

Francielle Garghetti Battiston

**HOMEOSTASE GLICÊMICA EM RATAS COM PERDA DE
FUNÇÃO OVARIANA E TRATADAS COM
GLICOCORTICOIDE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas
Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho
Coorientador Prof. Dra. Fernanda Barbosa de Lima Christian

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Battiston, Francielle Garghetti
HOMEOSTASE GLICÊMICA EM RATAS COM PERDA DE FUNÇÃO
OVARIANA E TRATADAS COM GLICOCORTICOIDE / Francielle
Garghetti Battiston; orientador, Alex Rafacho;
coorientador, Fernanda Barbosa de Lima Christian. -
Florianópolis, SC, 2015.

104 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.
Inclui referências

1. Ciências Fisiológicas. 2. 4-vinilciclohexeno
diepóxido. 3. falha ovariana. 4. glicocorticoide. 5.
homeostase glicêmica. I. Rafacho, Alex. II. Christian,
Fernanda Barbosa de Lima. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
Multicêntrico em
Ciências Fisiológicas. IV. Título.

Francielle Garghetti Battiston

TÍTULO: SUBTÍTULO (SE HOVER)

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”, e aprovad(o)a em sua forma final pelo Programa ...

Local, x de xxxxx de xxxx.

Prof. xxx, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Orientadora
Universidade xxxx

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Corientadora
Universidade xxxx

Prof. xxxx, Dr.
Universidade xxxxxx

*Dedico esse estudo à minha família:
Daniel, Luiza e Angelo e aos meus
pais: Valdemar e Eunice.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força que me alicerçou durante este período de conciliação entre os estudos, trabalho e família.

Ao professor Dr. Alex Rafacho (orientador) e à professora Dra. Fernanda Barbosa de Lima Christian (coorientadora), por todo auxílio, paciência e dedicação no andamento de todas as etapas desta pesquisa.

Ao meu esposo Daniel, e meus filhos Luiza e Angelo, por terem permitido e compreendido a minha ausência neste período; com certeza essa foi a fase mais difícil ao longo destes dois anos de muito trabalho.

Aos meus pais Valdemar e Eunice e meus sogros Sérgio e Eni, por terem cuidado dos meus filhos enquanto estive fora de casa e meu irmão Alexandre por ter me abrigado em Florianópolis durante esse período de atividades.

Ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas por ter aberto as portas para meu ingresso na pesquisa.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela disponibilização de suas dependências e pelo suporte financeiro para o desenvolvimento das atividades científicas.

À Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) e ao Colégio La Salle por terem permitido e auxiliado em minhas ausências do período de trabalho, confiando em minha capacitação para retornar com um melhor desempenho de minhas atividades docentes.

Aos colaboradores de outras instituições, pelo suporte financeiro e técnico de alguns resultados, Professora Dra. Janete A. Anselmo Franci (USP/Ribeirão Preto) e Professor Dr. Sebastião Roberto Taboga (UNESP).

Aos professores Dra. Domitila Augusta Huber, Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva, Dra. Marta Paschoalini e Dr. Rodrigo Augusto da Silva por terem aceitado fazer parte da Banca Examinadora de defesa dessa dissertação.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas LIDoC, Cristiane dos Santos, Amanda Marreiro, Kátia Motta, Marina Fernandes Ruiz, Paola Miranda Sulis, Priscila de Cássia Francisco, Cristina Link Runtzel, Thayz Rodrigues Chagas e Henver Simionato Brunetta, pelo auxílio, conversas, trocas de experiências e apoio. À colega Sibeles por participar da primeira etapa do experimento.

À todos que direta ou indiretamente auxiliaram na conclusão desse estudo.

RESUMO

O glicocorticoide (GC) é amplamente aplicado na clínica para o tratamento de doenças inflamatórias. Seu uso prolongado repercute sobre a homeostase glicêmica podendo levar a resistência periférica à insulina (RI). Mulheres na transição de segunda para a terceira idade iniciam um processo natural de falha ovariana, a menopausa. Na menopausa há ganho de peso e modificações na distribuição da gordura, especialmente na região visceral. A associação entre GCs e menopausa não está bem estabelecida na literatura. Assim, avaliamos as repercussões da perda de função ovariana associada ao tratamento com GC sobre parâmetros relacionados à homeostase glicêmica. Para tanto, ratas Wistar (28 dias de vida) foram submetidas à falha ovariana por meio da administração de 4-vinilciclohexeno diepóxido (4-VCD), *i.p.* (VCD) ou receberam somente veículo (CTL) e 168 dias após foram tratadas com dexametasona (1 mg/kg, *p.c.*, *i.p.*) por 5 dias consecutivos (DEX e VCD+DEX) ou veículo (CTL e VCD). O grupo DEX e VCD+DEX demonstraram redução da massa corporal e da ingestão alimentar durante tratamento com dexametasona ($p<0,05$). As ratas tratadas com dexametasona apresentaram aumento na glicemia, insulinemia, triacilgliceridemia e conteúdo de glicogênio hepático vs. seus respectivos grupos controles ($p<0,05$) não havendo nenhum efeito do tratamento com 4-VCD *per se*. O tratamento com 4-VCD não alterou a sensibilidade à insulina, enquanto que os grupos tratados com dexametasona apresentaram redução da sensibilidade comparada aos seus respectivos controles ($p<0,05$). O grupo VCD exibiu intolerância à glicose (GTT *i.p.*) vs. grupo CTL ($p<0,05$) e a intolerância presente no grupo DEX não foi potencializada pelo tratamento com o 4-VCD (VCD+DEX). No desafio glicêmico oral o tratamento com 4-VCD não promoveu nenhuma alteração nos grupos VCD e VCD+DEX em relação aos seus respectivos controles. O tratamento com o 4-VCD não causou nenhuma alteração na massa de células β no grupo VCD, porém impediu a compensação do incremento compensatório (grupo VCD+DEX) ocorrido no grupo DEX. O tratamento com GC resultou em marcante elevação dos valores de progesterona plasmática vs. grupo CTL ($p<0,05$). Concluímos que o tratamento com o 4-VCD não promove alterações nos parâmetros metabólicos basais, mas causa intolerância à glicose. O tratamento com o 4-VCD não predispõe às ratas a maiores disfunções metabólicas causadas pelo tratamento com GC, exceto pela atenuação do incremento da massa de células β induzida pela administração de dexametasona.

Palavras-chaves: 4-vinilciclohexeno diepóxido, falha ovariana, glicocorticoide, homeostase glicêmica.

ABSTRACT

Glucocorticoids (GC) are widely applied in clinic for the treatment of inflammatory diseases. Its prolonged use influences the glucose homeostasis and may lead to insulin resistance (IR). Women in transition from natural reproductive life to menopause begin a natural process of ovarian failure. In this case, there are weight gain and changes in fat distribution, especially in the visceral region. The association between GCs and menopause is not well established in the literature. We evaluated the impact of the loss of ovarian function associated with GC treatment on parameters related to glucose homeostasis. Wistar rats (28 days old) underwent ovarian failure by administration of 4-vinylcyclohexene diepoxide (4-VCD) *i.p.* (VCD), while controls received vehicle (CTL). After 168 days rats were treated with dexamethasone (1 mg / kg bw, *i.p.*) for 5 consecutive days (DEX and VCD+DEX) or vehicle (CTL and VCD). The DEX and VCD+DEX groups showed reduced body weight and food intake during treatment with dexamethasone ($p<0.05$). The rats treated with dexamethasone showed an increase in glycemia, insulinemia, triglyceridemia and hepatic glycogen content *vs.* their respective control groups ($p<0.05$) and there is no effect of treatment with 4-VCD *per se*. Treatment with 4-VCD does not alter insulin sensitivity, whereas the groups treated with dexamethasone showed a reduction in insulin sensitivity compared to their respective controls ($p<0.05$). The VCD group exhibited impaired glucose tolerance (GTT *ip.*) *vs.* CTL group ($p<0.05$) and intolerance present in the DEX group was not enhanced by treatment with 4-VCD (VCD+DEX). In oral glucose challenge treatment with 4-VCD did not promote changes in VCD and VCD+DEX groups compared to their respective controls. Treatment with 4-VCD caused no change in the mass of β cells in the VCD group, but prevented the compensatory increase (VCD+DEX group) occurred in the DEX group. The GC treatment resulted in a marked increase in plasma progesterone values *vs.* CTL ($p<0.05$) group. We conclude that treatment with 4-VCD does not cause alterations in the basal metabolic parameters, but causes glucose intolerance. Treatment with 4-VCD does not predisposes rats to additional metabolic dysfunctions caused by the GC treatment, except for the attenuation of the increase in mass of β cells induced by administration of dexamethasone.

