

VANESSA COUTINHO DO AMARAL

Avaliação da expressão do mRNA do GLUT 4 em corpo lúteo de cadelas
sadias ao longo do diestro

São Paulo
2006

VANESSA COUTINHO DO AMARAL

Avaliação da expressão do mRNA do GLUT 4 em corpo lúteo de cadelas
sadias ao longo do diestro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres

Orientadora:

Profª. Dra. Paula de Carvalho Papa

São Paulo
2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1817
FMVZ

Amaral, Vanessa Coutinho do
Avaliação da expressão do mRNA do GLUT4 em corpo lúteo de cadelas sadias ao longo do diestro / Vanessa Coutinho do Amaral. – São Paulo: V. C. Amaral, 2006.
82 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa.

1. Cadelas. 2. Diestro. 3. GLUT4. 4. PCR tempo real. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da expressão do mRNA do GLUT 4 em corpo lúteo de cadelas sadias ao longo do diestro", protocolo nº 856/2006, utilizando 28 (vinte e oito) cães (ovários resultantes de cirurgias), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Evaluation of GLUT 4 mRNA expression in the canine corpus luteum during diestrus", protocol number 856/2006, utilizing 28 (twenty and eight) dogs, under the responsibility of Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 06 de dezembro de 2006

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AMARAL, Vanessa Coutinho

Título: Avaliação da expressão do mRNA do GLUT-4 em corpo lúteo de cadelas ao longo do diestro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Aos meus pais, **Ricardo e Rosária**, e à minha irmã, **Daniele**, por serem meu exemplo de dignidade e caráter, e por sempre me mostrarem que o caminho correto quase sempre é o mais difícil, mas que todos os obstáculos podem ser superados com a união da família.

Ao meu namorado, **Sérgio**, pelo carinho, paciência e apoio incondicional. Por deixar mais fácil e agradável até mesmo os momentos mais turbulentos.

Obrigada por tudo. Amo muito vocês!

Aos meus avôs, **José e Alcebíades** (em memória), e às
minhas avós, **Santa e Lucila**, que são as mais belas
flores do jardim da minha vida, e também responsáveis
pela pessoa que hoje me tornei.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa**, pelos ensinamentos e por todo o esforço e dedicação a mim dispensados.

Muito Obrigada.

Ao **Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato**, que me trouxe até este departamento, obrigada pela amizade, conselhos e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Maria Angélica Miglino**, coordenadora do curso de pós-graduação, pela oportunidade;

Aos professores **José Roberto Kfoury Jr. e José Buratini Jr.** por disponibilizarem seus laboratórios;

À amiga **Liza Margareth**, por toda a ajuda em todas as etapas deste trabalho, pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos do laboratório, **Liza, Laura, Fernando, Eduardo, Cadú, Alex, Alice, Luciana, Danila, Vanessa, Mariana e Selene**, pois todos, de alguma maneira, ajudaram na realização deste trabalho.

Aos amigos **Mariana e Antony**, pelo auxílio na extração do RNA.

Aos técnicos, **Edinaldo (Índio), Ronaldo e Diogo** por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos funcionários do Departamento, **Maicon, Jaqueline e Paulo**, por toda a colaboração durante todo o tempo.

Aos meus amigos, **Adriana, Renê, Sandra e Wiliam**, e toda a minha **família**, pelo carinho, por sempre me apoiarem e torcerem por mim.

A todos os meus colegas de pós-graduação, por todos os momentos agradáveis que passamos juntos.

RESUMO

AMARAL, V. C. **Avaliação da expressão do mRNA do GLUT 4 em corpo lúteo de cadelas sadias ao longo do diestro.** [Evaluation of the expression of GLUT4 mRNA in canine corpus luteum during diestrus] 2006. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O ciclo estral das cadelas difere das demais espécies domésticas. Estudos demonstraram que o aumento da concentração plasmática de P4 durante a fase luteínica das cadelas pode levar a alterações metabólicas como a resistência insulínica, acarretando complicações como Diabetes mellitus. A glicose é uma molécula transportada, na maioria das células, por proteínas transportadoras. O processo de instalação da resistência insulínica é caracterizado por alterações teciduais da expressão de algumas proteínas transportadoras de glicose, como o GLUT4. Atualmente 13 isoformas de proteínas transportadoras já foram seqüenciadas (GLUT1 ao GLUT13). O GLUT4 está presente nos músculos e no tecido adiposo, principalmente. Para avaliar se a expressão do GLUT 4 está presente nas células luteínicas e se esta expressão relaciona-se à produção de P4 e E2, 28 cadelas foram divididas em 7 grupos de acordo com os dias após a ovulação –p.o. (de 10 à 70 dias, n = 4 por grupo). Os ovários foram dissecados e congelados em nitrogênio líquido, o RNA extraído e o cDNA confeccionado e submetido ao PCR em tempo real. O gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno para padronização da expressão do gene alvo. Foi coletado sangue para dosagem da glicemia, insulinemia, progesterona e estradiol. Para avaliar a regulação positiva do GLUT4 avaliamos também a expressão do mRNA do HIF-1 α , destas mesmas cadelas. A expressão do GLUT4 apresentou tendência a aumento de expressão aos 20 dias (p. o.), quando comparado aos 10, 30 e 40 dias, pico de expressão aos 50 dias (p.o.), e então apresentou tendência a queda aos 60 e 70 dias p.o. Já a expressão do HIF-1 α manteve-se muito semelhante através dos dias, tendendo a queda aos 10 e aos 40 dias pós ovulação, quando comparado com os demais grupos. Os resultados de dosagem de P4 e E2 variaram dentro do esperado para o diestro e não apresentaram correlação com a expressão de GLUT 4; a glicemia e insulina, aqui expressas através do índice HOMA (insulina x glicose % 22,5), apresentou pico aos 40 dias. Sabe-se que quanto mais alto o índice HOMA, menos este animal é sensível à insulina, ou seja, mais resistente à ela. Observou-se que o índice

HOMA apresentou-se mais alto aos 40 dias, associado aos menores valores de expressão do GLUT4. Por outro lado, obtivemos o pico de expressão de GLUT4 aos 50 dias, quando o índice HOMA apresentou valores baixos. Sugere-se que a queda da P4 associada à elevação do estradiol plasmático possa influenciar o índice HOMA. Pode-se concluir que a expressão do GLUT4 no corpo lúteo de cadelas segue o padrão observado para tecidos sensíveis à insulina, nos quais existe uma maior expressão durante a fase de maior sensibilidade à insulina e diminuição drástica em fase de pré ou já instalada resistência insulínica.

Palavras-chave: Cadelas. Diestro. GLUT4. PCR tempo real.

ABSTRACT

AMARAL, V. C. **Evaluation of the expression of GLUT4 mRNA in canine corpus luteum during diestrus.** [Avaliação da expressão do mRNA do GLUT 4 em corpo lúteo de cadelas sadias ao longo do diestro] 2006. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The canine estral cycle differs from other domestic species. Some studies demonstrated that the increase of the plasmatic concentration of progesterone during canine luteinic phase can lead to metabolic alterations, such as insulinic resistance and may cause complications such as Diabetes mellitus. Glucose is a molecule that is transported in most cells by transporting proteins. The process of installation of the insulinic resistance is characterized by tissue alterations of the expression of some glucose transporting proteins, as GLUT4. Currently, 13 isoforms of transporting proteins were sequenced (GLUT1 to GLUT13). GLUT4 is present mainly in muscle and fat tissue. In order to assess if GLUT4 expression is present in luteal cells, and if this expression is related to P4 and E2 production, 28 bitches were divided into 7 groups, in accordance with the days after the ovulation –p.o. (from 10 to 70 days, n=4 for group). The ovaries were dissected and frozen in liquid nitrogen. The RNA was extracted and the cDNA was made and submitted to real time PCR. GAPDH gene was used as endogenous control to standardization of target gene expression. Blood was collected to glycemia, insulinemia, P4, and E2 β dosage. To assess the positive regulation of GLUT4, we also assessed HIF-1 α mRNA expression of the same bitches. GLUT4 expression showed a tendency to increase the expression on the twentieth day (p.o.), when compared to the 10th, 30th, and 40th days, expression top on the 50th day (p.o.), and then, it showed a tendency to fall on the 60th and 70th days p.o. HIF-1 α expression was very similar over the days, tending to fall on the 10th and 40th days post ovulation, when compared to other groups. P4 and E2 β dosage results varied according to the expectations in diestrus and have not shown correlation with GLUT4 expression; glycemia and insulin, here expressed by HOMA index (insulin x glucose % 22,5) showed crest (highest point) on the 40th day. It is known that the higher the HOMA index, the less sensitive this animal is to insulin, it is, more resistant to it. It was observed that HOMA index was higher on the 40th day, associated to small values of the GLUT4 expression. Otherwise, the group got the top of GLUT4

expression on the 50th day, when HOMA index showed low values. It has been suggested that P4 fall associated to the plasmatic E2 increase may influence HOMA index. We may conclude that GLUT4 expression into the corpus luteum of bitches follows the standard observed in insulin-sensitive tissues, in which there is a higher expression over the phase of higher sensitiveness to insulin and remarkable decrease in pre or even installed insulinic resistance.

Key-words: Bitches. Corpus luteum. Diestrus. GLUT4. Real time PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS

CL	corpo lúteo
E2	17 β -estradiol
FSH	hormônio folículo estimulante
GH	hormônio do crescimento
GLUT	proteína transportadora de glicose
HIF-1 α	fator induzível pela hipóxia
IL-6	interleucina-6
LH	hormônio luteinizante
NF- κ B	fator nuclear kappa B
P4	progesterona
PAI-1	inibidor de plasminogênio ativado-1
PCR	proteína –C reativa
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	21
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3.1 Ovários	24
3.2 Ciclo estral das candelas.....	25
3.3 Corpo lúteo	27
3.4 Variações da Insulinemia no ciclo estral.....	28
3.5 Resistência Insulínica e transportadores de glicose (GLUTs).....	30
3.5.1 GLUT-1.....	31
3.5.2 GLUT-4.....	31
3.6 Regulação da expressão de GLUT-4.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Grupos experimentais.....	39
4.2 Detecção da data de ovulação.....	39
4.3 Protocolo anestésico.....	40
4.4 Protocolo cirúrgico.....	40
4.5 Coleta dos corpos lúteos.....	41
4.6 Dosagem hormonal.....	41
4.6.1 Dosagem de progesterona e estradiol.....	41
4.6.2 Dosagem de insulina.....	43
4.6.3 Dosagem de glicemia.....	44
4.7 Procedimentos Experimentais.....	45
4.7.1 Extração de RNA.....	45
4.7.2 Método do Trizol.....	45
4.7.3 Transcrição reversa.....	46

4.7.4 Padronização do PCR em tempo real.....	47
4.7.5 PCR em tempo real.....	47
4.7.6 Sequências de Primers e probes	49
4.7.7 Cálculo da expressão relativa dos genes-alvo.....	49
4.8 Western Blotting.....	50
4.8.1 SDS-PAGE.....	51
4.8.2 Eletrophoretic Transfer.....	51
4.8.3 Immunoblotting.....	52
4.9 Análise estatística.....	53
5 RESULTADOS.....	54
5.1 Níveis séricos de P4 e E2.....	55
5.2 Insulinemia, glicemia e índice HOMA.....	57
5.3 PCR em tempo real.....	60
5.3.1 GLUT-4.....	60
5.3.2 HIF-1 α	61
5.4 Western Blotting.....	62
6 DISCUSSÃO.....	63
7 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As fêmeas da espécie canina são classificadas como monoéstricas não estacionais por apresentarem apenas um estro a cada novo ciclo reprodutivo, o qual não apresenta relação com a estação do ano. O ciclo estral das cadelas difere das demais espécies domésticas, e é dividido em proestro, estro, diestro e anestro (FELDMAN; NELSON, 1987). As cadelas ciclam de 1 a 4 vezes por ano, dependendo da raça e também de variações individuais, apresentando um ciclo reprodutivo muito particular. No diestro existe uma intensa atividade do corpo lúteo (medida através da secreção de progesterona), e este é tão longo nas cadelas prenhes quanto nas não prenhes, o que não ocorre em outras espécies. Os hormônios hipofisários são responsáveis pela produção de progesterona pelo corpo lúteo na segunda metade do diestro (CONCANNON et al., 1987; HOFFMANN et al., 1992, 1996; OKKENS; BEVERS, 1990). O aumento da concentração plasmática de progesterona durante a fase luteínica das cadelas, a longo prazo, pode levar a alterações metabólicas como resistência insulínica e depleção dos estoques pancreáticos de insulina, predispondo estes animais a desenvolverem Diabetes mellitus, patologia que afeta tanto animais quanto seres humanos, e é responsável por grandes investimentos na área da saúde.

A progesterona atua de duas formas na resistência insulínica: a forma direta, na qual diminui o transporte da glicose para os tecidos, e indiretamente induzindo a hipersecreção de hormônio do crescimento (GH) pelas glândulas mamárias; neste caso o GH diminui o número de receptores de insulina nas células e também diminui o transporte de glicose aos tecidos (EIGENMANN, 1984; SELMAN et al., 1994). Segundo Swenson (1988) o GH atua em músculos e tecido adiposo como antagonista da insulina.

A insulina é um hormônio capaz de induzir respostas anabólicas no fígado, tecido muscular e tecido adiposo, sendo importante para a homeostase de lipídios e carboidratos e, conseqüentemente, para o funcionamento do organismo. Além disso, a insulina regula vários processos fisiológicos em diferentes tipos celulares e tecidos como fluxo de íons, captação de aminoácidos, expressão gênica, proliferação celular, apoptose, rearranjo do citoesqueleto e

regulação de enzimas celulares (MAASSEN; OWENS, 1997; MYERS; WHITE, 1996). Deficiência na secreção e/ou na ação da insulina resulta na doença Diabetes mellitus, que é caracterizada, principalmente, pela presença de hiperglicemia (ETTINGER, 1992a).

A Diabetes mellitus tem como definição uma Síndrome que abrange uma série de doenças de etiologias diferentes e clinicamente heterogêneas, que se caracterizam pela hiperglicemia, decorrente da falta de insulina ou da incapacidade desta em exercer adequadamente seus efeitos metabólicos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1997). A Diabetes mellitus canina tem como principais causas a predisposição genética e insulinite imunomediada, associadas a exposição prolongada a fatores de resistência à insulina, como por exemplo, obesidade, progestágenos, infecções, diestro, corticóides, devendo estes fatores serem eliminados já no início do tratamento (DUNN, 2001).

