistência à insulina (GRUNDY, 2016; MEDINA-CONTRERAS, et al., 2020). Assim se deu a importância de gerar modelos animais que mimetizem essa fisiopatologia e forneçam informações sobre seu desenvolvimento, progressão e prevenção. Dessa maneira, foram propostos modelos experimentais de alterações metabólicas induzidas pelo consumo de dietas hipercalóricas (RODRÍGUEZ-CORREA, et al., 2020), como modelos transgênicos e drogas, especialmente em roedores, têm sido amplamente utilizados para entender sua relação com diversas alterações associadas à SM e suas complicações

subsequentes (LEHNEN, et al., 2013; WONG, 2016). Consideravelmente, devido à importância dos estrogênios no metabolismo, o uso de modelos animais para perda, deficiência ou resistência a estrogênios, como ratas e camundongos fêmeas ovariectomizadas, camundongos nocaute para aromatase (ARKO) e camundongos ER $\alpha$ KO tem sido usado para avaliar muitos dos fatores associados à SM (MEDINA-CONTRERAS, et al., 2020).

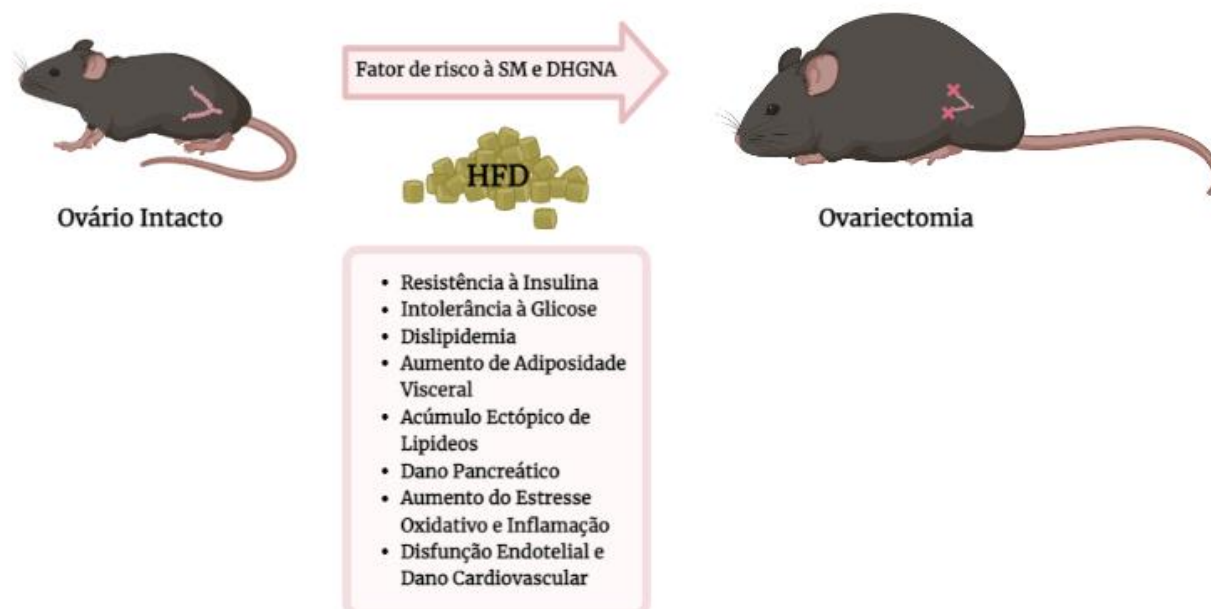
Camundongos fêmeas OVX representam um excelente modelo para SM e principalmente para DHGNA, pois estas, apresentam após a cirurgia de remoção, um aumento de adiposidade visceral o que leva a distúrbios metabólicos como dislipidemia, resistência à insulina, acúmulo ectópicos de lipídeos, intolerância à glicose, estresse oxidativo e inflamação, o que ocorre também em mulheres na pós-menopausa (FAHMY, et al., 2018; CAMPOREZ, et al., 2013). Existem inúmeras evidências que apoiam que a cirurgia por ovariectomia permite o desenvolvimento de múltiplos distúrbios metabólicos já mencionados e permite o maior desenvolvimento de fatores de risco para a SM quando comparados com os modelos nocautes que necessitam de uma combinação com uma dieta hiperlipídica (HFD) para evidenciar e desenvolver a maioria dos fatores de riscos associados a SM (RIBAS, et al., 2010; MEDINA-CONTRERAS, et al., 2020).

Para além da ovariectomia, existem também modelos como a senescência reprodutiva, ou seja, roedores que já estejam na estropausa semelhante a menopausa em mulheres (DIAZ BRINTON, 2012; KOEBELE & BIMONTE-NELSON, 2016). Porém, nesse modelo, apenas 25% dos animais apresentam semelhanças entre a estropausa e a menopausa, a maioria das camundongos fêmeas na senescência apresentam uma resposta de estro constante, representando altos níveis sustentados de P4 e E2, diferindo dos baixos níveis hormonais encontrados na menopausa (DIAZ BRINTON, 2012). Além disso, outros problemas também estão relacionados em roedores idosos são as altas taxas de mortalidade e de que, durante a estropausa, os animais apresentam folículos ovarianos maduros, enquanto nas mulheres em menopausa a falência ovariana é praticamente completa (KOEBELE & BIMONTE-NELSON, 2016).

Outro modelo utilizado é o modelo animal que leva o esgotamento seletivo dos folículos ovarianos por meio de atresia, resultando da depleção dos folículos primordiais e primários e levando a falha ovariana por meio da administração de 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD). O modelo por falha ovariana química retém o tecido ovariano residual, assim como ocorre na mulher menopausada. Alguns problemas relacionados a esse modelo são que altas doses de VCD podem ser fatais e levar ao óbito e o regime de aplicação do VCD requer pelo menos uma

série de 15 doses intraperitoneais (DIAZ BRINTON, 2012; KOEBELE & BIMONTE-NELSON, 2016).

Assim a ovariectomia é denominado como modelo padrão ouro para investigações da deficiência hormonal, que também apresenta, dentre as outras vantagens citadas, facilidade de execução, custos baixos e uma rápida manifestação da diminuição dos níveis hormonais e apesar da ovariectomia não representar muito bem o período de transição da menopausa, com uma mudança hormonal brusca, o modelo continua sendo o mais eficaz em mimetizar a menopausa e os fatores de risco para SM e DHGNA principalmente quando associado a uma HFD (DIAZ BRINTON, 2012; KOEBELE & BIMONTE-NELSON, 2016; MEDINA-CONTRERAS, et al., 2020) (Figura 4).



**Figura 4.** Modelo animal padrão ouro em mimetizar os efeitos observados na menopausa em uma HFD. Camundongos ovariectomizados apresentam diversas disfunções fisiopatológicas como um aumento de adiposidade visceral o que leva a distúrbios metabólicos como dislipidemia, resistência à insulina, acúmulo ectópicos de lipídeos, tolerância à glicose, estresse oxidativo e inflamação, o que ocorre também em mulheres na pós-menopausa. Esquema feito pelo autor na plataforma Biorender.com

#### 1.4 Justificativa do Trabalho

Dado todo contexto levantado, tendo como base o observado nos estudos clínicos com mulheres na pós-menopausa, dos estudos experimentais com animais, da importância de novos

estudos sobre a fisiopatologia da SM e DHGNA em mulheres na pós-menopausa. Sabendo que existe uma grande lacuna na literatura sobre os conhecimentos do efeito da P4 sob o metabolismo energético e resistência à insulina e que a maior parte dos tratamentos de reposição hormonal em mulheres é feita com os hormônios E2 e P4, o objetivo principal desse projeto foi investigar os efeitos da P4 sobre o metabolismo energético e resistência à insulina no modelo animal de menopausa (ovariectomizado) alimentados com uma HFD que mimetiza os efeitos da maioria dos fatores de riscos associados a SM e principalmente a DHGNA.

## **2 OBJETIVOS**

## **2.1 Hipótese**

A hipótese desse trabalho é de que a reposição hormonal conjugada com P4 anularia os efeitos protetores do E2 na homeostase metabólica e a reposição apenas com P4 levaria a uma menor tolerância à glicose e menor sensibilidade a ação da insulina.

Essa hipótese está baseada nas seguintes premissas: 1) Os efeitos da P4 em neutralizar os efeitos do E2 em estudos clínicos e experimentais em diversos sistemas fisiológicos. 2) Estudos clínicos sugerem que a reposição hormonal combinada com E2 mais P4 afetam a tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. 3) O tratamento crônico com P4, em um estudo experimental, mostrou uma maior resistência hepática à insulina.

## **2.2 Objetivo geral**

O objetivo geral desse trabalho foi investigar os efeitos da P4 sobre o metabolismo energético e resistência à insulina em um modelo experimental de menopausa (camundongos fêmeas ovariectomizadas) alimentadas com dieta rica em gordura ou em dieta padrão.

## **2.3 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos foram:

- I. Avaliar o efeito da P4 na tolerância à glicose por meio de teste de tolerância à glicose (GTT);
- II. Analisar o acúmulo de lipídeos no fígado e músculo esquelético (TAG).
- III. Analisar a expressão gênica e proteica de marcadores inflamatórios e de síntese de lipídeos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1 Animais

Foram utilizados 69 camundongos fêmeas com background C57BL/6J. Elas foram mantidas em sala com temperatura controlada a  $22 \pm 2$  °C com acesso *ad libitum* a ração e água, submetidos a um ciclo claro-escuro de 12h (claro de 6 a.m. – 18h). Todos os experimentos realizados aqui foram previamente aprovados de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo código CEUA – 038/2021.

### 3.2 Cirurgia de ovariectomia e reposição hormonal

As fêmeas foram submetidas a ovariectomia bilateral (OVX – retirada dos ovários). Os animais foram anestesiados usando 3% de isoflurano (5% para indução). Colocados em decúbito ventral. Foi aplicado salina nos olhos para proteção e seus pelos foram raspados a 3 x 3 cm próximo da crista ilíaca. A área foi lavada com álcool 70%. Após incisão com bisturi na mesma área, foi cortado a pele e separado esta da fáscia subjacente e depois cortado o músculo. Com uma pinça, foi pego o tecido adiposo que envolve o ovário na cavidade abdominal e puxado com cuidado. Após identificação do ovário, este foi cortado junto ao tecido adiposo ligado e o tecido restante colocado de volta na cavidade abdominal. O corte foi fechado com fio de sutura nylon.

Após o fechamento da incisão da ovariectomia, o animal foi colocado em decúbito dorsal e foi realizado os mesmos procedimentos para incisão, como a depilação e lavagem da área no pescoço do animal. Foi feita uma incisão de 1 cm e dissecado uma bolsa subcutânea caudolateralmente, com amplo espaço para implantação de *pellets* subcutâneos de E2 0,5 mg/*pellet* e/ou P4 a 15 mg/*pellet* (CAMPOREZ et al, 2013) e antibiótico e anti-inflamatório analgésico diluído em salina, de maneira subcutânea em seu dorso (*PENIKEL L.A.* e *BIOFEN* 10 mg/kg ). Após ter colocado o *pellet* suavemente através da incisão, esta foi posteriormente fechada por uma sutura e o animal deixado acordar da anestesia em uma gaiola aquecida (25-27 °C) durante pelo menos 2 horas após a cirurgia.

Para desenho experimental, o estudo foi dividido em quatro grupos: animais OVX controles; animais OVX tratados com E2 (OVX+E2), animais OVX tratados com P4 (OVX+P4) e animais OVX tratados com E2 mais P4 (OVX+E2+P4) (Figura 5).

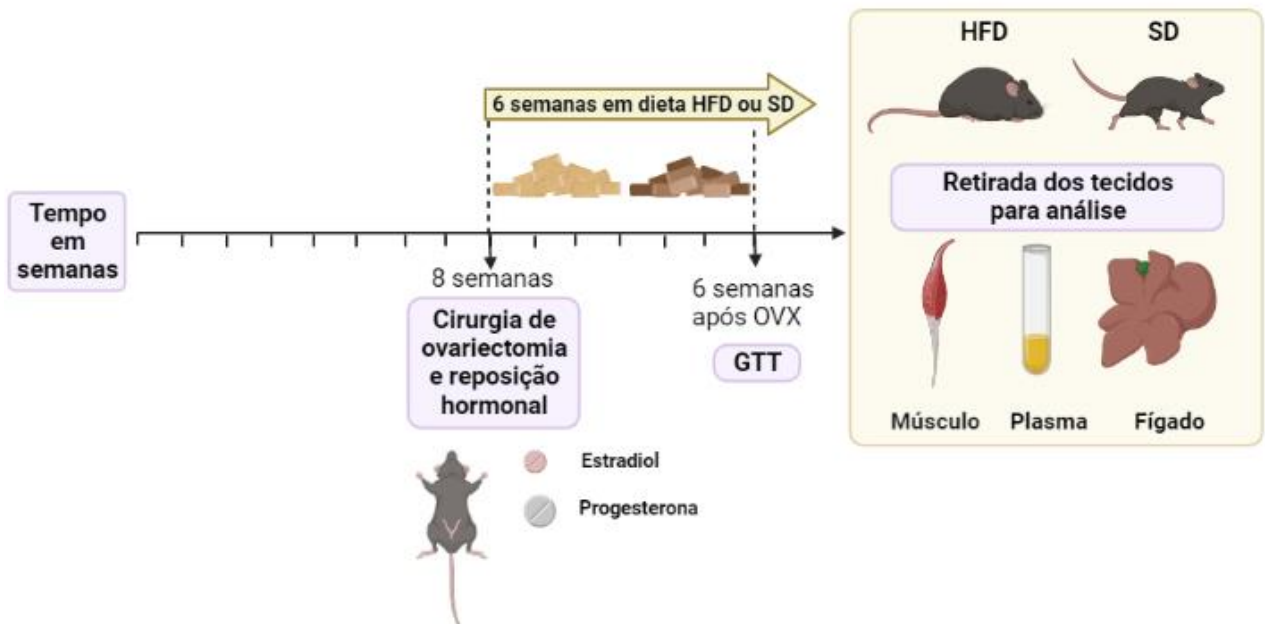


### 3.3 Dieta hiperlipídica

Os animais foram alimentados, após a cirurgia, com dieta hiperlipídica (HFD) contendo 45% das calorias provenientes de gordura (*D12451, Research Diets, NJ, USA*) ou dieta padrão (SD) por seis semanas. A dieta HFD começou quando os animais tinham aproximadamente 8 semanas de vida, quando ocorreu a cirurgia para retirada dos ovários.

### 3.4 Teste de tolerância a glicose e insulina

Após restrição alimentar de 6 horas, os camundongos foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com glicose (1 mg / kg de peso corporal - 10% de dextrose). As amostras de sangue para mensuração da glicose e insulina plasmática foram retiradas pelo sangramento da cauda aos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a injeção. Foi feito também o teste de tolerância à insulina em que a insulina solúvel (Novolin, Novo-Nordisc, Plainsboro, NJ, EUA) a 1 U/kg foi administrada por injeção i.p. O sangue para níveis séricos de glicose, foi coletado em 0, 4, 8, 12, 16 e 20 min por sangramento na cauda.



**Figura 5.** Esquema representando a linha do tempo dos procedimentos experimentais realizados. Ilustração feita na plataforma BioRender.com

### 3.5 Conteúdo tecidual de lipídeos e análise AST/ALT

Após seis horas de restrição alimentar, os animais foram eutanasiados e os tecidos retirados para análise do conteúdo de lipídeos (fígado e músculo esquelético – gastrocnêmio). TAG tecidual foram extraídos usando o método de Bligh e Dyer (Bligh and Dyer, 1959) e mensurado usando um reagente para TAG (Bioclin). O plasma também foi retirado para análise de enzimas hepáticas (transaminase pirúvica - ALT e transaminase oxalacética - AST), sendo utilizado o kit comercial LabTest (Minas Gerais, Brasil).

### 3.6 Western blot

Para expressão proteica foram utilizados os fígados. Os tecidos dos animais foram pulverizados e homogeneizados em tampão RIPA a 4°C (Triton-X-100 1%, Tris 100mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM e PMSF 2 mM) com homogenizador Polytron PTA 20S (*Brinkmann Instruments*). Os extratos teciduais foram centrifugados a 12000 rpm a 4°C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o conteúdo proteico total foi quantificado utilizando-se o método de Bradford (*BioRad*). Amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo DTT 200 mM e 30 ug de proteínas totais solubilizadas dos fragmentos do fígado dos camundongos. Essas amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (extrato total). Em cada gel haverá um marcador com peso molecular com valores estabelecidos.

A transferência das proteínas separadas no gel foi realizada eletricamente para uma membrana de PVDF, por meio de um sistema de transferência *semidry* (Bio-Rad) por 120 minutos. As membranas de PVDF foram incubadas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico® 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) a 4°C por 2 horas para reduzir a ligação inespecífica de proteínas nas membranas.

Para avaliação da sinalização da insulina, os tecidos usados para Western Blot foram coletados e as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos:, fosfo-AKT2<sup>ser473</sup> (*Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA*).

Todas as membranas foram incubadas com GAPDH (*Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA*) para controle da quantidade de proteína na membrana.

Essas incubações foram feitas com solução bloqueadora (3% de BSA ao invés de leite), por 12 h a 4°C e a concentração de cada anticorpo foi de acordo com o sugerido pelo fabricante. Em seguida, as membranas foram lavadas com a solução bloqueadora sem leite ou BSA por 30

minutos. Estas membranas foram incubadas com o segundo anticorpo, conjugado com peroxidase, por 2 h em temperatura ambiente e, logo após, com a solução para detecção por quimioluminescência como descrito no protocolo do kit comercial (*ECLPlus, Amersham*). A emissão de luz foi detectada e visualizada usando filmes radiográficos. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização de programa de análise de intensidade de bandas (*Scion Image Software, MD, USA*).

### **3.6 Avaliação da expressão gênica – reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Foram usados o tecido do fígado para RT-PCR. O tecido foi retirado e 50 mg da amostra foi homogeneizada em 1 mL de trizol (Life Technologies) para extração do RNAm. A amostra foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente (25°C), foi adicionado 200 µL de clorofórmio e incubado por 15 min a temperatura ambiente, centrifugada por 15 min a 2°C a 12000 rpm. A fase aquosa que contém o RNA foi separada, e em seguida foi adicionado 500 µL de isopropanol e a mostra foi colocada no freezer -20°C por 1 h. A amostra foi centrifugada por 10 min a 4°C a 12000 rpm, depois passou por um processo de lavagem, o sobrenadante foi descartado, e foi adicionado 1 mL de álcool 75%, centrifugado por 10 min a 4°C a 12000 rpm, essa etapa foi realizada 2 vezes seguida. O sobrenadante foi descartado e o RNA passou por uma etapa de dissolução, foi adicionada 50 µL de água livre de RNase. A leitura da concentração de RNA foi avaliada a 260 nm e a pureza a partir da relação 260/280 nm no aparelho nanodrop (DeNovix). Em seguida, o cDNA foi preparado através da reação de transcrição reversa (High-Capacity DNA kit, Applied Biosystems). Foi preparado um mix contendo os componentes: tampão RT 10x, mix dNTP 25x 100 Mm, primers RT 10x, transcriptase reversa, inibidor de RNase, água livre de RNase, e adicionado a amostra. A amostra foi levada ao termociclador. A expressão gênica foi analisada por RT-PCR (Rotor Gene Q - Qiagen) e sonda fluorescente SYBR Green (Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix UDG, Invitrogen). As análises da expressão gênica foram realizadas usando um método descrito por Livak e Schmittgen (2001) e Pfaffl (2001).

