

**Gabriela Virginia Moreira**

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

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

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

Versão corrigida. Versão original encontra-se no setor de comunicação do ICB.

SÃO PAULO  
2011

## RESUMO

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

## 1 INTRODUÇÃO

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

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

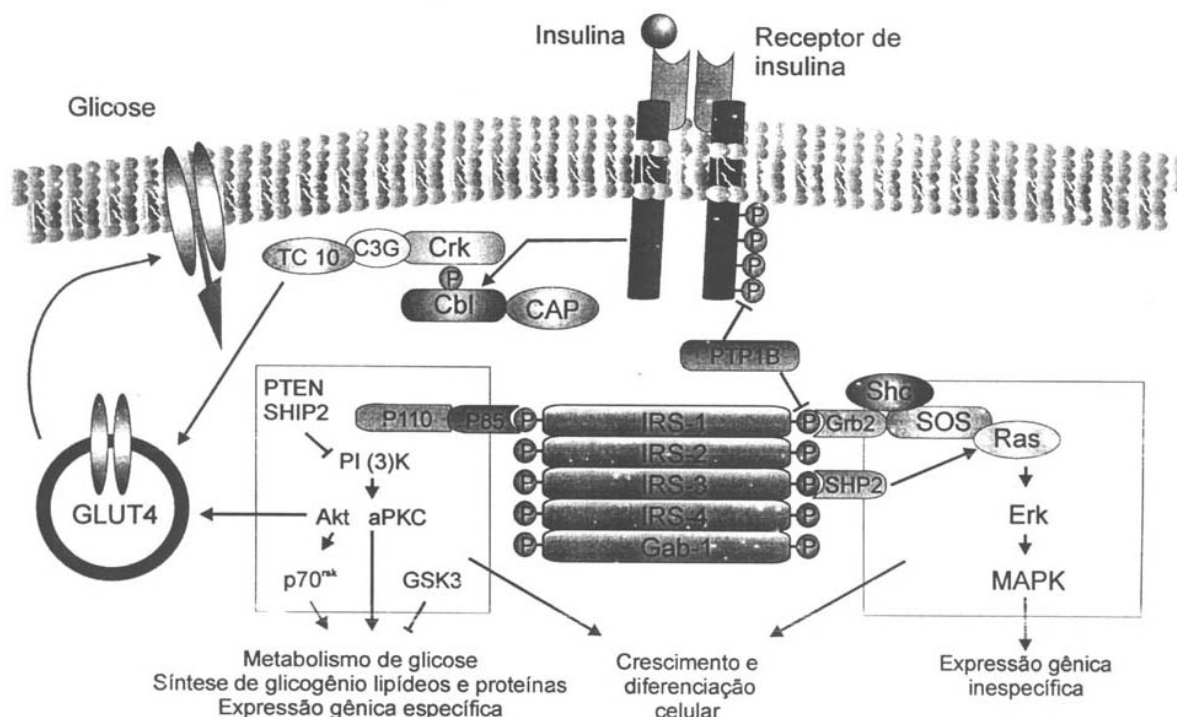
Os receptores de insulina foram identificados em inúmeros tipos celulares de mamíferos, variando suas concentrações desde 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 em células adiposas e hepáticas (WHITE; KAHN, 1994). Assim, além dos três tecidos alvos clássicos para as ações da insulina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

O primeiro substrato endógeno identificado foi o IRS-1 (substrato 1 do receptor de insulina). A fosforilação em resíduos tirosina das proteínas IRS permitem a associação dessas com outras proteínas que contém os denominados domínios com homologia a proteína Src, SH2 e SH3, tais como a subunidade regulatória de 85KDa da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-K) e a fosfatase fosfotirosina (SHP2) (CHEATHAM; KAHN, 1995; SALTIEL; KAHN, 2001). Para alguns autores, os substratos IRS-1, IRS-