A glicose é uma molécula polar, portanto não é capaz de atravessar a membrana celular, sendo transportada, na maioria das células, através de difusão facilitada por proteínas transportadoras. O processo de instalação da resistência insulínica é caracterizado por alterações teciduais da expressão de algumas proteínas transportadoras de glicose, como o GLUT4. Atualmente 13 isoformas de proteínas transportadoras já foram seqüenciadas (GLUT1 ao GLUT13). O GLUT4 está presente nos músculos e no tecido adiposo. O fato destes transportadores de glicose possuírem maior expressão em determinado tecido não quer dizer que não possam estar presentes em outro (JAMES, 1995; MUECKLER, 1994). Estudos mostram que não foi evidenciada a presença da proteína GLUT4 em corpos lúteos de cadelas entre 10 e 70 dias pós-ovulação através da técnica Northern blotting (Paarmann, comunicação pessoal), nem em corpo lúteo de vaca pelo método de RT-PCR (Sugai et al., 2004). Porém o GLUT4 já foi evidenciado em células da teca e granulosa de ovário de ovelha (WILLIAMS et al., 2001) e em células de ovário de Hamster chinês in vitro (BOGAN et al., 2001, 2003).

A regulação da homeostasia intra e extra-celular da glicose está diretamente relacionada ao controle preciso da expressão dos genes que codificam as diferentes isoformas de proteínas transportadoras de glicose, as quais se expressam de maneira tecido-específica, em consequência do padrão de ativação dos fatores transcricionais reguladores de cada gene, em cada tipo celular (MACHADO et al., 2006). A regulação da transcrição do gene GLUT4 envolve o controle de

fatores transcricionais, e estes podem ativar (MEF2, e o HIF-1) ou inibir (NF- κ B) a transcrição do gene.

A utilização de cadelas no diestro é um excelente modelo para estudar a influência das variações nas concentrações de progesterona na expressão dos transportadores de glicose no corpo lúteo, e, conseqüentemente, um bom modelo para estudar a resistência insulínica e as complicações observadas durante o tratamento de pacientes diabéticas durante o diestro. Este estudo poderá então contribuir melhorando a qualidade de vida das cadelas diabéticas.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Testou-se a hipótese de que o GLUT4 encontra-se expresso no corpo lúteo de cadelas na fase de diestro, e que este transportador de glicose pode ser regulado ao longo deste período. Para tal, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- quantificar a expressão relativa do mRNA do GLUT4 ao longo do diestro;
- quantificar a expressão relativa do gene HIF-1 α , regulatório para o GLUT4 ao longo do diestro;
- quantificação de parâmetros hormonais (Progesterona – P4, e Estradiol – E2 β) e metabólicos (insulinemia e glicemia), que possam influenciar a expressão do GLUT4 ao longo do diestro.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Os órgãos reprodutivos femininos compõem-se de ovários, ovidutos, útero, cérvice uterina, vagina e genitália externa (CATCOTT, 1979; DUNN, 2001).

3.1 Ovários

Os ovários normais posicionam-se na cavidade abdominal dorsal, caudalmente aos rins (CATCOTT, 1979; DUNN, 2001), e apresentam duas funções, uma exócrina (liberação de óvulos) e uma endócrina (esteroidogênese). O tecido predominante do ovário é o córtex, e este contém folículos ovarianos e/ou corpos lúteos em vários estágios de desenvolvimento ou regressão (HAFEZ, 1995). Cada ovário é circundado por uma cápsula gordurosa, evitando assim o exame da superfície ovariana. Durante o proestro o ovário aumenta de tamanho devido ao desenvolvimento de folículos múltiplos (DUNN, 2001).

Segundo Ettinger (1992b), a função ovariana geralmente divide-se nas fases folicular, luteínica e quiescente. Os folículos ovarianos são formações celulares arredondadas, sujeitos a uma evolução que pode reuzir-se a três estágios principais: folículos primários, folículos secundários e folículos maduros ou folículos de Graaf, também denominados de folículos pré ovulatórios (DERIVAUX, 1980). Na fase folicular o hormônio dominante é o 17β -estradiol, produzido em quantidade crescente pelas células da granulosa dos folículos de Graaf em crescimento (ETTINGER, 1992b). Após a luteinização do folículo maduro, e a ovulação ser estimulada pelo aparecimento do hormônio luteinizante (LH) à partir da hipófise anterior 38 a 48 horas antes (MIALOT, 1988), as células foliculares da granulosa e teca interna cessam sua atividade esteroidogênica e começam a produzir progesterona. O folículo agora é corpo lúteo, e este período do ciclo estral dominado pela progesterona, produzida pelo próprio corpo lúteo, (DERIVAUX, 1980; KOLB, 1974) é a fase luteínica. A fase quiescente é o anestro, que ocorre em intervalos característicos para cada indivíduo e geralmente não é afetado pelas estações do ano. As três fases se sucedem umas às

outras de forma cíclica. As alterações resultantes que ocorrem no comportamento, aparência da genitália externa, e na estrutura da vagina, útero, e ovários, são coletivamente chamados de ciclo estral (ETTINGER, 1992b).

3.2 Ciclo estral das cadelas

Normalmente as cadelas exibem seu primeiro ciclo alguns meses depois de terem atingido altura e peso adulto (ETTINGER, 1992b; FELDMAN; NELSON, 1987;). Em raças pequenas corresponde geralmente aos 6-10 meses de idade, enquanto raças grandes podem não ciclar até chegarem aos 18- 24 meses. É relatada uma grande variação racial e até mesmo individual quanto a esse aspecto. A maioria das cadelas apresenta um novo ciclo a cada 7 meses, mas são considerados intervalos normais aqueles que duram de 5 a 10 meses (FELDMAN; NELSON, 1987).

As fêmeas da espécie canina são classificadas como monoéstricas não estacionais por apresentarem apenas um estro a cada novo ciclo reprodutivo, o qual não apresenta relação com a estação do ano (DUNN, 2001; ETTINGER, 1992 b). O ciclo estral das cadelas difere das demais espécies domésticas, e é dividido em proestro (período em que a atividade folicular é maior, precedendo o estro), estro (período em que a fêmea aceita o macho para montar e cruzar), diestro (associado com a atividade do corpo lúteo, e portanto dominado pela progesterona), e anestro (é o tempo compreendido entre o fim da fase luteínica –diestro, e o início de outra fase folicular – proestro; clinicamente é um período de quietude reprodutiva). (FELDMAN & NELSON, 1987).

O proestro caracteriza-se por sangramento vaginal e turgidez da vulva, que persiste por 9 a 10 dias, com variação de 4 a 14 dias (DERIVAUX, 1980), 6 a 9 dias (CATCOTT, 1979), 6 a 11 dias (ETTINGER, 1992 b). Neste período a cadela mostra-se inquieta, não se submete ao coito, demonstrando inclusive certa hostilidade para com os machos que a perseguem (DERIVAUX, 1980; ETTINGER, 1992). A cadela em proestro está sob influência do estrógeno sintetizado e secretado pelos folículos ovarianos em desenvolvimento. O estrógeno é responsável pela preparação uterina para a prenhez, além de outros eventos proestrais. A concentração de

estrógeno, que estava em níveis de 8 a 15 pg/ml no anestro, se eleva para 25 pg/ml no início do período, chegando a picos de 60-70 pg/ml no final, que ocorrem 24 a 48 horas precedendo o estro. Os níveis de progesterona durante o proestro, exceto nas últimas 12 a 48 horas, são basais (<0.5ng/ml). O fim do proestro é caracterizado por elevação dos níveis de progesterona, enquanto que os níveis de estrógeno decaem. (FELDMAN; NELSON, 1987).

O estro corresponde ao período de aceitação do macho pela fêmea (ETTINGER, 1992b). A vulva, edemaciada e úmida, permite fácil penetração do órgão genital masculino. O período estral é de duração variável, 4 a 12 dias (DERIVAUX, 1980), 6 a 12 dias (CATCOTT, 1979), 7 a 9 dias (ETTINGER, 1992 b), e a ovulação, que é espontânea, ocorre 1 a 3 dias após a primeira aceitação (DERIVAUX, 1980). A concentração de estrógeno alcança um pico 1 ou 2 dias antes do começo do estro. A cadela, geralmente, começará a exibir sinais de cio somente quando a concentração de estrógeno circulante (uma vez elevada) está declinando. O declínio da concentração de estrógeno é um reflexo do final do processo de maturação do folículo, muitos dias antes da ovulação. Simultaneamente com o declínio dos níveis de estrógeno, as células do folículo ovariano começam a luteinizar-se e secretar progesterona. A combinação do aumento da concentração plasmática de progesterona e do declínio da concentração de estrógeno estimula: a mudança do comportamento da cadela, deixando de ser contrária à cobertura, e sim procurá-la ativamente; e realiza forte “feedback” positivo para hipotálamo e pituitária, resultando numa descarga de GnRH, e este induzindo uma onda de secreção do hormônio folículo-estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) no começo dos sinais de cio. A onda de LH inicia a ovulação dentro de 24 a 48 horas, e depois desta, há a formação do corpo lúteo. Os níveis de progesterona continuam aumentando na circulação durante estes dias; e com o desenvolvimento do corpo lúteo funcional, a concentração de progesterona aumenta ainda mais, por um período de 1 a 3 semanas (ETTINGER, 1992; FELDMAN; NELSON, 1987; MIALOT, 1988).

O diestro começa quando uma cadela previamente receptiva abruptamente recusa a aceitar a monta de um macho. Ela pode também não ser mais atrativa para os machos, a vulva retorna ao normal e não é mais flácida. Basicamente, não há nenhuma diferença clínica quando comparada com uma cadela em anestro (ETTINGER, 1992b FELDMAN; NELSON, 1987). Diestro é a fase

de elevada concentração de progesterona circulante. A duração é em média de 56 a 58 dias nas gestantes e 60 a 75 dias nas não gestantes (ETTINGER, 1992 b).

A concentração de progesterona no plasma eleva-se acima da concentração basal ($>0,5\text{ng/ml}$) 72 a 96 horas antes da ovulação. Depois da ovulação, o desenvolvimento do corpo lúteo ocorre na cavidade folicular, formando uma fonte contínua para manter a concentração plasmática de progesterona elevada. O pico da concentração de progesterona é originado desse corpo lúteo, e é geralmente atingido 20 a 30 dias após a ovulação. Esta secreção máxima ocorre aproximadamente 2 a 3 semanas depois do início do diestro, e um platô da concentração de progesterona persiste por 1 a 2 semanas. A concentração de progesterona nesse momento é muito maior que a concentração basal, normalmente chegando a 15 a 60 ng/ml. A concentração de estrógeno no início do diestro está normalmente em níveis basais (isto é, semelhante à concentração do anestro). A secreção de FSH e LH da pituitária durante o diestro ocorre em episódios não contínuos (FELDMAN; NELSON, 1987).

O anestro é o período de repouso do aparelho genital, inatividade sexual, com duração aproximada de 65 a 281 dias (ETTINGER, 1992b), 3 meses (DERIVAUX, 1980). Nesta fase a pituitária e o ovário são hormonalmente ativos. Esporádicas elevações na secreção de LH ocorrem durante o anestro nas cadelas, podendo resultar em dois breves, mas potentes, episódios secretórios. A concentração de estrógeno flutua significativamente durante o anestro, precedendo o começo do proestro há um declínio da concentração de estrógeno (FELDMAN; NELSON, 1987), que já estava em concentrações baixas no início e meio do anestro (ETTINGER, 1992b). A progesterona se mantém em extremamente baixa concentração durante o anestro, com níveis menores que 1,0 ng/ml (ETTINGER, 1992; WRIGHT, 1990).

3.3 Corpo Lúteo

O corpo lúteo desenvolve-se após o colapso do folículo na ovulação. Dentro de 24 horas após a ovulação todas as células tecais remanescentes encontram-se em avançado estado de degeneração. Após a ovulação inicia-se um processo hipertrófico e de luteinização das células

granulosas, as quais secretam progesterona sob a forma de grânulos. O aumento de peso do corpo lúteo é inicialmente rápido, seu período de crescimento geralmente ultrapassa um pouco a metade do ciclo estral. O diâmetro do corpo lúteo maduro é maior do que aquele do folículo de Graaf maduro (HAFEZ, 1995).

O corpo lúteo estimula o desenvolvimento folicular e a ovulação por meio de um mecanismo local intra-ovariano. Caso não ocorra a fertilização, o corpo lúteo regride, permitindo assim a maturação de outros folículos ovarianos. A medida que as células degeneram, todo o órgão diminui de tamanho, torna-se branco ou castanho claro, e agora é denominado de corpus albicans (AIUDI et al., 2006; HAFEZ, 1995).

A presença de um corpo lúteo funcional aumenta consideravelmente a irrigação sangüínea do ovário (NISWENDER et al., 1976). Durante a regressão, o fluxo sangüíneo para o ovárioluteinizado declina bruscamente. A irrigação sangüínea do corpo lúteo exerce um papel na regulação desta glândula e no controle da atividade dos hormônios gonadotróficos ao nível celular luteínico. Uma ação secundária do LH pode ser a de aumentar o fluxo sangüíneo para o corpo lúteo, e a PGF2 α afeta o componente vascular do corpo lúteo (HAFEZ, 1995).

3.4 Variações da Insulinemia no ciclo estral

Os hormônios esteróides sexuais influenciam a homeostasia da insulina e o metabolismo glicêmico. O estradiol (E2) e a progesterona (P4) induzem mudanças na insulinemia, tanto em jejum quanto no período pós-prandial em roedores. Morimoto et al. (2001) em seus estudos, utilizaram ratos adultos em cada dia do ciclo estral, e determinaram por radioimunoensaio as concentrações plasmáticas de progesterona, estradiol e insulina, e por Northern blot a expressão do gene da insulina no tecido pancreático. Eles encontraram uma variação marcante da expressão do gene da insulina durante o ciclo estral, sendo a maior expressão observada durante o proestro, e os níveis de progesterona e estradiol estavam correlacionados com as mudanças na expressão do mRNA da insulina. As variações da insulina plasmática no decorrer do ciclo correlacionaram-se

com o seu mRNA no pâncreas, e estas variações estão relacionadas aos níveis circulantes de P4 e E2. Para Barros et al. (2006b), a expressão do gene da insulina também é influenciado pelos níveis de E2; no proestro, quando há pico nos níveis de E2, a expressão do mRNA da insulina está diminuída no pâncreas (MORIMOTO, 2001). Campbell e Febbraio (2002) demonstraram em seus estudos com ratos ovariectomizados valores de insulina plasmática elevados quando estes eram tratados com progesterona.