Foram usados os seguintes primers para marcadores inflamatórios: TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ . E F480. Para marcadores da via de síntese de lipídios foram usados os seguintes primers: FASN, SREBP1.

### 3.7 Análise da composição corporal por time domain nuclear magnética (TD-NMR)

TD-NMR é um método baseado na aquisição de sinais de radiofrequência gerados por spins de hidrogênio de fluidos e tecidos moles, como músculo e tecido adiposo. Utilizamos o TD-NMR LF90 (Minispec, LF90, Bruker Corporation, (Billerica, Massachusetts, EUA) para estimar a composição de gordura total. Todos os camundongos foram habituados à análise TD-NMR antes das medições experimentais. Os animais foram colocados em um cilindro de plástico transparente (50 mm de diâmetro) e mantido no menor espaço possível, permitindo movimentos livres pela inserção de um êmbolo de ajuste apertado no cilindro. O tubo foi então inserido no Minispec por dois minutos, seguido do processo de digitalização e processamento dos dados.

### 3.8 Análise dos resultados

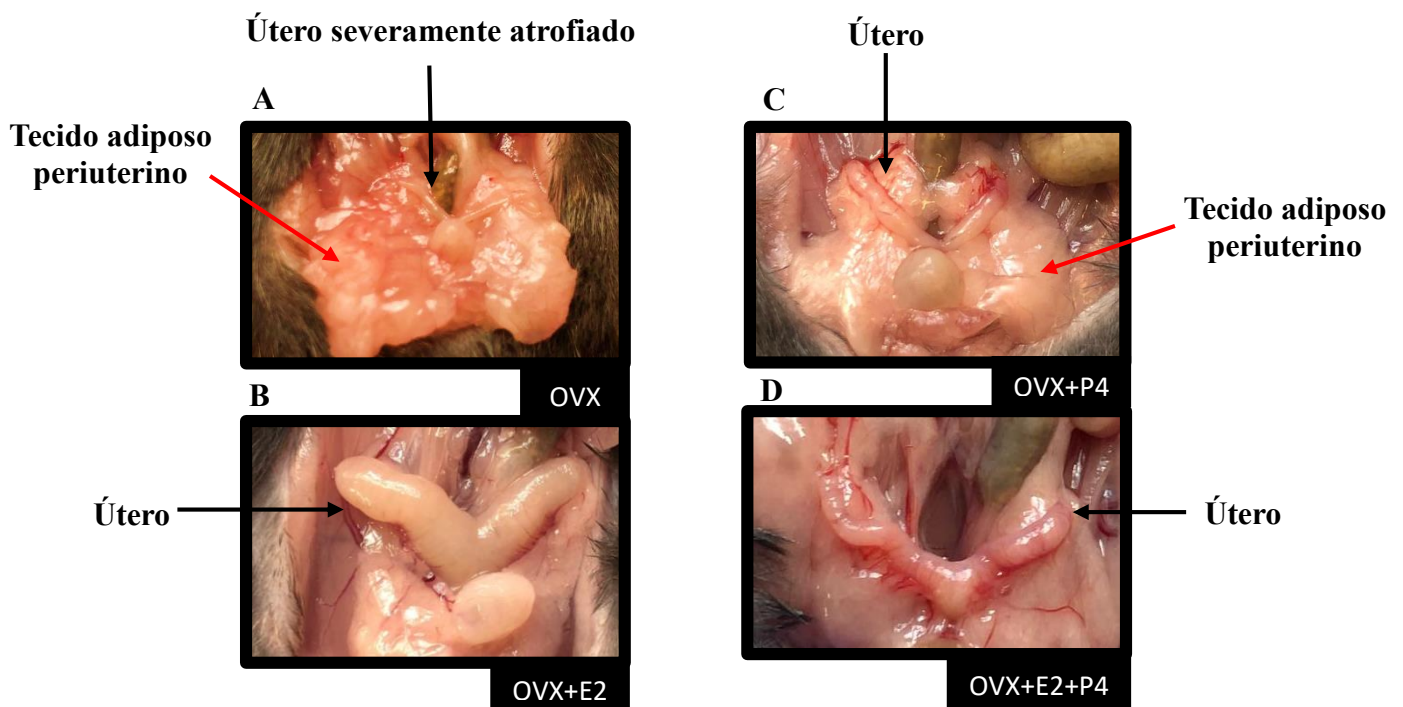
Os resultados foram analisados utilizando o GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). O mínimo de amostras por grupo foi definido por um  $n$  suficiente para realizar a análise da distribuição de amostras através do teste de normalidade *D'Agostino-Pearson omnibus* recomendado pelo programa GraphPad Prism 9.0. Os resultados foram expressos como médias  $\pm$ EPM. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste de Bartlett para a homogeneidade das variâncias e teste de múltiplas comparações Bonferroni. Quando necessário foi realizado o teste  $t$  para amostras não pareadas. O nível de significância mínima aceitável foi de  $p < 0,05$ .



#### 4.1 Caracterização do modelo animal proposto e avaliação do peso corporal

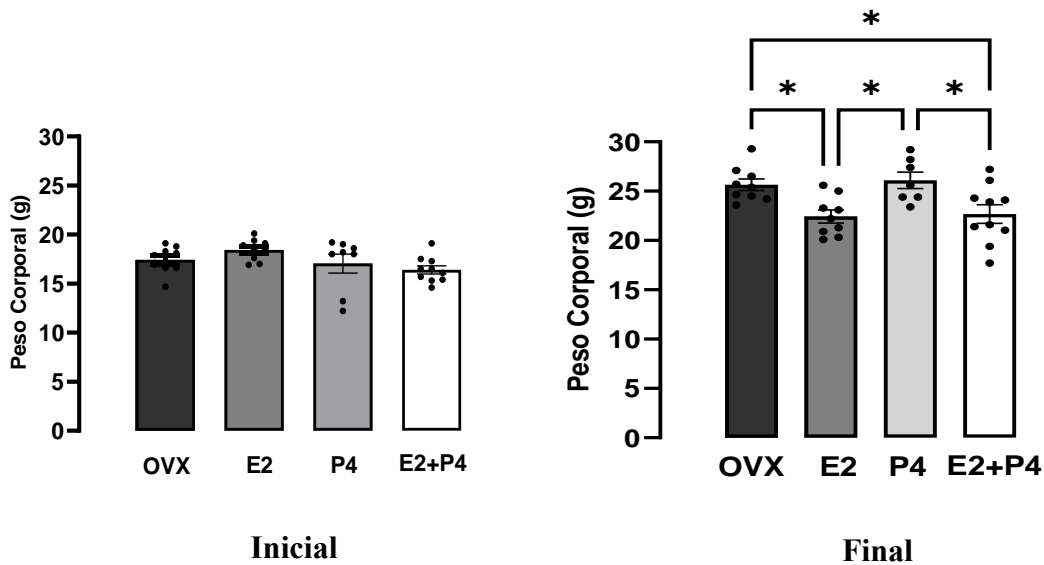
Para início do trabalho, foram utilizadas 37 camundongos fêmeas C57bl/6 de oito semanas, que foram divididas randomicamente em quatro grupos experimentais, tiveram seus pesos corporais mensurados e foram submetidas à cirurgia de ovariectomia. Os grupos experimentais foram fêmeas ovariectomizadas controle (OVX; n=10), fêmeas ovariectomizadas tratadas com E2 (OVX+E2; n = 9), fêmeas ovariectomizadas tratadas com P4 (OVX+P4; n = 8) e fêmeas ovariectomizadas tratadas com E2 + P4 (OVX+E2+P4; n = 10).

A ovariectomia foi realizada através da remoção dos ovários, que foi precedida pela sedação e anestesia através da inalação monitorada de 3% de isoflurano. Após a recuperação cirúrgica, os animais foram alimentados por seis semanas com dieta rica em gorduras. O sucesso da ovariectomia foi constatada durante eutanásia dos animais, pela ausência dos ovários e por intensa atrofia das trompas uterinas (Figura 6, WRONSKI et al., 1985).



**Figura 6.** Imagem qualitativa mostrando o útero em cada grupo experimental. A) Imagem mostrando severa atrofia do útero nos grupos de camundongos ovariectomizados e grande aumento de tecido adiposo periuterino. B) Útero durante reposição hormonal com E2. C) Útero com reposição hormonal apenas com P4 D) Útero com reposição hormonal de E2+P4.

Os animais foram pesados antes do início da dieta e após seis semanas de dieta hiperlipídica. Nossos resultados revelaram que nos pesos corporais iniciais, antes da cirurgia por ovariectomia, não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Já ao final de 6 semanas em dieta hiperlipídica houveram diferenças estatísticas significativas de diminuição de peso no grupo OVX+E2 e OVX+E2+P4 ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o grupo controle OVX e o grupo OVX+P4. (Figura 7;  $F_{3,31} = 5.969$ ;  $p < 0,05$ , ANOVA de uma via de medidas repetidas, *pos-hoc* de Bonferroni).



**Figura 7.** Peso corporal inicial e final dos animais antes e depois de 6 semanas de HFD. Os dados são expressos pela média  $\pm$  EPM, \* $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via (OVXn=10; OVX+E2 n=9; OVX+P4 n=8 e OVX+E2+P4 n=9).

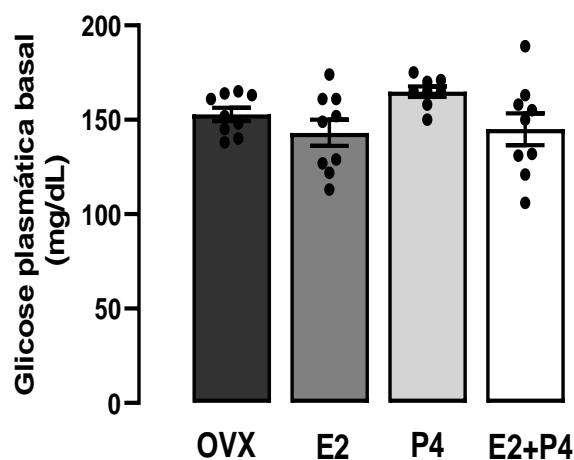
#### 4.2 Avaliação do teste de tolerância a glicose e resistência periférica à insulina

Para caracterizar o fenótipo metabólico, realizamos os testes de tolerância à glicose (GTT). Este teste mediu as alterações nos níveis de glicose nos animais jejuados (durante o período da manhã por seis horas) em um intervalo de duas horas após a administração de 1 mg/kg de glicose. As medidas dos níveis de insulina também foram feitas como prática padrão para esse teste, assim como o cálculo de área sob a curva (AUC) e dos níveis de glicose basal de acordo com Ayala et al., 2010.

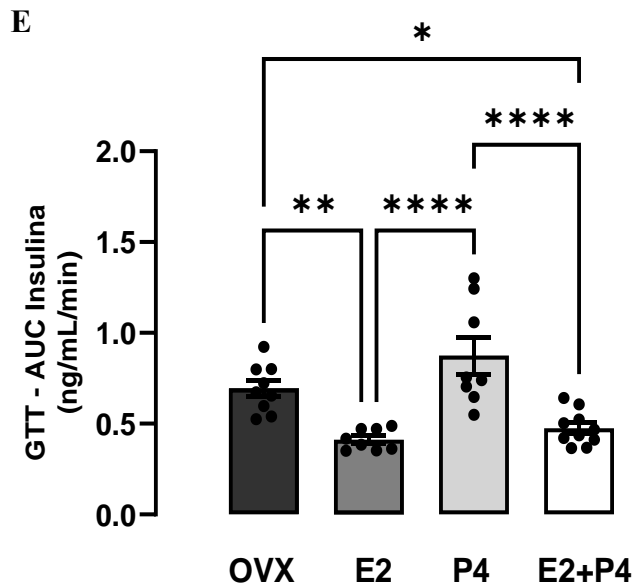
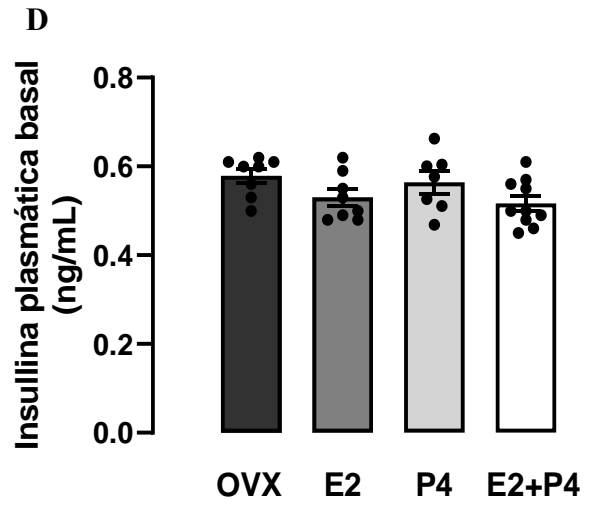
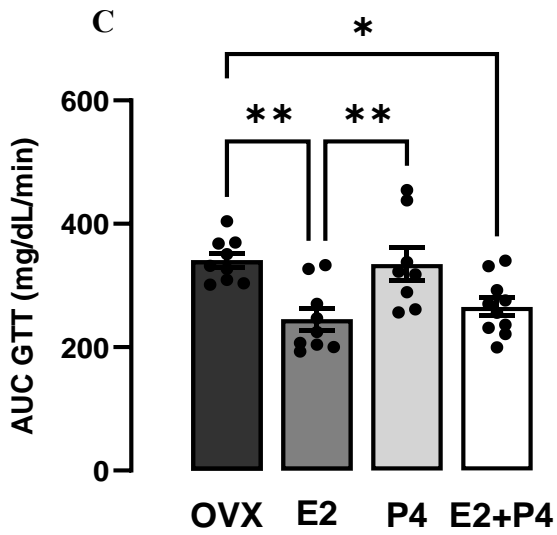
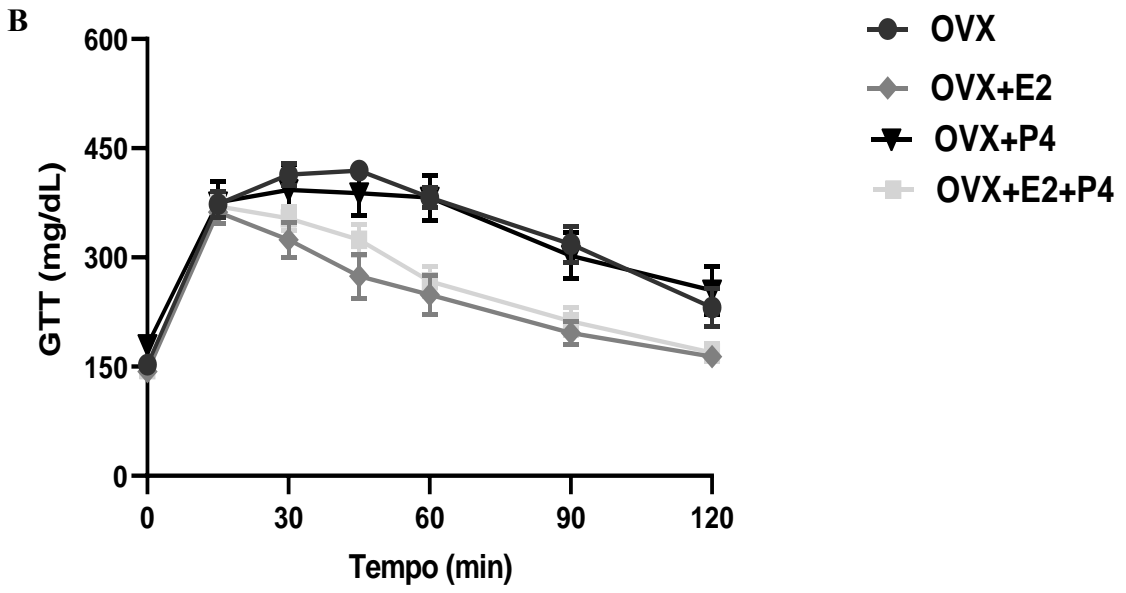
Nossos resultados mostram que não houve diferenças estatísticas nos níveis de glicose basal entre os grupos (Figura 8 A;  $F_{6,31} = 2.568$ .  $P > 0,05$ ; ANOVA de uma via de medidas repetidas). O teste de GTT revelou diferenças entre os grupos (Figura 8 B;  $F_{6,217} = 65.98$ ; OVX

vs OVX+E2; OVX vs OVX+E2+P4 como também OVX+P4 vs OVX+E2; OVX+P4 vs OVX+E2+P4). O teste *pos-hoc* evidenciou diferenças estatísticas, mostrando que houve menores níveis de glicose plasmática em animais alimentadas com alto teor de gordura do grupo OVX+E2 vs OVX-controle nos tempos de 30, 45, 60 e 90 minutos ( $p < 0,05$ ). Já entre os grupos OVX+E2+P4 vs OVX-controle houve menores níveis de glicose plasmática nos tempos de 45, 60 e 90 minutos ( $p < 0,05$ ). Nos grupos OVX+P4 vs OVX+E2 e OVX+P4 vs OVX+P4+E2 houveram diferenças nos tempos de 60 e 90 e 120 minutos ( $p < 0,05$ ). Os menores níveis de glicose plasmática nos grupos com reposição hormonal foi melhor ilustrada no cálculo de AUC e esses são evidenciados estatisticamente no gráfico (C) mostrando uma maior tolerância a glicose nos grupos OVX+E2 e OVX+E2+P4 quando comparados ao controle OVX-controle. A reposição apenas com OVX+P4 vs OVX+E2 também evidenciou diferenças ( $p < 0,05$ ) e mesmo que, apesar de não ter mostrado diferença estatística entre a comparação com OVX+P4 vs OVX+E2+P4, houve uma tendência a diminuir ( $p = 0,06$ ) (Figura 8 C;  $F_{3,32} = 7,275$   $P < 0,05$ ). Para os níveis de insulina durante o GTT, a insulina basal não mostrou diferenças estatística entre os grupos (Figura 8 D;  $F_{3,29} = 0,4213$   $p > 0,05$ ). Por fim, os níveis de insulina no plasma durante o GTT também foram significativamente menores no grupo OVX+E2 e OVX+E2+P4, revelando um indicativo de maior sensibilidade à insulina quando comparados ao grupo OVX-controle e OVX+P4 e isso foi refletido nos dados de AUC para insulina (Figura 8 E;  $F_{3,31} = 14,21$ ;  $p < 0,05$ ). Não houveram diferenças estatísticas significativas entre os grupos OVX+E2 vs OVX+E2+P4 durante o GTT (Figura 8 E;  $p > 0,05$ ).