2, IRS-3 e IRS-4, são os mais específicos da via de sinalização da insulina. Entretanto, há evidências que as diferentes isoformas de IRS apresentam especificidade em diferentes tecidos (VIRKAMAKI; UEKI; KAHN, 1999; UENO et al., 2000). No hipotálamo, os IRS-1, IRS-2 e IRS-4 são substratos encontrados em diversos núcleos (CARVALHEIRA et al., 2003; NUMAN; RUSSELL, 1999; PARDINI et al., 2006). Camundongos *knouckout* para IRS-1 e IRS-2 apresentam resistência à insulina; porém o primeiro modelo mostra retardo no crescimento na vida intra-uterina e pós-natal (TAMEMOTO et al., 1994) enquanto que o segundo modelo apresenta retardo do crescimento de somente alguns órgãos como o cérebro, retina e na massa total de ilhotas pancreáticas  $\beta$  levando ao desenvolvimento do diabetes tipo 2 (WHITERS et al., 1998).

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

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



FONTE: Modificado de CARVALHEIRA et al., 2002.

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

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

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

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

tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 6 (IL-6) (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006).

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

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

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

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

25 a 35% de desenvolverem diabetes tipo 2 ou intolerância a glicose até os 30 anos de idade (NESTLER, 1998).

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

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

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

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

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



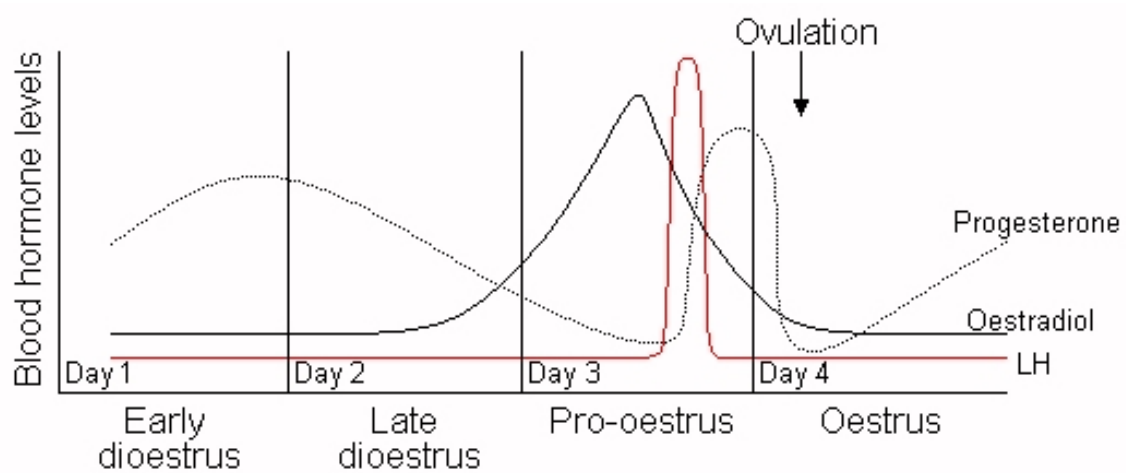
nucleadas e algumas células cornificadas. Esta fase dura de 12 a 14 horas. É seguida por alteração no epitélio vaginal com células queratinizadas, caracterizando a fase de estro, cuja duração corresponde ao período de 25 a 27 horas. Nessa fase ocorre o pico de secreção de LH que precede a ovulação ao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