Embora os hormônios ovarianos atuem primeiramente na reprodução, sabe-se que eles atuam também influenciando a homeostase da glicose (CAMPBELL; FEBBRAIO, 2002). Alteração na tolerância pós-prandial está correlacionada com as flutuações naturais dos hormônios ovarianos durante todo o ciclo menstrual (ELKIND HIRSCH et al., 1993; EZENWAKA et al., 1993). Além disso, o transporte de glicose estimulado pela insulina é freqüentemente (DIAMOND et al., 1989; VALDES; ELKIND-HIRSCH, 1991), mas não sempre (TOTH et al., 1987; YKI-JARVINEN, 1984) prejudicado durante a fase luteínica do ciclo menstrual. A progesterona é acusada de ser, pelo menos parcialmente, responsável por resistência insulínica durante a gravidez, e poderia possivelmente contribuir com o início da Diabetes mellitus gestacional (KUHL, 1991; RYAN; ENNS, 1988).

A progesterona é considerada o hormônio que mantém a gestação em cadelas, com sua concentração aumentando logo após o pico ovulatório de LH (hormônio luteinizante) (HADLEY, 1975; GRÄF, 1978; PURSWELL; PARKER, 2000; VANNUCCHI, 2000), apresentando pico entre 15 (GRÄF, 1978; VANNUCCHI, 2000) e 18 dias (HADLEY, 1975) e declinando continuamente até o parto ou final do diestro em cadelas não gestantes (HADLEY, 1975; GRÄF, 1978; VANNUCCHI, 2000). Já o estradiol é o hormônio que caracteriza o proestro, com pico 1 ou 2 dias antes do estro, ficando em níveis basais durante o diestro, e flutuando muito no anestro, mas com um declínio precedendo o proestro (FELDMAN; NELSON, 1987).

O aumento de níveis séricos de progesterona e/ou estrógeno está correlacionado com o aumento do hormônio do crescimento (GH). Este hormônio possui funções catabólicas sobre o metabolismo de carboidratos e gorduras, interferindo na atuação da insulina em tecidos

periféricos, e anabólicas sobre a produção de somatomedinas, que incrementam a condrogênese e o crescimento ósseo (FELDMAN; NELSON, 1987).

A progesterona atua de duas formas na resistência insulínica, a forma direta, em que diminui o transporte da glicose para os tecidos, e indiretamente induzindo a hipersecreção de hormônio do crescimento (GH) pelas glândulas mamárias, neste caso o GH diminui o número de receptores de insulina nas células e também diminui o transporte de glicose aos tecidos (CONCANNON et al., 1980; EIGENMANN, 1984; SELMAN et al., 1994). Segundo Swenson (1988) o GH atua em músculos e tecido adiposo como antagonista da insulina. Selman et al. (1994) demonstraram de forma experimental a diminuição da resistência insulínica após a diminuição das concentrações de progesterona em cadelas submetidas a OSH. Campbell e Febbraio, 2002, demonstraram em ratos ovariectomizados tratados com progesterona uma diminuição nos níveis de GLUT4 nos tecidos sensíveis à insulina.

3.5 Resistência Insulínica e Transportadores de glicose

A glicose é a principal fonte de energia utilizada pelas células dos mamíferos, mas por ser uma molécula polar, não é capaz de atravessar a membrana celular, sendo necessário transporte por difusão facilitada na maioria das células, e este mecanismo envolve proteínas transportadoras (PAPA, 1997).

Os transportadores de glicose são uma família de 14 membros, os quais permitem a difusão facilitada de glicose, por gradiente de concentração, através da membrana plasmática das células. São expressas de formas tecido e célula-específicas, e a função de uma mesma isoforma pode ser diferente de um tecido para outro, em consequência do processo de diferenciação celular (MACHADO et al., 2006).

O fato destes transportadores de glicose possuírem maior expressão em determinado tecido não quer dizer que não possam estar presentes em outro.

3.5.1 GLUT1

O GLUT 1 está presente nos eritrócitos e no tecido ovariano. Sugai, 2004, o detectou em corpo lúteo de vaca pelo método de RT-PCR. Zhou et al. (2000) detectaram GLUT 1 e seu mRNA em oócitos, células da granulosa e vasos sanguíneos ovarianos. O GLUT 1 também foi detectado em células da teca e granulosa de ovelhas (WILLIAMS et al., 2001) e em células da granulosa de ratas, tanto mRNA quanto proteína (KODAMAN; BEHRMAN, 1999). Lequarre et al. (1997) também detectaram a expressão de GLUT 1 em oócitos e embriões jovens bovinos por RT-PCR. As proteínas GLUT são inversamente reguladas pela concentração de glicose e a proteína GLUT 1 é positivamente regulada por um fator de crescimento análogo à insulina (IGF), pelo hormônio de crescimento da placenta e pela hipóxia tecidual. A expressão de GLUT 1 aumenta na gestação diabética e diminui em hipóxia crônica como uma tentativa de diminuir os efeitos patológicos dessas situações (BAUMANN et al, 2002).

3.5.2 GLUT 4

GLUT4 é um transportador de glicose encontrado apenas em tecidos insulino sensíveis: tecidos adiposo e muscular (MUECKLER, 1994). Tem como função a captação de glicose mediada pela insulina nestes tecidos. Modificações na expressão do gene do GLUT4 no tecido adiposo e no músculo esquelético estão correlacionados de maneira direta com aumento ou redução da sensibilidade insulínica (THORENS et al., 1990).

Nas células em repouso, o GLUT4 localiza-se principalmente no compartimento intracelular. O estímulo produzido pela insulina movimenta o GLUT4 deste compartimento, e sua rápida translocação em direção à membrana plasmática aumenta a captação de glicose, participando assim no controle da homeostase glicêmica em nível tecidual e plasmático (PIPER et al., 1991;

REA; JAMES, 1997). Esse mecanismo torna a captação de glicose em músculo e tecido adiposo dependente da transmissão do sinal insulínico.

A associação entre a resistência insulínica e a expressão do GLUT4 já está bem estabelecida (BERGER et al., 1989; KAHN et al., 1989; KERN et al., 1990; SIVITZ et al., 1989). Sivitz et al. (1989) observaram um drástico declínio nos níveis de mRNA do GLUT4 em tecido adiposo de ratos em jejum; e em 1990 demonstraram que a glicemia não influencia a expressão do mRNA do GLUT4 in vivo, mas sugere que a insulina seja o maior fator regulatório dos níveis do mRNA do GLUT4 no tecido adiposo.

Papa et al. (2002) investigaram as alterações de conteúdo da proteína transportadora de glicose GLUT4 em tecidos sensíveis à ação da insulina como músculo esquelético e tecido adiposo branco, durante o processo de evolução de um modelo de animais obesos. A instalação da obesidade nestes animais compreendeu, entre outras alterações, a hiperglicemia, a hiperinsulinemia e a resistência insulínica, como a observada em cadelas durante a fase luteínica do ciclo estral. Neste estudo observou-se que o GLUT4 mostrava-se aumentado nos tecidos estudados durante a fase de maior sensibilidade à insulina e diminuído quando estes animais já apresentavam quadro de resistência insulínica

Em ratos, sabe-se que o aumento da idade é caracterizado pelo desenvolvimento espontâneo de um quadro de obesidade, acompanhado de resistência insulínica (MACHADO et al., 1994). Obesidade, Diabetes mellitus tipo 2 Diabetes mellitus tipo 1 tratada com insulina estão claramente relacionadas à resistência insulínica (DE FRONZO; FERRANINI, 1991).

Diminuição nos níveis do GLUT4 no tecido adiposo relaciona-se com obesidade e desenvolvimento de resistência insulínica (SHEPHERD; KAHN, 1999). Diminuição do GLUT4 em tecido muscular também é observada na presença de obesidade. Isso foi comprovado nos estudos de Lin et al. (1991) com ratos.

Embora o músculo esquelético seja o principal sítio de captação de glicose estimulada pela insulina, alguns estudos demonstram que a resistência insulínica se iniciaria no tecido adiposo, e

que este tecido teria um papel importante na sua indução em músculo esquelético e fígado (SMITH, 2002).

Houmard et al. (1995) observaram em humanos idosos diminuição do GLUT4 em tecido muscular, e relacionado com a instalação da resistência insulínica. De Fronzo e Ferranini (1991) demonstraram, em humanos, dois mecanismos que podem levar à instalação da resistência insulínica, sendo eles ingestão excessiva de calorias que induz um quadro de obesidade, e a herança genética que induz a instalação da diabetes, ambos com conseqüente instalação da resistência insulínica. A resistência insulínica, por sua vez, conduz à instalação da hiperinsulinemia (resposta das células β à resistência insulínica do organismo).

Nos humanos e na maioria dos modelos experimentais, a resistência insulínica associa-se com obesidade, porém algumas situações de resistência insulínica sem obesidade também já mostraram que são acompanhadas de redução na expressão do GLUT4, são elas: gestação, DM e síndrome dos ovários policísticos. Em seus estudos, Lima e colaboradores (1998) e Zanquetta et al. (2003) utilizando modelo animal de resistência insulínica sem obesidade (ratos pinealectomizados), mostrou que a falta de melatonina induz redução do GLUT4 em tecido adiposo e muscular. Essas observações reforçam a associação entre redução do GLUT4 e resistência insulínica, independente da presença da obesidade. Portanto, tanto redução no conteúdo de GLUT4 como defeito na sua translocação do intracelular para a membrana plasmática foram observados em modelos animais e em humanos com obesidade e/ou resistência insulínica e/ou Diabetes mellitus tipo 2 (MACHADO et al., 2006).

O tecido adiposo é um órgão dinâmico que secreta fatores denominados adipocinas. Estas adipocinas, em sua grande maioria, estão relacionadas, direta ou indiretamente, a processos que contribuem na aterosclerose, hipertensão arterial, resistência insulínica e diabetes tipo 2 (ARNER, 1995; HSUEH; LAW, 2003). Dentre elas destacam-se o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6), o inibidor de plasminogênio ativado-1 (PAI-1), a proteína C reativa (PCR), a resistina, a proteína estimulante de acilação (ASP) e os fatores envolvidos no sistema renina angiotensina (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004). TNF- α , IL-6 e resistina reduzem a ação da insulina, e a adiponectina tem ação contrária (ARNER, 1995, MACHADO et al., 2006). TNF- α suprime a sinalização da insulina (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004), e em

níveis elevados suprimem a adiponectina e o GLUT4 no tecido adiposo (ARNER, 1995; RAJALA; SCHERER, 2003).

A resistina é uma proteína com propriedades pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, secretada por monócitos e adipócitos (MCTERNAN et al., 2002; MISRA; VIKRAM, 2003). Ela promove resistência insulínica por meio de aumento da glicogênese hepática, tendo rápido efeito sobre este tecido (RAJALA; SCHERER, 2003). Como outros fatores pró-inflamatórios, a resistina tem potencial ação aterogênica pelo aumento da expressão de moléculas de adesão intercelular-1 e antivascular-1 em células endoteliais vasculares e pelo aumento da atividade do fator NF- $\kappa\beta$, sinalizador para indução de adesão destas moléculas (KAWANAMI et al., 2004).

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6) aumentam a liberação de ácidos graxos livres (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004), e estes influenciam o transporte de glicose para as células, competindo como substrato energético utilizado especialmente nos músculos oxidativos aeróbios. Esta produção aumenta muito na obesidade e está associada à geração da resistência insulínica nesta condição, uma vez que inibe a via de sinalização da insulina e a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática (GUERRE-MILLO, 2004; HOTAMISLIGIL et al., 1994), assim como pode reprimir a expressão de GLUT4 nos adipócitos (HOTAMISLIGIL; SPIEGELMAN, 1994).

Não só a obesidade, mas também outros fatores predispõem a resistência insulínica. O aumento de níveis séricos de progesterona e/ou estrógeno está correlacionado com o aumento do hormônio do crescimento (GH). Este hormônio possui funções catabólicas, com ação no metabolismo de carboidratos e gorduras, interferindo na atuação da insulina em tecidos periféricos, e anabólicas com produção de somatomedinas, que incrementam a condrogênese e o crescimento ósseo (FELDMAN; NELSON, 1987).

A progesterona atua de duas formas na resistência insulínica, a forma direta, em que diminui o transporte da glicose para os tecidos, e indiretamente induzindo a hipersecreção de hormônio do crescimento (GH) pelas glândulas mamárias, neste caso o GH diminui o número de receptores de insulina nas células e também diminui o transporte de glicose aos tecidos (CONCANNON et al., 1980; EIGENMANN, 1984; SELMAN et al., 1994). Segundo Swenson (1988) o GH atua em

músculos e tecido adiposo como antagonista da insulina. Selman et al. (1994) demonstraram de forma experimental a diminuição da resistência insulínica após a diminuição das concentrações de progesterona em cadelas submetidas a OSH. Campbell e Febbraio (2002) demonstraram em ratos ovariectomizados tratados com progesterona uma diminuição nos níveis de GLUT4 nos tecidos sensíveis à insulina.

3.6 Regulação da expressão do GLUT4

Sugaya et al. (2000) demonstraram que o estradiol e a progesterona estão envolvidos na regulação da expressão do mRNA do GLUT4 no tecido adiposo, e que as mudanças ocorridas no tecido muscular não são significativas, isso através de tratamento com estes hormônios em ratas ovariectomizadas. Os níveis de mRNA do GLUT4 no tecido adiposo sofrem redução significativa na presença do estradiol, e isso não ocorre da mesma maneira com a progesterona (SUGAYA et al., 1999). O estradiol participa na homeostasia da glicose pela modulação da expressão dos genes que estão envolvidos na sensibilidade à insulina e na captação de glicose (BARROS et al., 2006a).

A contração muscular é um estímulo mais distante para o transporte de glicose do que a insulina (PLOUG et al., 1987). Os mecanismos para o transporte de glicose mediado pela insulina e pela contração muscular são completamente diferentes (HAYASHI et al., 1999). Zderic et al. (2001) demonstraram recentemente que a disposição da glicose está diminuída durante o exercício na fase luteínica comparada com a fase folicular em mulheres saudáveis. Entretanto, por causa das mudanças nas concentrações dos hormônios ovarianos durante todo o ciclo menstrual, é difícil verificar os efeitos individuais do estrógeno e da progesterona nos estudos em humanos (CAMPBELL e FEBBRAIO, 2002).

Sabe-se que a condição de hiperglicemia pode regular a função dos transportadores de glicose, os quais sofrem uma internalização celular, diminuindo sua expressão (LI et al, 2004). DAS et al.

(1999) relataram em casos de hiperglicemia, uma “downregulation” de proteínas transportadoras de glicose para proteger a célula de uma provável toxicidade causada pelo excesso de glicose.

Alguns estudos realizados em ratos têm indicado a existência de uma regulação da expressão de GLUT 4 pelos hormônios tireoideanos, essa regulação já foi comprovada em musculatura esquelética vermelha por Torrance et al. (1997).

A regulação da homeostasia intra e extra-celular da glicose está diretamente relacionada ao controle preciso da expressão dos genes que codificam as diferentes isoformas de proteínas transportadoras de glicose, as quais se expressam de maneira tecido-específica, em consequência do padrão de ativação dos fatores transcricionais reguladores de cada gene, em cada tipo celular (MACHADO et al., 2006).