A

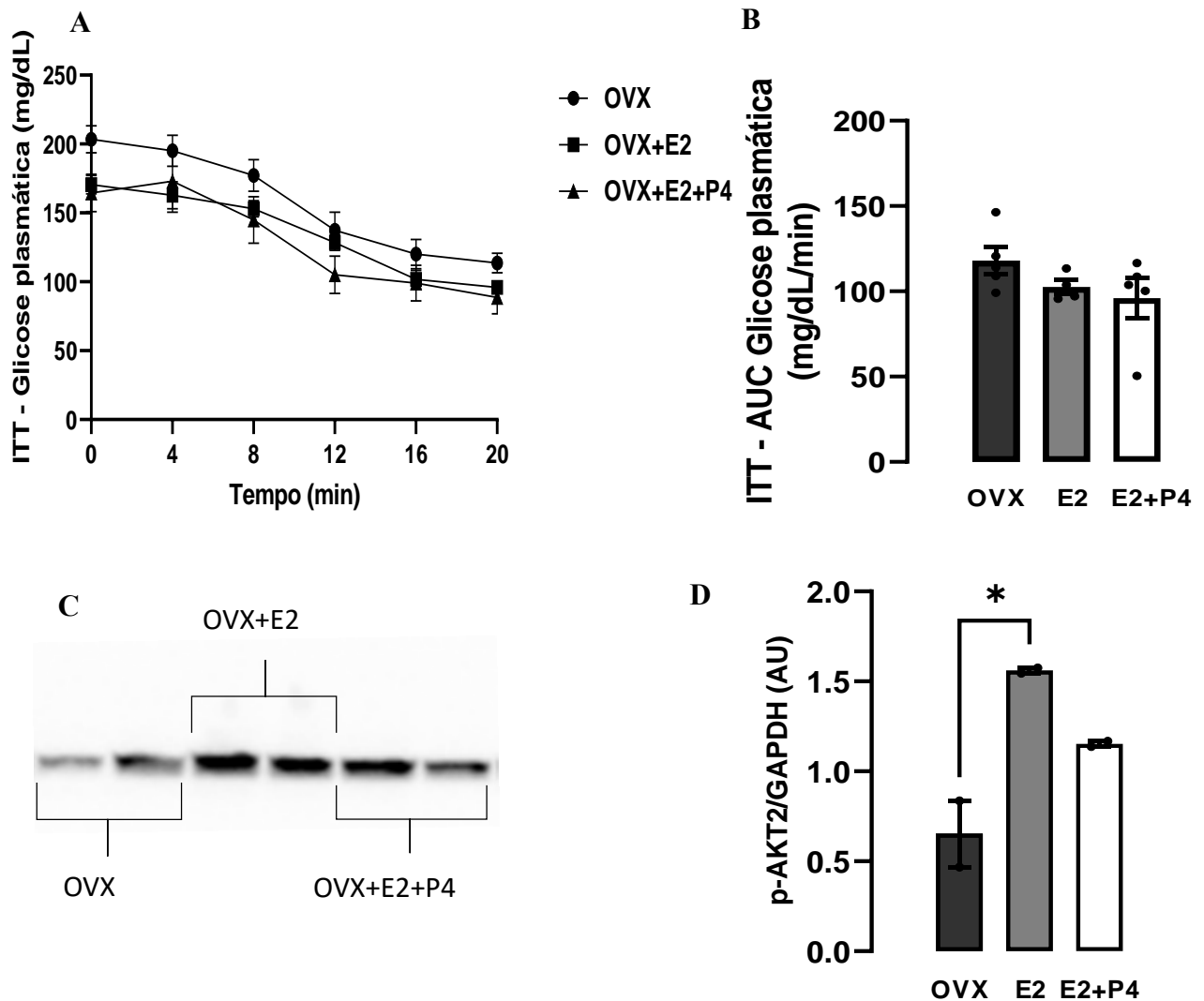






**Figura 8.** Teste de tolerância à glicose e avaliação de resistência periférica à insulina. Avaliação do plasma de glicose basal não apresentou diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ; ANOVA de uma via de medidas repetidas). **B)** Teste de tolerância, a glicose foi medida nos tempos 0, 15,30, 45, 60, 90 e 120 minutos após I.P. de glicose mostrando a curva e seu decaimento. **C)** AUC - GTT (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ANOVA de uma via de medidas repetidas, e *pos-hoc* de Bonferroni). **D)** Insulina plasmática basal não mostrou diferença estatística ( $p > 0,05$ ). **E)** AUC – insulina plasmática durante o GTT (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA de uma via, *pos-hoc* de Bonferroni). Os dados são expressos pela média  $\pm$  EPM (OVX -  $n = 8-10$ ; OVX+E2 –  $n = 8-9$ , OVX+P4  $n = 8$  e OVX+E2+P4 –  $n = 9-10$ ).

Para complementar a análise de tolerância à glicose *in vivo*. Realizamos o teste de tolerância à insulina (ITT), um método simples e tecnicamente muito semelhante ao GTT, pois envolve o monitoramento dos níveis de glicose no sangue ao longo do tempo, mas em resposta à administração de insulina e não à carga de glicose. O ITT ajuda a determinar a sensibilidade dos tecidos responsivos à insulina. O grau em que a glicose cai após o bolus de insulina é indicativo da ação da insulina em todo o corpo. Aqui realizamos um teste piloto com um  $n$  amostral pequeno e que deve ser aumentado nos próximos projetos. Utilizamos apenas os grupos OVX-controle OVX+E2 e OVX+E2+P4, o grupo OVX+P4 não foi incluído. O ITT não revelou diferenças estatísticas significativas durante o curso de tempo (Figura 9 A e AUC Figura 9 B,  $F_{2,11} = 0,3624$ ;  $p > 0,05$ ). Apesar de não termos visto diferenças entre os grupos durante ITT resolvemos realizar análise de expressão proteica de fosfo-AKT2 no fígado. A Akt2 ativada fosforila e inibe o fator de transcrição FoxO, o receptor-coativador-1 $\alpha$  ativado por proliferadores de peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ) e outros, encerrando assim a expressão das enzimas controladoras da taxa de gliconeogênese (GROSS, VAN DEN HEUVEL & BIRNBAUM, 2008). Durante a resistência à insulina, esse processo é atenuado e a persistência da produção hepática de glicose diminui a absorção de glicose resultando em hiperglicemia (SALTIEL, 2001). Nossos resultados mesmo que prévios evidenciaram diferença estatística entre o grupo OVX-controle e OVX+E2 na expressão de AKT2 (Figura 9 C e D;  $F_{2,3}=18.05$ ;  $p < 0,05$ ).



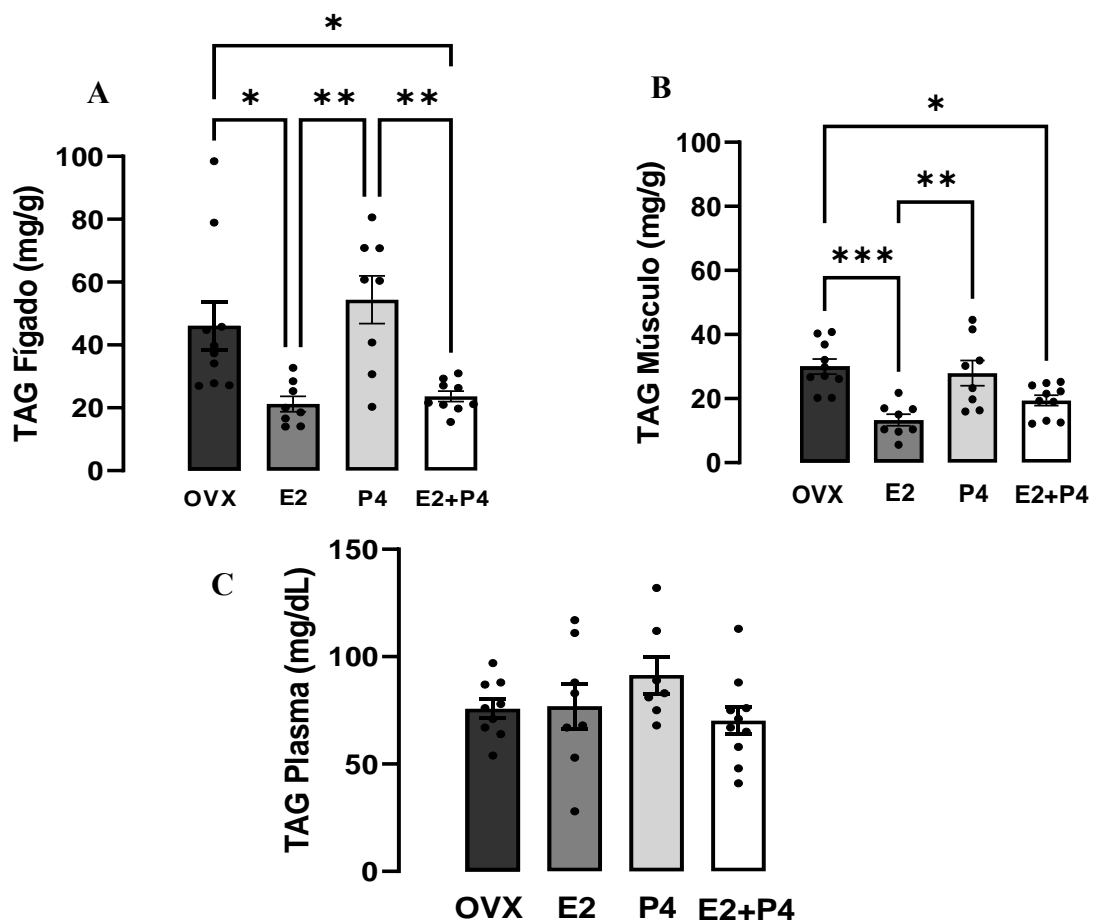
**Figura 9.** Teste de tolerância à insulina. A) Monitoramento dos níveis de glicose no sangue ao longo do tempo de 20 minutos, em resposta à administração de insulina. B) AUC – ITT em que não houve diferença significativas nos níveis de glicose após i.p. de insulina ( $p > 0,05$  ANOVA de uma via). C-D) Western blot de fosfo-AKT2 mostrando a diferença da expressão protéica nos grupos OVX-controle vs OVX+E2 ( $*p < 0,05$  ANOVA de uma via). (OVX - n = 2-4; OVX+E2 – n= 2-4 e OVX+E2+P4 – n= 2-4).

#### 4.3 Conteúdo tecidual de lipídeos

Existem diversas hipóteses de mecanismos que levam a resistência à insulina conforme mencionado na introdução. Entre essas hipóteses, o acúmulo de lipídeos é uma das mais

relevantes. Dessa forma, entendemos como importante avaliarmos o conteúdo de TAG no fígado, no músculo esquelético e no plasma sanguíneo.

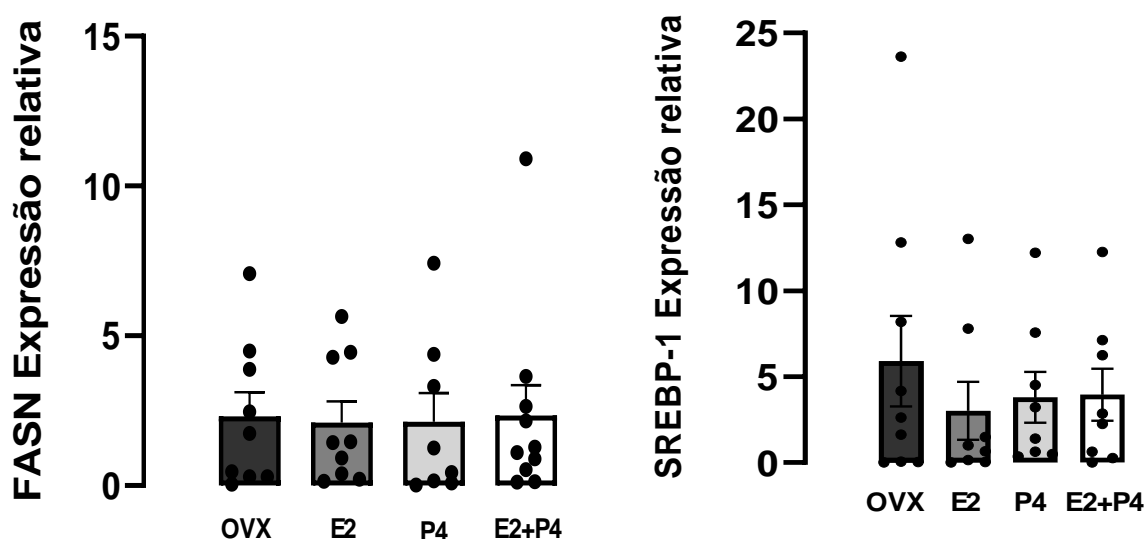
Nossos resultados demonstraram que os animais OVX+E2 e OVX+E2+P4 apresentam redução significativa do conteúdo de TAG no fígado em comparação ao grupo-OVX controle e OVX+P4 (Figura 10 A;  $F_{3,31} = 7.959$ ;  $p < 0,05$ ). No músculo esquelético o tratamento com OVX+E2 e OVX+E2+P4 também reduziu o conteúdo de TAG (Figura 10 B;  $F_{3,31} = 6.469$   $p < 0,05$ ). Não houve diferenças estatísticas significantes no conteúdo de TAG no plasma dos grupos (Figura 10 C  $F_{3,30} = 1.340$ ;  $p > 0,05$ ).



**Figura 10.** Perfil do conteúdo tecidual lipídico TAG. A-C, Análise do conteúdo lipídico extraídos do fígado, músculo e plasma (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  ANOVA de uma via, *post-hoc* de Bonferroni). Os dados são expressos pela média  $\pm$  EPM (OVX -  $n = 8-10$ ; OVX+E2 -  $n = 8-9$ , OVX+P4  $n = 8-10$  e OVX+E2+P4 -  $n = 10$ ).

Avaliamos por expressão gênica de reação em cadeia da polimerase (PCR) de dois marcadores da via de síntese de lipídeos. O primeiro mais direcionados para a investigação do

controle transicional da *lipogênese De novo*, para a qual a insulina e a glicose ativam conjuntos de genes sobrepostos por meio da proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol-1c (SREBP1c) (MOSLEHI & HAMIDI-ZAD, 2018). O segundo é o gene para enzima de ácido graxo sintase (FASN) que catalisa a última etapa na biossíntese de ácidos graxos e, portanto, acredita-se ser um determinante importante da capacidade hepática máxima de gerar ácido graxo por *Lipogênese De Novo* (MOSLEHI & HAMIDI-ZAD, 2018). Apesar de observarmos redução no conteúdo lipídico no fígado e músculos nos animais OVX+E2 e OVX+E2+P4 quando comparados com OVX-controle e animais OVX+P4, não foi visto diferenças estatísticas nesses dois marcadores (Figura 11; SREBPc  $F_{3,32} = 0,01867$ ; FASN  $F_{3,29}=0,4136$   $p>0,05$ ).



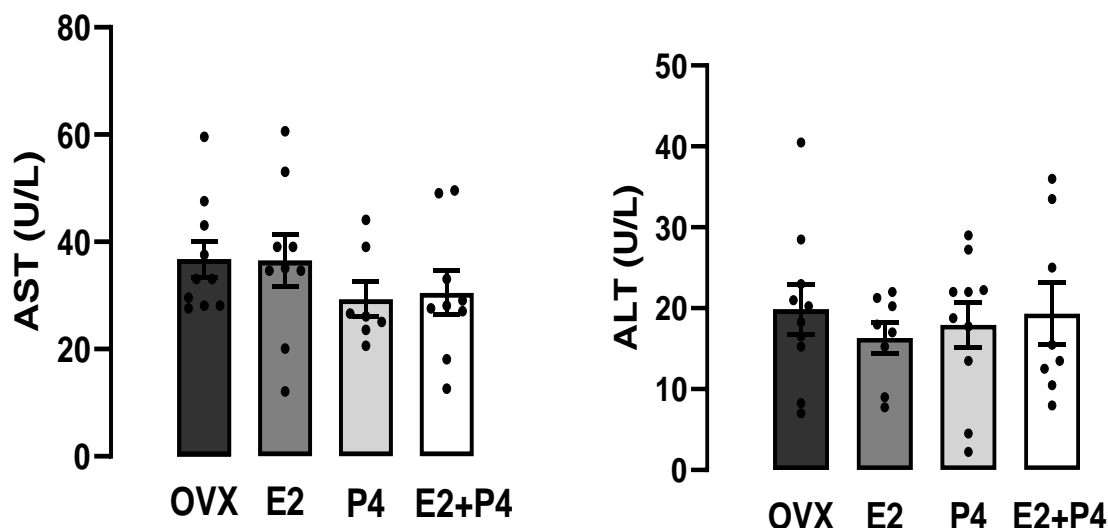
**Figura 11.** Marcadores de síntese de lipídeos e *lipogênese DE Novo*. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Os dados são expressos pela média  $\pm$  EPM, ANOVA de uma via (OVX - n = 8; OVX+E2 - n = 8, OVX+P4 n=8 e OVX+E2+P4 - n = 8).

#### 4.4 Análise AST e ALT

AST e ALT são enzimas encontradas principalmente no fígado, mas também encontradas em glóbulos vermelhos, células cardíacas, tecido muscular e outros órgãos, como o pâncreas e rins. AST e ALT anteriormente são chamados de transaminase glutâmico oxaloacética sérica (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica sérica (TGP) (GIANNINI et al., 1999). Embora não seja específico para doença hepática, pode ser usado em combinação com outras enzimas para monitorar o curso de vários distúrbios hepáticos.

Os nossos resultados não indicaram qualquer diferença significativa entre os grupos na

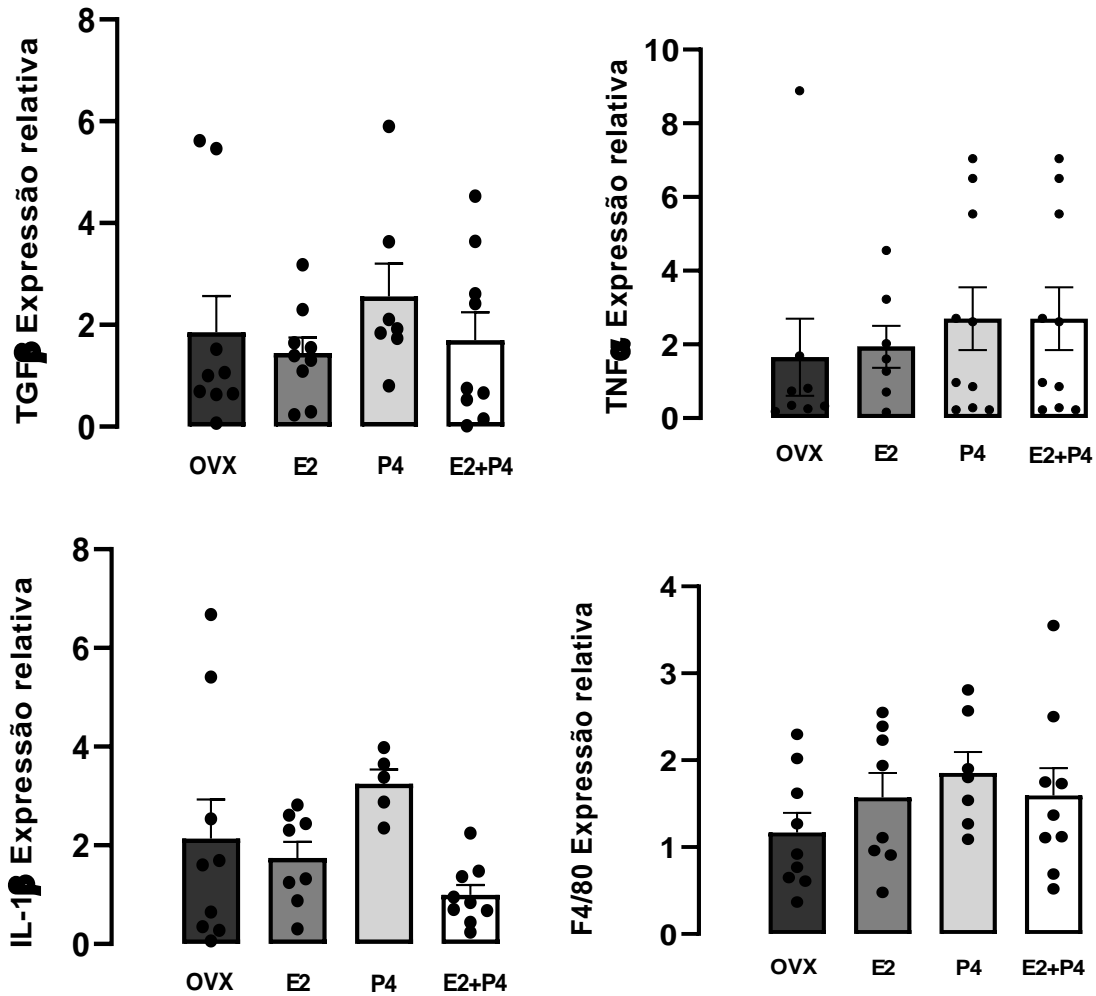
análise dessas enzimas (Figura 12; AST –  $F_{3,31} = 0,9132$  e ALT –  $F_{3,32} = 0,2688$ ;  $p > 0,05$ ).