Key words: 4-vinylcyclohexene diepoxide, ovarian failure, glucocorticoids, glucose homeostasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	<i>Homeostase Glicêmica.....</i>	25
Figura 2:	<i>Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal no período reprodutivo funcional.....</i>	27
Figura 3:	<i>Transição entre perimenopausa e menopausa na fisiologia reprodutiva a partir da falência ovariana.....</i>	31
Figura 4:	<i>Efeitos da administração de GCs sobre a homeostase glicêmica.....</i>	40
Figura 5:	<i>Período dos tratamentos com 4-VCD e dexametasona.....</i>	49
Figura 6:	<i>Peso corporal (g) dos animais antes do tratamento com dexametasona.....</i>	58
Figura 7:	<i>Tratamento com dexametasona em ratos controle e tratados com 4-VCD promove redução da massa corporal e da ingestão alimentar.....</i>	60
Figura 8:	<i>Massa ovariana e progesterona plasmática (ng/mL) em ratas tratadas com 4-VCD e dexametasona.....</i>	61
Figura 9:	<i>Glicose sanguínea, insulina plasmática e índice HOMA em ratas tratadas com 4-VCD e dexametasona.....</i>	62
Figura 10:	<i>Lactatemia e glicogênio hepático em ratas CTL, DEX, VCD e VCD+DEX.....</i>	63
Figura 11:	<i>Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) e secreção de insulina “in vivo”.....</i>	65
Figura 12:	<i>Desafio da glicose via oral e secreção de insulina “in vivo”.....</i>	66

Figura 13:	<i>Triacilglicerol plasmático e hepático e colesterol total plasmáticos.....</i>	67
Figura 14:	<i>Lipólise em TAB perigonadal.....</i>	68
Figura 15:	<i>Massa dos órgãos em ratas tratadas com 4-VCD e dexametasona.....</i>	69
Figura 16:	<i>Morfologia pancreática e massa de células β.....</i>	70
Figura 17:	<i>Massa absoluta e relativa (normalizada pelo peso) de células β em ratas tratadas com 4-VCD e dexametasona.....</i>	71
Figura Complementar 1	<i>Estradiol plasmático em pg/mL das ratas tratadas com 4-VCD e dexametasona.....</i>	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	<i>Principais hormônios envolvidos na homeostase glicêmica.....</i>	23
Tabela 2:	<i>Diferenças nas funções reprodutivas do rato e do humano.....</i>	36
Tabela 3:	<i>GCs: fonte e potência biológica.....</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 β -HSD	11 β -hidroxi esteroide desidrogenase
4-VCD.....	4-vinilciclohexeno diepóxido
ACTH.....	Hormônio adrenocorticotrófico
AFC.....	Contagem de folículos antrais
AG.....	Ácidos graxos saturados
AGL.....	Ácidos graxos livres
AMH.....	Hormônio antimulleriano
ASC	Área sob a curva
CBG.....	Proteína ligadora de corticosteroides
CRH.....	Hormônio liberador de glicocorticoides
CTL	Ratas tratados com salina
DCNT.....	Doenças crônicas não transmissíveis
DEX.....	Ratas tratadas com dexametasona
DM2.....	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
FSH.....	Hormônio folículo estimulante
GC	Glicocorticoide
GLP-1.....	Peptídeo semelhante ao glucagon - 1
GnRH.....	Hormônio liberador de gonadotrofina
GR.....	Receptor de glicocorticoide
GS.....	Glicogênio sintase
HAS.....	Hipertensão arterial sistêmica
HOMA	Modelo de análise homeostática
HPA.....	Hipotálamo-hipófise-adrenal

HSP.....Proteína de choque térmico
IG.....Intolerância à glicose
ipGTT.....Teste intraperitoneal de tolerância à glicose
LH.....Hormônio luteinizante
LPL.....Lipoproteína lipase
LHS.....Lipase hormônio sensível
P.....Progesterona
RI..... Resistência à insulina
SM.....Síndrome metabólica
SNC.....Sistema Nervoso Central
T.....Testosterona
TAB.....Tecido adiposo branco
TG.....Triacilglicerol
VCD.....Ratas tratadas com o 4-vinilciclohexeno diepóxido
VCD+DEX....Ratas tratadas com 4-vinilciclohexeno diepóxido
e dexametasona
VLDL.....Lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 HOMEOSTASE GLICÊMICA.....	21
1.2 HOMEOSTASE GLICÊMICA NA MENOPAUSA.....	26
1.2.1 Modelos experimentais em menopausa.....	35
1.3 HOMEOSTASE GLICÊMICA E GLICOCORTICOIDES.....	39
1.3.1 Modelos experimentais com o uso de GCs.....	41
1.4 JUSTIFICATIVA.....	45
2. OBJETIVOS.....	47
2.1 Geral.....	47
2.2 Específicos.....	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1 ANIMAIS.....	48
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	48
3.3 PARÂMETROS METABÓLICOS.....	50
3.3.1 Peso corpóreo.....	50
3.3.2 Consumo de ração.....	50
3.3.3 Glicose sanguínea.....	50
3.3.4 Componentes plasmáticos.....	51
3.3.5 Peso de órgãos.....	51
3.3.6 Glicogênio hepático.....	52
3.3.7 Gordura Hepática.....	52
3.3.8 Avaliação da ação da insulina pelo modelo de análise homeostática (HOMA).....	53
3.3.9 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) e desafio da glicose oral	53
3.3.10 Secreção de insulina <i>in vivo</i>.....	53

3.3.11 Lipólise.....	54
3.5. PROCEDIMENTOS ESTRUTURAIS E QUANTITATIVOS.....	54
3.5.1 Aspectos morfológicos e massa das células β.....	54
3.5.2. Avaliação da Histologia Ovariana.....	56
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	56
4. RESULTADOS.....	59
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL.....	59
4.1.1 Peso corpóreo e ingestão alimentar.....	59
4.1.2 Dosagem de Progesterona Plasmática.....	61
4.1.3 Glicose sanguínea, insulina e lactato plasmáticos e glicogênio hepático.....	62
4.1.4 Tolerância à glicose e secreção de insulina <i>in vivo</i>.....	64
4.1.5 Parâmetros lipídicos plasmáticos e hepáticos.....	67
4.1.6 Liberação de glicerol em tecido adiposo.....	69
4.1.7 Massa dos órgãos.....	69
4.1.8 Morfometria do pâncreas.....	71
5. DISCUSSÃO.....	73
6. PERSPECTIVAS.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

1. INTRODUÇÃO

1.1 HOMEOSTASE GLICÊMICA

Ao longo da vida, o consumo e o gasto energético mantêm-se relativamente equilibrado e este balanço ocorre principalmente devido à regulação da ingestão de alimentos. Por meio da utilização de modelos experimentais a partir dos anos 1950 foi proposto que o peso corporal se mantém relativamente constante por um mecanismo de sinalização entre os tecidos de reserva periféricos (*ex.*, o tecido adiposo) e sistema nervoso central (Ladyman & Grattan, 2013). Esta retroalimentação envolve hormônios circulantes que informam sobre as reservas energéticas ao hipotálamo, com subseqüentes ajustes compensatórios no controle da ingestão alimentar a fim de manter os estoques energéticos, normalmente contidos na forma de tecido adiposo, em torno de um ponto de equilíbrio (Reichlin, 1989; Rodrigues et al., 2003; Ladyman & Grattan, 2013).

A energia obtida por meio da ingestão alimentar garante a manutenção dos processos vitais que resulta da energia proveniente da oxidação dos substratos energéticos (*ex.*, glicose, lipídeos e aminoácidos). A energia necessária para a manutenção das atividades diárias do indivíduo é composta pelo gasto energético basal, gasto energético na atividade física e pelo efeito térmico relacionado à digestão dos alimentos e à absorção dos nutrientes (Diener, 1997; Sartorelli et al., 2006). Na espécie humana, o gasto energético basal compõe entre 60 a 75% das necessidades energéticas diárias incluindo o equilíbrio termodinâmico do organismo, a energia requerida para a manutenção dos sistemas cardiovascular, respiratório, e síntese de

componentes celulares, dentre outros (Elwyn et al., 1981). Este gasto energético é baseado na quantidade de energia necessária para a manutenção das funções vitais em condições padronizadas (jejum, repouso físico e mental em ambiente controlado em relação à temperatura, iluminação e ruído) (Bursztein et al, 1989). O envolvimento do hipotálamo no presente processo tem sido desde há muito conhecido em modelos experimentais, devido às alterações observadas na ingestão de alimentos e no peso corporal após lesões em núcleos hipotalâmicos orexígenos e anorexígenos (Ladyman & Grattan, 2013).

Na ingestão alimentar intermitente o excedente de energia absorvido após as refeições pode ser armazenado para o uso durante os períodos de jejum, quando há redução da abundância de substratos energéticos. Os substratos energéticos devem estar constantemente disponíveis à demanda metabólica independente do contexto metabólico (Westerterp, 1993).

O excesso de glicose circulante, principal substrato energético, pode ser armazenado no fígado e nos músculos na forma de glicogênio hepático e muscular, respectivamente, bem como ser metabolizada na biossíntese de triacilglicerol que são transportados na circulação por meio das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e disponibilizado aos tecidos periféricos como o tecido adiposo (Westerterp, 1993). Os carboidratos fornecem a maior parte da energia requerida pelo metabolismo energético. A ingestão diária de carboidratos, recomendada aos seres humanos, é de 50% a 60% do valor energético total. Os carboidratos são encontrados nos amidos e açúcares

e, com exceção da lactose do leite e do glicogênio do tecido animal, são de origem vegetal (Seyffarth e Bressan, 2009).

Inúmeros fatores estão relacionados ao controle da homeostase glicêmica. Este controle inclui diversos hormônios e a participação de tecidos e órgãos como o tecido adiposo, muscular, hepático, o sistema nervoso, o pâncreas, e os intestinos. Dentre os hormônios envolvidos neste controle, merecem atenção a insulina, o glucagon, a adrenalina, o cortisol (humanos) ou corticosterona (roedores), o hormônio de crescimento (GH), as incretinas (*ex.*, peptídeo semelhante ao glucagon 1), a leptina, a adiponectina, entre outros. Estes hormônios modulam as concentrações de substratos energéticos no estado absorptivo e pós-absorptivo, através dos processos de glicogênese/glicogenólise/gliconeogênese, lipogênese/lipólise e proteogênese/proteólise. Na Tabela 1 podem ser vistas as principais ações dos hormônios relacionados à homeostase glicêmica.