A regulação da transcrição do gene GLUT4 envolve o controle de fatores transcricionais, e estes podem ativar ou inibir a transcrição do gene. Os ativadores da transcrição do GLUT4 são: MEF2 (MACLEAN et al., 2000; MOLKENTIN et al., 1996; MORA; PESSIN, 2000; NAYA; OLSON, 1999; THAI et al., 1998), PPAR- γ (EZAKI, 1997), TR α 1 (SANTALUCIA et al., 2001), NRF-1 (DOHM, 2002) e o KLF15 (GRAY et al., 2002). No papel de inibidor da transcrição do gene do GLUT4 encontra-se o NF- κ B, que foi caracterizado como mediador da ação do fator de necrose tumoral TNF- α (RUAN et al., 2002). A expressão aumentada da interleucina-6 também leva a uma redução da expressão do GLUT4, porém em tecidos muscular e hepático (LYON, et al., 2003; MOHAMED-ALI et al., 2001; REXRODE, et al., 2003; SMITH, 2002).

Sob condições de hipóxia as células seguem um caminho metabólico independente de oxigênio, utilizando a glicólise como mecanismo primário na produção de ATP (DANG; SEMENZA, 1999; SEAGROVES et al., 2001), e a glicólise fornece apenas 2 moléculas de ATP para cada molécula de glicose. Muitos genes envolvidos na absorção de glicose e na glicólise foram identificados como gens alvo do HIF-1 (LEE et al., 2004; WENGER, 2000). O HIF-1 (fator induzível por hipóxia) não só regula todas as enzimas no caminho glicolítico, mas também modula a transcrição dos transportadores de glicose GLUT 1 (EBERT et al., 1996; CHEN et al.,

2001 a) e GLUT 3 (EBERT et al., 1996), que mediam a absorção de glicose celular (CHEN et al., 2001b). E considerando-se que a hipóxia, por si só, pode aumentar a expressão do GLUT4 (ROYER et al., 2000), o HIF-1 representa um potencial modulador da transcrição do GLUT4 (SILVA et al., 2005).

Dentre as adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, encontramos a resistina, e esta tem a capacidade de aumentar a expressão de moléculas de adesão intercelular-1 e antivascular-1 em células endoteliais vasculares, além de aumentar a atividade do fator NF- κ B, sinalizador para indução de adesão destas moléculas (KAWANAMI et al., 2004). O TNF- α (fator de necrose tumoral), outra adipocina secretada pelo tecido adiposo, induz a mudanças rápidas na expressão do gene do adipócito que é suficiente para desencadear o desenvolvimento de resistência insulínica *in vitro*. Dado que o TNF- α é expressado ao extremo no tecido adiposo de indivíduos obesos, quaisquer defeitos induzidos pelo TNF- α na transdução de sinais insulínicos em adipócitos ou mudanças dependentes do TNF- α na expressão do gene adipócito poderiam ser essenciais para a ocorrência de resistência à insulina em humanos. O NF- κ B tem um papel na indução do TNF- α na resistência insulínica (RUAN et al., 2002).

4 MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

O material e método foi dividido conforme os itens a seguir.

4.1 Grupos experimentais

Foram utilizados corpos lúteos provenientes de 28 cadelas de diferentes idades e sem padrão racial definido. Os animais estavam alojados em um canil localizado no município de Itapeberica da Serra, apresentavam-se saudáveis e bem nutridas, sem histórico de alterações e/ou doenças do aparelho reprodutor.

As cadelas foram divididas em 7 grupos (n = 4 por grupo), as quais foram submetidas à OSH (ovariosalpingohisterectomia) aos 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 dias após a ovulação.

4.2 Detecção da data de ovulação

O acompanhamento das cadelas a serem ovariosalpingohisterectomizadas ocorreu a partir do surgimento de sinais de proestro, como edema vulvar e secreção vaginal sanguinolenta. Com o surgimento de tais sinais foram iniciadas as coletas de sangue, feitas em dias alternados. A partir desse material foram feitas dosagens de progesterona sérica a fim de se detectar a data de ovulação de cada animal ($P4 \geq 5\text{ng/ml}$, Concannon et. al., 1989), e programar as cirurgias para a obtenção dos corpos lúteos.

4.3 Protocolo anestésico

Foi utilizada como medicação pré-anestésica a Acepromazina 0,2% na dose de 0,5 a 1,3 ml para cada 10 Kg de peso vivo. Como medicação anestésica foram utilizados cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina nas doses de 0,2 ml/Kg e 0,1 ml/kg, respectivamente, ambos por via intramuscular.

4.4 Protocolo cirúrgico

Primeiramente realizou-se incisão abdominal de aproximadamente 5 cm na linha alba, caudalmente à cicatriz umbilical. Após localização do primeiro corno uterino com o dedo indicador, foi aplicada uma pinça no ligamento próprio do ovário, enquanto o ligamento suspensor foi divulsionado com o dedo indicador. O pedículo ovariano foi pinçado três vezes, a secção foi feita entre a pinça mais próxima ao ovário e a pinça média. A pinça mais distante ao ovário foi removida e a ligadura do pedículo foi feita no sulco deixado pelo instrumento.

Nas ligaduras foram usados fios não absorvíveis monofilamentosos de Nylon 2-0. O pedículo foi pinçado com pinça hemostática, a última pinça foi removida e o pedículo inspecionado quanto a possíveis hemorragias. O pedículo foi reposicionado no abdômen e a pinça hemostática foi removida. O processo foi repetido no pedículo ovariano oposto.

No corpo uterino também foram colocadas três pinças na região imediatamente cranial à cérvix. O corpo uterino foi seccionado entre as pinças proximal e intermediária e as artérias uterinas ligadas, quando necessário, individualmente. A pinça mais caudal foi removida e o útero ligado no sulco deixado por este último instrumento. O pedículo foi pinçado com uma pinça hemostática, a pinça intermediária foi removida, o pedículo inspecionado quanto a possíveis hemorragias e depois recolocado no abdômen removendo-se a pinça hemostática.

A sutura interna foi feita com fio não absorvível monofilamentoso de Nylon 2-0 e a sutura externa com fio de algodão preto 2-0. O curativo foi feito com nitrofurazona, atadura de crepe e esparadrapo. Foi aplicado como antibiótico a Benzilpenicilina benzatina 1.200.000 UI na dose de 40.000 UI por Kg de peso vivo. O curativo e a aplicação do antibiótico foram refeitos a cada dois dias durante 7 dias.

4.5 Coleta dos corpos lúteos

Logo após a excisão dos ovários e útero esse material foi processado para obtenção dos corpos lúteos. Estes foram separados do restante dos ovários através de dissecação e, em seguida, foi injetada solução fisiológica (NaCl 0,9%) no material coletado com a finalidade de retirar grande parte do sangue contido no interior do tecido, para redução de possíveis interferências nos resultados. Os corpos lúteos foram então congelados em nitrogênio líquido para futuro processamento.

4.6 Dosagem hormonal

4.6.1 Dosagem de progesterona e estradiol

Para a dosagem da progesterona (P4) e do estradiol-17 β (E2 β) foram utilizados os meios de cultura e Kits de radioimunoensaio Genese®, onde a progesterona e o estradiol marcados com I¹²⁵ competiram por sítios de anticorpos fixos em tubos de polipropileno, com a progesterona e o estradiol presentes nas amostras. Após a realização dos procedimentos descritos para a montagem da reação, e decorridas 3 horas de incubação em temperatura ambiente, findou-se a competição, e a progesterona e o estradiol radiomarcados estavam separados da fração de (P4) e (E2 β) que se ligaram aos anticorpos. Em seguida, os tubos foram colocados em um contador gama, o qual

forneceu um número, que convertido por meio de uma curva padrão, determinou os níveis destes hormônios esteróides presentes nas amostras analisadas.

A precisão intra-ensaios da progesterona foi determinada a partir da média de várias replicatas para cada amostra (Quadro 1).

Amostra	Média (ng/mL)	Coefficiente de Variação
I	0,77	6,4%
II	5,75	3,3%
III	14,55	5,6%

Quadro 1 – Precisão intra-ensaios da progesterona

E a precisão inter-ensaio da P4 foi determinada a partir da média de duplicatas de 10 corridas separadas (Quadro 2).

Amostra	Média (ng/mL)	Coefficiente de Variação
I	0,81	2,4%
II	1,17	1,7%
III	11,40	3,3%

Quadro 2 – Precisão inter-ensaio da progesterona

Para o estradiol a precisão intra-ensaio foi determinada a partir da média de 14 replicatas de cada uma das 3 amostras de seres humanos utilizadas (Quadro 3).

Amostra	Média (ng/mL)	Coefficiente de Variação
I	0,35	9,2%
II	8,98	4,6%
III	59,33	4,7%

Quadro 3 – Precisão intra-ensaios do estradiol

E a precisão inter-ensaio do E2 β foi determinada a partir da média dos valores das duplicatas em 8 série independentes realizadas com 3 amostras de seres humanos em um período de 8 dias (Quadro 4)).

Amostra	Média (ng/mL)	Coefficiente de Variação
I	0,08	8,8%
II	0,49	5,1%
III	11,30	5,5%

Quadro 4 – Precisão inter-ensaio do estradiol.

4.6.2 Dosagem de insulina

Para a dosagem de insulina foram utilizados os meios de cultura e Kits de radioimunoensaio de fase sólida Coat-A-Count®, onde a insulina marcada com I¹²⁵ compete por sítios de anticorpos fixos em tubos de polipropileno, com a insulina presente na amostra. Após a realização dos procedimentos descritos para a montagem da reação, e decorridas 3 horas de incubação em temperatura ambiente, findou-se a competição, e a insulina radiomarcada estava separada da fração de insulina que se ligou aos anticorpos. Em seguida, os tubos foram colocados em um contador gama, o qual forneceu um número, que convertido por meio de uma curva padrão, determinou os níveis deste hormônio presente nas amostras analisadas.

Na precisão intra-ensaio (dentro do ensaio) as estatísticas foram calculadas para cada 5 amostras dos resultados dos 20 pares de tubos em um único ensaio. O estudo foi realizado usando-se o procedimento alternativo(Quadro 5).

Amostra	Média (μU/ml)	Coefficiente de Variação
1	17	9,3%
2	39	5,1%
3	80	3,5%
4	117	3,1%
5	278	5%

Quadro 5 – Precisão intra-ensaios da insulina

Já na precisão inter-ensaio (ensaio a ensaio) as estatísticas foram calculadas para cada 4 amostras dos resultados dos pares de tubos em 20 ensaios diferentes. O estudo foi realizado usando o procedimento básico (Quadro 6).

Amostra	Média (μU/ml)	Coefficiente de Variação
1	16	10,0%
2	35	7,1%
3	76	7,2%
4	95	4,9%

Quadro 6 – Precisão inter-ensaio da insulina

4.6.3 Dosagem de Glicemia

A glicemia foi analisada através do método enzimático colorimétrico de glicose-oxidase da empresa CELM. Este método é específico para determinação da concentração de glicose no sangue e outros líquidos biológicos (LOTT; TURNER, 1975). Iniciou-se o processo adicionando-se o reativo de trabalho fornecido pelo Kit nos tubos das amostras, e seguiu-se de incubação por 10 minutos em banho a 37°C. Após a retirada das amostras do banho procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 505nm. Aguardou-se 60 minutos para obtenção dos resultados.

A empresa processou as amostras em 21 dias diferentes, e obteve os seguintes resultados (Quadro 7):

Nível	Coefficiente de variação
94,9 mg/dL	3,7%
233,9 mg/dL	2,2%

Quadro 7 – Reprodutibilidade da glicemia

4.7 Procedimentos Experimentais

4.7.1 Extração do RNA

No Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Fisiologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *Campus* de Botucatu, sob coordenação do Prof. Dr. José Buratini Jr, foi realizada a extração do RNA total de todas as amostras a partir do protocolo de Trizol[®], seguida da transcrição reversa utilizando-se Transcriptase Reversa (Superscript III Invitrogen Carlsbad, CA - USA) para a confecção do cDNA.

4.7.2 Descrição do método de Trizol[®] (Invitrogen) para extração do RNA total

Transferimos os corpos lúteos para tubos eppendorf de 1,5 ml RNase free e estes foram armazenados à temperatura de -80°C até análise. Cerca de 40 mg de tecido foram pesados, acrescidos de 500 μl de Trizol e homogeneizados com o auxílio do aparelho homogenizador de tecidos, POLITRON ou TISSUMIZER (Ultraturrax - T25 basic, IKA Works INC, Wilmington - NC - USA). O aparelho homogenizador foi lavado com água DEPC (Diethyl Pirocarbonato), água RNase-ZAP (removedor de RNase) e novamente água DEPC após cada amostra. Em seguida, 200 μl de clorofórmio foram adicionados em cada eppendorf com amostra, os tubos foram fechados e agitados vigorosamente por aproximadamente 15 segundos e incubados a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos, a 11.000 rpm a 2 a 8°C .

Enquanto isso, identificaram-se novos tubos aos quais foram acrescentados 500 μl de isopropanol. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante, o qual foi transferido para os tubos contendo isopropanol, homogeneizados suave e manualmente, e incubados a temperatura

ambiente por 10 minutos. Novamente centrifugaram-se as amostras por 10 minutos, 11.000 RPM a 2 a 8°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado (RNA-Total) solubilizado com 1 ml de álcool 75% diluído em água DEPC. Uma nova centrifugação foi realizada por 5 minutos, 7.500 RPM a 2 a 8 °C, o excesso de álcool retirado e o precipitado (RNA Total) solubilizado em 20 µl de água GIBCO. Nova incubação foi realizada, por 10 minutos em banho maria a 58 °C. As amostras foram submetidas a um pulso de centrifugação e colocadas em gelo para realização da leitura de concentração do RNA no Biofotômetro (Eppendorf, Hamburg - Germany).

4.7.3 Transcrição Reversa (construção da fita de DNA complementar – cDNA)

Cada tubo contendo RNA total foi tratado com 2µl de uma mistura de tampão contendo DNase (Invitrogen Carlsbad, CA – USA) (1µl de tampão e 1µl de DNase), e necessitou de incubação de 15 minutos em temperatura ambiente, para se obter a segurança de que os resultados são oriundos do mRNA e não do DNA genômico. Completado esse tempo, adicionou-se 1µl de EDTA 25mM para inativar a DNase. Os tubos foram então levados ao termociclador por 10 minutos a 65 °C para o término do bloqueio da DNase. Em seguida foram retirados de cada tubo 8µl, aos quais foram adicionados 1µl de Oligo DT, 1 µl de dNTPs e 3 µl de água para cada amostra. As amostras foram incubadas no termociclador por 5 minutos a 65 °C. A seguir, foram acrescentados aos tubos: 4 µl do buffer 5X Superscript III ; 1 µl de DTT 1 M; 1 µl de RNase OUT e 1µl de Superscript. Os tubos voltaram ao termociclador por 50 minutos a 50 °C seguido de 15 minutos a 70 °C. Depois disso os tubos foram todos levados ao freezer –80 °C. Todos os reagentes e enzimas utilizados eram provenientes da (Invitrogen Carlsbad, CA – USA).