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

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

---

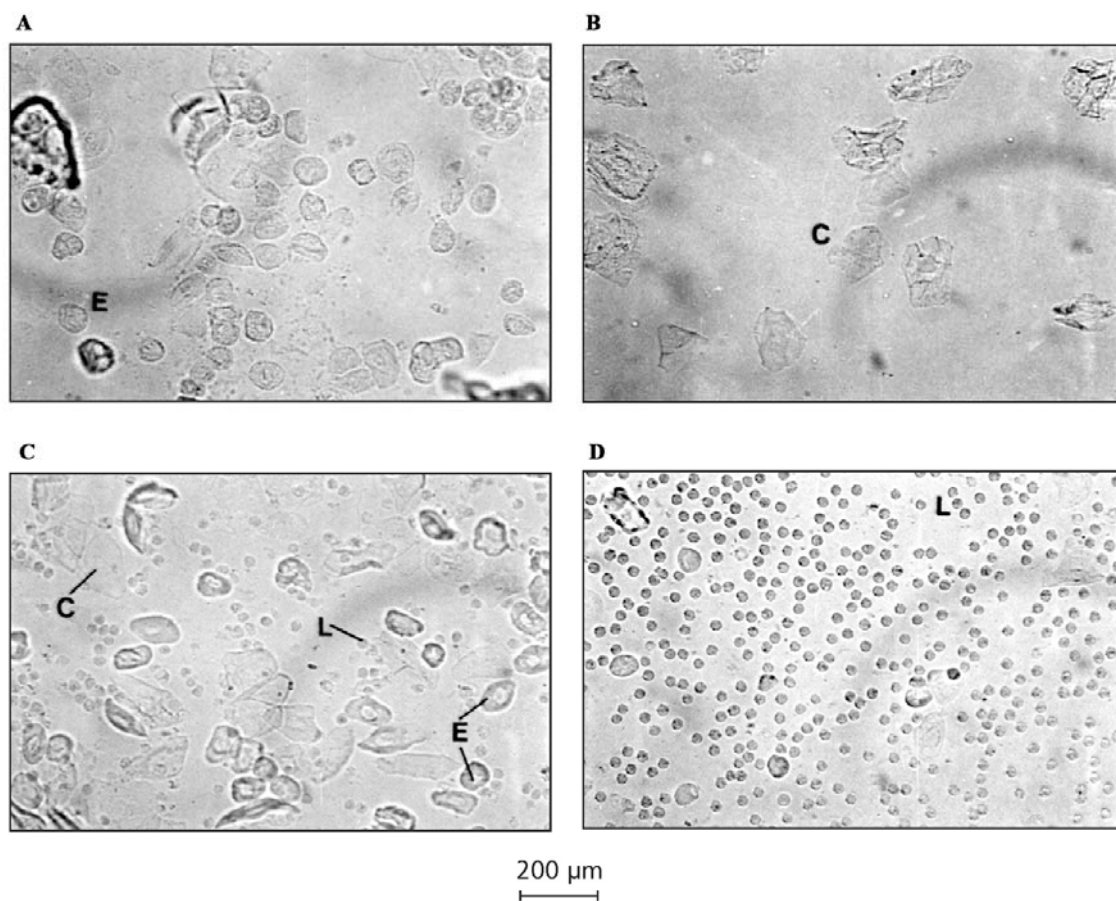
<sup>1</sup> Apud ANDREWS, W. W.; OJEDA, S. R. A detailed analysis of the serum LH secretory profiles of conscious free-moving female rats during the time of puberty. **Endocrinology** v.109, p. 2032-2039, 1981.



FONTE: Adaptado de PINTO, 2007.

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

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



FONTE: Adaptado de MARCONDES, 2002.

Fase de proestro (A), estro (B), metaestro (C) e diestro (D). Na figura estão marcadas as células encontradas nas diferentes fases: Leucócitos (L), Epiteliais (E) e Cornificadas (C). Os esfregaços vaginais foram observados em microscópio comum, sem o uso da lente condensadora e objetiva de 40 x. A proporção dos três tipos de células foi utilizada para a determinação das fases do ciclo estral.