Tabela 1: Principais hormônios envolvidos na regulação da homeostase glicêmica.

<i>Hormônio</i>	<i>Ações sobre a homeostase glicêmica</i>
Insulina	↑glicogênese muscular e hepática ↓glicogenólise muscular e hepática, ↓gliconeogênese hepática e renal, ↓conversão de ácidos graxos e aminoácidos em cetoácidos, ↑captção de glicose no músculo e no tecido adiposo
Glucagon	↑glicogenólise e ↑gliconeogênese

Cortisol (humanos) Corticosterona (roedores)	↑gliconeogênese e ↓captação de glicose nos tecidos periféricos
Adrenalina	↑glicogenólise
GH	indiretamente por ↑lipólise e ↑produção de ácidos graxos livres (AGL) nos adipócitos
Incretinas	indiretamente por ↑secreção de insulina pelas células β
Adiponectinas	indiretamente por ↑sensibilidade periférica à insulina
Leptina	indiretamente por ↑lipólise, ↑utilização da glicose e ↓secreção de insulina pelas células β

↓: reduz/diminui; ↑: aumenta/eleva

Os tecidos muscular, adiposo, hepático e órgãos como o pâncreas e os intestinos estão diretamente relacionados com o metabolismo energético (Figura 1). Por efeito da insulina, os músculos são responsáveis pela maior parcela da captação de glicose, em torno de 75% a 80% (em humanos). A utilização da glicose pode ser imediata ou, a partir da ação da enzima glicogênio sintase, pode ser convertida em glicogênio (DeFronzo, 2004). O tecido adiposo é responsável por aproximadamente 20% da captação periférica da glicose em um indivíduo saudável (Machado et al., 2006). A glicose em excedente pode ser convertida em triacilglicerol no tecido adiposo branco (TAB). Esse efeito é mediado pela insulina, a partir da ativação da lipase lipoprotéica (LPL) presente nas paredes dos vasos capilares que drenam no tecido

adiposo, que hidrolisa os triglicérides contidos nas VLDL em ácidos graxos permitindo que sejam captados nos adipócitos, onde são novamente reesterificados e armazenados. Outra ação da insulina reside sobre a inibição da lipase sensível a hormônios nos adipócitos, evitando que os triacilgliceróis armazenados sejam hidrolisados em ácidos graxos e se difundam na circulação bem como na estimulação da oxidação da glicose que fornece glicerolfosfato para a síntese de TG.

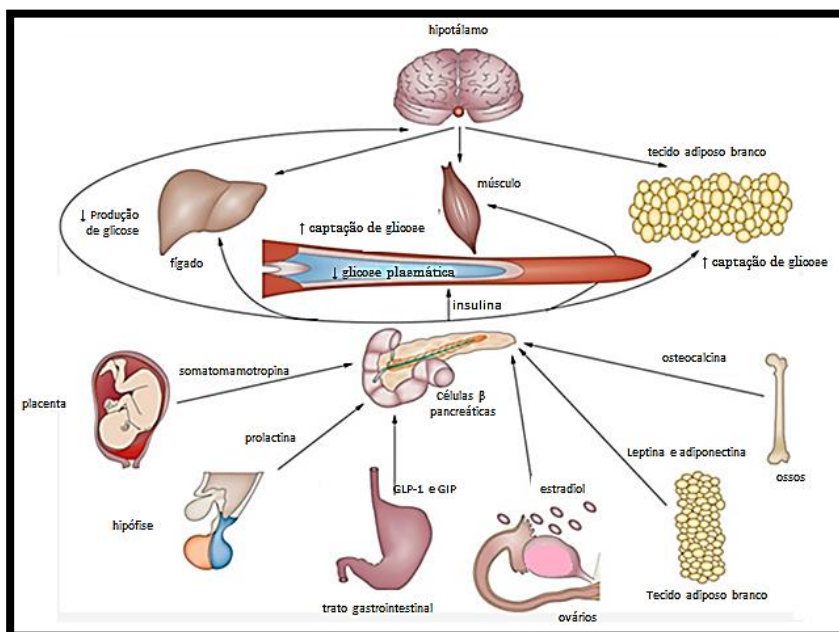


Figura 1- Homeostase Glicêmica. A homeostase glicêmica requer ações coordenadas de diversos órgãos e tecidos. A glicose é oxidada em praticamente todos os tecidos, especialmente o tecido muscular e adiposo, por ação da insulina. Adaptado de Tiano & Mauvais-Jarvis, 2012.

1.2 CICLO HORMONAL E ALTERAÇÕES DA HOMEOSTASE GLICÊMICA NA MENOPAUSA

A menopausa é um processo natural em que ocorrem alterações na fisiologia ovariana (Agil, et al., 2010). Esta alteração fisiológica se refere ao término da atividade folicular dos ovários manifestada pela interrupção do ciclo menstrual por pelo menos 12 meses em seres humanos (Elavsky & McAuley, 2009). Os esteróides ovarianos regulam a secreção de gonadotrofinas por meio de dois mecanismos de retroalimentação: positivo e negativo, que exercem efeitos opostos. Essa regulação envolve os hormônios estrógenos, progesterona, e inibinas A e B. O núcleo arqueado do hipotálamo, localizado na sua região ventromedial, contém neurônios neurosecretores, cujos axônios terminam na eminência mediana, uma região centro-hipotalâmica. As terminações desses axônios secretam o hormônio liberador das gonadotrofinas GnRH (também chamado de LHRH), de forma pulsátil, exclusivamente para a circulação porta-hipofisária (Reichlin, 1992).

O GnRH atua na adeno hipófise estimulando as células gonadotróficas, promovendo a síntese e a liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo-estimulante (FSH). A adeno hipófise normalmente responde ao estímulo do GnRH quando este ocorre de forma pulsátil, com consequente liberação pulsátil de LH e FSH. (Belchetz et al., 1978; Reichlin, 1992). A Figura 2 mostra a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-ovários numa condição do período reprodutivo normal da mulher.

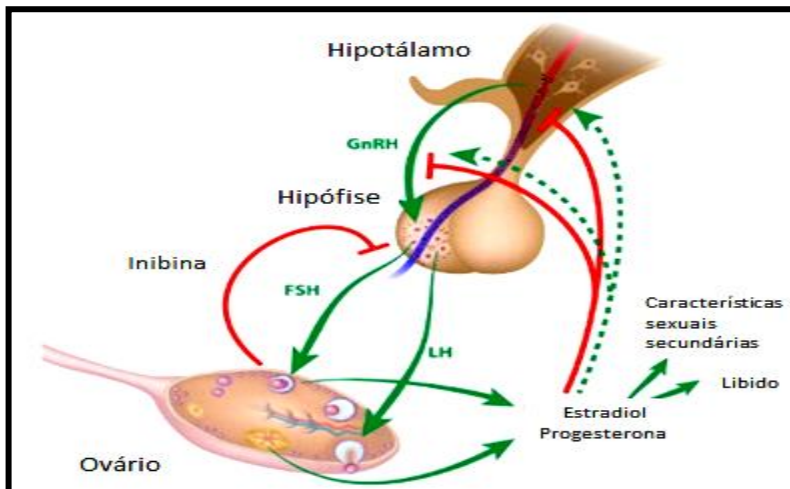


Figura 2– Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal no período reprodutivo funcional. O período reprodutivo funcional é caracterizado pela autorregulação hormonal, envolvendo a interação do sistema neuroendócrino que permite a condição de fertilidade na fêmea. Hormônios-chaves envolvidos nesse sistema são os hormônios gonadotrófico (GnRH) que atua regulando a atividade gonadal pela estimulação da secreção de FSH e LH. Estes dois hormônios promovem o crescimento e a maturação dos folículos ovarianos durante a ovogênese (FSH) e a liberação do folículo ovariano (LH). Simultaneamente, o ovário produz estradiol e progesterona, a partir da maturação folicular que atuam como retroalimentação negativa sobre o hipotálamo e a adeno hipófise bem como em diversas respostas metabólicas e fisiológicas como a caracterização sexual secundária e a libido. A inibina, secretada pelos ovários, também regula a liberação de hormônios adeno hipófisários. (http://www.alilamedicalmedia.com/acesso_2015; Dul e Wong, 2009; Beshay e Carr, 2013)

As gonadotrofinas atuam sobre os ovários, promovendo a secreção dos esteróides sexuais 17β -estradiol que promovem ações em tecidos periféricos e alterações físicas típicas do período pubertário. Sob a mesma ação, as gônadas também secretam inibina, que participa da modulação do eixo. As gonadotrofinas agem de forma intermitente sobre os folículos primários, localizados na região cortical dos ovários. O hormônio luteinizante estimula a produção de andrógenos pelas

células tecais. O FSH estimula o crescimento do folículo ovariano e também a atividade da aromatase, que converte os andrógenos produzidos na teca em estrógenos (principalmente o estradiol) (Rosenfield, et al., 1990). O LH também é responsável pela maturação folicular e pela indução da ovulação, com posterior formação do corpo lúteo que secreta, além de estrógenos, também a progesterona (P).