4.7.4 Padronização da Reação de PCR em tempo real

Para o cálculo da eficiência de competição dos gene-alvo (GLUT4, HIF-1) do controle endógeno (GAPDH), uma amostra foi diluída nas proporções 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32.

4.7.5 PCR em tempo real

Todas as amostras, de todos os grupos, foram diluídas na razão de 1:4 e submetidas ao PCR em Tempo Real (Real Time PCR) no aparelho ABIPrism[®] 7500. Neste sistema, as fases de anelamento, extensão e desnaturação ocorrem durante os ciclos de maneira similar quando da utilização do termociclador comum, uma vez que o ABIPrism 7000/7500 é um termociclador acoplado a uma câmera CCD. A diferença é que a amplificação da seqüência alvo é detectada em tempo real pela emissão de fluorescência.

O sistema adotado no LEME do Departamento de Cirurgia, Setor de Anatomia da FMVZ/USP para a detecção da expressão gênica do GAPDH, GLUT4, HIF-1 foi o sistema TaqMan. No sistema TaqMan, além do par de primers, é necessária a utilização de uma sonda que, por ter um T_m (temperatura de melting) mais alto (cerca de 10°C de diferença), se hibridiza de forma específica com a fita molde de cDNA antes do par de primers. A sonda é composta na sua extremidade 5' por fluoróforo R (repórter dye, denominado de FAM) cuja fluorescência, quando a sonda está íntegra, é capturada pelo Quencher (NFQ) acoplado ao MGB (Minor Groove Binder – que aumenta a T_m). O MGB é a substância que permite a construção da sonda com a diferença de 10°C em relação ao primer.

Através da atividade corretiva 5' exonuclease da Taq polimerase, o fluoróforo é clivado e a fluorescência emitida é capturada pela câmera CCD do equipamento. Assim, durante o processo de extensão iniciado pelo par de primers, a sonda se separa da fita molde, e nesse momento ocorre a liberação do fluoróforo.

A quantificação relativa da amplificação é feita pela fluorescência captada pela unidade óptica do aparelho.

Conforme a reação de amplificação se processa, um gráfico é construído, e nele a ordenada corresponde ao número de cópias e a abscissa ao número de ciclos. A amplificação é detectada na fase exponencial, onde as condições “ótimas” para o PCR são mantidas. Neste período, os substratos para a amplificação ainda estão presentes nas concentrações ideais. Pelas características do sistema, no PCR em tempo real é possível determinar este perfil de amplificação, o que representa uma das vantagens metodológicas.

O ponto na abscissa correspondente ao início do trecho linear é chamado de Ct (*cycle threshold* = limiar de corte) e este valor é utilizado para a comparação relativa da expressão gênica: quanto menor o Ct, teoricamente mais expressa é determinada mensagem, ou seja, a diferença de 1 Ct, representa o dobro de expressão.

Etapa de PCR	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de Ciclos
1 Descontaminação de carry-over via UNG	50	2 min	X 1 ciclo
2 Pré-ativação da DNA polimerase	95	10 min	X 1 ciclo
3 Etapa de desnaturação	95	15 segundos	X 40 ciclos
4 Etapa de anelamento/ extensão (combinadas)	60	1 min	X 40 ciclos

Quadro-8 - Protocolo de termociclagem universal

4.7.6 Sequências

As sequências iniciadoras (primers) e as sondas (probe) específicas para GAPDH, GLUT4, HIF-1 e NFκB estão descritas no quadro 9.

Gene (GeneBank#)	PRIMERS	TAMANHO DO AMPLICON	PROBE*
GAPDH	▶ GCTGCCAAATATGACGACATCA ◀ GTAGCCCAGGATGCCTTTGAG	75bp	TaqmanTCCCTCCGATGCCTGCTTCACTAC CTT AB028142
GLUT4	▶ GCCTGCCAGAAAGAGTCTGAAG ◀ CAGTGCCCCAGATACAT	58 bp	TaqmanGCTTCCGCTTCTCCTCCTT
HIF-1	▶ GCTGCTGGAGACACAATCATATCTT ◀ ACATCATTATACAACGGAACCTCCT CAAG	71 bp	Taqman CAATGACACAGAAACTG

*Características de monitoramento dos sinais fluorescentes do sistema 7000 ou 7500 gerados durante o PCR pelos fluoróforos FAM™, e VIC™. ▶ = forward; ◀ = reverse. Os primers e probes para a GLUT4 e HIF-1 foram desenhados pelo serviço Assays-by-DesignSM de expressão gênica (Applied Biosystems); GAPDH foi desenhado pelo Custom Oligo Synthesis Service (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Quadro-9 - Primers, probes e seus respectivos produtos de amplificação

4.7.7 Cálculo da Expressão Relativa dos genes alvo a partir dos resultados do PCR

No método comparativo para a expressão relativa (ratio) de um gene alvo em comparação a um gene de referência, baseado na eficiência dos primers (PFAFFL, 2001), a quantidade do gene alvo é normalizada a um controle endógeno e calculada em relação a um calibrador.

Fórmula:

$$\text{ratio} = \frac{(E \text{ target})^{\wedge\text{CP target (contol-sample)}}}{(E \text{ ref})^{\wedge\text{CP ref (contol-sample)}}$$

E target = eficiência do gene alvo

E ref = eficiência do gene constitutivo

$\wedge\text{CP target}$ = Ct do controle menos a amostra do gene alvo transcrito

$\wedge\text{CP ref}$ = Ct do controle menos do gene constitutivo transcrito

4.8 Western blotting

A proteína total das amostras foi extraída com tampão de homogeneização acrescentado aos tecidos em proporção peso : volume 1 : 6. A homogeneização feita em polytron, a 24.000 rpm, durante 30 segundos. Em seguida, realizou-se uma centrifugação a 1000 g durante 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi separado e o precipitado ressuspense em mesmo tampão (1 / 3 do volume inicial) e submetido a nova centrifugação a 1000 g por 10 minutos, a 4 °C. Juntos, os dois sobrenadantes foram submetidos a uma ultracentrifugação a 150.000 g durante 75 minutos, a 4 °C. Este novo sobrenadante formado foi desprezado e o sedimento ressuspense em tampão de homogeneização e estocado a - 20 °C, correspondendo ao conjunto de membranas totais. A proteína total presente nas amostras foi dosada através do método de Lowry.

Conhecidas as concentrações protéicas das diferentes amostras de tecidos, estas foram submetidas ao método de “Western blotting” para quantificação do transportador de glicose GLUT 4.

O método envolve os seguintes passos:

4.8.1 “SDS-PAGE” - (“Sodium Dodecil Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis”)

O primeiro passo do Western blotting consiste em submissão das amostras a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Através deste método foi possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades protéicas fossem perdidas, permitindo estudos posteriores nessas frações protéicas. Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes: o gel de resolução (“stacking” gel 6 % T, 2,7 % C) e o gel de separação (10 % T, 2,7 % C). Amostras de frações de membranas (50 µg de proteína / *lane*) foram solubilizadas em tampão de Laemmli (Tris 0,5 M pH 7,5; SDS 9 %; glicerol 15 %; bromofenol blue 0,05 %; 2-mercaptoetanol 6 %) e, então, submetidas à fervura durante 3 minutos para posterior aplicação no sistema de corrida. A eletroforese foi realizada sob voltagem constante de 70 V para o gel de stacking durante cerca de 1 hora, e o gel de separação foi submetido a corrente constante de 66 mA, durante cerca de 5 horas, utilizando-se como tampão de corrida Tris HCl 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1 %, EDTA 2 mM, pH 8,3. Juntamente com as amostras, sempre colocou-se um padrão de proteínas de conhecidos pesos moleculares (marcadores), o que facilitou a localização da proteína desejada para o estudo.

4.8.2 “Electrophoretic transfer”

Após a separação das frações protéicas em gel de poliacrilamida, fez-se a transferência eletroforética dessas frações para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL. A transferência realizou-se sob corrente constante de 35 mA, “overnight”, a 4 °C, utilizando-se como tampão de transferência Tris HCl 12,5 mM, glicina 95 mM, metanol 20 %, pH 8,3. A qualidade da transferência pode ser avaliada corando-se o gel pós-transferência com azul brilhante de Coomassie. Esta metodologia é baseada em Timmons & Dunbar (1990).

4.8.3 “Immunoblotting”

Após a transferência eletroforética, iniciou-se o processo de imunodeteção de proteínas específicas, conforme o anticorpo utilizado. Primeiramente a membrana de nitrocelulose foi incubada na presença de PBS pH 7,2 (NaCl 0,8 %; Na₂HPO₄ . (12 H₂O) 0,115 %; KCl 0,02 %; KH₂PO₄ 0,02 %) acrescido de leite desnatado com concentração de 5% de proteína, durante 1 hora a temperatura ambiente, em agitação constante. Depois realizaram-se 2 lavagens rápidas da membrana de nitrocelulose com tampão PBS pH 7,2 , seguida por incubação na presença do anticorpo, anti - GLUT 4 (diluição 1:3000), em estufa a 37 °C, durante 3 horas. Posteriormente, realizou-se 2 lavagens da membrana de nitrocelulose cada uma com 10 mL de solução de lavagem (tampão PBS pH 7,2 acrescido de 0,1% de Tween 20). Realizou-se nova lavagem durante 15 minutos com a mesma solução, sendo esta realizada sob agitação constante, seguidas de mais 3 lavagens, novamente com a mesma solução. A membrana, então, foi incubada durante 1 hora com anti-corpo de coelho com HRP (Horse Radish Peroxidase) diluído 1:10000 em solução de PBS pH 7,2 com BSA 1% a temperatura ambiente. Após essa incubação foi realizada a seguinte seqüência de lavagens usando a solução de lavagem (tampão PBS pH 7,2 acrescido de 0,1% de Tween 20): 2 lavagens rápidas, seguida por nova lavagem de 15 minutos e 4 lavagens de 5 minutos cada. Por fim foram usadas as soluções A e B do KIT ECL[®] Amershan na diluição 1:40 e aplicado sobre a membrana de nitrocelulose durante 5 minutos, iniciando assim a reação de quimioluminescência.

Por fim, a membrana de nitrocelulose foi exposta a Hyperfilm[®]. O filme foi revelado com solução reveladora e reforçadora GBX e solução fixadora e reforçadora GBX, sendo evidenciados os “blots” correspondentes à proteína transportadora GLUT 4. As bandas expostas ao filme foram analisadas por meio de densitometria óptica através do software (IMLD-Pharmacia Biotech, Uppsala, sw), e os resultados foram apresentados em unidades arbitrárias.

4.9 Análise Estatística dos resultados

Devido a não distribuição normal dos dados obtidos através do PCR em tempo real para os mRNAs de GLUT-4 e HIF-1 α ($6\% < CV < 57\%$), foi aplicado o Teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico) seguido do Teste de Comparações Múltiplas de Dunn. Para testar a relação entre as expressões dos mRNAs para GLUT-4 e HIF-1 α e, entre estes e a glicemia e a insulinemia, além da produção de P4 e E2 β no corpo lúteo canino, foi aplicado o Teste de Correlação de Pearson. Para todos os testes foi utilizado o software estatístico GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Progesterona (P4) e Estradiol (E2 β) Séricos

A progesterona plasmática apresentou pico de concentração aos 20 dias p.o., com concentração plasmática de 13,22 ng/ml, valores pouco menores do que deste grupo aos 40 dias p.o. (8,39 ng/ml), e valores basais dos 50 aos 70 dias pós ovulação (Figura 1)

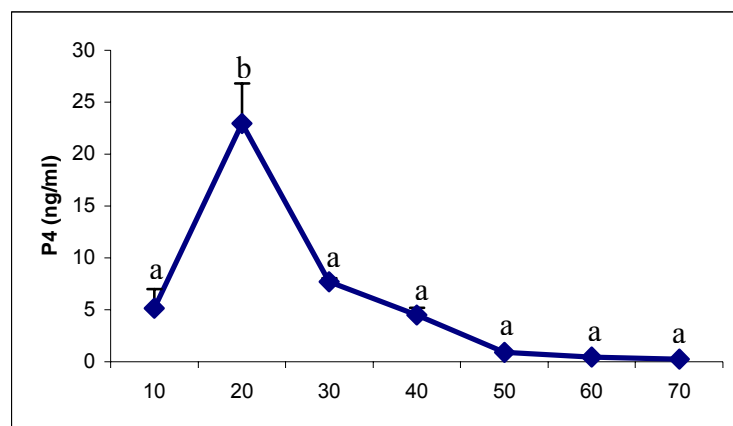


Figura 1: Expressão da progesterona sérica de cadelas sadias ao longo do diestro (10 a 70 dias pós ovulação). Os valores representam $\bar{x} \pm DP$ (n= 4/ grupo). a, b: Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre o grupo de 20 dias p.o e os demais grupos.

O estradiol plasmático apresentou aumento gradativo dos 10 até os 40 dias p.o., onde obteve seu pico de concentração de 27,27 pg/ml, seguido de valor semelhante (25,51 pg/ml) aos 50 dias p.o., e de sua menor concentração (1,4 pg/ml) aos 60 dias pós ovulação (Figura 2).

É importante salientar que a concentração plasmática de E2 variou inclusive entre os animais de um mesmo grupo. Isso ocorreu de maneira mais significativa nos grupos de 20, 30, 40 e 50 dias pós ovulação.

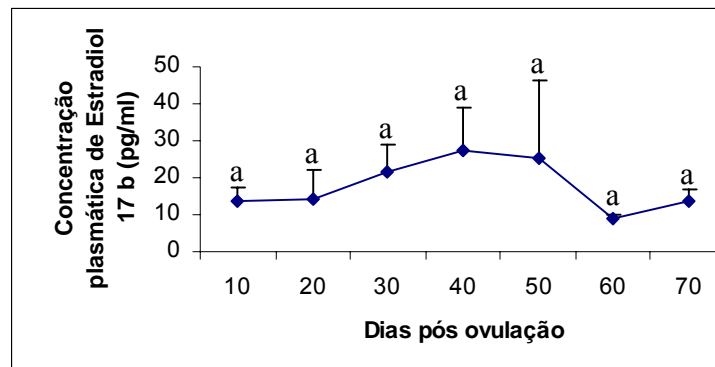


Figura 2: Expressão do estradiol plasmático de cadelas sadias ao longo do diestro (de 10 a 70 dias pós a ovulação).