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

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

## 6 CONCLUSÃO

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

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

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

## REFERÊNCIAS\*

ACOSTA-MARTÍNEZ, M.; LUO, J.; ELIAS, C.; WOLFE, A.; LEVINE, J. E. Male Biased Effects of GnRH Neuron-Specific Deletion of the PI3K Regulatory Subunit p85 $\alpha$  on the Reproductive Axis. **Endocrinology**, v. 150, p. 4203-4212, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory pathways and insulin action. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 27, p. 53-55, 2003.
- ISHIKAWA, K.; TAKAHASHI, K.; BUJO, H.; HASHIMOTO, N.; YAGUI, K.; SAITO, Y. Subcutaneous Fat Modulates Insulin Sensitivity in Mice by Regulating TNF- $\alpha$  expression in Visceral Fat. **Horm. Metab. Res.**, v. 38, p. 631-638, 2006.
- JACOBSON, L. Middle-aged C57BL/6 mice have impaired responses to leptin that are not improved by calorie restriction. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 282, p. E786-E793, 2002.
- KANDARAKI, E.; CRISTAKOU, C.; KANDARAKI, E. D. Metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome...and vice versa. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 53, n.2, p. 227 - 237, 2009.
- KANDARIAN, S. C.; JACKMAN, R. W. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. **Muscle Nerve**, v. 33, p. 155-165, 2006.
- KHAN, A. H.; PESSIN, J. E. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signaling pathways. **Diabetologia**, v. 45, p. 1475-1483, 2002.
- KHAN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, p. 840-846, 2006.
- KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, p. 613-646, 1994.
- KOVACS, P.; MORALES, J. C.; KARKANIAS, G. B. Central insulin administration maintains reproductive behavior in diabetic female rats. **Neroendocrinology**, v. 78, p. 90-95, 2003.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEGRO, R. S.; GNATUK, C. L.; KUNSELMAN, A. R.; DUNAIF, A. Changes in glucose tolerance over time in women with polycystic ovary syndrome: a controlled study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 90, p. 3236-3242, 2005.
- LONG, J. A.; EVANS, H. M. The oestrus cycle in the rat its associated phenomena. **Men. Univ. California**, v. 6, p. 1-148, 1922.
- LU, J. K. H.; DAMASSA, D. A.; GILMAN, D. P.; JUDD, H. L.; SAWYER, C. H., Differential patterns of gonadotropin responses to ovarian steroids and to LH-releasing hormone between constant-estrous and pseudopregnant states in aging rats. **Biol. Reprod.**, v. 23, p. 345-351, 1980.
- MANDL, A. M., The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. **J. Exp. Biol.** v. 28, p. 576-584, 1951.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.**, v. 62, p. 609-614, 2002.
- MATT, D.W.; COQUELIN, A.; LU, J. K. , Neuroendocrine Control of Luteinizing Hormone Secretion and Reproductive Function in Spontaneously Persistent- Estrous Aging Rats. **Biol. Reprod.**, v. 37, p. 1198-1206, 1987.
- MEZIANE, H.; OUAGAZZAL, A.M.; AUBERT, L.; WITRZYCH, M.; KREZEL, W. Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. **Genes, Brain Beh.**, v. 6, p. 192-200, 2007.
- MCCOWEN, K.C.; MALHOTRA, A.; BISTRAN, B.R. Stress-induced hyperglycemia. **Crit. Care Clin.**, v. 17, p. 107-124, 2001.