A regulação desse eixo depende das concentrações séricas dos próprios hormônios que o compõem. Os esteróides sexuais e a inibina atuam sobre o hipotálamo e a hipófise, promovendo a redução da secreção de GnRH e LH/FSH (Wu et al., 1991, Reichlin, 1992) (Figura 2). Da mesma forma, as gonadotrofinas atuam sobre o hipotálamo, reduzindo a secreção de GnRH. Esta ação inibitória é inversamente proporcional às concentrações desses hormônios (Reichlin, 1992). Quando os ovários atingem um nível elevado de produção de estradiol e o mantém por um determinado período, a ação inibitória do estradiol sobre o hipotálamo torna-se estimulatória (retroalimentação positiva) resultando em maior liberação de GnRH => LH e FSH e de estradiol. Essa elevação aguda do estradiol plasmático promove ruptura do folículo ovariano. Após a ovulação, as concentrações de estrógenos reduzem abruptamente, e sua ação sob o hipotálamo volta a ser inibitória (retroalimentação negativa). Essa inversão da retroalimentação ocorre de forma cíclica permitindo a ovulação periódica na mulher adulta (Reichlin, 1992). Assim, o período reprodutivo funcional apresenta dois padrões distintos de secreção de gonadotrofinas: o tônico e o cíclico. O padrão tônico ou basal é caracterizado pela liberação hormonal constantemente regulada pelas concentrações hormonais circulantes. Este é o padrão geral existente nos homens e um dos

mecanismos de controle na mulher. O padrão cíclico caracteriza-se pela elevação acentuada das concentrações circulantes de estrógeno, promovendo ação estimulante sobre a secreção de gonadotrofinas, que elevarão ainda mais as concentrações de estrógenos séricos necessários para a ovulação.

A secreção das inibinas A e B diferenciam-se de acordo com a fase do ciclo ovulatório: as concentrações de inibina A aumentam na fase folicular e atingem o maior incremento na fase lútea e sua secreção está vinculada especialmente ao folículo dominante e ao corpo lúteo. As concentrações de inibina B atingem o máximo incremento na fase folicular média, com um pico ovulatório antes de retornarem aos valores basais na fase lútea e sua secreção é realizada por pequenos folículos antrais em desenvolvimento. Clinicamente, a inibina B é um marcador direto da atividade ovariana e está relacionada ao número de ovócitos obtidos, enquanto que a inibina A tem sido descrita como um marcador útil para prever o surgimento de pré-eclâmpsia em gestantes (Reis e Rezende, 2009). Progesterona e estrógeno atuam sobre o eixo hipotálamo-hipófise. A inibina atua sobre a hipófise suprimindo a liberação de FSH, mas sem efeito sobre o LH (Molitch 2004, Lambalk, 2010). A retroalimentação negativa ocorre na maior parte do ciclo reprodutivo e mantém as concentrações de gonadotrofinas reduzidas. Este mecanismo inibitório pode ser facilmente demonstrado pelo aumento da secreção de LH e FSH que ocorre após a menopausa, em consequência da redução acentuada da secreção dos hormônios ovarianos. Essa inibição pode também ser demonstrada pela redução da secreção destas gonadotrofinas observada após a administração de

estrogênios e/ou progesterona na menopausa, ou após o uso de contraceptivos orais (Bulum e Adashi, 2003).

Em ratas, a maturidade sexual ocorre por volta dos sessenta dias de idade. O ciclo estral dura em média quatro a cinco dias, distribuídos nas fases de proestro, estro, metaestro e diestro. Estas fases são identificáveis através de análise citológica vaginal, pela avaliação de proporções entre células típicas do esfregaço vaginal (Hoar e Hickman, 1975; Mies-Filho, 1987). Em ratas, os níveis plasmáticos de esteroides sexuais se modificam ao longo das fases do ciclo reprodutivo. Concentrações menores de estradiol são observadas durante o estro, aumentando no metaestro e atingindo o pico no proestro (Smith et al., 1975; Freeman, 1988). Já a progesterona, o pico de liberação ocorre na fase de metaestro e outro pico durante o proestro, sendo as menores concentrações presentes durante o diestro (Smith et al., 1975; Freeman, 1988).

A falência ovariana é progressiva e é uma condição de transição natural na vida reprodutiva das fêmeas sinalizando o término da fertilidade. Ao longo desta transição pode ser observada alterações de aspectos psicológicos, somáticos, vasomotores e urogenitais (Greene, 2008). Os 5 a 10 anos que precedem a menopausa, período chamado de perimenopausa, possui característica flutuante em relação às concentrações de estradiol (Keck et al., 2007, Dul e Wong, 2009). Portanto, a perimenopausa é caracterizada pelo início das alterações hormonais e os sintomas físicos e biológicos começam a ocorrer. Os efeitos colaterais da perimenopausa, descritos em mulheres, são semelhantes aos associados com a menopausa: fadiga, ondas de calor, sensibilidade mamária, o agravamento da síndrome pré-menstrual,

secura vaginal, desconforto durante a relação sexual, diminuição da libido, micção freqüente, dificuldade para dormir, e alterações bruscas de humor. Este período dura em média de três a oito anos. Nesse período ainda é possível que a mulher engravide (Santoro et al., 1996, Keck et al., 2007). A Figura 3 mostra as características presentes na transição entre a perimenopausa e a menopausa.

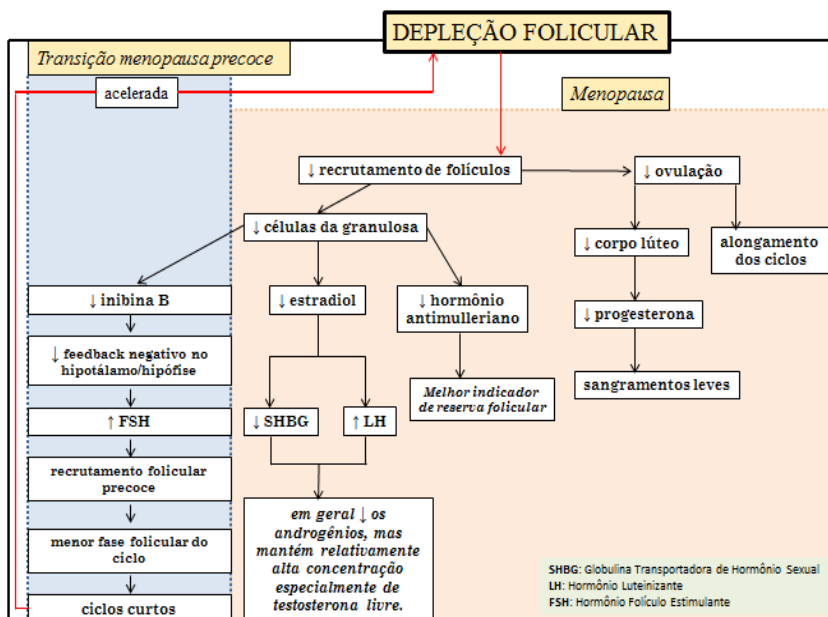


Figura 3: Transição entre perimenopausa e menopausa na fisiologia reprodutiva a partir da falência ovariana. Os ciclos menstruais tornam-se irregulares durante a transição da menopausa precoce devido à flutuação hormonal das gonadotrofinas. A diminuição da liberação de inibina B constitui passo inicial para a progressão da menopausa. Os ciclos menstruais tornam-se relativamente mais curtos e irregulares, levando à perda folicular acelerada nos anos anteriores à menopausa. Eventualmente, há redução importante no conjunto de folículos remanescentes que conduz à ciclos anovulatórios. Mulheres na perimenopausa podem apresentar oligomenorréia (alongamento no intervalo entre os ciclos) e hipomenorréia (sangramentos leves) (Dul e Wong, 2009).

A perimenopausa pode ser observada a partir de 43 anos e inclui hiperestrogenismo, hipergonadotropismo, e diminuição da secreção de progesterona na fase lútea (Santoro et al., 1996). Como os roedores, mulheres na perimenopausa apresentam disfunção neuroendócrina caracterizada pela redução nas concentrações de estradiol comprometendo a retroalimentação positiva necessária para a indução do pico de LH (Genevieve et al., 2010). A menopausa consiste em um fator de risco para doenças cardiovasculares e fraturas ósseas (Brand et al., 2013). Clinicamente, a menopausa é definida como a cessação da ciclicidade menstrual por pelo menos um ano (Wu et al., 2005). Com o advento da menopausa, são frequentes o ganho de peso e as modificações na distribuição da gordura corporal. Alterações na distribuição da gordura corporal relacionada à menopausa podem explicar, em partes, o maior risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas (Toth et al., 2000). O sedentarismo e a diminuição do metabolismo basal, associadas ao aumento na ingestão alimentar, contribuem para o ganho de peso com o avançar da idade. A obesidade – em particular, a gordura visceral – está diretamente associada com ao desenvolvimento de um grupo de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), entre elas a síndrome metabólica (SM), que pode incluir a presença resistência periférica à insulina (RI), dislipidemia e hipertensão arterial, e até mesmo o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Liu Y et al., 2001). Em um estudo com ratas *Wistar* foi demonstrado associação entre o envelhecimento e prejuízos metabólicos e físicos que incluem aumento da pressão arterial e redução da sensibilidade de pressoreceptores em paralelo a diminuição das concentrações de hormônios ovarianos (Dias et al., 2011).

Estudos transversais e longitudinais, utilizando a circunferência da cintura ou a relação cintura-quadril não mostram efeito da menopausa sobre a distribuição de gordura corporal. Por outro lado, estudos utilizando densitometria de duplo feixe de raios-X mostraram aumento da gordura do tronco em mulheres na menopausa. Além disso, estudos com tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (MRI) mostram que as mulheres na pós-menopausa têm maior quantidade de gordura intra-abdominal em relação às mulheres na pré-menopausa. Estes estudos sugerem que a transição da menopausa está associada a um acúmulo de gordura central e, em particular, a gordura intra-abdominal (Toth et al., 2000).