Os valores representam $\bar{x} \pm DP$ (n= 4/ grupo). a significa que não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos.

5.2 Insulinemia, Glicemia, e índice HOMA

A insulinemia destas cadelas, por sua vez, apresentou dois picos, sendo um deles de 3,7 uU/ml aos 10 dias e o outro de 3,83 uU/ml aos 40 dias p.o. Já os seus menores valores foram observados aos 20 e aos 60 dias p.o. (1,4 e 1,2 uU/ml respectivamente), sendo que a insulinemia dos outros grupos flutuou entre estes valores mencionados (Figura 3).

Houve grande variação dos valores insulinêmicos das cadelas do grupo de 40 dias.

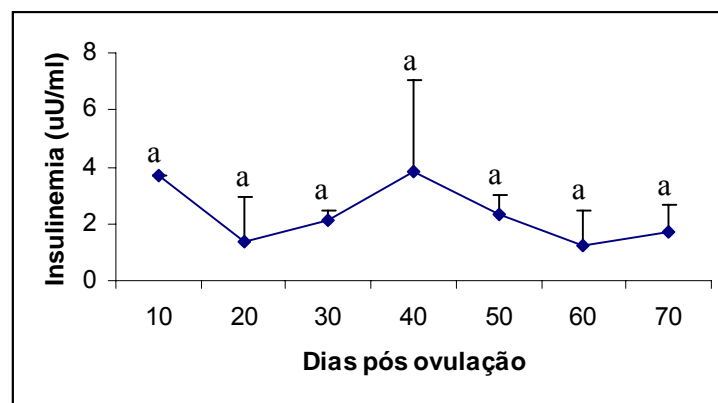


Figura 3: Insulinemia de cadelas sadias ao longo do diestro (de 10 a 70 dias pós a ovulação). Os valores representam $\bar{x} \pm DP$ (n= 4/ grupo). a significa que não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos.

A glicemia das cadelas pós jejum mostrou-se muito semelhantes em todos os grupos, com valores de aproximadamente 80 mg/ml, apresentando um único e pequeno pico de 90 mg/ml aos 40 dias pós ovulação (Figura 4).

Neste caso também encontramos variações entre os valores obtidos dentro de um mesmo grupo, e isso ocorreu de maneira mais significativa aos 20, 40 e 50 dias p.o.

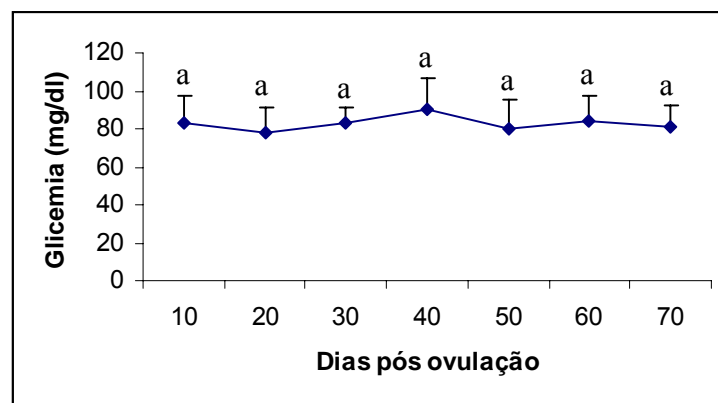


Figura 4: Expressão da glicemia de cadelas sadias ao longo do diestro (de 10 a 70 dias pós a ovulação). Os valores representam $\bar{x} \pm DP$ (n= 4/ grupo). a significa que não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos.

No índice Homa (glicemia x insulina % 22,5) as cadelas de todos os grupos foram reorganizadas de modo a introduzirem-se da melhor maneira possível nos grupos de 25, 40, 55 e 70 dias pós a ovulação. Assim como ocorrido na glicemia, o pico (0,89) neste caso também ocorreu aos 40 dias p.o., em quanto que os demais grupos apresentaram-se muito semelhantes, com valores em torno de 0,35 (Figura 5).

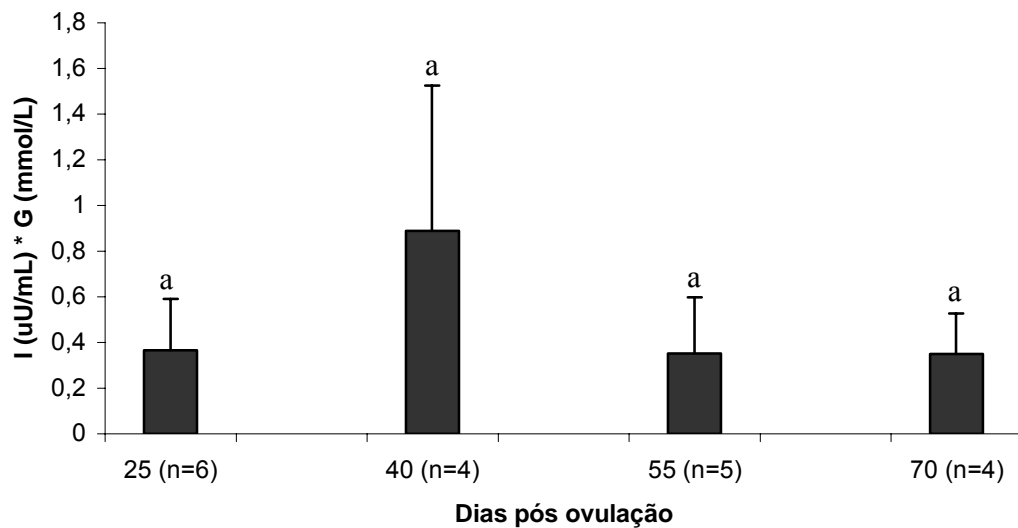


Figura 5: Expressão do HOMA (insulina x glicose % 22,5) de cadelas sadias ao longo do diestro (25, 40, 55 e 70 dias pós a ovulação). Os valores representam $\bar{x} \pm DP$ (n= 4/ grupo). a significa que não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos.

5.3 PCR tempo real

5.3.1 GLUT4

Através do método de PCR tempo real foi evidenciada a presença de mRNA de GLUT 4 nos corpos lúteos de todas as cadelas do experimento, dentro de todos os grupos entre 10 e 70 dias pós a ovulação. O mRNA do GLUT4 em corpo lúteo teve seus menores valores de expressão aos 10, 30 e 40 dias p.o., sendo eles de aproximadamente 4,5 UA, e apresentou seu pico de expressão (de 15,55 UA) aos 50 dias ($p < 0,05$). (Figura 6)

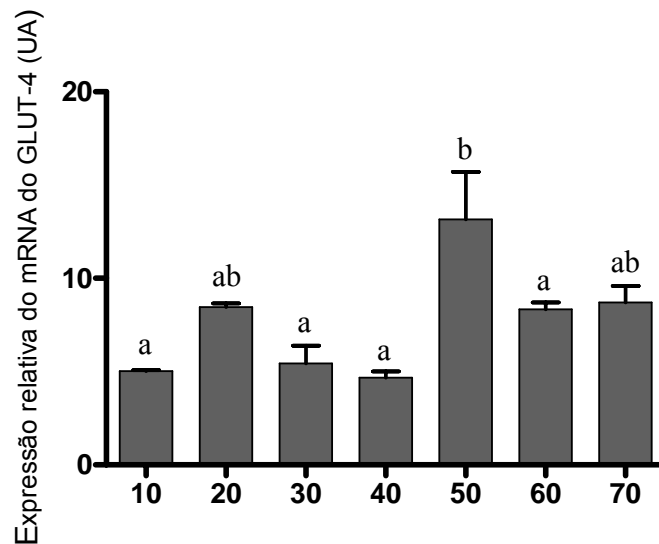


Figura 6: Expressão do GLUT4 mRNA em corpo lúteo de cadelas sadias ao longo do diestro (de 10 a 70 dias pós a ovulação). Os valores representam $\bar{x} \pm DP$ ($n = 4$ / grupo). a, b, ab: Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre o grupo de 50 dias pós ovulação e todos os demais grupos.

5.3.2 HIF-1

Através do método de PCR tempo real também foi evidenciada a presença de mRNA de HIF-1 nos corpos lúteos de todas as cadelas do experimento, dentro de todos os grupos entre 10 e 70 dias pós a ovulação. O HIF-1 apresentou valores de expressão de seu mRNA muito semelhantes (0,3 UA) em todos os grupos, com exceção dos grupos 10 e 40 dias p.o., que foram representados com valores de 0,2 UA (Figura 7).

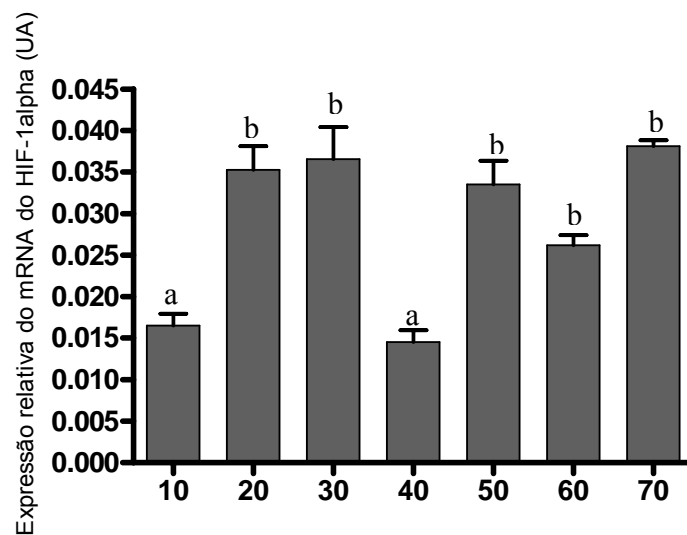


Figura 7: Expressão do HIF-1 mRNA em corpo lúteo de cadelas sadias ao longo do diestro (de 10 a 70 dias pós a ovulação). Os valores representam $\bar{x} \pm DP$ (n= 4/ grupo). a, b: Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre os grupos de 10 e 40 dias pós ovulação e todos os demais grupos.

5.4 GLUT4 pela técnica Western blotting

Não foi evidenciada a presença da proteína GLUT 4 nos corpos lúteos de nenhuma das cadelas dos grupos entre 10 e 70 dias após a ovulação.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A presença do transportador de glicose GLUT 4 ainda não havia sido evidenciada em corpo lúteo até o presente momento, o que confere ineditismo ao trabalho apresentado. O significado funcional da expressão do mRNA deste transportador em tecido luteínico aponta para uma provável sensibilidade do corpo lúteo a ação da insulina, uma vez que a proteína deste transportador é translocada para membrana plasmática para transportar glicose quando a insulina se liga a seus receptores (IR) presentes na membrana de células alvo. As correlações apresentadas entre a expressão do GLUT 4 e a do HIF-1 α , bem como com os hormônios sexuais progesterona e estradiol-17 β e parâmetros metabólicos (glicemia e insulinemia) permitiram que um panorama mais abrangente pudesse ser visualizado em relação ao transporte de glicose no CL.

Outras técnicas, como o Western e Northern blotting, as quais quantificam a expressão de proteínas e mRNA, respectivamente, não evidenciaram a presença de GLUT 4 nos mesmos animais utilizados. É importante salientar que muitos autores encontram dificuldades com a técnica de Western blot para a detecção das proteínas GLUT, entre os problemas encontrados estão: bandas não específicas, dificultando sua identificação pelos soros não-ímmunes (WAGSTAFF et al., 1995); necessidade em usar anticorpos policlonais, que diminuem a especificidade do teste (HABER et al., 1993; HOCQUETTE et al., 1996), podendo dosar uma proteína similar ao GLUT como sendo efetivamente um GLUT 1 (ZHAO et al., 1996) ou GLUT 4 (BALAGE et al., 1997). Paarman (comunicação pessoal) estudando a expressão do mRNA do GLUT4 nos corpos lúteos das mesmas cadelas deste trabalho, também não evidenciou a presença do mesmo através do Northern blotting.

Outros autores também pesquisaram GLUT 4 em tecido ovariano e não o encontraram, como foi observado por Kodaman e Behrman (1999) em células da granulosa de ratas também por análise de Western blot; e Zhou et al. (2000) em oócitos e folículos de camundongo pela técnica de imunohistoquímica.

Porém este trabalho evidenciou a expressão relativa do mRNA do GLUT4 no corpo lúteo de cadelas em todo o diestro pelo método de PCR em tempo real. Sugai et al. (2004), pelo mesmo método, não o detectaram em corpo lúteo de vacas. Em contrapartida, o GLUT 4 já foi evidenciado em células da teca e granulosa de ovário de ovelha (WILLIAMS et al., 2001) e em células de ovário de Hamster chinês, *in vitro*, (BOGAN et al., 2001, 2003). Tais diferenças podem estar ligadas às diferenças entre as espécies, envolvendo aspectos fisiológicos e nutricionais, mas também diferenças de expressão dependentes do estágio do ciclo reprodutivo.

Royer et al. (2000) descreveram que, em condições de hipóxia, há um aumento do GLUT4 na membrana citoplasmática do músculo esquelético de ratos adultos, levando a uma rápida captação de glicose. Os mesmos autores ainda demonstraram que a hipóxia gestacional leva a uma expressão aumentada do mRNA do GLUT4, e que o aumento concomitante do GLUT4 e do HIF-1 α em resposta a hipóxia gestacional sugerem a hipótese do envolvimento do HIF-1 α na regulação dos genes transportadores de glicose. Porém, neste trabalho não houve correlação significativa entre a expressão do GLUT4 e do HIF-1 α . Mas Royer trabalhou com outro tipo de animal, o rato, e em um tecido muito distinto, o cérebro. O fato da hipóxia regular positivamente a expressão do GLUT4 em tecidos que captam glicose em abundância, como cérebro e músculos esqueléticos, pode não se aplicar a tecidos periféricos como o CL. Além disso, a variabilidade encontrada em relação a transporte de glicose em animais como o cão é evidentemente maior do que as encontradas em animais de laboratório.

A glicose é predominantemente absorvida pelos tecidos sensíveis à insulina (músculos e tecido adiposo) através de difusão facilitada pelos transportadores de glicose transmembrânicos, principalmente pelo GLUT 4, que é altamente ativado durante o exercício ou pela presença da insulina (HOCQUETTE et al., 1998). Nos resultados deste trabalho, utilizando corpos lúteos, pode-se inferir sobre um transporte de glicose realizado pelo GLUT 4: esse fato evidenciou-se no grupo de 40 dias pós ovulação, no qual foi obtido o maior valor de glicemia, e este fato coincidiu com o menor valor de expressão do GLUT4, ou seja, na ausência de transportadores, a glicemia tende a ficar mais alta, embora uma correlação negativa significativa entre os valores da glicemia com a expressão do GLUT4 encontrados neste trabalho não foi obtida.