**Figura 12.** Mensuração das enzimas AST e ALT. Análise das enzimas Aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no plasma. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos de estudo ( $p > 0,05$  ANOVA de uma via, *pos-hoc* de Bonferroni). Os dados são expressos pela média  $\pm$  EPM (OVX -  $n = 10$ ; OVX+E2 -  $n = 9$ , OVX+P4  $n = 8-10$  e OVX+E2+P4 -  $n = 8-10$ ).

#### 4.5 Avaliação do perfil inflamatório

Associado ao aumento do acúmulo de lipídeos ectópicos, outra hipótese sobre os mecanismos que são relacionados à resistência à insulina, é a inflamação. Em nosso estudo, avaliamos marcadores citocinas anti-inflamatórias, como fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$  e outro marcador para inflamação como F4/80, para verificar se há indícios de infiltração e aumento do recrutamento por macrófagos e/ou possível lesão hepática (ITOH et al., 2013; OATES et al., 2019). Nesse sentido, buscamos analisar o perfil de inflamação no fígado de alguns marcadores inflamatórios através da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR). Nossos resultados não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os marcadores descritos (Figura 13;  $p > 0,05$ ).



**Figura 13.** Expressão gênica de marcadores inflamatórios e fibrótico. Níveis relativos de expressão de mRNA de genes relacionados inflamação e fibrose não houveram diferenças estatísticas (TGFβ –  $F_{3,30}=0,6493$ ; TNFα –  $F_{3,31}=0,3719$ ; IL-1β –  $F_{3,27}=2,770$ ; F4/80 –  $F_{3,29}= 1,006$ ;  $p > 0,05$  ANOVA de uma via, *pós-hoc* de Bonferroni). Os dados são expressos pela média  $\pm$  EPM (OVX - n = 9; OVX+E2 – n= 7-8; OVX+P4 n=5-7 e OVX+E2+P4 – n=10).

#### 4.6 Análise dos efeitos de P4 em uma dieta padrão

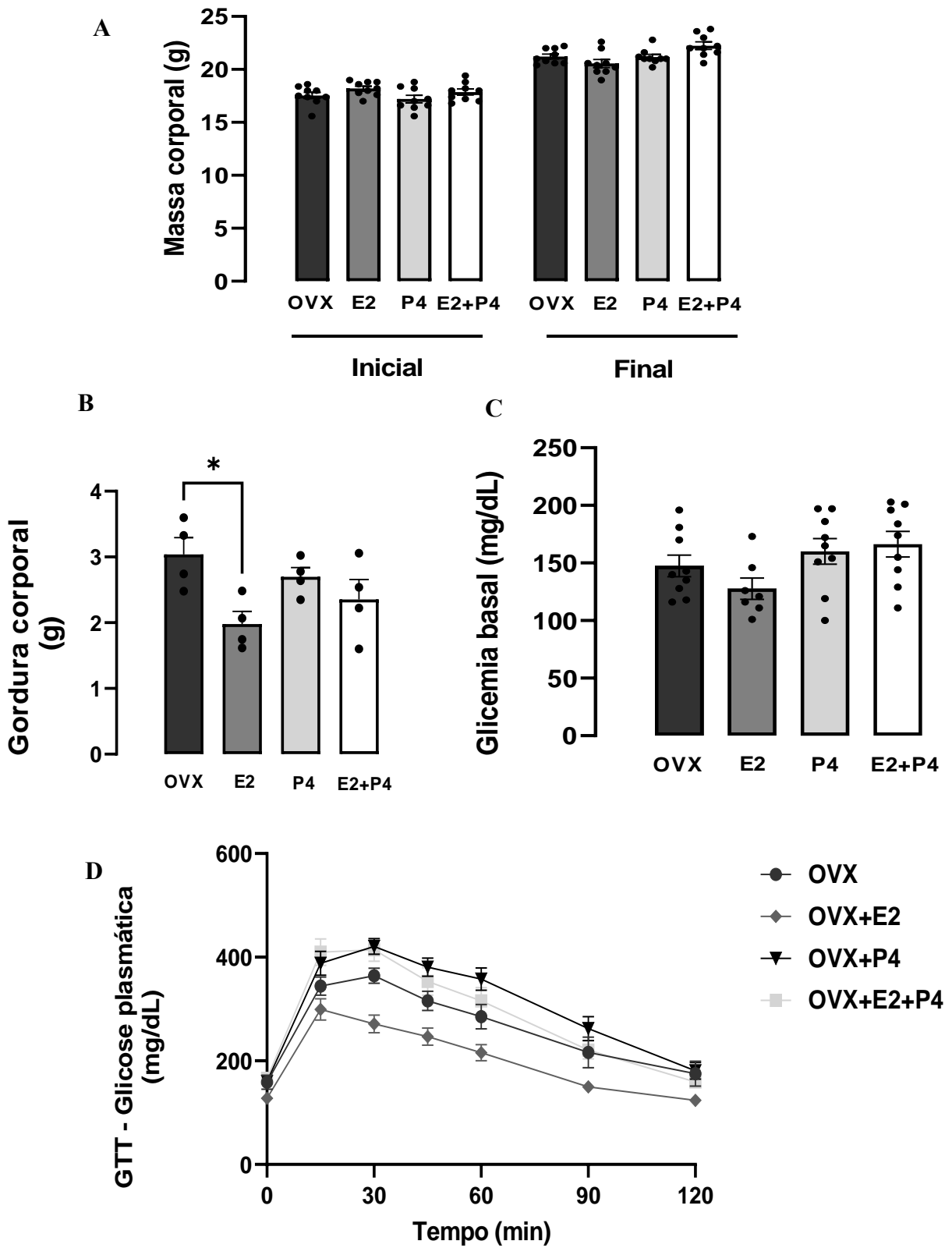
Para avaliar melhor o papel dos hormônios e principalmente da P4 *per se*, sem os efeitos de uma HFD resolvemos avaliar os efeitos de P4 e de P4+E2 em camungongos fêmeas ovarietomizadas e alimentadas por seis semanas com dieta padrão (SD). Realizamos o teste de

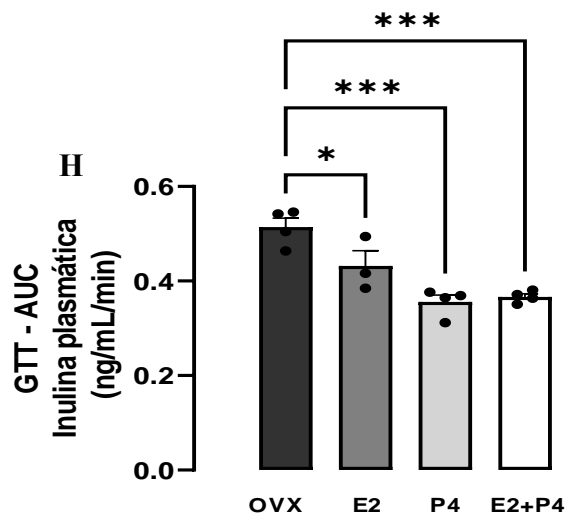
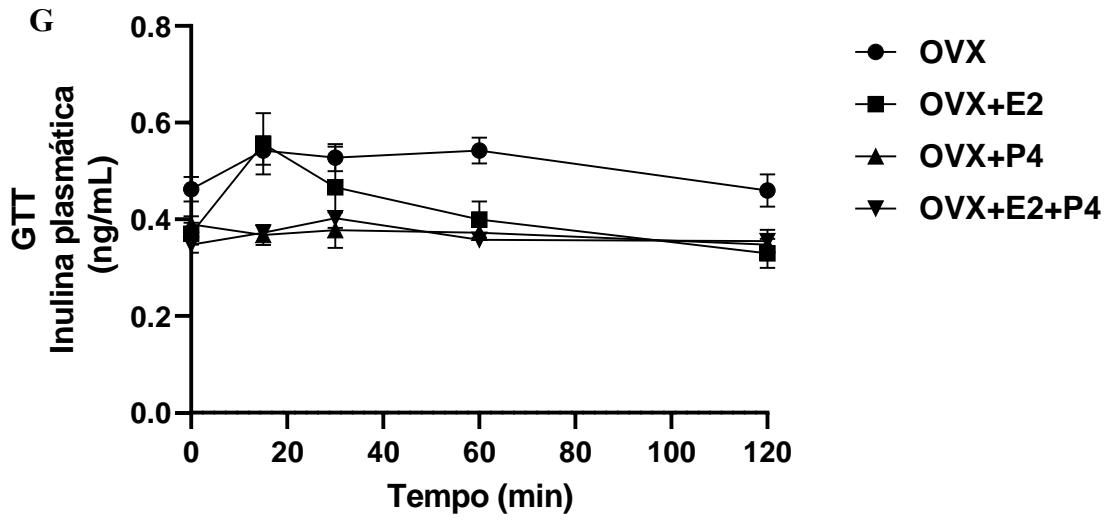
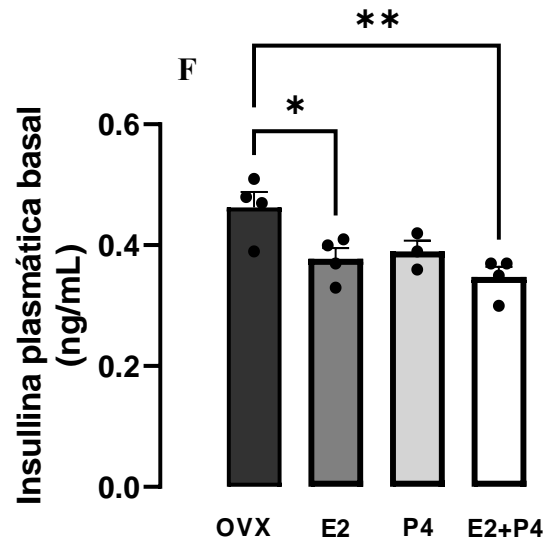
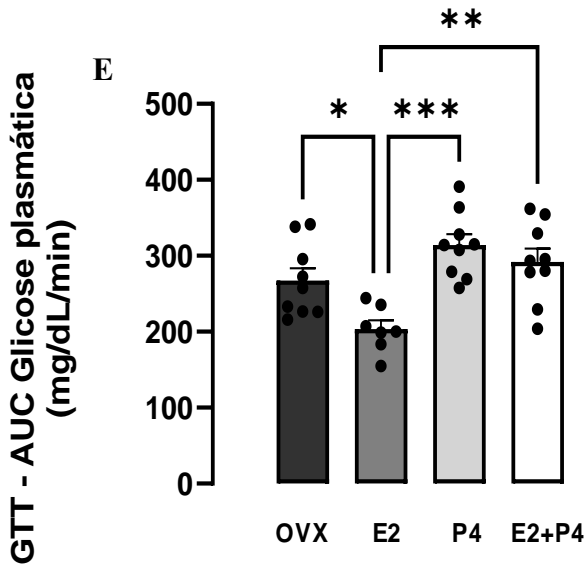
tolerância à glicose nesses animais para quantificar o efeito da administração de P4 sozinha e em conjunto de E2 no metabolismo da glicose (Figura 14).

Nossos resultados revelaram que nos pesos corporais iniciais, antes da cirurgia por ovariectomia, e após seis semanas de dieta SD os grupos não apresentaram diferenças estatísticas significativas (Figura 14; A;  $F_{3,64}=1.355$   $p>0,05$ ). Houve diferença estatística na análise da gordura corporal total em que o grupo OVX+E2 evidenciou uma redução dessa gordura quando comparado com o controle OVX (Figura 14 B;  $F_{3,12}=3.829$ ;  $p>0,05$ ).

Não houve diferenças estatísticas nos níveis de glicose basal entre os grupos (Figura 14 C;  $F_{3,30} = 2,423$ ;  $p>0,05$ ). Durante o teste de tolerância a glicose, houve diferenças entre os grupos OVX-controle vs. OVX+E2 em que no grupo OVX+E2 houveram menores níveis de glicose plasmática nos tempos de 45, 60 e 90 minutos (Figura 14 D;  $p < 0,05$ ). Nos grupos OVX+P4 vs OVX+E2 houveram diferenças nos tempos de 45, 60 e 90 minutos (Figura 14 D;  $p < 0,05$ ). Interessante desse resultado é de que entre os grupos OVX+E2 vs. OVX+E2+P4 também houveram diferenças significativas entre os tempos de 45, 60 e 90 minutos (Figura 14 D;  $p < 0,05$ ). Foram observados menores níveis de glicose plasmática apenas no grupo de OVX+E2 em relação aos outros grupos e esses dados estão melhores ilustrados estatisticamente no cálculo de AUC, mostrando uma maior sensibilidade a glicose apenas no grupo OVX+E2 quando comparados aos demais (Figura 14 E;  $F_{3,30}=8,555$   $p < 0,05$ ). Para os níveis de insulina durante o GTT, a insulina basal mostrou diferenças estatística entre os grupos OVX+E2, como também, para os grupos OVX+E2+P4 quando comparadas ao grupo OVX-controle (Figura 14 F;  $F_{3,11}=6,222$   $p < 0,05$ ). As curvas de insulina plasmáticas durante o GTT mostraram que o grupo OVX-controle se mantém mais alto que os demais, para o grupo OVX+E2, a curva evidência um pico ao 30 minutos com decaimento dos níveis de insulina no decorrer do tempo, entretanto os grupos OVX+P4 e OVX+E2+P4 os níveis de insulina não mudam (Figura 14 G). Por fim, os níveis de insulina no plasma durante o GTT foram estatisticamente evidenciado no cálculo de AUC em que houveram menores níveis de insulina nos grupos OVX+E2, OVX+E2+P4 e OVX+P4 quando comparados com OVX-controle (Figura 14 H;  $F_{3,11}=16,85$ ;  $P < 0,05$ ). Não houveram diferenças estatísticas significativas entre as demais comparações de grupo ( $p>0,05$ ). Interessante ressaltar que apesar dos grupos OVX-controle, OVX+P4 e OVX+E2+P4 mostrarem uma menor tolerância a glicose, nos grupos OVX+P4 e OVX+E2+P4 seus níveis plasmáticos de insulina foram menores.



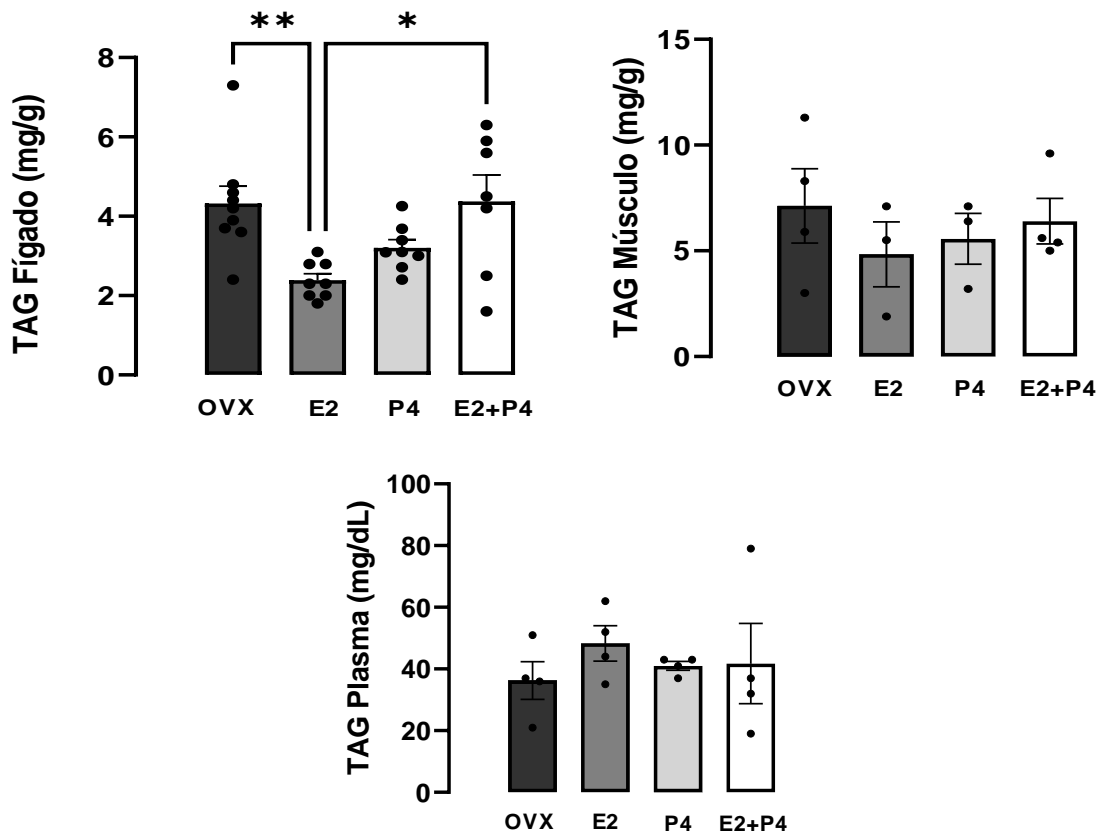




**Figura 14.** Análise GTT dieta padrão. A) Massa corporal inicial e final dos animais antes e depois da dieta padrão de 6 semanas. B) Gordura corporal total mostrando diferença entre OVX-controle vs OVX+E2 \* $p < 0,05$ ) C) Avaliação do plasma de glicose basal não apresentou diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ). D) Teste de tolerância, a glicose foi medida nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após I.P. de glicose mostrando a curva e seu decaimento. E) AUC - GTT (\*\* $p < 0,01$ ; \* $P < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$ ). F) Insulina plasmática basal mostrou diferenças estatísticas entre OVX+E2 e OVX+E2+P4 vs OVX-controle ( $p < 0,05$ ). G) Curva do GTT para insulina plasmática. H) AUC – insulina plasmática durante o GTT (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Os testes foram avaliados pela ANOVA de uma via ou duas vias de medidas repetidas, pos-hoc de Bonferroni). Os dados são expressos pela média  $\pm$  EPM (OVX -  $n = 4-10$ ; OVX+E2 -  $n = 4-9$ , OVX+P4  $n = 3-8$  e OVX+E2+P4 -  $n = 4-10$ ).

#### 4.7 Análise do conteúdo de lipídeos em dieta padrão

Após as observações sobre o teste de tolerância a glicose, avaliamos também os níveis de acúmulo de lipídeos no fígado, músculo e plasma. Mesmo em uma dieta padrão foi observado diferenças estatísticas nos animais tratado com E2 em relação aos grupos OVX-controle e OVX+E2+P4 (Figura 15;  $F_{3,28}=5.568$   $p < 0,05$ ). As análises do acúmulo no músculo como no plasma não revelou diferenças estatísticas significativas (Figura 15; Músculo  $F_{3,10}=0.4607$ ; Plasma  $F_{3,12}=0.4038$   $p > 0,05$ ).