- NANDI, A.; WANG, X.; ACCILI, D.; WOLGEMUTH, D. J. The effect of insulin signaling on female reproductive function independent of adiposity and hyperglycemia. **Endocrinology**, v. 151, p. 1863-1871, 2010.
- NESTLER, J. E. Polycystic ovary syndrome: a disorder for the generalist. **Fertil. Steril.**, v. 70, p. 811-812, 1998.
- NISHIMURA H., KUZUYA H., OKAMOTO M., YOSHIMASA Y., YAMADA K., IDA T., TAKEHI T., IMURA H. Change of insulin action with aging in conscious rats determined by euglycemic clamp. **Am. J. Physiol.**, v. 254, p. E92-98, 1988.
- NOVELLI, E. L.; DINIZ, Y. S.; GALHARDI, C. M.; EBAID, G. M.; RODRIGUES, H. G.; MANI, F.; FERNANDES, A. A.; CICOONA, A. C.; NOVELLI FILHO, J. L. , Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab. Anim.**, v. 41, p. 111-119, 2007.
- NUMAN S, RUSSELL D. S. Discrete expression of insulin receptor substrate-4 *mRNA* in adult rat brain. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 72, p. 97-102, 1999.
- PANIDIS, D. K.; ROUSSO, D. H.; MATALLIOTAKIS, I. M.; KOURTIS, A. I.; VLASSIS, G. D.; KOUMANTAKIS, E. E. Hyperinsulinemia does not influence androgens/estrogens ratio in patients with polycystic ovary syndrome. **Int. Fertil Women's Med.**, v. 44, p. 301-306, 1999.
- PARDINI, A. W; NGUYEN, H. T.; FIGLEWICZ, D. P.; BASKIN, D. G.; WILLIAMS, D. L.; KIM, F.; SCHWARTZ, M. W. Distribution of insulin receptor substrate-2 in brain areas involved in energy homeostasis. **Brain Res.**, v. 1112, p. 169-178, 2006.
- PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The insulin receptor – a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.**, v. 9, p. 89-109, 1998.
- PINTO, C. M. H. **O ciclo estral de rata e efeitos da castração hormonal e da terapia hormonal substitutiva.** 2011. Disponível em < [www.cristina.prof.ufsc.br/v2/endocrino/rato\\_gonadas.ppt](http://www.cristina.prof.ufsc.br/v2/endocrino/rato_gonadas.ppt) > acesso em: 01/11/2011.
- PORETSKY, L.; CLEMONS, J.; BOGOVICH, K. Hyperinsulinemia and human chorionic gonadotropin synergistically promote the growth of ovarian follicular cysts in rats. **Metabolism**, v. 41, p. 903- 910, 1992.
- ROMERO-CALVO, I.; OCÓN, B.; MARTÍNEZ-MOYA, P.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S.. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Anal. Biochem.**, v. 401, p. 318-320, 2010.
- SALTIEL, A. R; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p.799-806, 2001.
- SALTIEL, A.R.; PESSIN, J.E. Insulin signaling pathways in time and space. **Trends Cell Biol.**, v. 12, p. 65-71, 2002.
- SALVI, R.; CASTILLO, E.; VOIROL, M. J.; GLAUSER, M.; REY, J. P.; GAILLARD, R. C.; VOLLENWEIDER, P.; PRALONG, F. P.. Gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons immortalized conditionally are activated by insulin: implication of the mitogen-activated protein kinase pathway. **Endocrinology**, v. 147, p. 816-826, 2006.
- SARDINHA, F. L. C.; TELLES, M. M.; ALBUQUERQUE, K. T.; OYAMA, L. M.; GUIMARÃES, P. A.; SANTOS, O. F.; RIBEIRO, E. B. Gender difference in the effect of intrauterine malnutrition on the central anorexigenic action of insulin in adult rats. **Nutrition**, v. 22, p. 1152-1161, 2006.
- SCHAFFLER, A.; SCHOLMERICH, J.; SALZBERGER, B. Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. **Trends Immunol.**, v. 28, p. 393–399, 2007.
- SHEPHERD, P. R. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin- sensitive tissues. **Acta. Physiol. Scand**, v. 183, p. 3-12, 2005.



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

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

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

TERAUCHI, Y.; TSUJI, Y.; SATOH, S.; MINOURA, H.; MURAKAMI, K.; OKUNO, A.; INUKAI, K.; ASANO, T.; KABURAGI, Y.; UEKI, K.; NAKAJIMA, H.; HANAFUSA, T.; MATSUZAWA, Y.; SEKIHARA, H.; YIN, Y.; BARRETT, J. C.; ODA, H.; ISHIKAWA, T.; AKANUMA, Y.; KOMURO, I.; SUZUKI, M.; YAMAMURA, K.; KODAMA, T.; SUZUKI, H.; YAMAMURA, K.; KODAMA, T.; SUZUKI, H.; KOYASU, S.; AIZAWA, S.; TOBE, K.; FUKUI, Y.; YAZAKI, Y.; KADOWAKI, T. Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 $\alpha$  subunit of phosphoinositide 3-kinase. **Nat. Genet.**, v. 21, p. 230-235, 1999.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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