Embora relacionada à depleção de folículos ovarianos, as causas e os processos da menopausa são pouco compreendidos. Alterações no sistema nervoso central (SNC) relacionadas à idade, incluindo padrões críticos de secreção de GnRH, precedem a depleção folicular e podem desempenhar papel importante na menopausa. Como os folículos não se desenvolvem em resposta aos hormônios LH e FSH, as concentrações de estrógeno e progesterona diminuem. A perda da inibição por retroalimentação negativa do estrógeno no GnRH e LH/FSH resulta em notáveis aumentos das concentrações circulantes de LH e FSH. As concentrações de FSH se elevam mais que as de LH, podendo resultar na diminuição da liberação de inibina ovariana (Thiery & Martin, 1991). A produção de estrogênios ovarianos declina em até 300 mg/dia podendo atingir concentrações plasmáticas desprezíveis. Entretanto, as mulheres na menopausa não estão completamente desprovidas de estrogênios. O tecido adiposo, o fígado e o córtex adrenal contribuem com uma produção de aproximadamente 20mg/dia. Além do término

dos ciclos ovarianos e menstruais, a redução das concentrações estrogênicos ovarianos durante a menopausa pode resultar em inúmeras alterações metabólicas e psicológicas como mencionado anteriormente (Butler & Santoro, 2011).

A partir dos 50 anos de idade as mulheres apresentam aumento considerável no risco de doenças cardiovasculares (Ford et al., 1998). Essa mudança no perfil de risco coincide com o climatério e caracteriza-se pelo surgimento ou piora de alguns fatores tais como: obesidade central, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e dislipidemia (American Heart Association, 2005; Alberti et al., 2006). Desde a década de 70, estudos mostram uma associação causal entre a menopausa e os fatores de risco para a SM, enquanto outros atribuem o aumento do risco apenas ao processo de envelhecimento (Casiglia et al., 1996, Casiglia et al., 2000, Park et al., 2003).

Mulheres na menopausa possuem maior acúmulo de gordura visceral do que as que ainda menstruam, sendo independente do processo de envelhecimento (Janssen et al., 2010). O estradiol é considerado como fator protetor para doenças cardiovasculares nas mulheres pré-menopáusicas, e a redução das concentrações deste hormônio na menopausa confere maior suscetibilidade ao aumento de gordura na região abdominal. Outro hormônio relacionado a essa variação na gordura visceral é a testosterona, sendo um forte preditor de gordura visceral e, como tal encontra-se elevado na menopausa, confere maior risco cardiovascular (Simpkins et al., 2005, Singh et al., 2006, Suzuki et al., 2006, Lima e Bethea, 2010). Apesar de haver inúmeros indícios de distúrbios metabólicos durante a menopausa, pouco se sabe

acerca da regulação da homeostase glicêmica e se há alguma deterioração desta em contextos de desafios metabólicos.

1.2.1 Modelos experimentais em menopausa

A utilização de animais de laboratório é imprescindível para o entendimento das fisiopatologias. O sistema “*Stages of Reproductive Aging Workshop*” é considerado padrão ouro para a caracterização de envelhecimento reprodutivo durante a menopausa em seres humanos, assim como a descrição dos estágios de maturação puberal descritos por “*Marshall-Tanner Stages*”. Esse sistema é uma ferramenta que auxilia pesquisadores na área da biologia reprodutiva, avaliando a trajetória de mudanças no sistema endócrino e das concentrações de biomarcadores de senescência ovárica (Battistini et al., 2002, Freeman et al., 2007, Su et al., 2008, Sowers et al., 2008). Pesquisas realizadas durante os últimos 10 anos têm avançado no entendimento das alterações críticas observadas no hipotálamo-hipófise e função ovariana que ocorrem antes e após o período menstrual. Os critérios potenciais para a avaliação da transição dos ciclos são definidos com base nas concentrações do FSH, hormônio antimülleriano (AMH) e inibina-B e contagem de folículos antrais (AFC) (Harlow et al., 2012).

Os roedores são modelos úteis para o estudo da fisiologia reprodutiva feminina porque exibem um elevado grau de semelhança genética e fisiológica para os seres humanos, possuem ciclo vital relativamente curto, e espécies homogêneas estão amplamente disponíveis (Wu et al., 2005). O ciclo estral dos roedores apresenta padrões semelhantes de alterações cíclicas das concentrações de LH, FSH, estrógeno e progesterona como se observa no humano. As

principais diferenças nos roedores são a fase lútea muito curta e a ausência de fluxo menstrual quando a gravidez não ocorre. Mesmo que o envelhecimento reprodutivo em ratos e humanos possuam características particulares (Wise et al., 1991) várias características na perimenopausa de mulheres e ratas são comuns, tais como apresentarem sinais fisiológicos de iminente senescência reprodutiva pela elevação das concentrações de FSH. Também apresentam diminuição da atividade das células da granulosa, diminuição da produção de inibina B e redução da responsividade do eixo hipotálamo-hipófise à retroalimentação positiva exercida pelo estrógeno (Wu et al., 2005).

Comparativamente, há diferenças entre as funções reprodutivas entre ratos e humanos. Algumas dessas diferenças estão descritas na Tabela 2:

Tabela 2. *Diferenças nas funções reprodutivas do rato e do humano.*

<i>Ratas</i>	<i>Mulheres</i>
Gestação de aproximadamente 22 dias	Gestação de aproximadamente 270 dias
Migração das células germinativas para a crista genital leva 11 a 12 dias	Migração das células germinativas para a crista genital leva 30 a 35 dias
Início da prófase meiótica em 17 dias	Início da prófase meiótica em 45 dias
Início da foliculogênese ocorre 1 a 2 dias após o nascimento	Início da foliculogênese em 98 dias (fetal)
Regressão do ducto de Wolff em aproximadamente 17 dias	Regressão do ducto de Wolff em 70 dias.
As ratas têm um ciclo estral de 4 a 5 dias, sem corpo lúteo funcional. Mostra receptividade sexual apenas durante o estro e no proestro. Este comportamento é dependente de estrógeno e progesterona	Os seres humanos têm um ciclo menstrual de aproximadamente 28 dias e não apresentam períodos de pico comportamental de estro durante o ciclo. O corpo lúteo mantém-se cerca de 10 a 14 dias após a ovulação

Ambos os ovários liberam espontaneamente vários óvulos em resposta ao aumento das concentrações do LH em cornos uterinos separados	Nas mulheres, um único óvulo é tipicamente liberado durante cada ciclo
A puberdade nas ratas (medida pela idade na abertura vaginal e o início da ciclicidade estral) ocorre em cerca de 32 dias de idade	Nos seres humanos, a puberdade inicia entre 9 a 12 anos de idade
A fertilidade começa a diminuir por cerca do 6º mês de idade, especialmente se nunca acasalou, porém é contínuo até a senescência ovariana	A fertilidade começa a declinar em mulheres com cerca de 35 anos e segue até a perimenopausa
A menopausa em ratas ocorre entre 15 a 24 meses de vida	A menopausa instalada em mulheres varia entre 48 a 55 anos

Adaptado de (Thibault, MC et al. 1993; Sengupta, P. 2011)

O modelo experimental mais empregado para o estudo dos efeitos da menopausa é o da ovariectomia. Porém, este modelo não mimetiza a progressão natural da perimenopausa para a menopausa, um processo gradual pelo qual a maioria das mulheres experenciam entre as idades de 48 aos 55 anos e nas ratas entre 15 e 24 meses de vida. Um modelo experimental alternativo tem sido proposto através da administração do composto denominado 4-vinilciclohexeno diepóxido (4-VCD). O 4-VCD é um composto químico obtido no processo de produção de inseticidas, antioxidantes, pneus de borracha e é utilizado comercialmente como um diluente reativo e intermediário químico para diepóxidos resinas epóxi (Huff 2001, Kermath e Gore, 2012). O 4-VCD apresenta efeitos ovotóxicos (tóxico para os ovócitos ovarianos) e pode resultar em menopausa prematura em fêmeas (Hoyer et al., 2001). Com base em seus efeitos ovotóxicos, pesquisadores vêm utilizando o 4-

VCD para estudar a perimenopausa e a menopausa, pois esta droga proporciona depleção gradual de folículos ovarianos, mantendo o ovário intacto (Doerr et al., 1995; Hoyer et al., 2001). O 4-VCD danifica seletivamente os folículos primordiais e primários por meio da aceleração do processo natural de atresia folicular (apoptose). Portanto, a falha ovariana prematura ocorre pela depleção dos folículos ovarianos e conseqüentemente resulta na redução das concentrações de estrogênios e progesterona (Mayer et al., 2001).

O modelo de menopausa induzida pela administração de 4-VCD também é importante, pois descarta o fator do envelhecimento como variável para a causa das alterações metabólicas observadas durante a menopausa considerando que se trata de um modelo de menopausa precoce (onde as ratas atingem menopausa aproximadamente a partir do sétimo mês de vida).

Os estudos demonstram que a redução do número de folículos primordiais e primários induzida pela administração do 4-VCD em ratas ocorre por apoptose e é acompanhado por aumento da atividade da caspase-3, especificamente nos folículos pré-antrais (Hoyer e Sipes, 1996, Springer et al. 1996, Hu et al, 2001, Thompson et al., 2005). No entanto, não tem efeitos depletivos em outros folículos já desenvolvidos ou órgãos, na dosagem de 160 mg/kg de peso corpóreo por 15 dias consecutivos (Mayer et al., 2004, Romero-Aleshire et al., 2009). Esse modelo atualmente está sendo estudado em pesquisa de câncer ovariano, reforçando a ideia da similaridade com a transição natural de pré-, peri- e pós-menopausa (Hariri et al., 2010).