**Figura 15.** Perfil do conteúdo tecidual lipídico TAG. Análise do conteúdo lipídico extraídos do fígado, músculo e plasma \*p< 0,05; \*\*P < 0,01 ANOVA de uma via, *pos-hoc* de Bonferroni). Os dados são expressos pela média ± EPM (OVX - n = 3-8; OVX+E2 - n= 3-8, OVX+P4 n=3-8 e OVX+E2+P4 - n=3-8).

## **5 DISCUSSÃO**

Exitem uma gama de estudos que evidenciam os efeitos dos hormônios esteróides na homeostase metabólica, principalmente, os efeitos do E2. Porém os efeitos do hormônio P4 permanecem relativamente controversos e sua literatura é bastante escassa (LETURQUE et al., 1987, CÓRDOBA et al., 1991). Nesse trabalho, reportamos que a reposição com E2, exerceu efeitos no controle do peso corporal em camundongos fêmeas ovariectomizadas sob uma dieta hiperlipídica e confirmou a importância e os efeitos desse hormônio, corroborando com a literatura já existente (LOVEJOY et al., 2008; ROGERS et al., 2009; CAMPOREZ et al., 2013). Assim como no papel dos estrogênios e seu reconhecido efeito sobre o metabolismo da glicose e sensibilidade à insulina (HEINE et al., 2000; LOUETL et al., 2004; MARGOLIS et al., 2004; CAMPOREZ et al., 2011; CAMPOREZ et al., 2013).

A P4, sob um regime de uma HFD por seis semanas, não exerce influências no ganho de peso corporal, mostrando um menor ganho de peso quando conjugada com o E2. Nossos resultados mostraram um indicativo de melhora nos teste de tolerância a glicose, na avaliação dos níveis plasmáticos de insulina e de acúmulo de TAG no fígado com reposição conjugada de E2+P4, mas não nos animais apenas com reposição de P4 que foram semelhantes aos efeitos do grupo OVX-controle, evidenciando que P4 demonstrou exercer pouco ou nenhum efeito sobre o metabolismo da glicose e sensibilidade à insulina nestes testes, quando associada ao E2 durante a reposição hormonal.

Os dados com dieta padrão, entretanto, revelaram o contrário. A P4 demonstrou exercer efeito sobre o metabolismo da glicose e sensibilidade à insulina no teste de GTT quando associado ao E2. Os resultados indicaram que apenas o grupo com E2 teve redução de gordura corporal e que a reposição conjugada com P4 foi capaz de diminuir os efeitos do E2 na perda de gordura. O teste de tolerância à glicose mostrou que apenas o grupo de reposição com E2 apresentou efeitos no aumento da sensibilidade a glicose e insulina, já a reposição de P4, mesmo quando associada ao E2 revelou uma menor tolerância à glicose. Interessante ressaltar, diante desses resultados, o esperado era que os níveis de insulina durante o GTT nos grupos P4 e E2+P4 fossem proporcionais aos níveis de glicose, assim como vistos no grupo OVX-controle durante o teste, porém nos grupos P4 e E2+P4 os níveis de insulina foram menores.

### **5.1 Efeito da reposição hormonal de E2 e P4 no peso corporal**

Mulheres na menopausa podem ter aumento na massa de gordura corporal e de gordura visceral (LOVEJOY et al., 2008). Segundo Lovejoy 2008 o aumento da massa gorda pode ser explicado pelo gasto energético reduzido em mulheres na pós-menopausa. Essas observações

em mulheres se encaixam também para modelos experimentais de camundongos fêmeas ovariectomizadas. Segundo estudos como de Rogers et al (2005) e estudos anteriores de nosso grupo de trabalho, (CAMPOREZ, et al., 2013) os animais OVX reduziram o consumo de O<sub>2</sub> e produção de CO<sub>2</sub> corporal total e o gasto de energia, levando ao aumento do peso corporal associado ao aumento da massa gorda. Esse estudo também revelou que embora os camundongos OVX fossem obesos em comparação com os camundongos OVX+E2, sua ingestão de alimentos foi ligeiramente menor do que os camundongos OVX+E2, sugerindo maior eficiência energética nesses camundongos e que as diferenças observadas na atividade entre os grupos podem ser devidas ao comportamento alimentar reduzido (CAMPOREZ, et al., 2013). A terapia crônica de reposição de E2 corrigiu a redução do gasto energético e do consumo de O<sub>2</sub> corporal, e esse estudo também indicou um balanço energético global negativo para o grupo tratamento em relação a um balanço energético global positivo para os animais ovariectomizados. Camporez et al. (2013) também evidenciou que há uma redução oxidativa no metabolismo do tecido adiposo branco dos animais OVX, em que proteínas como UCP-1, Cidea e PRDM16 no tecido adiposo branco em OVX estavam reduzidas, o que pode explicar a diminuição do gasto energético nesses camundongos, pois é conhecido que essas proteínas podem melhorar o metabolismo energético de todo o corpo quando altamente expressas nesse tecido (CAMPOREZ, et al., 2013).

Outro estudo clínico de Chmouliovsky et al. (1999) evidenciou que a terapia de reposição hormonal combinada de E2+P4 não só preveniu o ganho de peso, mas favoreceu a perda de peso por aumentar significativamente a oxidação lipídica após 3 meses de tratamento (CHMOULIOVSKY et al., 1999). Também influenciou favoravelmente a resposta à insulina, de lipídios plasmáticos e de gasto energético, corroborando com nossos resultados. Nossos resultados de HFD por seis semanas, o peso corporal com tratamento crônico conjugado de E2+P4 não mostraram diferenças em relação ao grupo apenas com E2, revelando que a P4 possivelmente não afetou nenhum dos componentes citados acima e favoreceu a perda de peso, possibilitando um balanço energético global negativo, semelhante ao observado com reposição apenas com E2.

Os resultados observados em uma dieta padrão não evidenciaram diferenças em ganho de peso corporal porém, foi visto, uma diferença na gordura corporal total apenas no grupo de tratamento com E2, o que indicaria que a P4 poderia reduzir os efeitos benéficos do E2 em corrigir uma provável redução do gasto energético. Como esses resultados foram obtidos ao final de meu mestrado, é de grande importância que seja feita uma avaliação do gasto energético e de proteínas que podem estar associadas a uma melhora do metabolismo oxidativo no tecido

adiposo para uma melhor avaliação do balanço energético global em animais tratados com P4 ou conjugados com E2.

## **5.2 Acúmulo de lipídeos e inflamação no modelo animal de menopausa e DHGNA**

Uma das grandes preocupações com a DHGNA é que o acúmulo de lipídeos ectópicos tem sido claramente ligado ao desenvolvimento de resistência hepática à insulina e DM2. Nossos resultados demonstraram que os animais OVX+E2 e OVX+E2+P4 apresentam redução significativa do conteúdo de TAG no fígado em comparação ao grupo-OVX controle e OVX+P4. No músculo esquelético, o tratamento com OVX+E2 e OVX+E2+P4 também reduziu o conteúdo de TAG. As nPKCs, como citado na introdução do trabalho, tem sido consistentemente observada em músculo e fígado em estado de resistência à insulina e são ativadas pelo aumento de DAG nas células. A ativação da PKC $\theta$  associada ao acúmulo de DAG no músculo esquelético tem sido observada tanto em roedores resistentes à insulina (CAMPOREZ et al., 2013) quanto em humanos (SZENDROEDI et al., 2014). Esse aumento da ativação da PKC $\theta$  no músculo esquelético foi associado ao aumento da fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), consequentemente reduzindo a sinalização da insulina nesse tecido. Já no fígado, o aumento do conteúdo de DAG foi associado a ativação da isoforma PKC $\epsilon$  tanto em modelos experimentais de resistência hepática à insulina (PETERSEN et al., 2016; CAMPOREZ et al., 2017), quanto em humanos que apresentam esteatose hepática e resistência à insulina (KUMASHIRO et al., 2011), levando a prejuízos na sinalização proximal da insulina. Nos hepatócitos, a PKC $\epsilon$  fosforila o receptor de insulina (IR) em treonina, reduzindo sua capacidade de se autofosforilar em tirosina e desencadear a sinalização da insulina a jusante, levando a resistência hepática a insulina (PETERSEN et al., 2016). Estudos anteriores já demonstraram a capacidade do E2 em reduzir o acúmulo de lipídeos e da ativação de PKC $\epsilon$ , que são observados no modelo animal de menopausa (CAMPOREZ, et al., 2013), os resultados obtidos nesse trabalho, apontam que a reposição conjugada com P4 não interferiu na capacidade em reduzir o acúmulo ectópico no músculo e no fígado.

Associado ao aumento do acúmulo de lipídeos ectópicos, outra hipótese sobre os mecanismos que são relacionados à resistência à insulina, é a inflamação. Nos hepatócitos, o acúmulo de TAG nas gotículas lipídicas é um mecanismo protetor e previne a lipotoxicidade ao tamponar os ácidos graxos livres que podem ser tóxicos (LISTENBERGER et al, 2003). No entanto, é uma questão de um equilíbrio dinâmico e esse mecanismo de proteção pode ser



superado na presença de distúrbios metabólicos. A remodelação alterada das gotículas lipídicas ou a mobilização lipídica podem aumentar, por exemplo, a lipotoxicidade dos hepatócitos e conduzir a progressão da DHGNA (já que DHGNA não é caracterizado por apresentar inflamação) como também podem levar a deficiências associadas na sinalização da insulina (LISTENBERGER et al., 2003; ASRIH, JORNAYVAZ, 2013).

Estudos clínicos e experimentais mostraram que mudanças no perfil e na produção de citocinas anti-inflamatórias, como fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) apresentam concentração aumentada na progressão de DHGNA (NAIR & NATH, 2020). Além disso, mudanças nos perfis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  TNF- $\alpha$  também foram observadas (KAKINO et al., 2018; MIREA et al., 2018). Em nosso estudo, avaliamos além dos marcadores aqui mencionados, outros marcadores para inflamação como F4/80 para verificar se há indícios de infiltração e aumento do recrutamento por macrófagos e/ou possível lesão hepática assim como da análise de enzimas hepáticas AST e ALT (ITOH et al., 2013; OATES et al., 2019). Os resultados não revelaram alterações entre os grupos, mostrando que em nosso modelo de menopausa, o acúmulo de lipídeos ectópicos e outras vias devem estar implicadas ao desenvolvimento de resistência à insulina, mas não a inflamação. Importante ressaltar que mesmo resultados de estudos clínicos em pacientes com DHGNA e sobrepeso ou obesos, estes são assintomáticos e com exames de função hepática normais. O padrão bioquímico habitualmente observado de aumento de inflamação e dessas enzimas está mais associado na esteato-hepática por DHGNA (SATTAR, FORREST & PREISS, 2014).

### **5.3 Obesidade, a relação entre a tolerância à glicose, resistência à insulina e a reposição hormonal no modelo animal de menopausa**

A obesidade observada em camundongos OVX também foi associada à resistência à insulina em todo o corpo e tolerância à glicose prejudicada (RIANT, et al., 2009, CAMPOREZ et al., 2013). Estudos anteriores de Riant et al. (2009) e Camporez et al. (2013) já mostraram uma intolerância à glicose e resistência à insulina em camundongos OVX alimentados com HFD, sendo que a reposição de E2 reverteu tais efeitos. Já os estudos em relação a P4 e resistência à insulina são escassos, entretanto estudos do nosso grupo de trabalho (Camporez et al 2013) mostrou que camundongos fêmeas SHAM, o E2 endógeno protegeu da resistência à insulina induzida por HFD apenas no músculo esquelético, exibindo resistência à insulina hepática, assim como camundongos OVX (CAMPOREZ et al., 2013). Os animais SHAM claramente exibem concentrações de P4 mais altas em comparação com camundongos OVX e

OVX+E2. Camporez et al 2013 propôs que o nível mais alto de P4 plasmática em camundongos SHAM poderia anular os efeitos benéficos endógenos de E2 na ação da insulina no fígado e que o possível mecanismo pelo qual a P4 poderia impedir os efeitos do E2 é pelo aumento da expressão da enzima estrogênio sulfotransferase, uma enzima primária responsável pela inativação do estrogênio induzido pelo aumento de P4 (GAO, AET AL., 2012). Contudo, nossas observações mostraram que a reposição conjugada de E2+P4 mostrou um indicativo de melhora nos teste de tolerância a glicose, na avaliação dos níveis plasmáticos de insulina semelhantes a reposição apenas com E2 e foi capaz de reverter os efeitos de intolerância à glicose e resistência à insulina observado nos grupos ovariectomizados e ovariectomizados e com reposição hormonal apenas com P4. Outro trabalho de Lee et al. (2021), evidenciaram que a P4 pode suprimir a gliconeogênese após a indução de insulina plasmática em condições normais em um modelo de camundongo. No entanto, a P4 pode aumentar a glicose no sangue via gliconeogênese em paralelo com aumentos na expressão *Pgrmc1*, um novo receptor membranar para P4, e pelos aumentos de do mediador chave da gliconeogênese, o fosfoenolpiruvato carboxiquinase (Pepck), em camundongos em condições de deficiência de insulina e resistência à insulina, concluindo que a P4 aumenta a produção hepática de glicose via *Pgrmc1*, o que pode exacerbar a hiperglicemia no diabetes, onde a ação da insulina é limitada (LEE, et al., 2020).

Nossos resultados com dieta padrão mostraram que no GTT, apenas o grupo de reposição com E2 apresentou efeitos no aumento da sensibilidade a glicose e insulina, já a reposição de P4, mesmo quando associada ao E2 revelou uma menor tolerância à glicose. Interessante ressaltar, diante desses resultados, o esperado era que os níveis de insulina durante o GTT nos grupos P4 e E2+P4 fossem proporcionais aos níveis de glicose, assim como vistos no grupo OVX-controle durante o teste, porém nos grupos P4 e E2+P4 os níveis de insulina foram menores. Dado esses resultados, levantamos a hipótese de que talvez a reposição crônica com P4 em dieta padrão esteja levando a intolerância à glicose devido a efeitos nas células pancreáticas. Straub et al (2001) evidenciou que em ilhotas pancreáticas de ratos, a P4 pode causar uma inibição imediata e dependente de concentração, sendo que a inibição foi específica, pois tanto a testosterona quanto E2 não tiveram esse efeito (STRAUB, et al., 2001). De acordo com esse estudo, a P4 pode estar suprimindo a liberação de insulina estimulada por glicose através de um bloqueio da entrada de  $Ca^{2+}$  nessas células (STRAUB, et al., 2001). Assim, experimentos futuros sobre as influências da P4 na liberação de insulina pelas células  $\beta$ , poderiam responder de melhor maneira esses achados.

Em relação as possíveis comparações entre os resultados dicotômicos encontrados em ambas dietas, acreditamos que a HFD possa impor maiores desafios metabólicos que a dieta

padrão e que os efeitos da P4 sob as ações protetoras do E2 podem ser superados por outros mecanismos subjacentes a dieta, como por exemplo, uma HFD pode levar um aumento da proliferação das células  $\beta$  pancreáticas e uma hiperinsulinemia no pâncreas (MOSSER, et al., 2015) quanto também, da própria reposição com E2. Contudo mais estudos se fazem necessários para elucidar o papel da P4 na homeostase da glicose.



Nossos resultados revelaram que em uma HFD, a reposição de P4 sozinha não parece exercer influências sob a homeostase da glicose e/ou agir no acúmulo ectópico de lipídeos, mostrando resultados semelhantes aos animais ovariectomizados. A reposição hormonal conjugada de E2+P4 mostrou um indicativo de melhora nos testes de tolerância à glicose, na avaliação dos níveis plasmáticos de insulina e redução do acúmulo de lipídeos ectópicos semelhantes a reposição apenas com E2 e foi capaz de reverter os efeitos de intolerância à glicose e resistência à insulina observado nos grupos OVX e OVX com reposição hormonal apenas com P4. A P4 demonstrou exercer pouco ou nenhum efeito nestes testes quando associada ao E2. Contudo, a P4 demonstrou exercer efeito sobre o metabolismo da glicose e sensibilidade à insulina em uma dieta padrão, revelando que P4 pode neutralizar os efeitos protetores de E2 e levar a uma menor tolerância à glicose. Portanto, acreditamos que esses resultados ajudarão ampliar o conhecimento sobre a reposição hormonal na menopausa e seus efeitos na homeostase metabólica, implicado na fisiopatologias como a Síndrome Metabólica e o desenvolvimento de DHGNA.



ALKHOURI, Naim et al. Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 5, p. 3428-3438, 2010.

ANSELMO-FRANCI, J.A.; SPRITZER, P.M.; FRANCI, C.R. Fisiologia da Reprodução. In: **Fisiologia**, Margarida de Mello Aires. Rio de Janeiro Guanabara Koogan. 5ª edição. P 2018

ASRIH, M.; JORNAYVAZ, F. R. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulinresistance. **J Endocrinol**, v. 218, n. 3, p. R25-36, Sep 2013.

BALLESTRI, S. et al. NAFLD as a sexual dimorphic disease: role of gender and reproductive status in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease and inherent cardiovascular risk. **Advances in therapy**, v. 34, p. 1291-1326, 2017.

BIRKENFELD, A. L.; SHULMAN, G. I. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. **Hepatology**, v. 59, n. 2, p. 713-23, Feb 2014.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BLUEMEL, S. et al. Tumor necrosis factor alpha receptor 1 deficiency in hepatocytes does not protect from non-alcoholic steatohepatitis, but attenuates insulin resistance in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 33, p. 4933, 2020.

BOERRIGTER, P. J. *et al.* Endometrial response in estrogen replacement therapy quarterly combined with a progestogen. **Maturitas**, 24, n. 1-2, p. 63-71, May 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas e Agravos não Transmissíveis no Brasil 2021-2030**. Brasília, 2021.

BUNOUT, D. *et al.* Interleukin 1 and tumor necrosis factor in obese alcoholics compared with normal-weight patients. **Am J Clin Nutr**, 63, n. 3, p. 373-376, Mar 1996.

CAGNACCI, A. et al. Effects of Low-Doses of Transdermal 17-Beta-Estradiol on Carbohydrate-Metabolism in Postmenopausal Women. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 74, n. 6, p. 1396-1400, Jun 1992.

CAHILL, Michael A. Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 105, n. 1-5, p. 16-36, 2007.

CAMPOREZ, J. P. G. et al. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. **Journal of Physiology-London**, v. 589, n. 10, p. 2585-2596, May 15, 2011.

CAMPOREZ, J. P. G. et al. Cellular Mechanism by Which Estradiol Protects Female Ovariectomized Mice From High-Fat Diet-Induced Hepatic and Muscle Insulin Resistance. **Endocrinology**, v. 154, n. 3, p. 1021-1028, Mar 2013.

CAMPOREZ, J. P. G. et al. Cellular Mechanisms by Which FGF21 Improves Insulin Sensitivity in Male Mice. **Endocrinology**, v. 154, n. 9, p. 3099-3109, Sep 2013.

CAMPOREZ, J. P. G.; KANDA, S.; PETERSEN, M. C.; JORNAYVAZ, F. R. *et al.* ApoA5 knockdown improves whole-body insulin sensitivity in high-fat-fed mice by reducing ectopic lipid content. **J Lipid Res**, 56, n. 3, p. 526-536, Mar 2015.