Segundo Li et al. (2004) condição de hiperglicemia pode regular a função dos transportadores de glicose, os quais sofrem uma internalização celular, diminuindo sua expressão. Sivitz et al. (1989) observaram um drástico declínio nos níveis de mRNA do GLUT4 em tecido adiposo quando do jejum; e em 1990 demonstraram que a glicemia não influencia a expressão do mRNA do GLUT4 in vivo, e o mesmo fato foi observado por nós, quando não encontramos correlação entre os níveis de glicemia e a expressão do GLUT4. Mas os mesmos sugerem que a insulina seja o maior fator regulatório dos níveis do mRNA do GLUT4 no tecido adiposo, fato não observado neste trabalho quando não estabeleceu-se correlação entre os níveis de insulina e a expressão do GLUT4.

Segundo Piper et al. (1991) e Rea e James (1997), o mecanismo de captação de glicose em músculo e tecido adiposo é dependente da transmissão do sinal insulínico. E isso faz com que aumento da glicemia leve a um rápido aumento da insulinemia, a qual induz translocação do GLUT4 para que este capte a glicose circulante e a introduza nas células dos tecidos insulino-sensíveis. Isso também foi observado aqui, quando utilizamos corpos lúteos, e obtivemos os maiores valores de glicemia e insulinemia coincidindo no mesmo período, aos 40 dias p.o.

O índice HOMA, descrito por Matthews et al. (1985) pode ser calculado para a estimativa da resistência insulínica, na qual $HOMA-RI = \text{insulinemia de jejum (mU/L)} \times \text{glicemia de jejum (mmol/L)} / 22,5$. Quanto mais alto o índice HOMA, menos este animal é sensível à insulina (OLIVEIRA et al., 2005), ou seja, mais resistente à ela. O mesmo foi observado por nós, pois assim como a insulinemia e a glicemia, o índice HOMA também obteve seus maiores valores 40 dias p.o., momento em que obtiveram-se os menores valores de expressão de GLUT4. Quando o índice HOMA apresenta-se alto ocorre resistência insulínica, aqui expressa nos baixos valores de transportadores de glicose. Para Shepherd e Kahn (1999) redução na expressão de GLUT4 no tecido adiposo associa-se com o desenvolvimento da resistência insulínica. Isso mostra também que o ovário se comporta como um tecido insulino-sensível.

Quanto a progesterona e o estradiol, ambos seguiram um padrão para o diestro, ou seja, progesterona com pico aos 20 dias e após isso queda gradativa até o final do diestro,

concomitantemente com o aumento gradativo do estradiol desde o início do diestro, assim como relatado por Feldman e Nelson (1987).

Segundo Concannon et al. (1980), Eigenmann (1984) e Selman et al. (1994) a progesterona atua na resistência insulínica pois diminui o transporte da glicose para os tecidos. Isso também foi por nós visto, quando aos 20 dias p.o. houve pico de progesterona plasmática coincidente com baixa expressão de GLUT4, e queda dos níveis de progesterona, principalmente no final do diestro, período de maiores valores de expressão do GLUT4, principalmente aos 50 dias p.o. Campbell & Febbraio (2002) demonstraram em seus estudos com ratos ovariectomizados valores de insulina plasmática elevados quando estes eram tratados com progesterona. No presente trabalho, insulinemia e progesterona plasmática não apresentaram correlação significativa, apesar dos dados sugerirem o mesmo observado pelos autores acima citados.

Sugaya et al. (2000) demonstraram que o estradiol e a progesterona estão envolvidos na regulação da expressão do mRNA do GLUT4 no tecido adiposo, pois este sofre uma redução significativa na presença do estradiol, e que isso não ocorre da mesma maneira com a progesterona (SUGAYA et al., 1999). Para Barros et al. (2006a) o estradiol participa na homeostasia da glicose pela modulação da expressão dos genes que estão envolvidos na sensibilidade à insulina e na captação de glicose. Porém não conseguimos evidenciar correlação entre estes e o GLUT4.

Nossos dados sugerem um novo mecanismo de transporte utilizado pelas células do CL para realização de suas funções e ainda que estas células responderiam positivamente a ação da insulina. Dados de expressão protéica bem como experimentos funcionais seriam necessários para confirmação destas suposições.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- O mRNA do GLUT 4 está presente no CL ao longo do diestro e sofre regulação de acordo com a fase observada;
- O HIF-1 α não está positivamente correlacionado à expressão do GLUT 4 ao longo do diestro em corpo lúteo de cadelas;
- Índices metabólicos e hormonais não estão diretamente relacionados à expressão do GLUT 4 em CL de cadelas ao longo do diestro.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ARNER, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. **Ann Med.**, v. 27, n. 7, p. 435-438, 1995.

BALAGE, M.; HOCQUETTE, J. F.; GRAULET, B.; FERRÉ, P.; GRIZARD, J. Skeletal muscle glucose transporter (GLUT 4) protein is decreased in lactating goats. **Anim. Sci.** v. 65, p. 257-265, 1997.

BARROS, R. P.; MACHADO, U. F.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. **Trends. Mol. Med.**, v. 12, n.9, p. 425-431, 2006a.

BARROS, R. P.; MACHADO, U. F.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.103, n. 5, p. 1605-1608, 2006b.

BAUMANN, M. U.; DEBORD, S.; ILLSLEY, N. P. Placental glucose transfer and fetal growth. **Endocrine**, v. 19, p. 13-22, 2002.

BERGER, J.; BISWAS, C.; VICARIO, P. P.; STROUT, H. V.; SAPERSTEIN, R.; PILCH, P. F. Decreased expression of the insulin-responsive glucose transporter in diabetes and fasting. **Nature**, v. 340, p. 70-72, 1989.

BOGAN, J. S.; MCKEE, A. E. & LODISH, H. F. Insulin-responsive compartments containing GLUT 4 in 3T3-L1 and CHO cells: regulation by amino acid concentrations. **Mol. Cel. Biol.** v. 21, n.14, p. 4785-4806, 2001.

BOGAN, J. S.; HENDON, N.; MCKEE, A. E.; TSAO, T. S.; LODISH, H. F. Functional cloning of TUG as a regulator of GLUT 4 glucose transporter trafficking. **Nature**, v. 425, n. 6959, p. 727-733, 2003.

CAMPBELL, S. E.; FEBBRAIO, M. A. Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake. **Am. J. Physiol. Edocrinol. Metab.**, v 282, n. 5, p. 1139-1146, 2002.

CATCOTT, E. J. **Canine medicine**. 4 ed., California: American Veterinary Publications, v. 01, 1979, p. 501-518.

CHEN, C.; PORE, N.; BEHROOZ, A.; ISMAIL-BEIGI, F.; MAITY, A. Regulation of Glut 1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Inter-action between H-ras and hypoxia. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 9519-9525, 2001a.

CHEN, E. Y.; MAZUME, N. M.; COOPER, J. A.; GIACCIA, A. J. Hypoxia activates a plated-derived growth factor receptor / phosphatidylinositol 3-kinase / Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. **Cancer Res.**, v. 61, p. 2429-2433, 2001b.

CONCANNON, P. W.; ALTSZULER, N.; HAMPSHIRE, J.; BUTLER, W. R.; HANSEL, W. Growth hormone, prolactin and cortisol in dogs developing mammary nodules and an acromegalic-like appearance during treatment with medroxyprogesterone acetate. **Endocrinology**. v. 106, p. 1173-1177, 1980.

CONCANNON, P. W.; MC CANN, J. P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v. 39, p.3-25, 1989.

CONCANNON, P. W.; WEINSTEIN, P.; WHALEY, S.; FRANK, D. Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine. **J. Reprod. Fertil.** v. 81, p. 175-180, 1987.

DANG, C. V.; SEMENZA, G. L. Oncogenic alterations of metabolism. **Trends Biochem. Sci.**, v. 24, p. 68-72, 1999.

DAS, U. G.; SCHOEDER, R. E.; HAY, W. W.; DEVASCAR, S. U. Time-dependent and tissue-specific effects of circulating glucosa on fetal ovine glucosa transporters, **Am. J. Physiol.** v. 276, p. 809-817, 1999.

DE FRONZO, R. A; FERRANINI, E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dislipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care**, v. 14, p. 173-194, 1991.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos**. 3 ed., Zaragoza: Editora Acribia, 1980, p. 03-82.

DIAMOND, M. P.; SIMONSON, D. C.; DEFRONZO, R. A. Menstrual cyclicality has a profound effect on glucose homeostasis. **Fertil Steril**, v. 52, p. 204-208, 1989.

DOHM, G. L. Invited review: regulation of skeletal muscle GLUT-4 expression by exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 93, p.782-787, 2002.

DUNN, J. K. **Tratado de medicina de pequenos animais**. São Paulo: Editora Roca, 2001, p. 569-584.

EBERT, B. L.; GLEADLE, J. M.; O'ROURKE, J. F.; BARTLETT, S. M.; POULTON, J.; RATCLIFFE, P. J. Isoenzyme-specific regulation of genes involved in energy metabolism by hypoxia: similarities with the regulation of erythropoietin. **Biochem.**, v. 313, p.809-814, 1996.

EIGENMANN, J. E. Acromegaly in the dog. **Vet. Clin. North Am. (Small Anim. Pract.)**, v. 14, p. 827-836, 1984.

ELKIND HIRSCH, K. E.; SHERMAN, L. D.; & MALINAK, R. Hormone replacement therapy alters insulin sensitivity in young women with premature ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 76, p. 472-475, 1993.

ETTINGER, S. J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3 ed., São Paulo: Editora Manole, v. 1, 1992a, p.143-152.

ETTINGER, S. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3 ed., São Paulo: Editora Manole, v. 4, 1992b, p.1857-1876.

EZAKI, O. Regulatory elements in the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 241, p. 1-6, 1997.

EZENWAKA, E. C.; AKANJI, A. O.; ADEJUWON, C. A.; ABBIYESUKU, F. M.; AKINLADE, K. S. Insulin responses following glucose administration in menstruating women. **Int J Gynaecol Obstet.**, v. 42, p. 155-159, 1993.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R. W. Canine and Feline Reproduction. In: **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1987, p. 399-480.

GARFIN, D. E. One- Dimensional Gel Eletrophoresis. **Methods Enzimol.**, v 182, p. 425-441, 1990.

GRÄF, K. J. Serum oestrogen, progesterone and prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs. **J. Reprod. Fertil.** v. 52, p. 9-14, 1978.

GRAY, S.; FEINBERG, M. W.; HULL, S.; KUO, C. T.; WATANABE, M.; SEN BANERJEE, S.; DEPINA, A.; HASPEL, R.; JAIN, M. K. The Krüppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 34322-34328, 2002.

GUERRE-MILLO M. Adipose tissue and adipokines: For better or worse. **Diabetes Metab.**, v. 30, p. 13-19, 2004.

HABER, R. S.; WEINSTEIN, S. P.; O'BOYLE, B.; MORGELLO, S. Tissue distribution of the human GLUT 3 glucose transporter. **Endocrinology**, v. 132, p. 2538-2543, 1993.

HADLEY, J. C. Total unconjugated oestrogen and progesterone concentrations in peripheral blood during pregnancy in the dog. **J. Reprod. Fertil.** v. 44, p. 453-460, 1975.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6 ed., São Paulo: Editora Manole, 1995, p. 21-145.

HAYASHI, T.; DUFRESNE, S. D.; ARONSON, D.; SHERWOOD, D. J.; HIRSHMAN, M. F.; BOPPART, M. D.; FIELDING, R. A.; GOODYEAR, L. J. Intracellular signaling pathways in contracting skeletal muscle. In: HARGREAVES, M.; THOMPSON, M. (Ed.) **Biochemistry of exercise X**. Champaign, IL: Human Kinetics, 1999, p. 19-34.

HERMSDORFF, H. H.; MONTEIRO, J. B. Visceral, subcutaneous or intramuscular fat: where is the problem? **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 48, n. 6, p. 803-811, 2004.

HOCQUETTE, J-F.; BALAGE, M.; FERRÉ, P. Facilitative glucose transporters in ruminants. **Proc. Nutr. Soc.** v. 55, p. 221-236, 1996.

HOFFMANN, B.; HÖVELER, R.; HASAN, S. H.; FAILING, K. Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. **J. Reprod. Fert.** v. 96, p. 837- 845, 1992.

HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches. **Anim. Reprod. Sci.** v. 42, p. 275-288, 1996.

HOTAMISLIGIL, G. S.; BUDA VARI, A.; MURRAY, D.; SPIEGELMAN, B. M. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. **J Clin Invest**, v. 94, p. 1543-1549, 1994.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SPIEGELMAN, B. M. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. **Diabetes**, v. 43, p. 1271-1278, 1994.

- HOUMARD, J. A.; WEIDNER, M. D.; DOLAN, P. L.; LEGGETT-FRAZIER, N.; GAVIGAN, K. E.; HICKEY, M. S.; TYNDALL, G. L.; ZHENG, D.; ALSHAMI, A.; DOHM, G. L. Skeletal muscle GLUT4 protein concentration and aging in humans. **Diabetes**, v. 44, p. 555-560, 1995.
- HSUEH, W. A.; LAW, R. The central role of fat and effect of peroxisome proliferator-activated receptor-g on progression of insulin resistance and cardiovascular disease. **Am. J. Cardiol.** , v. 92, p. 3-9, 2003.
- JAMES, D. The mammalian facilitative glucose transporter family. **NIPS**, v. 10, p. 67-71, 1995.
- KAHN, B. B.; CHARRON, M. J.; LODISH, H. F.; CUSHMAN, S. W.; FLIER, J. S. Differential regulation of two glucose transporters in adipose cells from diabetic and insulin-treated diabetic rats. **J Clin Invest.**, v. 84, 404-411, 1989.
- KAWANAMI, D.; MAEMURA, K.; TAKEDA, N.; HARADA, T.; NOJIRI, T.; IMAI, Y.; MANABE, I.; UTSUNOMIYA, K.; NAGAI, R. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytocine-endothelial cell interaction. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 314, p. 415-419, 2004.
- KERN, M.; WELLS, J. A.; STEPHENS, J. M; ELTON, C. W.; FRIEDMAN, J. E.; TAPSCOTT, E. B.; PEKALA, P. H.; DOHM, G. L. Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (Glut4) protein level. **Biochem J**, v. 270, p. 397-400, 1990.
- KODAMAN, P. H.; BEHRMAN, H. R. Hormony-regulated and glucose-sensitive transport of dehydroascorbic acid in immature rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 140, n. 8, p. 3659-3665, 1999.
- KOLB, E. **Fisiologia veterinaria**. 2 ed., Zaragoza : Editorial Acribia, v. 2, 1974, p. 757-770 .
- KOSIOR-KORZECKA, U.; BOBOWIEC, R.; LIPECKA, C. Fasting-induced changes in ovulation rate, plasma leptin, gonadotropins, GH, IGF-I and insulin concentrations during oestrus in ewes. **J. Vet. Med. A. Physiol. Pathlo. Clin. Med.**, v. 53, n. 1, p. 5-11, 2006.
- KUHL, C. Insulin secretion and insulin resistance in pregnancy and GDM. Implications for diagnosis and management. **Diabetes**. v.2, p. 18-24, 1991.
- LEE, J. W.; BAE, S. H.; JEONG, J. W.; KIM, S. H.; KIM, K. W. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. **Exp. Mol. Med.**, v. 36, n. 1, p.1-12, 2004.