Um estudo investigando a progressão da menopausa em camundongas, com o modelo 4-VCD, demonstrou o aparecimento de RI

e o favorecimento de um quadro metabólico que se assemelha à SM quando submetidos à dieta hiperlipídica. Nestes animais, a intolerância à glicose surgiu 12 semanas após o tratamento com a dieta, enquanto que as fêmeas tratadas somente com a dieta hiperlipídica apresentaram intolerância à glicose 4 semanas após (na 16ª semana) (Romero-Aleshire et al., 2009). Dessa forma, esse modelo apresenta uma aproximação com a condição natural de falência ovariana. Com a depleção dos folículos ovarianos, a gradual redução das concentrações de estradiol está associada ao aumento da adiposidade, e conseqüentemente da incidência de doenças metabólicas em humanos (Tchernof et al., 2004) e em camundongos (D'eon et al., 2005).

1.3 ALTERAÇÕES NA HOMEOSTASE GLICÊMICA E GLICOCORTICOIDES

Os glicocorticoides (GCs) estão entre os fatores que participam da modulação da homeostase glicêmica (Delbende et al., 1992, Kaplan, 2000). Os GCs são sintetizados na zona fasciculada do córtex adrenal sob estímulo do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A regulação da secreção dos GCs ocorre por meio do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, um circuito de retroalimentação neuroendócrino que pode ser modulado por alterações fisiológicas e/ou patológicas tais como o estresse, citocinas inflamatórias, febre, traumas, hipotensão arterial e hipoglicemia que normalmente ativam o eixo hipotálamo-hipófise (CRH-ACTH) culminando no aumento da liberação do cortisol (Faria & Longui, 2006, Mormède et al., 2007, Yau e Seckl, 2012).

Os GCs desempenham papel importante no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, além de exercerem atividades

permissivas para outras ações hormonais (Andrews & Walker, 1999, Rhen et al., 2005). Um dos efeitos fisiológicos dos GCs reside em aumentar as concentrações de glicose sanguínea. No fígado, os GCs induzem a gliconeogênese, favorecendo a ação de outros hormônios contrareguladores (*ex.*, glucagon, catecolaminas e GH). Os GCs regulam o metabolismo de carboidratos agindo em direção oposta aos efeitos da insulina, estimulando a gliconeogênese hepática e aumentando a mobilização de substratos energéticos, como os lipídeos. Em paralelo, os GCs promovem RI transitória por diminuir a captação de glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo devido à interferência na sinalização da insulina (Figura 4).

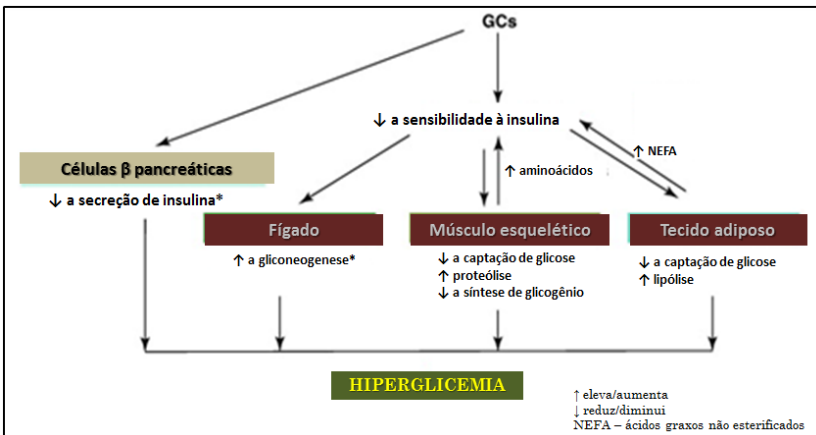


Figura 4: Efeitos da administração de GCs sobre à homeostase glicêmica. Os GCs, dependendo da dose e tempo de tratamento, podem resultar em *relativa diminuição da secreção de insulina pelas células β pancreáticas. Podem ainda diminuir a sensibilidade à insulina, resultando em efeitos no fígado, como o aumento da gliconeogênese e, no músculo esquelético, diminuição da captação de glicose e consequentemente redução da glicogênese. No tecido adiposo promove a diminuição da captação de glicose e ativação da lipólise. Essas alterações podem favorecer a elevação da glicemia. (Adaptado de Mazzotti et al., 2011)

Parte das alterações metabólicas evidenciadas na SM (*ex.*, dislipidemia, aumento da das concentrações de glicose sanguínea, adiposidade visceral) também são encontradas na síndrome de Cushing, patologia associada ao hipercortisolismo demonstrando o efeito diabetogênico destes hormônios quando em excesso (Reynolds e Walker, 2003, Shibli-Rahhal et al., 2006, Kadmiel e Ciclowski, 2013).

1.3.1 Modelos experimentais com o uso de GCs

Os diferentes modelos experimentais de RI podem ser classificados em: a) modelos genéticos: animais com mutação de um ou mais genes, animais transgênicos com deleção de um ou mais genes; b) aqueles nos quais a RI é secundária a uma condição patológica (*ex.*, DM2) ou, c) aqueles nos quais a RI é induzida através da administração de fármacos (*ex.*, GCs) ou dietas (*ex.*, hiperlipídicas) (Cesaretti & Kohlmann Jr., 2006).

Na Tabela 3 está descrito as principais propriedades farmacológicas de diferentes GCs. Os estudos para determinação dos efeitos adversos do uso dos GCs iniciou com Cushing em 1932. Em 1950 a indicação do uso de GCs para a atenuação da artrite reumatóide impulsionou os estudos para a redução dos efeitos colaterais do uso dos GCs (Longui, 2007).

Tabela 3: GCs: fonte e potência biológica (efeito anti-inflamatório)

<i>Nomenclatura</i>	<i>Potência biológica</i>	<i>Fonte</i>
Cortisol (humano)	Potente, atividade fisiológica de referência	Endógeno
Corticosterona (humano)	Baixa, 4% da atividade do cortisol	Endógeno
Cortisona (humano)	Potencia equivalente à do cortisol quando convertido na forma ativa	Sintético
Prednisona	4x mais potente que o cortisol quando convertido na forma ativa	Sintético
Metilprednisona	5x mais potente que o cortisol quando convertido na forma ativa	Sintético
Dexametasona	30x mais potente que o cortisol	Sintético
Prednisolona	4x mais potente que o cortisol	Sintético

Os GCs sintéticos (*ex.*, prednisolona e dexametasona) são amplamente prescritos para o tratamento de doenças com base inflamatória, alérgica e até mesmo para fins imunossupressores (Stahn & Buttgerit, 2008). Os GCs atuam em terapias de redução da inflamação e da resposta imune na asma, bem como para várias respostas alérgicas (Andrews & Walker, 1999, Rhen et al., 2005). Também são descritas utilização de GCs no tratamento de doenças

respiratórias (Bodor & Buchwald, 2006, Rizo & Sole, 2006), oftalmológicas (Polos'iants, 1999), de linfomas (Held et al., 2006), mielomas (Hussein, 2004), câncer de próstata (Trump & Lau, 2003), psoríase (Van de Kerkhof & Vissers, 2003) e de alotransplantes. Esses fármacos diferenciam-se dos GCs endógenos por terem maior ação anti-inflamatória associada a menor depuração metabólica. A dexametasona não é susceptível à inativação pela enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase 2 (11- β HSD2), o que lhe confere maior biodisponibilidade (Weinstein, 1998). Porém, a terapia baseada em GCs geralmente está associada a efeitos adversos, como a atrofia muscular, hipertensão arterial, osteoporose, aumento da deposição de gordura central e alterações metabólicas, tais como a indução da RI e da intolerância à glicose (Schacke et al., 2002). Observou-se também que a administração exógena de GCs aumenta os níveis séricos de insulina e triacilglicerol juntamente com a instalação de um quadro de RI (Freedman et al., 1986, Santos et al., 2007). A definição clínica da RI reside na redução da ação do hormônio frente aos tecidos periféricos que requerem uma hiperinsulinemia compensatória. O desenvolvimento da RI em algumas doenças crônicas, tais como obesidade e DM2 normalmente leva meses, anos ou mesmo décadas para ser diagnosticada (Li Li e Messina, 2009). Indivíduos com RI podem manter glicemia normal ou próxima de valores fisiológicos à custa de uma resposta compensatória promovida pelo pâncreas endócrino que resulta em hipersecreção de insulina e conseqüentemente hiperinsulinemia. A hiperinsulinemia compensatória pode prevenir alguns indivíduos do quadro de intolerância à glicose (Rogers & Smith, 2012).

A administração de dexametasona na dosagem de 0,5mg/kg/dia *i.p.* durante 30 dias resulta em RI, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, esteatose hepática, disfunção endotelial e hipertensão arterial (Pinheiro et al., 2009). Estudos *in vivo* demonstraram que a administração de dexametasona 1 mg/kg peso corpóreo por 5 (Saad et al., 1993), 11 (Burén et al., 2008) ou 12 dias consecutivos (Ruzzin et al., 2005) em ratos resulta em RI associada a hiperinsulinemia e dislipidemia, acompanhada ou não por hiperglicemia. Resultados similares foram observados por trabalhos de nosso grupo. Rafacho et al. (2008, 2011) demonstraram que a administração de diferentes doses (0,1, 0,5 e 1.0 mg/kg peso corpóreo) ou períodos (1, 3 e 5 dias) de dexametasona em ratos adultos induz hiperinsulinemia e RI de uma forma dependente da dose e tempo, com ou sem aumento dos valores glicêmicos em ambos os estados metabólicos (absortivo e pós-absortivo). A administração de dexametasona na dosagem de 1mg/kg de peso corpóreo por 5 dias consecutivos reproduz consistentemente intolerância à glicose, RI e dislipidemia (Nunes et al., 2013, Gonçalves-Neto 2014, Motta et al., 2014, Santos et al., 2014). A administração de GCs em ratos *Wistar* também pode alterar alguns parâmetros cardiovasculares como a hipertrofia ventricular esquerda (Cesaretti & Kohlmann Jr., 2006). Dessa forma, esse modelo serve para a compreensão dos mecanismos subjacentes às alterações cardiometabólicas, em especial da intolerância à glicose e da RI associado aos GCs.