CAMPOREZ, João Paulo *et al.* Mechanism by which arylamine N-acetyltransferase 1 ablation causes insulin resistance in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 52, p. E11285-E11292, 2017.

CAUSSY, Cyrielle *et al.* Noninvasive, quantitative assessment of liver fat by MRI-PDFF as an endpoint in NASH trials. **Hepatology**, v. 68, n. 2, p. 763-772, 2018.

CHEN, K. L.; MADAK-ERDOGAN, Z. Estrogens and female liver health. **Steroids**, 133, p. 38-43, May 2018.

CHMOULIOVSKY, L. *et al.* Beneficial effect of hormone replacement therapy on weight loss in obese menopausal women. **Maturitas**, v. 32, n. 3, p. 147-153, Aug 16 1999.

COHEN, J. C.; HORTON, J. D.; HOBBS, H. H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. **Science**, 332, n. 6037, p. 1519-1523, Jun 24 2011.

CORDOBA, P. *et al.* Inhibition of glucose metabolism by progesterone in adipocytes: role of protein synthesis. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 69, n. 12, p. 1861-1867, 1991.

DAVIS, S. R. *et al.* 649 Simoncini T. **Menopause. Nat Rev Dis Primers**, v. 1, p. 15004, 2015.

DE SIQUEIRA VALADARES, L. T. *et al.* Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults in the last 10 years: a systematic review and meta-analysis. **BMC Public Health**, 22, n. 1, p. 327, Feb 16 2022.

DEKKER, M. J. *et al.* Inhibition of sphingolipid synthesis improves dyslipidemia in the diet-induced hamster model of insulin resistance: evidence for the role of sphingosine and sphinganine in hepatic VLDL-apoB100 overproduction. **Atherosclerosis**, 228, n. 1, p. 98-109, May 2013.

DELLA TORRE, Sara. Non-alcoholic fatty liver disease as a canonical example of metabolic inflammatory-based liver disease showing a sex-specific prevalence: relevance of estrogen signaling. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, p. 572490, 2020.

DIAZ BRINTON, R. Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. **Endocrinology**, 153, n. 8, p. 3571-3578, Aug 2012.

DISTEFANO, J. K. NAFLD and NASH in Postmenopausal Women: Implications for Diagnosis and Treatment. **Endocrinology**, v. 161, n. 10, Oct 2020.

FAHMY, M. K. *et al.* Superimposed effect of ovariectomy on type 2 diabetes mellitus in Wistar rats. **Alexandria journal of medicine**, v. 54, n. 2, p. 129-137, 2018.



FEX, M. *et al.* The pathogenetic role of beta-cell mitochondria in type 2 diabetes. **J Endocrinol**, 236, n. 3, p. R145-R159, Mar 2018.

FUENTES, Nathalie; SILVEYRA, Patricia. Estrogen receptor signaling mechanisms. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 116, p. 135-170, 2019.

GALBO, T.; OLSEN, G. S.; QUISTORFF, B.; NISHIMURA, E. Free fatty acid-induced PP2A hyperactivity selectively impairs hepatic insulin action on glucose metabolism. **PLoS One**, 6, n. 11, p. e27424, 2011.

GALLOWAY, C. A. *et al.* Transgenic control of mitochondrial fission induces mitochondrial uncoupling and relieves diabetic oxidative stress. **Diabetes**, 61, n. 8, p. 2093-2104, Aug 2012.

GAO, J. *et al.* Sex-specific effect of estrogen sulfotransferase on mouse models of type 2 diabetes. **Diabetes**, 61, n. 6, p. 1543-1551, Jun 2012.

GARCIA-ROVES, P. *et al.* Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 25, p. 10709-10713, Jun 19 2007.

GODSLAND, *et al.* Insulin resistance, secretion, and metabolism in users of oral contraceptives. **J Clin Endocrinol Metab**, 74, n. 1, p. 64-70, Jan 1992.

GREGOR, M. F. *et al.* Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. **Diabetes**, v. 58, n. 3, p. 693-700, 2009.

GRIMM, Sandra L.; HARTIG, Sean M.; EDWARDS, Dean P. Progesterone receptor signaling mechanisms. **Journal of molecular biology**, v. 428, n. 19, p. 3831-3849, 2016.

GROSS, D. N.; VAN DEN HEUVEL, A. P.; BIRNBAUM, M. J. The role of FoxO in the regulation of metabolism. **Oncogene**, 27, n. 16, p. 2320-2336, Apr 7 2008.

GRUNDY, S. M. Overnutrition, ectopic lipid and the metabolic syndrome. **J Investig Med**, 64, n. 6, p. 1082-1086, Aug 2016.

HART-UNGER, S. *et al.* Hormone signaling and fatty liver in females: analysis of estrogen receptor alpha mutant mice. **Int J Obes (Lond)**, 41, n. 6, p. 945-954, Jun 2017.

HEINE, P. A. *et al.* Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 23, p. 12729-12734, Nov 2000.

HOLLAND, W. L. *et al.* Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. **Cell Metab**, 5, n. 3, p. 167-179, Mar 2007.

HOLMANG, AGNETA et al. Effects of short-term testosterone exposure on insulin sensitivity of muscles in female rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 262, n. 6, p. E851-E855, 1992.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, 1993.

HOTAMISLIGIL, G. S. *et al.* IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. **Science**, 271, n. 5249, p. 665-668, Feb 2 1996.

HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 900-17, Mar 19 2010.

ITOH, M. et al. Hepatic Crown-Like Structure: A Unique Histological Feature in Non-Alcoholic Steatohepatitis in Mice and Humans. **Plos One**, v. 8, n. 12, Dec 11 2013.

JELENIK, T.; RODEN, M. Mitochondrial plasticity in obesity and diabetes mellitus. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 3, p. 258-68, Jul 20 2013.

JONES, M. E. et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 23, p. 12735-12740, 2000.

KAAJA, R. J. Metabolic syndrome and the menopause. **Menopause International**, v. 14, n. 1, p. 21-25, 2008.

KAKINO, S. et al. Pivotal Role of TNF- $\alpha$  in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Murine Model. **Horm Metab Res**, v. 50, n. 1, p. 80-87, Jan 2018.

KALRA, A. et al. Physiology, liver. **Menopause International** .2018.

KERN, P. A. et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **The Journal of clinical investigation**, v. 95, n. 5, p. 2111-2119, 1995.

KLEINER, David E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-1321, 2005.

KOEBELE, S. V.; BIMONTE-NELSON, H. A. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. **Maturitas**, 87, p. 5-17, May 2016.

KUMASHIRO, N. *et al.* Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 39, p. 16381-16385, Sep 27 2011.

LEE, Y. H. *et al.* c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. **J Biol Chem**, 278, n. 5, p. 2896-2902, Jan 31 2003.

LETURQUE, A. et al. Glucose metabolism in pregnancy. **Neonatology**, v. 51, n. 2, p. 64-69, 1987.

LEE, S. R. *et al.* Progesterone increases blood glucose via hepatic progesterone receptor membrane component 1 under limited or impaired action of insulin. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 16316, Oct 1 2020.

LINDHEIM, S. R. *et al.* A possible bimodal effect of estrogen on insulin sensitivity in postmenopausal women and the attenuating effect of added progestin. **Fertil Steril**, 60, n. 4, p. 664-667, Oct 1993.

LINDHEIM, S. R.; DUFFY, D. M.; KOJIMA, T.; VIJOD, M. A. *et al.* The route of administration influences the effect of estrogen on insulin sensitivity in postmenopausal women. **Fertil Steril**, 62, n. 6, p. 1176-1180, Dec 1994.

LISTENBERGER, L. L. et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 6, p. 3077-82, Mar 18 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LEHNEN, A. M. *et al.* Cardiovascular changes in animal models of metabolic syndrome. **J Diabetes Res**, 2013, p. 761314, 2013.

LOBO, R. A. et al. Back to the future: hormone replacement therapy as part of a prevention strategy for women at the onset of menopause. **Atherosclerosis**, v. 254, p. 282-290, 2016.

LOOMBA, R.; FRIEDMAN, S. L.; SHULMAN, G. I. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. **Cell**, v. 184, n. 10, p. 2537-2564, May 13 2021.

LOUET, J. F.; LEMAY, C.; MAUVAIS-JARVIS, F. Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models. **Curr Atheroscler Rep**, v. 6, n. 3, p. 180-5, May 2004.

LOVEJOY, J. C. et al. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. **Int J Obes (Lond)**, v. 32, n. 6, p. 949-58, Jun 2008.

LUSIS, A. J.; ATTIE, A. D.; REUE, K. Metabolic syndrome: from epidemiology to systems biology. **Nat Rev Genet**, 9, n. 11, p. 819-830, Nov 2008.

MARGOLIS, K. L. et al. Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial. **Diabetologia**, v. 47, n. 7, p. 1175-1187, Jul 2004.

MASSCHELIN, Peter M. et al. The impact of oxidative stress on adipose tissue energy balance. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 1638, 2020.

MEDINA-CONTRERAS, J. M. L. et al. Ovariectomized rodents as a menopausal metabolic syndrome model. A minireview. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 475, p. 261-276, 2020.

MEIRELLES, Ricardo MR. Menopausa e síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, p. 91-96, 2014.

MIREA, A. M. et al. IL-1 Family Cytokine Pathways Underlying NAFLD: Towards New Treatment Strategies. **Trends Mol Med**, v. 24, n. 5, p. 458-471, May 2018.

MONTGOMERY, M. K.; TURNER, N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. **Endocr Connect**, 4, n. 1, p. R1-R15, Mar 2015.

MOREIRA, F. P. et al. Metabolic syndrome and psychiatric disorders: a population-based study. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 41, p. 38-43, Out 2018.

MOSLEHI, A.; HAMIDI-ZAD, Z. Role of SREBPs in Liver Diseases: A Mini-review. **J Clin Transl Hepatol**, 6, n. 3, p. 332-338, Sep 28 2018.

MOSSER, R. E.; MAULIS, M. F.; MOULLE, V. S.; DUNN, J. C. *et al.* High-fat diet-induced beta-cell proliferation occurs prior to insulin resistance in C57Bl/6J male mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 308, n. 7, p. E573-582, Apr 1 2015.

NAIR, B.; NATH, L. R. Inevitable role of TGF-beta1 in progression of nonalcoholic fatty liver disease. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 40, n. 3, p. 195-200, Jun 2020.

NAKATANI, Y. *et al.* Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. **J Biol Chem**, 280, n. 1, p. 847-851, Jan 7 2005.

NELSON, L. R.; BULUN, Serdar E. Estrogen production and action. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 45, n. 3, p. S116-S124, 2001.

NELSON, T. et al. Progesterone Administration Induced Impairment of Insulin Suppression of Hepatic Glucose-Production. **Fertility and Sterility**, v. 62, n. 3, p. 491-496, Sep 1994.

NUUTILA, P. et al. Gender and Insulin Sensitivity in the Heart and in Skeletal-Muscles – Studies Using Positron Emission Tomography. **Diabetes**, v. 44, n. 1, p. 31-36, Jan 1995.

OATES, J. R. et al. Macrophage Function in the Pathogenesis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: The Mac Attack. **Frontiers in Immunology**, v. 10, Dec 12 2019.

OETTEL, M.; MUKHOPADHYAY, A. K. Progesterone: the forgotten hormone in men? **Aging Male**, 7, n. 3, p. 236-257, Sep 2004.

OKURA, T. *et al.* Association of polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene with body fat distribution. **Int J Obes Relat Metab Disord**, 27, n. 9, p. 1020-1027, Sep 2003.

OLIVEIRA, L. V. A. et al. Prevalência da Síndrome Metabólica e seus componentes na população adulta brasileira. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, p. 4269-4280, Nov 2020.

OZCAN, U. *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, 306, n. 5695, p. 457-461, Oct 15 2004.

PALMISANO, B. T.; ZHU, L.; STAFFORD, J. M. Role of Estrogens in the Regulation of Liver Lipid Metabolism. **Adv Exp Med Biol**, 1043, p. 227-256, 2017.

PEDRAM, A. *et al.* Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. **J Biol Chem**, 277, n. 52, p. 50768-50775, Dec 27 2002.

PETERSEN, M. C. *et al.* Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. **J Clin Invest**, 126, n. 11, p. 4361-4371, Nov 1 2016.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, May 1 2001.

PRASUN, P. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, 1866, n. 10, p. 165838, Oct 1 2020.

POSTIC, Catherine *et al.* ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 27, p. 179-192, 2007.

RANASINGHE, P. *et al.* Prevalence and trends of metabolic syndrome among adults in the asia-pacific region: a systematic review. **BMC public health**, v. 17, n. 1, p. 1-9, Jan 2017.

RIANT, E.; WAGET, A.; COGO, H.; ARNAL, J. F. *et al.* Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. **Endocrinology**, 150, n. 5, p. 2109-2117, May 2009.

RIAZI, K. *et al.* The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Gastroenterol Hepatol**, 7, n. 9, p. 851-861, Sep 2022.

RIBAS, V. *et al.* Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ERalpha-deficient mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 298, n. 2, p. E304-319, Feb 2010.

RODRÍGUEZ-CORREA, E. *et al.* Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? **Nutrition & diabetes**, v. 10, n. 1, p. 24, 2020.

ROGERS, N. *et al.* Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. **Endocrinology**, 150, n. 5, p. 2161-2168, May 2009.

SAKLAYEN, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. **Curr Hypertens Rep**, 20, n. 2, p. 12, Feb 26 2018.

SALTIEL, A. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 517-529, 2001.

SAMUEL, V. T.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. **Lancet**, v. 375, n. 9733, p. 2267-77, Jun 26 2010.

SATTAR, N.; FORREST, E.; PREISS, D. Non-alcoholic fatty liver disease. **Bmj-British Medical Journal**, v. 349. ISSN 1756-1833. Jul 2014.

SCHATZ, G. Mitochondrial oxidative phosphorylation. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 6, n. 12, p. 1035-1046, 1967.

SZENDROEDI, J. *et al.* Role of diacylglycerol activation of PKC $\theta$  in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 26, p. 9597-9602, Jul 1 2014.

UYSAL, K. T. *et al.* from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. **Nature**, 389, n. 6651, p. 610-614, Oct 9 1997.

VISSER, M. *et al.* Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. **JAMA**, 282, n. 22, p. 2131-2135, Dec 8 1999.

WATANABE, R. M. *et al.* Defects in carbohydrate metabolism in oral contraceptive users without apparent metabolic risk factors. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 79, n. 5, p. 1277-1283, 1994.

WONG, S, *et al.* Animal models of metabolic syndrome: a review. **Nutrition & metabolism**, v. 13, p. 1-12, 2016.

WRONSKI, T. J.; LOWRY, P. L.; WALSH, C. C. Skeletal Alterations in Ovariectomized Rats. **Maturitas**, v. 6, n. 2, p.210-210, 1984.

XIA, J. Y. *et al.* Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis. **Cell Metab**, 22, n. 2, p. 266-278, Aug 4 2015.

YANG, M. *et al.* Dysfunction of estrogen-related receptor  $\alpha$ -dependent hepatic VLDL secretion contributes to sex disparity in NAFLD/NASH development. **Theranostics**, 10, n. 24, p. 10874-10891, 2020.

ZHU, X. *et al.* Opposing effects of estrogen and progestins on LDL oxidation and vascular wall cytotoxicity: implications for atherogenesis. **Proc Soc Exp Biol Med**, 222, n. 3, p. 214-221, Dec 1999.

ZHU, L. *et al.* Estrogen signaling prevents diet-induced hepatic insulin resistance in male mice with obesity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 306, n. 10, p. E1188-1197, May 15 2014.





Article

# Progesterone Has No Impact on the Beneficial Effects of Estradiol Treatment in High-Fat-Fed Ovariectomized Mice

Carlos H. Z. Talarico, Ester S. Alves, Jessica D. M. Dos Santos, Felipe G. S. Sucupira , Layanne C. C. Araujo and João Paulo Camporez \*

Department of Physiology, Ribeirao Preto School of Medicine, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, Brazil

\* Correspondence: camporez@fmrp.usp.br

**Abstract:** In recent decades, clinical and experimental studies have revealed that estradiol contributes enormously to glycemic homeostasis. However, the same consensus does not exist in women during menopause who undergo replacement with progesterone or conjugated estradiol and progesterone. Since most hormone replacement treatments in menopausal women are performed with estradiol (E2) and progesterone (P4) combined, this work aimed to investigate the effects of progesterone on energy metabolism and insulin resistance in an experimental model of menopause (ovariectomized female mice—OVX mice) fed a high-fat diet (HFD). OVX mice were treated with E2 or P4 (or both combined). OVX mice treated with E2 alone or combined with P4 displayed reduced body weight after six weeks of HFD feeding compared to OVX mice and OVX mice treated with P4 alone. These data were associated with improved glucose tolerance and insulin sensitivity in OVX mice treated with E2 (alone or combined with P4) compared to OVX and P4-treated mice. Additionally, E2 treatment (alone or combined with P4) reduced both hepatic and muscle triglyceride content compared with OVX control mice and OVX + P4 mice. There were no differences between groups regarding hepatic enzymes in plasma and inflammatory markers. Therefore, our results revealed that progesterone replacement alone does not seem to influence glucose homeostasis and ectopic lipid accumulation in OVX mice. These results will help expand knowledge about hormone replacement in postmenopausal women associated with metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease.

**Keywords:** menopause; ovariectomy glucose metabolism; metabolic syndrome



**Citation:** Talarico, C.H.Z.; Alves, E.S.; Dos Santos, J.D.M.; Sucupira, F.G.S.; Araujo, L.C.C.; Camporez, J.P. Progesterone Has No Impact on the Beneficial Effects of Estradiol

Treatment in High-Fat-Fed Ovariectomized Mice. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2023**, *45*, 3965–3976. <https://doi.org/10.3390/cimb45050253>

Academic Editor: Igor E. Deyev

Received: 3 April 2023

Revised: 20 April 2023

Accepted: 25 April 2023

Published: 3 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Metabolic syndrome (MetSyn) can be characterized by a complex pathophysiological state which originates from several imbalances associated with caloric intake and energy expenditure. However, it is also affected by genetic/epigenetic factors and the predominance of a sedentary lifestyle over physical activity, among other factors such as food quality and composition, intestinal microbiota composition, and quality of life [1–3]. MetSyn can be described as a group of metabolic conditions that occur together and promote the development of physiological and pathophysiological disorders such as atherogenic dyslipidemia (elevated serum triglycerides (TAG), reduced high-density lipoprotein (HDL), and increased cholesterol), high blood pressure, cardiovascular diseases, and type 2 diabetes mellitus (T2DM) [1,2]. Generally, the critical component of this syndrome is the development of insulin resistance associated with obesity [1,2].

Global data on MetSyn are considered difficult to measure, and prevalence estimates variability based on the criteria used to define MetSyn [1]. However, since MetSyn is about three times more common than diabetes, it is estimated that the global prevalence may be about a quarter of the world's adult population [1]. The prevalence of MetSyn has increased during the last three decades [1], but the understanding of the biology of the syndrome has also been expanded. Currently, several biological mechanisms are considered to cause insulin resistance in MetSyn [3]. Among the proposed mechanisms are



endoplasmic reticulum stress [4], inflammation [5], and mitochondrial dysfunction [6], in addition to abnormal lipid metabolism [7] and ectopic accumulation [8].