LEQUARRE, A. S.; GRISART, B.; MOREAU, B.; SCHUURBIERS, N.; MASSIP, A.; DESSY, F. Glucose metabolism during bovine preimplantation development: analysis of gene expression in single oocytes and embryos. **Mol. Reprod. Dev.** v.48, p. 216-226, 1997.

LI, H.; GU, Y.; ZHANG, Y.; LUCAS, M. J.; WANG, Y. High Glucose levels down-regulate glucose transport expression that correlates to oxidative stress in placental trophoblast cells in vitro. **J. Soc Gynecol Investig**, v. 11, p. 75-81, 2004.

LIMA, F. B.; MACHADO, U. F.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; MORAES, S. M.; HELL, N. S.; OKAMOTO, M. M.; SAAD, M. J.; CARVALHO, C. R.; CIPOLLA-NETO, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **Am J Physiol**, v. 275(6Pt1), p. E934-E941, 1998.

LIN, J. L.; ASANO, T.; SHIBASAKI, Y.; TSUKUDA, K.; KATAGIRI, H.; ISHIHARA, H., et al. Altered expression of glucose transporter isoforms with aging in rats selective decrease in GLUT4 in the fat tissue and skeletal muscle. **Diabetologia**, v. 34, p. 477-82, 1991.

LOTT, J. A. & TURNER, K. Evaluation of Trinder's Glucose Oxidase Method for Measuring glucose in serum and urine. **Clin. Chem.**, v. 21, p. 1754-1760, 1975.

LYON, C. J.; LAW, R. E.; HSUEH, W. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2195-2200, 2003.

MAASSEN, J. A.; OUWENS, D. M. Mechanism of Insulin Action. **Molecular Pathogenesis of Diabetes mellitus**, v. 22, p. 201-221, 1997.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. Glucose transporters in the metabolic syndrome. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v. 50, n. 2, p. 177-189, 2006.

MACHADO, U. F.; SHIMIZU, I.; SAITO, M. Reduced content and preserved translocation of glucose transporter (GLUT 4) in white adipose tissue of obese mice. **Physiol Behav**, v. 55, p. 621-625, 1994.

MACLEAN, P. S.; ZHENG, D.; DOHM, G. L. Muscle glucose transporter (GLUT4) gene expression durinh exercise. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v. 28, p. 148-152, 2000.

MATTHEWS, D. R.; HOSKER, J. P.; RUDENSKI, A. S.; NAYLOR, B. A.; TREACHER, D. F.; TURNER, R. C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, p. 412-419, 1985

MCTERNAN, P. G.; MCTERNAN, C. L.; CHETTY, R.; JENNER, K.; FISHER, F. M.; LAUER, M. N.; CROCKER, J.; BARNETT, A. H.; KUMAR, S.. Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 5, p. 2407-2410, 2002.

MIALOT, J. P. **Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos**. São Paulo: Editora A Hora Veterinária, 1988, 17-22.

MISRA, A.; VIKRAM, N. K. Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. **Nutr.**, v. 19, p. 457-466, 2003.

MOHAMED-ALI, V.; FLOWER, L.; SETHI, J.; HOTAMISLIGIL, G.; GRAY, R.; HUMPHRIES, S. E.; YORK, D. A.; PINKNEY, J. β -adrenergic regulation of IL-6 release from adipose tissue: *in vivo* and *in vitro* studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 12, p. 5864-5869, 2001.

MOLKENTIN, J. D.; FIRULLI, A. B.; BLACK, B. L.; MARTIN, J. F.; HUSTAD, C. M.; COPELAND, N.; JENKINS, N.; LYONS, G.; OLSON, E. N. MEF2B is a potent transactivator expressed in early myogenic lineages. **Mol. Cell. Biol.**, v. 16, p. 3814-3824, 1996.

MORA, S.; PESSIN, J. E. The MEF2A isoform is required for striated muscle-specific expression of the insulin-responsive GLUT4 glucose transporter. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 14285-14292, 2000.

MORIMOTO, S.; CERBON, M. A.; ALVAREZ-ALVAREZ, A.; ROMERO-NAVARRO, G.; DIAZ-SANCHEZ, V. Insulin gene expression pattern in rat pâncreas during the estrous cycle. **Life Sci.**, v. 68, n. 26, p. 2979-2985, 2001.

MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters. **Eur. J. Biochem.**, v. 219, p. 713-725, 1994.

MYERS, M. G.; WHITE, M. F. Insulin signal transduction and the IRS proteins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 36; p. 615 – 58, 1996.

NAYA, F. S.; OLSON, E. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 11, p. 683-688, 1999.

NISWENDER, G. D.; REIMERS, T. J.; DIEKMAN, M. A.; NETT, T. M. Blood flow: a mediator of ovarian function. **Biol. Reprod.** v. 13, p. 381, 1976.

OKKENS, A. C.; BEVERS, M. M. Evidence for prolactin as the main luteotropic factor in the cyclic dog. **Veterinary Quarterly**, v. 12, p. 193-201, 1990.

OLIVEIRA, E. P.; SOUZA, M. L. A.; LIMA, M. D. A. HOMA (homeostasis model assessment) index in clinical practice: a review. **J. Bras. Patol. Méd. Lab.**, v. 41, n. 4, 2005.

PAPA, P. C. **Sensibilidade Insulínica e conteúdo de GLUT4 em camundongos obesos por tratamento com Glutamato Monossódico**. 1997. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

PAPA, P. C.; VARGAS, A. M.; SILVA, J. L. T.; NUNES, M. T. ; MACHADO, U. F. GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monossodium glutamate-treated mice. **Life Sciences**, v. 61, p. 1917-1928, 2002.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45, 2001.

PIPER, R. C.; HESS, L. J.; JAMES, D. E. Differential sorting of two glucose transporters expressed in insulin-sensitive cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 260, p. 570-580, 1991, 3 Pt 1.

PLOUG, T.; GALBO, H.; VINTEN, J.; JORGENSEN, M.; RICHTER, E. A. Kinetics of glucose transport in rat muscle: effects of insulin and contractions. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 253, p. E12-E20, 1987.

PURSWELL, B. J.; PARKER, N. A. Modern breeding management in dogs. **Vet. Med.** September, p.708-25, 2000.

RAJALA, M. W.; SCHERER, P. E. Minireview: the adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. **Neuroendocrinol**, v. 144, n. 9, p. 3765-3773, 2003.

REA, S.; JAMES, D. E. Moving GLUT4: The biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. **Diabetes**, v 46, p. 1667-1677, 1997.

REXRODE, K. M.; PRADHAN, A.; MANSON, J. E.; BURING, J. E.; RIDKER, P. M. Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women. **Ann Epidemiol.**, v. 13, p. 1-9, 2003.

ROYER, C.; LACHUER, J.; CROUZOUOLON, G.; ROUX, J.; PEYRONNET, J.; MAMET, J.; PEQUIGNOT, J.; DALMAZ, Y. Effects of gestational hypoxia on mRNA levels of GLUT3 and GLUT4 transporter, hypoxia inducible factor-1 and thyroid receptors in developing rat brain. **Brain Res.**, v. 856, p. 119-128, 2000.

RUAN, H.; HACOHEN, N.; GOLUB, T. R.; VAN PARIJS, L.; LODISH, H. F. Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocytes in 3T3-L1 adipocytes. Nuclear factor- κ B activation by TNF- α is obligatory. **Diabetes**, v. 51, p. 1319-1336, 2002.

RYAN, E. A.; ENNS, L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 67, p. 341-347, 1988.

SANTALUCIA, T.; MORENO, H.; PALACIN, M.; YACOUB, M. H.; BRAND, N. J.; ZORZANO, A. A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TR α 1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene expression. **J. Mol. Biol.**, v. 314, p. 195-204, 2001.

SEAGROVES, T. N.; RYAN, H. E.; LU, H.; WOUTERS, B. G.; KNAPP, M.; THIBAUT, P.; LADERROUTE, K.; JOHNSON, R. S. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. **Mol. Cell. Biol.**, v. 21, p. 3436-3444, 2001.

SELMAN, P. J.; MOL, J. A.; RUTTEMAN, G. R.; VAN GARDEREN, E.; RIYNBERK, A. Progesterin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. **Endocrinology**, v. 134, n. 1, p. 287-292, 1994.

SHEPHERD, P. R.; KAHN, B. B. Glucose transporters and insulin action implications for insulin resistance and diabetes mellitus. **N. Engl. J. Méd.**, v. 341, p. 248-257, 1999.

SILVA, J. L.; GIANNOCCO, G.; FURUYA, D. T.; LIMA, G. A.; MORAES, P. A.; NACHEF, S.; BORDIN, S.; BRITTO, L. R.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. NF- κ B, MEF2A, MEF2D and HIF1- α involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 30, n. 1-2, p. 82-93, 2005

SIVITZ, W. I.; DESAUTEL, S. L.; KAYANO, T.; BELL, G. I.; PESSIN, J. E. Regulation of glucose transporter messenger RNA in insulin-deficient states. **Nature**, 6; 340 (6228): 72-4, 1989.

SIVITZ, W. I.; DESAUTEL, S. L.; KAYANO, T.; BELL, G. I.; PESSIN, J. E. Regulation of glucose transporter messenger RNA levels in rat adipose tissue by insulin. **Mol. Endocrinol.**, v. 4, n. 4, p. 583-588, 1990.

SMITH U. Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance is insulin resistance initiated in the adipose tissue? **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v. 26, p. 897-904, 2002.

SUGAI, H.; YAMAMOTO, S.; TAKAHASHI, T.; HAYASHI, K.; MIYAMOTO, A.; HAMANO, S.; TETSUKA, M. Expression of glucose transporter 1 (GLUT 1) and 4 (GLUT 4) in bovine follicles and corpora lutea. **Biology of Reproduction**, p. 139-140, 2004, supplement 1.

SWENSON, M. J. Endocrinologia, reprodução e lactação. In: **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 10 ed., 1988, cap. 48, p.659-687.

SUGAYA, A.; SUGIYAMA, T.; YANASE, S.; TEREDA, Y.; TOYODA, N. Glucose transporter 4 (GLUT4) mRNA abundance in the adipose tissue and skeletal-muscle tissue of ovariectomized rats treated with 17 beta-estradiol or progesterone. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, v. 25, n. 1, p. 9-14, 1999.

SUGAYA, A.; SUGIYAMA, T.; YANASE, S.; SHEN, X. X.; MINOURA, H.; TOYODA, N. Expression of glucose transporter 4 mRNA in adipose tissue and skeletal muscle of ovariectomized rats treated with sex steroid hormones. **Life Sci.**, v. 66, n. 7, p. 641-648, 2000.

THAI, M. V.; GURUSWAMY, S.; CAO, K. T.; PESSIN, J. E.; OLSON, A. L. Myocyte enhancer factor 2 (MEF2) binding site is required for GLUT4 gene expression in transgenic mice. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 14285-14292, 1998.

THORENS, B.; CHARRON, M. J.; LODISH, H. F. Molecular physiology of glucose transporters. **Diabetes Care**, v. 13, p. 209-218, 1990.

TIMMONS, T. M.; DUNBAR, B. Protein Blotting and Immunodetection. **Methods Enzymol.**, v. 182, p. 679-688, 1990.

TORRANCE, C. J.; DEVENT, J. E., JONES, J. P., DOHM, G. L. Effects of thyroid hormones on GLUT 4 glucose transporter gene expression and niddm in rats. **Endocrinology**, v. 138, p. 1204-1214, 1997.

TOTH, E. L.; SUTHIJUMROON, A.; CROCKFORD, P. M.; RYAN, E. A. Insulin action does not change during the menstrual cycle in normal women. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 64, p. 74-80, 1987.

VALDES, C. T.; ELKIND-HIRSCH, K. E. Intravenous glucose tolerance test-derived insulin sensitivity changes during the menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 72, p. 642-646, 1991.

VANNUCCHI, C. I. **Perfil das proteínas plasmáticas e de fase aguda durante a gestação e diestro:** utilização no diagnóstico precoce de gestação em cadelas. 2000, 95 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

WAGSTAFF, P.; KANG, H. Y.; MYLOTT, D.; ROBBINS, P. J.; WHITE, M. K. Characterization of the avian GLUT 1 glucose transporter: differential regulation of GLUT 1 and GLUT 3 in chicken embryo fibroblast. **Mol. Biol. Cell**, v. 6, p. 1575-1589, 1995.

WENGER, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂ sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. **FASEB J.**, v. 16, p. 1151-1162, 2002.

WILLIAMS, S. A. ; BLACHE, D.; MARTIN, G. B.; FOOT, R.; BLACKBERRY, M. A.; SCARAMUZZI, R. J. Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells. **Reproduction**, v. 122, p. 947-956, 2001.

WRIGHT, P. J. Application of vaginal cytology and plasma progesterone determinations to the management of reproduction in the bitch. **Journal of small animal practice**. v.31, n. 7, p. 335-340, 1990.

YKI-JARVINEN, H. Insulin sensitivity during the menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 59, p. 350-353, 1984.

ZANQUETTA, M. M.; SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; CIPOLLA-NETO, J.; MACHADO, U. F. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. **J Pineal Res**, v. 35, p. 141-148, 2003.

ZDERIC, T. W.; COGGAN, A. R.; RUBY, B. C. Glucose kinetics and substrate oxidation during exercise in the follicular and luteal phases. **J Appl Physiol.**, v. 90, p. 447-453, 2001

ZHAO, F. G.; MOSELEY, W. M.; TUCKER, H. A.; KENNELLY, J. J. Regulation of glucose transporter gene expression in mammary gland, muscle and fat of lactating cows by administration of bovine growth hormone and bovine growth hormone-releasing factor. **J. Anim. Sci.** v. 74, p. 183-189, 1996.

ZHOU, J.; BIEVRE, M.; BONDY, C. O. Reduced GLUT 1 expression in Igf1-/- null oocytes and follicles. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 10, p. 111-117, 2000.