1.4 JUSTIFICATIVA

O avanço tecnológico especialmente na área da saúde e a ampla disseminação do conhecimento através de diferentes mídias, permite que a população possa ter uma maior longevidade. A biologia reprodutiva feminina possui um tempo definido, onde a partir da falência ovariana, ocorrem diversas modificações fisiológicas e psicológicas. Essas modificações podem diminuir a qualidade de vida da mulher, pois estão sob risco de desenvolverem doenças metabólicas durante a menopausa. A transição da fase reprodutiva ativa para a menopausa é caracterizada como uma situação estressante. As alterações hormonais que ocorrem durante a situações agudas e crônicas de estresse podem impactar negativamente sobre a homeostase glicêmica (Marcovecchio e Chiareli, 2012). Como a menopausa está presente nas mulheres por um período de vida cada vez maior, é imprescindível que novas informações a respeito da homeostase glicêmica e lipídica sejam investigadas com o intuito de ressaltar a qualidade de vida destas mulheres. Neste sentido o modelo 4-VCD vem contribuir para o conhecimento das eventuais vulnerabilidades presentes durante a perimenopausa e/ou menopausa uma vez que mimetiza a transição natural entre estas duas fases.

Considerando o uso em grande escala dos GCs na forma terapêutica, que inclui mulheres em menopausa, buscamos investigar se as alterações sabidamente promovidas pelos GCs sobre o metabolismo da glicose (que são similares entre humanos e roedores) estariam presentes em maior ou menor magnitude num contexto onde a redução das funções ovarianas esteja presente num modelo animal. Com isso esperamos verificar se a presença da menopausa precoce, induzida pela administração do 4-VCD estaria I) alterando algum parâmetro

relacionado à homeostase glicêmica nas ratas e se II) tornaria estas ratas mais ou menos vulneráveis aos efeitos dos GCs sobre o metabolismo glicídico. Esperamos contribuir com o entendimento destas associações e avançar nesta área de investigação.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar parâmetros morfofuncionais relacionados à homeostase glicêmica em ratas com perda de função ovariana e tratadas com dexametasona.

2.2 Específicos

- Determinação semanal do crescimento corpóreo e da ingestão alimentar ao longo do desenvolvimento das ratas;
- Determinação da distribuição e da massa de órgãos relacionados ao metabolismo energético como o fígado, tecido adiposo omental, retroperitoneal e perigonadal bem como das adrenais e do baço;
- Identificação do conteúdo de glicogênio e gordura hepáticos;
- Avaliação da homeostase glicêmica por meio da determinação da glicose sanguínea e da insulina plasmática;
- Determinação plasmática do lactato, triacilglicerol, colesterol total e da progesterona;
- Avaliação da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina bem como da capacidade secretória de insulina *in vivo*;
- Determinação da massa de células β pancreáticas identificando a resposta pancreática ao desafio com 4-VCD e a dexametasona.
- Avaliação indireta do efeito do tratamento do 4-VCD pela massa dos ovários.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização desse estudo, foram seguidos os princípios éticos de experimentação animal, descritos no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – protocolos nº PP00782 e PP00842.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 120 ratas Wistar, divididas em 3 lotes de 40 animais cada, provenientes do Biotério Central da UFSC, localizado no Campus Trindade, Florianópolis, SC. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 animais por caixa) e em ambiente com temperatura controlada (21 ± 2 °C) em ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas) – período de luz 06:00 as 18:00 , com livre acesso à comida e água, até atingirem a idade de 210 dias.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos em quatro grupos contendo um ‘n’ experimental de 10 animais por grupo x 3 lotes, descritos a seguir:

Controle (CTL): ratas tratadas com veículos: óleo de milho 2,5 µL/g de peso corpóreo, *i.p.* (Mayer et al. 2004; Lohff et al., 2005) e solução salina 1mL/kg peso corpóreo, *i.p.*;

Controle dexametasona (DEX): ratas tratadas com óleo de milho e fosfato de dexametasona (Decadron® - Aché) – (1 mg/kg peso corpóreo

i.p.) (Rafacho et al., 2009, Gonçalves-Neto et al., 2014, Motta et al., 2014);

Tratadas VCD (VCD): ratas tratadas com 4-VCD (160 mg/Kg peso corpóreo, *i.p.*) (Kao, et al., 1999; Mayer et al. 2004; Lohff et al., 2005) e solução salina;

Tratadas VCD + dexametasona (VCD/DEX): ratas tratadas com 4-VCD e fosfato de dexametasona como nos grupos VCD e DEX.

O tratamento pelo período de 15 dias com o 4-VCD (grupos VCD e VCD+DEX) ou óleo de milho (grupos CTL e DEX) se deu entre o 28º ao 42º dia de vida entre 07:00-08:00 h (Figura 5). Aos 120 dias de vida as ratas atingem condição de menopausa precoce (Romero-Aleshire et al., 2009; Merchenthaler et al., 2014). Aos 210 dias de vida, ou seja, 168 dias após o tratamento com o 4-VCD, as ratas receberam injeção de fosfato de dexametasona (grupos DEX e VCD+DEX) ou solução salina (grupos CTL e VCD) por 5 dias consecutivo no mesmo horário da manhã como no tratamento com o 4-VCD.

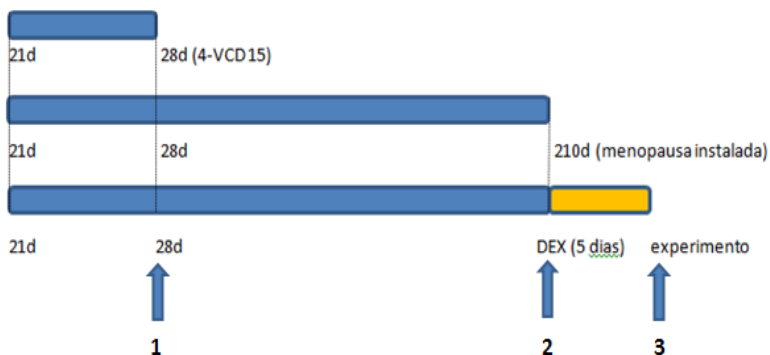


Figura 5: Período dos tratamentos com 4-VCD e dexametasona

1. Início do tratamento com 4-VCD ou óleo de milho
2. Início do tratamento com dexametasona ou solução salina
3. Experimentos *in vivo* e eutanásia

3.3 PARÂMETROS METABÓLICOS:

3.3.1 Peso corpóreo

A verificação do peso corpóreo foi realizada semanalmente a partir do início da administração do 4-VCD e diariamente a partir dos 210 dias de vida até o dia da eutanásia em balança eletrônica digital (TECNAL).

3.3.2 Consumo de ração

O consumo de ração foi acompanhado diariamente a partir do tratamento com a dexametasona. A avaliação foi realizada pela pesagem da ração remanescente (não ingerida) descontada do total daquela depositada no dia anterior. A diferença representou a quantidade ingerida por gaiola diariamente. A quantidade média de ração ingerida por animal foi obtida através da divisão da massa total de ração ingerida por gaiola pelo número de animais por gaiola. Os resultados foram expressos em gramas de ração ingeridos por quilo de peso corpóreo para se obter a normalização deste parâmetro (Rafacho et al., 2009, Motta et al., 2014, Santos et al., 2014).

3.3.3 Glicose sanguínea

A glicose sanguínea foi quantificada após jejum (12-14 h) e imediatamente antes da eutanásia através do sistema de fitas (monitor digital) Accu-Check Performa (ROCHE, Brasil). O procedimento se deu a partir da segunda gota de sangue obtida por secção da ponta da cauda (Nunes et al., 2013).

3.3.4 Componentes plasmáticos

A coleta de sangue dos animais ocorreu imediatamente após a eutanásia em animais jejuados (12–14 h). Os animais foram eutanasiados por exposição ao CO₂, seguido por decapitação. O sangue do tronco foi coletado em tubo de ensaio de vidro, previamente lavado em solução salina e na presença de anticoagulante. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 600 x g por 10 min a 4°C (ependorf 5810R) e o plasma foi aliquoteado e armazenado a -80°C para posterior quantificação da insulina (sistema de microesferas – Enspire® Perkin Elmer), triacilglicerol, colesterol total e lactato (espectrofotometria em leitor de placas) de acordo com instruções dos fabricantes e com detalhes previamente publicados (Rafacho et al., 2008, Rafacho et al., 2009; Motta et al. 2014). A progesterona foi enviada para FMRP/USP Ribeirão Preto (SP), para a quantificação pelo método de radioimunoensaio (Reis et al., 2014). O estradiol plasmático foi dosado pelo método de ELISA (DRG® Estradiol ELISA - EIA-2693), seguindo as orientações do fabricante.

3.3.5 Peso de órgãos

Após coleta de sangue, os órgãos fígado, baço, adrenais e gorduras foram cuidadosamente removidos e pesados em balança eletrônica analítica digital (TECNAL).