MetSyn is mainly associated with the development of T2DM and is linked to characteristic dyslipidemia. Most obese individuals with T2DM and insulin resistance have an abnormal accumulation of TAG in their livers, characteristic of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [7,8]. NAFLD can be determined as the hepatic manifestation of MetSyn and is commonly associated with adjacent metabolic risk factors [7]. The progression of NAFLD can lead to hepatic steatosis, generally recognized as a benign disease, but can progress to non-alcoholic steatohepatitis (NASH). In addition to the presence of steatosis, NASH is typically characterized by lobular inflammation, hepatocyte ballooning, and perisinusoidal fibrosis [9,10]. Additionally, NASH can be a precursor to more severe liver diseases, such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma [11]. Therefore, new approaches to the prevention and treatment of MetSyn are necessary to reduce the consequences of MetSyn, improving the quality of life of these individuals.

NAFLD is more prevalent in men than women of reproductive age [12]. However, in postmenopausal women, the prevalence of the disease becomes similar to that in men of the same age [12,13]. In recent decades, data from both clinical and experimental studies have revealed that endogenous steroid hormones such as estradiol (E2) contribute enormously to glycemic homeostasis [14,15]. Clinical studies also suggest the pivotal role of E2 in energy metabolism, since decreased estrogen levels during menopause are associated with increased visceral fat and, in turn, metabolic diseases such as insulin resistance, T2DM, and cardiovascular disease. In addition, women after menopause have an increased risk of glucose intolerance, insulin resistance, hyperlipidemia, and visceral fat accumulation [16–18]. Clinical studies have also shown that estrogen replacement therapy in postmenopausal women reduces the incidence of T2DM [19]. All of this evidence is closely related to NAFLD [12,20].

Progestogens are also a class of steroid hormones that bind to the nuclear progesterone (P4) receptor (PR) [21]. In addition to this, putative P4 membrane receptors PGRMC (P4 receptor membrane component) 1 and 2 have been identified in various human tissues, including the liver [22]. P4 is the body's primary and most crucial progestogen and is essential in both female and male reproductive systems [23]. However, the literature regarding the effects of P4 on metabolic homeostasis is scarce, and few studies have focused on understanding such effects. It is also known that combined estrogen + progestogen therapy [24] is very effective in controlling the effects of estrogen deprivation during menopause. Because the excessive proliferation of endometrial cells leads to endometrial hyperplasia and cancer, which can result from estrogen-only therapy, progestogens have been administered continuously or sequentially in combination with estrogen to inhibit unwanted endometrial growth [25].

Based on what was observed in clinical studies with postmenopausal women and experimental studies with animals, and knowing that there is a significant gap in the literature on the knowledge of P4 effects on energy metabolism and insulin resistance and that most hormone replacement treatments in women are conducted with conjugate hormones E2 and P4, the main objective of this study was to investigate the potential effects of P4 on energy metabolism and insulin resistance in an animal model of menopause (ovariectomized mice) fed a high-fat diet (HFD), mimicking the effects of most risk factors associated with MetSyn and especially NAFLD.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

Female mice with a C57BL/6J background were used. They were kept in a temperature-controlled room at  $22 \pm 2$  °C with ad libitum access to food and water and submitted to a 12 h light–dark cycle (light from 6 a.m. to 6 p.m.). At eight weeks of age, the female mice were anaesthetized with isoflurane (~3%) and were ovariectomized (OVX). Then, they were randomly divided into 4 groups: OVX, OVX treated with E2 (OVX-E2), OVX treated with

P4 (OVX-P4), and OVX treated with both E2 and P4 (OVX-E2-P4). To study the effect of chronic administration of E2 and/or P4, OVX mice were implanted subcutaneously with pellets releasing placebo or E2 or P4 (or both hormones) (0.05 mg/pellet of E2 for 60 days; 15.0 mg/pellet of P4 for 60 days; America's Innovative Research, Sarasota, FL, USA) at the same time as the ovariectomy. A high-fat diet (HFD) (45% fat, D12451; Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) was provided after ovariectomy and pellet implantation and continued for 6 weeks before the experiments. Since it was previously described that OVX mice and E2 treatment do not affect whole-body insulin sensitivity in regular chow-fed mice, it was decided to study just mice fed with HFD in this work [25].

All experiments carried out here were previously approved following the guidelines of the Ethics Committee of the Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo (CEUA—038/2021).

### 2.2. Glucose Tolerance Test

After 6 h of food restriction, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with glucose (1 mg/kg body weight—10% dextrose). Blood samples for measuring glucose and plasma insulin were taken by tail bleeding at 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min after injection as previously described [26]. Plasma insulin was measured using a commercial ELISA kit (Mercodia, Winston Salem, NC, USA). The area under the curve (AUC) was calculated using the statistical software GraphPad Prism 9.0 in order to use it for statistical analysis.

### 2.3. Liver and Skeletal Muscle Lipid Measurement

After 6 h of food restriction, the animals were euthanized and the tissues were removed for lipid content analysis (liver and skeletal muscle—gastrocnemius). Tissue TAGs were extracted using the method of Bligh and Dyer [27] and measured using a TAG reagent (Bioclin, Brazil).

#### Aspartate Aminotransferase and Alanine Aminotransferase Measurement

Plasma was removed for analysis of liver enzymes (aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) using the commercial LabTest kit (LabTest, Belo Horizonte, Brazil).

### 2.4. RT-qPCR

The liver tissue was used for RT-PCR. The tissue was removed and 50 mg of the sample was homogenized in 1 mL of trizol (Life Technologies) for mRNA extraction. The sample was incubated for 5 min at room temperature (25 °C), and 200 µL of chloroform was added and incubated for 15 min at room temperature and centrifuged for 15 min at 2 °C at 12,000 rpm. The aqueous phase containing the RNA was separated; then, 500 µL of isopropanol was added and the sample was placed in a −20 °C freezer for 1 h. The sample was centrifuged for 10 min at 4 °C at 12,000 rpm and then underwent a washing process, the supernatant was discarded, and 1 mL of 75% alcohol was added and centrifuged for 10 min at 4 °C at 12,000 rpm; this step was performed 2 times in a row. The supernatant was discarded and the RNA went through a dissolution step, and 50 µL of RNase-free water was added. The RNA concentration reading was evaluated at 260 nm, and the purity from the 260/280 nm ratio was analyzed with the nanodrop device (DeNovix). Then, the cDNA was prepared through a reverse transcription reaction (High-Capacity DNA kit, Applied Biosystems). A mix containing 10× RT buffer, 25× 100 Mm mixdNTP, 10× RT primers, reverse transcriptase, RNase inhibitor, and RNase-free water was prepared and added to the sample. The sample was taken to the thermal cycler. Gene expression was analyzed by RT-PCR (Rotor Gene Q—Qiagen) and SYBR Green fluorescent probe (Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Supermix UDG, Invitrogen).

The following primers for inflammatory markers were used: TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ , and F4/80 (Table 1).

Table 1. Primer sequences.

TNF- $\alpha$	Sense	TCT TCT CAT TCC TGC TTG TGG C
	Anti-sense	CAC TTG GTG GTT TGC TAC GAC G
IL-1 $\beta$	Sense	GGC AGC TAC CTG TGT CTT TCC C
	Anti-sense	ATA TGG GTC CGA CAG CAC GAG
F4/80	Sense	CCTGGACGAATCCTGTGAAG
	Anti-sense	GGTGGGACCACAGAGAGTTG
TGF $\beta$	Sense	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC
	Anti-sense	GCCTTAGTTGGACAGGATCTG

### 2.5. Statistical Analysis

Results were analyzed using GraphPad Prism version 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The minimum number of samples per group was defined by an  $n$  sufficient to perform the sample distribution analysis using the D'Agostino–Pearson omnibus normality test recommended by the GraphPad Prism 9.0 program. Results were expressed as means  $\pm$  SD. Each experimental group had between 8 and 10 animals. Statistical analyses were performed using Bartlett's test for homogeneity of variances followed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni multiple comparison test. The minimum acceptable significance level was  $p < 0.05$ .

### 3. Results

The performed ovariectomy was preceded by sedation and anesthesia through the monitored inhalation of isoflurane. After surgical recovery, the animals were fed a HFD for six weeks. The success of the ovariectomy was verified during the euthanasia of the animals, due to the absence of the ovaries and the intense atrophy of the uterine tubes (Figure 1) [24].

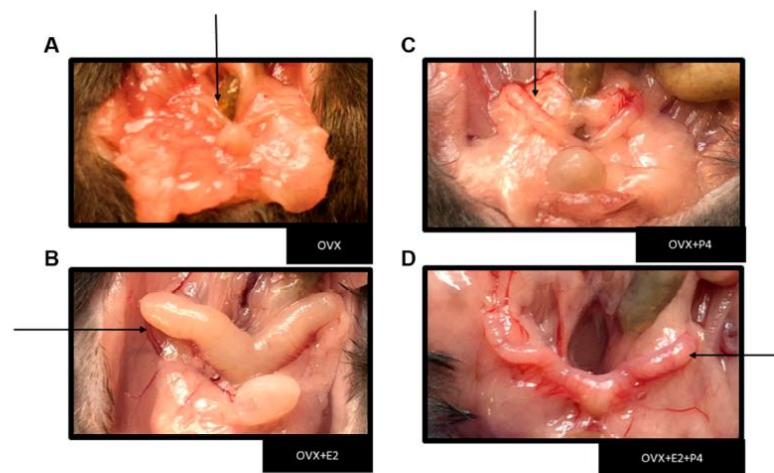


Figure 1. Representative image showing the uterus in each experimental group. Black arrows indicate the representative image of the uterus from each animal. (A) Image showing severe uterus atrophy in groups of ovariectomized mice and a large increase in peri-uterine adipose tissue. (B) Uterus with hormone replacement with E2. (C) Uterus with hormone replacement only with P4 (D) Uterus with hormone replacement with E2 + P4.

The animals were weighed before starting the diet and after six weeks on an HFD. Our results revealed that in the initial body weights, before the ovariectomy surgery, there were no statistically significant differences between the groups ( $p > 0.05$ ) (Figure 2A). At the end

of 6 weeks on an HFD, there were statistically significant differences in body weight in the OVX + E2 and OVX + E2 + P4 groups ( $p < 0.05$ ) when compared with the OVX control group and the OVX + P4 group (Figure 2B).

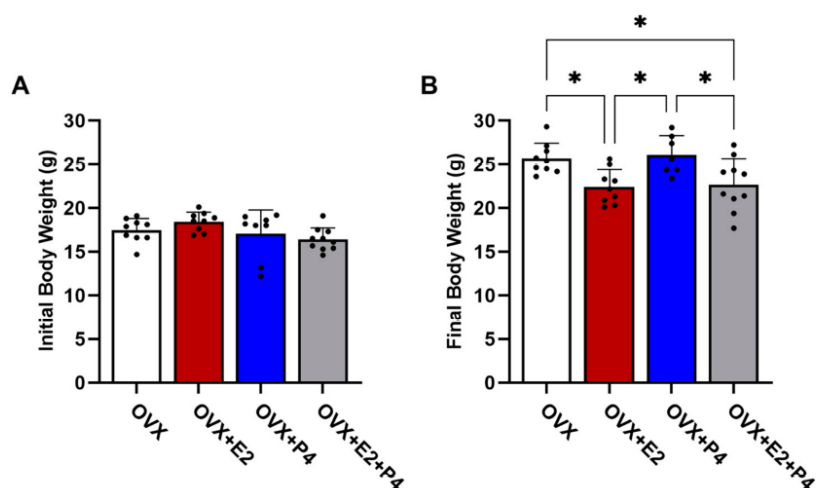
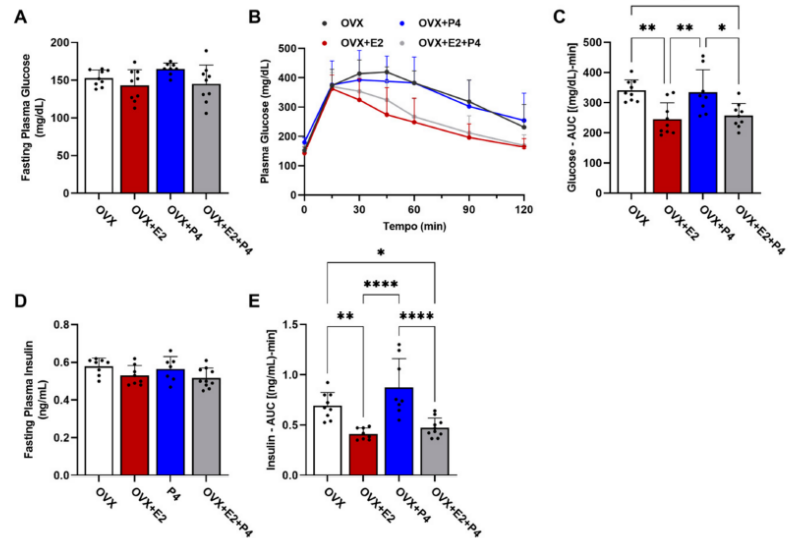


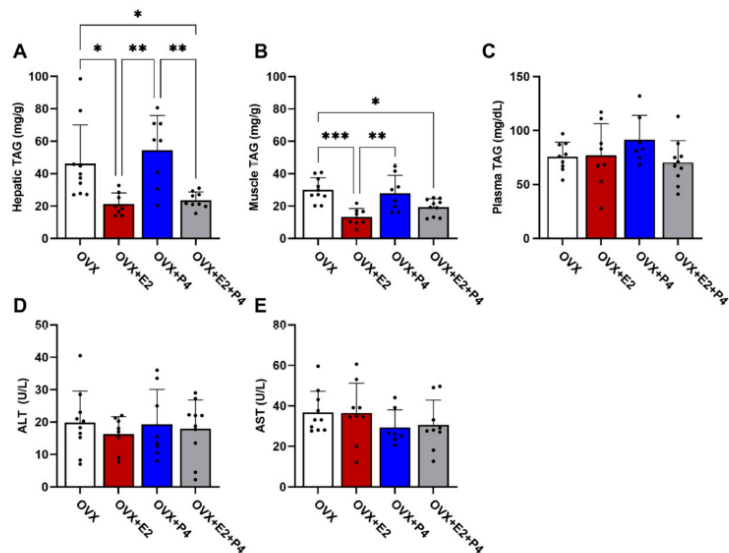
Figure 2. Initial (A) and final (B) body weight of animals before and after 6 weeks of HFD. Data are expressed as mean  $\pm$  SD, \*  $p < 0.05$ .

To characterize the metabolic phenotype, we performed the glucose tolerance test (GTT). This test measured changes in glucose levels in fasted animals (six hours) within a two-hour interval after the administration of 1 mg/kg of glucose, and the area under the curve (AUC) calculation was considered for statistical analysis. Measurements of insulin levels were also performed during this test, as well as the AUC calculation. Our results show that there were no statistical differences in baseline glucose levels between the groups (Figure 3A). The GTT test revealed differences between the groups (Figure 3B,C; OVX vs. OVX + E2; OVX vs. OVX + E2 + P4 and OVX + P4 vs. OVX + E2; OVX + P4 vs. OVX + E2 + P4), showing that the groups treated with E2 displayed improved glucose tolerance. Basal insulin did not show statistical differences between the groups (Figure 3D). Finally, plasma insulin levels during the GTT were also significantly lower in the OVX + E2 and OVX + E2 + P4 groups, revealing an indication of greater insulin sensitivity when compared with the OVX control and OVX + P4 groups. This was reflected in the AUC data for insulin (Figure 3E). There were no statistically significant differences between the OVX + E2 and OVX + E2 + P4 groups during the GTT (Figure 3E).

There are several hypotheses of the mechanisms leading to insulin resistance. Among these hypotheses, the accumulation of lipids is one of the most important [8]. Thus, we understand the significance of evaluating the TAG content in the liver, skeletal muscle, and plasma. Our results demonstrated that the OVX + E2 and OVX + E2 + P4 animals presented a significantly lower TAG content in the liver compared with control OVX and OVX + P4 animals (Figure 4A). In skeletal muscle, OVX + E2 and OVX + E2 + P4 mice also displayed reduced TAG content (Figure 4B). There were no statistically significant differences in the plasma TAG concentration among the groups (Figure 4C).



**Figure 3.** Glucose tolerance test and assessment of peripheral insulin resistance. (A) Fasting plasma glucose assessment. (B) Glucose tolerance test; plasma glucose was measured at 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min after I.P. of glucose. (C) AUC—glucose tolerance test. (D) Fasting plasma insulin. (E) AUC of plasma insulin during GTT. Data are expressed as mean  $\pm$  SD, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .



**Figure 4.** Analysis of TAG content. Analysis of lipid content extracted from the liver (A), muscle (B), and plasma (C). Analysis of the enzymes alanine aminotransferase (ALT) (D) and aspartate aminotransferase (AST) (E) in plasma. Data are expressed as mean  $\pm$  SD, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

AST and ALT are enzymes found primarily in the liver. These enzymes are used along with others to monitor the course of various liver disorders [28]. Our results did not indicate any significant difference between the groups in the analysis of these enzymes (Figure 4D,E).

Another hypothesis about the mechanisms related to insulin resistance is inflammation. In our study, we evaluated the expression by RT-PCR of anti-inflammatory cytokine markers such as transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and pro-inflammatory cytokines such as interleukin 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), and F4/80 to check the evidence of infiltration and increased recruitment by macrophages [29,30]. Our results did not show significant differences between the described markers (Figure 5).

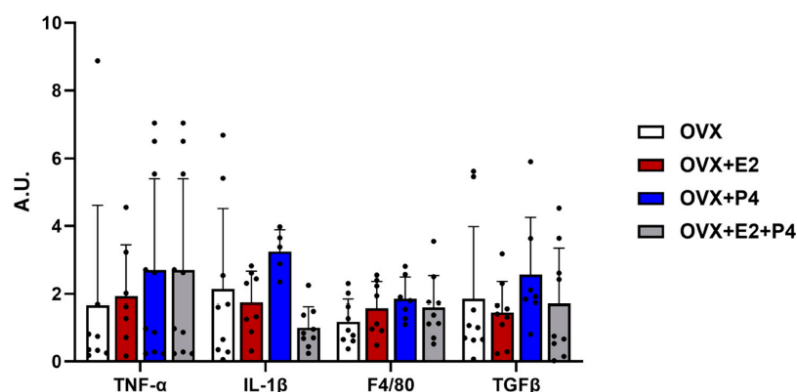


Figure 5. Gene expression of inflammatory and fibrotic markers. Relative levels of mRNA expression of genes related to inflammation and fibrosis did not show statistical differences. Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

#### 4. Discussion

Several studies have shown the effects of steroid hormones on metabolic homeostasis, most notably the effects of E2 [14,15,19,31–33]. However, the effects of the P4 hormone remain relatively controversial, since the literature on the topic is quite sparse [34,35]. In this work, we reported that E2 treatment exerted effects on body weight control in female OVX mice fed an HFD, confirming the effects of this hormone and corroborating the existing literature [13,15,31,36,37], as well as the role of estrogens and their recognized effect on glucose metabolism and insulin sensitivity [14,15,19,31–33].

Progesterone, administered to mice fed an HFD for six weeks, exerts no influence on body weight gain, showing less weight gain when combined with E2. Our results showed an improvement in glucose tolerance, insulin resistance, and TAG accumulation in the liver and muscle with the conjugated replacement of E2 + P4. This was not observed in animals with only P4 replacement, which was similar to the OVX control group, showing that P4 had little or no effect on glucose metabolism and insulin sensitivity in these animals.

Menopausal women may have increased body fat mass and visceral fat [34,36]. According to Lovejoy et al. [34], the increase in fat mass can be explained by reduced energy expenditure in postmenopausal women. These observations in women also fit experimental models of female OVX mice. In other studies, such as Rogers et al. [35] and previous studies by our group [13], OVX animals reduced total body O<sub>2</sub> consumption and CO<sub>2</sub> production, and energy expenditure, leading to increased body weight associated with increased fat mass. This study also revealed that although OVX mice were obese compared with OVX + E2 mice, their food intake was slightly lower than OVX + E2 mice, suggesting greater energy efficiency in these mice [13]. Chronic E2 replacement therapy corrected the reduction in energy expenditure and body O<sub>2</sub> consumption, and this study also indicated a negative global energy balance for the treatment group in relation to a

positive global energy balance for the OVX animals. Camporez et al. [13] also showed an oxidative reduction in the metabolism of white adipose tissue in OVX animals, associated with reduced expression of UCP-1, Cidea, and PRDM16, which may explain the decreased energy expenditure in these animals, since it is known that these proteins can improve the whole-body energy metabolism when highly expressed in this tissue [13]. All these published data can explain what was observed in our study, with OVX animals treated with E2 displaying reduced body weight and ectopic lipid content.

One of the major concerns with NAFLD is that ectopic lipid accumulation has been clearly linked to the development of hepatic insulin resistance and T2DM. Our results demonstrated that the OVX + E2 and OVX + E2 + P4 animals presented a significantly lower TAG content in the liver compared with OVX and OVX + P4 groups. In skeletal muscle, treatment with E2 and E2 + P4 also reduced the TAG content. Increased ectopic TAG content has been constantly related to increased diacylglycerol (DAG) content in the same tissues [8,33,38,39], which has been consistently associated with some isoforms of novel protein kinase C (PKCs) activation in muscle and liver in a state of insulin resistance. The activation of PKC $\theta$  associated with increased DAG content in skeletal muscle has been observed both in insulin-resistant rodents [32,40] and in humans [41]. In the liver, increased DAG content was associated with the activation of PKC $\epsilon$  isoform both in experimental models of hepatic insulin resistance [40,41] and in humans with hepatic steatosis and insulin resistance [41], leading to impaired proximal insulin signaling. In hepatocytes, PKC $\epsilon$  phosphorylates the insulin receptor (IR) in threonine, reducing its ability to auto-phosphorylate into tyrosine and trigger downstream insulin signaling, leading to hepatic insulin resistance [40]. Previous studies have already demonstrated the ability of E2 to reduce the accumulation of lipids and the activation of PKC $\epsilon$ , which are observed in the animal model of menopause [15] and in HFD-fed male mice treated with E2 [31]. The results obtained in this work indicate that the hormonal replacement with P4 did not interfere with the ability of E2 to reduce ectopic lipid accumulation in muscle and liver.

Despite the observed differences in ectopic TAG concentrations (muscle and liver), we did not observe differences in plasma TAG levels. This is in line with what we observed earlier, where OVX mice fed an HFD did not show differences in plasma TAG levels when compared to SHAM and E2-treated OVX animals [13]. This was also observed in other works using different rodent models of obesity and insulin resistance [32,33,42]. These data are also in agreement with previously published works that demonstrate that wild-type mice, unlike humans, are resistant to hypertriglyceridemia induced by an HFD, and these animals may even present a reduction in plasma TAG levels with a very prolonged HFD feeding [43–45]. For this reason, there is a widespread use of KO animals (ApoE $^{-/-}$  and LDLR $^{-/-}$ ) for the study of atherosclerosis [46].

Changes in the profiles of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ , have also been observed in NAFLD [47–49]. In our study, in addition to the markers mentioned here, we evaluated other markers for inflammation, such as F4/80, to check for signs of infiltration and increased recruitment by macrophages and/or possible liver injury, as well as the analysis of liver enzymes AST and ALT [30,50]. The results revealed no changes between groups. It is important to emphasize that even the results of clinical studies in patients with NAFLD and overweight or obese are asymptomatic and have normal liver function tests [50]. The commonly observed biochemical pattern of increased inflammation and these enzymes is more associated with NAFLD progress and NASH [50].

Obesity observed in OVX mice was also associated with whole-body insulin resistance and impaired glucose tolerance [13,26]. Previous studies by Riant et al. [25] and Camporez et al. [13] already showed glucose intolerance and insulin resistance in OVX mice fed an HFD, and E2 replacement reversed these effects. Studies regarding P4 and insulin resistance are scarce; however, studies by our group [13] showed that intact female mice were protected from HFD-induced insulin resistance by endogenous E2 only in skeletal muscle, exhibiting hepatic insulin resistance, as were OVX mice [13]. SHAM animals clearly exhibit

higher P4 concentrations than OVX and OVX + E2 mice. Camporez et al. [13] proposed that higher plasma P4 levels in SHAM mice could nullify the endogenous beneficial effects of E2 on insulin action in the liver. The possible mechanism by which P4 could prevent the effects of E2 would be to increase the expression of the enzyme estrogen sulfotransferase, a primary enzyme responsible for estrogen inactivation induced by increased P4 [51,52]. However, our observations showed that E2 + P4 conjugated replacement showed an indication of improvement in glucose tolerance and insulin resistance, similar to replacement with E2 alone. Another work by Lee et al. [51] showed that P4 could suppress gluconeogenesis after plasma insulin induction under normal conditions in a mouse model. However, P4 can increase blood glucose via gluconeogenesis in parallel with increases in Pgrmc1 expression, a novel membrane receptor for P4, and by increases in the key enzyme mediator of gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), in mice under conditions of insulin deficiency and insulin resistance, which may exacerbate hyperglycemia in diabetes, where insulin action is limited [51]. Nonetheless, it was not possible to observe any effect of P4 in OVX mice in our study.

Hormone replacement therapy is the most effective way to alleviate menopausal symptoms, such as vasomotor symptoms and genito-urinary menopause syndrome, and prevent bone loss and fracture [53]. However, the treatment must be individualized, and the patient's history must be considered, considering the benefit–risk ratio for the treatment. According to The American Menopause Society, combined treatment of E2 with P4 should always be indicated in the case of women with a uterus, alleviating the possible carcinogenic effects of E2 on this organ [53]. In addition, there is no indication for hormone replacement therapy with progesterone alone, such as the treatment performed in our study. Our work aimed solely at the mechanistic study of possible effects of progesterone on glucose metabolism and insulin resistance, under no circumstance indicating the treatments carried out in our work should be applied to humans. Therefore, our results revealed that in HFD-fed mice, P4 replacement alone does not seem to influence glucose homeostasis and ectopic lipid accumulation, showing similar results to OVX animals. Conjugated E2 + P4 hormone replacement showed improved glucose tolerance, insulin resistance, and reduced accumulation of ectopic lipids, similar to replacement with E2. P4 showed little or no effect on these tests when associated with E2. Consequently, we believe these results will help expand knowledge about hormone replacement in menopausal women and its effects on metabolic homeostasis implicated in pathophysiologies such as MetSyn and NAFLD.

**Author Contributions:** C.H.Z.T. performed experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript with input from all authors. E.S.A. performed experiments and analyzed and interpreted the data. J.D.M.D.S. performed experiments and analyzed and interpreted the data. F.G.S.S. performed experiments and analyzed and interpreted the data. L.C.C.A. performed experiments and analyzed and interpreted the data. J.P.C. performed experiments, designed the study, and wrote the manuscript with input from all authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP, 2018/04956-5, 2020/09094-1, 2020/16160-0, 2021/02638-9).

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of Ribeirao Preto Medical School of University of Sao Paulo (protocol CEUA—038/2021).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data are not in a public archive database.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



## References

1. Saklayen, M.G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* **2018**, *20*, 12. [[CrossRef](#)]
2. Grundy, S.M. Overnutrition, ectopic lipid and the metabolic syndrome. *J. Investig. Med.* **2016**, *64*, 1082–1086. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Lusis, A.J.; Attie, A.D.; Reue, K. Metabolic syndrome: From epidemiology to systems biology. *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 819–830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hotamisligil, G.S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* **2010**, *140*, 900–917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Asrih, M.; Jornayvaz, F.R. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *J. Endocrinol.* **2013**, *218*, R25–R36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Jelenik, T.; Roden, M. Mitochondrial plasticity in obesity and diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal.* **2013**, *19*, 258–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Loomba, R.; Friedman, S.L.; Shulman, G.I. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell* **2021**, *184*, 2537–2564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Samuel, V.T.; Petersen, K.F.; Shulman, G.I. Lipid-induced insulin resistance: Unravelling the mechanism. *Lancet* **2010**, *375*, 2267–2277. [[CrossRef](#)]
9. Kleiner, D.E.; Brunt, E.M.; Van Natta, M.; Behling, C.; Contos, M.J.; Cummings, O.W.; Ferrell, L.D.; Liu, Y.C.; Torbenson, M.S.; Unalp-Arida, A.; et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2005**, *41*, 1313–1321. [[CrossRef](#)]
10. Camargo, F.N.; Matos, S.L.; Araujo, L.C.C.; Carvalho, C.R.O.; Amaral, A.G.; Camporez, J.P. Western Diet-Fed ApoE Knockout Male Mice as an Experimental Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2022**, *44*, 4692–4703. [[CrossRef](#)]
11. Ramai, D.; Facciorusso, A.; Vigandt, E.; Schaf, B.; Saadedeen, W.; Chauhan, A.; di Nunzio, S.; Shah, A.; Giacomelli, L.; Sacco, R. Progressive Liver Fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Cells* **2021**, *10*, 3401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Louet, J.F.; LeMay, C.; Mauvais-Jarvis, F. Antidiabetic actions of estrogen: Insight from human and genetic mouse models. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2004**, *6*, 180–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Camporez, J.P.; Jornayvaz, F.R.; Lee, H.Y.; Kanda, S.; Guigni, B.A.; Kahn, M.; Samuel, V.T.; Carvalho, C.R.; Petersen, K.F.; Jurczak, M.J.; et al. Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance. *Endocrinology* **2013**, *154*, 1021–1028. [[CrossRef](#)]
14. Kaaja, R.J. Metabolic syndrome and the menopause. *Menopause Int.* **2008**, *14*, 21–25. [[CrossRef](#)]
15. Meirelles, R.M. Menopause and metabolic syndrome. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **2014**, *58*, 91–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ballestri, S.; Nascimbeni, F.; Baldelli, E.; Marrazzo, A.; Romagnoli, D.; Lonardo, A. NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. *Adv. Ther.* **2017**, *34*, 1291–1326. [[CrossRef](#)]
17. Margolis, K.L.; Bonds, D.E.; Rodabough, R.J.; Tinker, L.; Phillips, L.S.; Allen, C.; Bassford, T.; Burke, G.; Torrens, J.; Howard, B.V.; et al. Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: Results from the Women's Health Initiative Hormone Trial. *Diabetologia* **2004**, *47*, 1175–1187. [[CrossRef](#)]
18. DiStefano, J.K. NAFLD and NASH in Postmenopausal Women: Implications for Diagnosis and Treatment. *Endocrinology* **2020**, *161*, bqaa134. [[CrossRef](#)]
19. Riazi, K.; Azhari, H.; Charette, J.H.; Underwood, F.E.; King, J.A.; Afshar, E.E.; Swain, M.G.; Congly, S.E.; Kaplan, G.G.; Shaheen, A.A. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2022**, *7*, 851–861. [[CrossRef](#)]
20. Grimm, S.L.; Hartig, S.M.; Edwards, D.P. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 3831–3849. [[CrossRef](#)]
21. Cahill, M.A. Progesterone receptor membrane component 1: An integrative review. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *105*, 16–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Oettel, M.; Mukhopadhyay, A.K. Progesterone: The forgotten hormone in men? *Aging Male* **2004**, *7*, 236–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lobo, R.A.; Pickar, J.H.; Stevenson, J.C.; Mack, W.J.; Hodis, H.N. Back to the future: Hormone replacement therapy as part of a prevention strategy for women at the onset of menopause. *Atherosclerosis* **2016**, *254*, 282–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Boerrigter, P.J.; van de Weijer, P.H.; Baak, J.P.; Fox, H.; Haspels, A.A.; Kenemans, P. Endometrial response in estrogen replacement therapy quarterly combined with a progestogen. *Maturitas* **1996**, *24*, 63–71. [[CrossRef](#)]
25. Riant, E.; Waget, A.; Cogo, H.; Arnal, J.F.; Burcelin, R.; Gourdy, P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* **2009**, *150*, 2109–2117. [[CrossRef](#)]
26. Camporez, J.P.; Jornayvaz, F.R.; Petersen, M.C.; Pesta, D.; Guigni, B.A.; Serr, J.; Zhang, D.; Kahn, M.; Samuel, V.T.; Jurczak, M.J.; et al. Cellular mechanisms by which FGF21 improves insulin sensitivity in male mice. *Endocrinology* **2013**, *154*, 3099–3109. [[CrossRef](#)]
27. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917. [[CrossRef](#)]

28. Huang, X.J.; Choi, Y.K.; Im, H.S.; Yarimaga, O.; Yoon, E.; Kim, H.S. Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors* **2006**, *6*, 756–782. [[CrossRef](#)]
29. Ito, M.; Suzuki, J.; Tsujioka, S.; Sasaki, M.; Gomori, A.; Shirakura, T.; Hirose, H.; Ito, M.; Ishihara, A.; Iwaasa, H.; et al. Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatol. Res.* **2007**, *37*, 50–57. [[CrossRef](#)]
30. Oates, J.R.; McKell, M.C.; Moreno-Fernandez, M.E.; Damen, M.; Deepe, G.S., Jr.; Qualls, J.E.; Divanovic, S. Macrophage Function in the Pathogenesis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: The Mac Attack. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2893. [[CrossRef](#)]
31. Camporez, J.P.; Akamine, E.H.; Davel, A.P.; Franci, C.R.; Rossoni, L.V.; Carvalho, C.R. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *J. Physiol.* **2011**, *589*, 2585–2596. [[CrossRef](#)]
32. Camporez, J.P.; Wang, Y.; Faarkrog, K.; Chukijrungrat, N.; Petersen, K.F.; Shulman, G.I. Mechanism by which arylamine N-acetyltransferase 1 ablation causes insulin resistance in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E11285–E11292. [[CrossRef](#)]
33. Camporez, J.P.G.; Kanda, S.; Petersen, M.C.; Jornayvaz, F.R.; Samuel, V.T.; Bhanot, S.; Petersen, K.F.; Jurczak, M.J.; Shulman, G.I. ApoA5 knockdown improves whole-body insulin sensitivity in high-fat-fed mice by reducing ectopic lipid content. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 526–536. [[CrossRef](#)]
34. Lovejoy, J.C.; Champagne, C.M.; de Jonge, L.; Xie, H.; Smith, S.R. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. *Int. J. Obes.* **2008**, *32*, 949–958. [[CrossRef](#)]
35. Rogers, N.H.; Perfield, J.W., 2nd; Strissel, K.J.; Obin, M.S.; Greenberg, A.S. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology* **2009**, *150*, 2161–2168. [[CrossRef](#)]
36. Camporez, J.P.; Lyu, K.; Goldberg, E.L.; Zhang, D.; Cline, G.W.; Jurczak, M.J.; Dixit, V.D.; Petersen, K.F.; Shulman, G.I. Anti-inflammatory effects of oestrogen mediate the sexual dimorphic response to lipid-induced insulin resistance. *J. Physiol.* **2019**, *597*, 3885–3903. [[CrossRef](#)]
37. 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. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 12729–12734. [[CrossRef](#)]
38. Wronski, T.J.; Lowry, P.L.; Walsh, C.C.; Ignaszewski, L.A. Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.* **1985**, *37*, 324–328. [[CrossRef](#)]
39. Szendroedi, J.; Yoshimura, T.; Phielix, E.; Koliaki, C.; Marcucci, M.; Zhang, D.; Jelenik, T.; Muller, J.; Herder, C.; Nowotny, P.; et al. Role of diacylglycerol activation of PKCtheta in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 9597–9602. [[CrossRef](#)]
40. Petersen, M.C.; Madiraju, A.K.; Gassaway, B.M.; Marcel, M.; Nasiri, A.R.; Butrico, G.; Marcucci, M.J.; Zhang, D.; Abulizi, A.; Zhang, X.M.; et al. Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 4361–4371. [[CrossRef](#)]
41. Kumashiro, N.; Erion, D.M.; Zhang, D.; Kahn, M.; Beddow, S.A.; Chu, X.; Still, C.D.; Gerhard, G.S.; Han, X.; Dziura, J.; et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16381–16385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Camporez, J.P.; Petersen, M.C.; Abudukadier, A.; Moreira, G.V.; Jurczak, M.J.; Friedman, G.; Haqq, C.M.; Petersen, K.F.; Shulman, G.I. Anti-myostatin antibody increases muscle mass and strength and improves insulin sensitivity in old mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 2212–2217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Biddinger, S.B.; Almind, K.; Miyazaki, M.; Kokkotou, E.; Ntambi, J.M.; Kahn, C.R. Effects of diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearyl-CoA desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome. *Diabetes* **2005**, *54*, 1314–1323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Guo, J.; Jou, W.; Gavrilova, O.; Hall, K.D. Persistent diet-induced obesity in male C57BL/6 mice resulting from temporary obesigenic diets. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Podrini, C.; Cambridge, E.L.; Lelliott, C.J.; Carragher, D.M.; Estabel, J.; Gerdin, A.K.; Karp, N.A.; Scudamore, C.L.; Sanger Mouse Genetics, P.; Ramirez-Solis, R.; et al. High-fat feeding rapidly induces obesity and lipid derangements in C57BL/6N mice. *Mamm. Genome* **2013**, *24*, 240–251. [[CrossRef](#)]
46. Getz, G.S. Overview of murine atherosclerosis series. *Curr. Drug Targets* **2007**, *8*, 1144–1149. [[CrossRef](#)]
47. Mirea, A.M.; Tack, C.J.; Chavakis, T.; Joosten, L.A.B.; Toonen, E.J.M. IL-1 Family Cytokine Pathways Underlying NAFLD: Towards New Treatment Strategies. *Trends Mol. Med.* **2018**, *24*, 458–471. [[CrossRef](#)]
48. Kakino, S.; Ohki, T.; Nakayama, H.; Yuan, X.; Otabe, S.; Hashinaga, T.; Wada, N.; Kurita, Y.; Tanaka, K.; Hara, K.; et al. Pivotal Role of TNF-alpha in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Murine Model. *Horm. Metab. Res.* **2018**, *50*, 80–87. [[CrossRef](#)]
49. Nair, B.; Nath, L.R. Inevitable role of TGF-beta1 in progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J. Recept. Signal Transduct.* **2020**, *40*, 195–200. [[CrossRef](#)]
50. Sattar, N.; Forrest, E.; Preiss, D. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ* **2014**, *349*, g4596. [[CrossRef](#)]
51. Lee, S.R.; Choi, W.Y.; Heo, J.H.; Huh, J.; Kim, G.; Lee, K.P.; Kwun, H.J.; Shin, H.J.; Baek, I.J.; Hong, E.J. Progesterone increases blood glucose via hepatic progesterone receptor membrane component 1 under limited or impaired action of insulin. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 16316. [[CrossRef](#)]

52. Gao, J.; He, J.; Shi, X.; Stefanovic-Racic, M.; Xu, M.; O'Doherty, R.M.; Garcia-Ocana, A.; Xie, W. Sex-specific effect of estrogen sulfotransferase on mouse models of type 2 diabetes. *Diabetes* **2012**, *61*, 1543–1551. [[CrossRef](#)]
53. North American Menopause Society. The 2017 hormone therapy position statement of The North American Menopause Society. *Menopause* **2017**, *24*, 728–753. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.