3.3.6 Glicogênio hepático

A determinação do glicogênio hepático foi realizada a partir de fragmentos de 300 a 500 mg do tecido como descrito previamente (Lo et al., 1970) e com pequenas modificações (Rafacho et al. 2008b). Os fragmentos foram transferidos em tubos de ensaio, contendo uma solução de KOH 30% e fervidas por 1 h para completa digestão. Em seguida, acrescentou-se Na_2SO_4 e o glicogênio foi precipitado com etanol. O material foi homogeneizado e conduzido ao banho Maria novamente por 15 s. Após centrifugação, o sobrenadante contendo lípides saponificados, aminoácidos e outras substâncias foi descartado e o “pellet” ressuspenso em água destilada aquecida. Etanol foi adicionado em seguida e após novo aquecimento rápido em banho Maria o material foi centrifugado. Após diluição do precipitado em 25 mL de H_2O destilada aquecida, o conteúdo de glicogênio foi quantificado por espectrofotometria em reação com reagente fenol e H_2SO_4 . A absorbância foi determinada a 490 nm.

3.3.7 Gordura Hepática

Aproximadamente 100 mg de fígado foi homogeneizado (UltraTurrax® - IKA® Staufen, Germany) em 700 μL de NaCl 1M e transferido para tubos de ensaio. Na sequência, foi adicionado 2 mL de solução metanol/clorofórmio (1:2, v/v), e centrifugado por 5 minutos a 4.000 rpm, com a formação de 3 fases: 1ª fase lipídica metanólica, 2ª tecido e 3ª NaCl. A fase metanólica foi removida para outro tubo e após secagem

foi ressuspensa em 500 µL de Triton X100/Metanol (2:1). A leitura do triacilglicerol hepático foi realizada com leitura em espectrofotômetro (505 nm) de acordo com orientações do fabricante. Após a leitura, os cálculos foram normalizados pela massa do fragmento (Gonçalves-Neto et al., 2014)

3.3.8 Avaliação da ação da insulina pelo modelo de análise homeostática (HOMA)

O HOMA foi calculado a partir da fórmula: glicemia jejum (mmol/L) x insulinemia jejum (µU/mL)/22,5 (Matthews et al., 1985).

3.3.9 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) e teste de tolerância à glicose oral (oGTT)

O ipGTT e o oGTT foram realizados em grupos separados de animais jejuados (12-14h) e acordados. Os animais tiveram a extremidade da cauda seccionada para a coleta de 2 gotas de sangue. A primeira gota foi descartada e a segunda utilizada para determinação da glicemia no tempo 0. Logo em seguida, foi administrada solução de glicose 50% (2g/kg de peso corpóreo, a 36 °C) (*i.p.* ou por gavagem oral dependendo do protocolo) e foram coletadas amostras de sangue da cauda dos ratos aos 20, 40 e 120 min para a determinação das concentrações de glicose sanguínea como descrito acima (ipGTT) e no min 20 (oGTT) (Rafacho et al., 2007; Rafacho et al., 2008b).

3.3.10 Secreção de insulina *in vivo*

A secreção de insulina *in vivo* foi realizada de acordo com

procedimentos descritos previamente (Rafacho et al., 2011) e pequenos ajustes. Um grupo separado de animais jejuados (12-14h) e acordados foram eutanasiados como descrito anteriormente 20 min após desafio com glicose como descrito no ipGTT e oGTT. A obtenção do plasma e a dosagem da insulina plasmática ocorreram como descrito anteriormente.

3.3.11 Lipólise

Ao final do procedimento do ipGTT, as ratas foram eutanasiadas como descrito anteriormente para determinação da atividade lipolítica do tecido adiposo perigonadal. A taxa de lipólise do tecido adiposo *ex vivo* foi realizada através da incubação de fragmentos de tecido adiposo e avaliação da liberação de glicerol para o meio de incubação (Vaughan 1962). Fragmentos do tecido adiposo perigonadal (100 mg) foram incubados em solução de Krebs (pH 7,4), aerado com carbogênio (5% CO₂:95% O₂) contendo 1% de albumina sérica bovina pelo período de 60 min a 37°C na presença ou ausência de 20 µmol/L de isoproterenol. Ao final da incubação, amostras do meio foram coletadas e mantidas em gelo. A determinação do glicerol foi realizada pelo ensaio colorimétrico enzimático de acordo com Bucolo et al. (1973). Os resultados foram descritos em microgramas por miligramas de tecido por hora (µg/mg/h).

3.5. PROCEDIMENTOS ESTRUTURAIS E QUANTITATIVOS

3.5.1 Aspectos morfológicos e massa das células β

Para o estudo de aspectos morfológicos e a massa das células, 5 pâncreas de cada grupo foram coletados, os linfonodos e o tecido adiposo foram removidos para a pesagem do órgão. A porção esplênica

do pâncreas foi cuidadosamente selecionada e em seguida os fragmentos foram fixados por imersão em paraformaldeído 4% tamponado pelo período de 12 h a 4°C, desidratados e embebidos em parafina. Uma secção (5µm) no maior plano do fragmento foi obtida em micrótomo rotativo e aderidas em lâminas sinalizadas individuais. A imunomarcção foi determinada pela distribuição celular da insulina utilizando-se o método padrão de imunoperoxidase indireta. Após remoção da parafina, as secções foram reidratadas e bloqueadas contra a atividade peroxidase endógena com H₂O₂ 1%. Após lavagem com tampão fosfato 0,01M (PBS, pH 7,4) as secções foram tratadas com tampão Tris-EDTA (0,05% Tween 20, pH 9,0) por 20 min em panela vaporizadora para recuperação antigênica. Posteriormente, os cortes foram bloqueados com PBS (0,05% Tween 20 e 5% de leite desnatado) seguido de 2 h de incubação com anticorpo primário em temperatura ambiente (RT). O anticorpo utilizado foi coelho anti-insulina (Santa Cruz biotechnology, CA, USA) diluído a 1:175 em PBS com 2% de leite desnatado. Após lavagens com PBS, as secções foram incubadas pelo sistema ABC de acordo com instruções do fabricante. Os complexos biotina-estreptoavidina foram detectados com solução diaminobenzidina (DAB) solução (0,1% DAB e 0,02% H₂O₂ em PBS). Finalmente, as secções foram rapidamente coradas com Hematoxilina de Harris e montadas para observação microscópica. Após imunomarcções procedeu-se a análise morfológica estereológica do tecido pancreático. A massa de células β foi determinada pela estereologia de contagem de pontos (Weibel, 1979) em lâminas imunomarcadas para insulina. Cada secção foi sistematicamente contada com um gride de 130 pontos (magnificação final 320x). Os números de pontos incididos sobre o

tecido exócrino, células β e células não- β foram contados. A massa relativa de células β foi calculada dividindo-se o número de pontos incididos sobre as células β pela somatória do número de pontos incididos sobre o pâncreas. A massa absoluta foi determinada multiplicando-se a massa relativa (dada em %) pelo peso total do pâncreas (dado em mg). No mínimo 500 campos/imagens foram analisadas por secção. As imagens para documentação foram obtidas por câmera CCD acoplada ao fotomicroscópio Olympus BX-60. As análises morfométricas foram realizadas através do programa Imaje J (Collins, 2007; Schneider et al., 2012) e plotadas em planilha Excel.

3.5.2. Avaliação da Histologia Ovariana

Para o estudo de aspectos morfológicos e da densidade de folículos ovarianos, 5 pares de ovários de cada grupo foram coletados e tiveram o tecido adiposo cuidadosamente removidos. Após pesagem, os ovários foram fixados por imersão em paraformaldeído 4% tamponado pelo período de 12 h a 4°C, desidratados e embebidos em parafina. Uma secção (5 μ m) no maior plano do fragmento foi obtida em micrótomo rotativo e aderida em lâmina não-silanizada individual. Coloração de hematoxilina-eosina foi realizada para verificação dos aspectos morfológicos dos folículos (primordiais, primários e maduros) (Freeman (1994), modificado por Reis et al., 2014).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os dados coletados foram organizados no programa Microsoft Office Excel 2007[®]. A análise estatística dos dados foi realizada no programa

GraphPadPrism v.5.01 (Graphpad Inc; La Jolla, USA). Os dados paramétricos foram apresentados como média e erro padrão da média (EPM). O teste “t” de Student ou ANOVA de 1 via (one-way ANOVA) com *pós-teste* Tukey foi empregado para comparação de dados entre os grupos experimentais, após certificação de normalidade e homocedasticidade. Quando necessário, testes não paramétricos foram aplicados. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

4.1.1 Peso corpóreo e ingestão alimentar

Durante o período em que os animais estiveram alojados no biotério setorial do LIDoC, foi acompanhado o peso semanal dos grupos CTL e VCD, até atingirem a idade estabelecida para este estudo (210 dias). Nesse período, todos os animais apresentaram crescimento regular. Antes do início do tratamento com dexametasona, as ratas dos grupos CONTROLE e VCD apresentaram massa corporal similar (Figura 6, $p < 0,05$, $n = 20$) e foram redistribuídas em quatro grupos que poderão ser observados a partir da Figura 7.

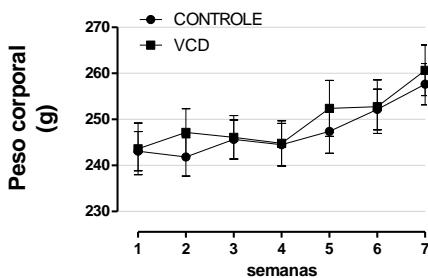


Figura 6: *Peso corporal dos animais antes do tratamento com dexametasona.* Os valores médios de peso corporal nas semanas antecedentes ao tratamento com dexametasona nos 2 grupos, CONTROLE e VCD. Note crescimento gradual e regular da massa corporal dos animais, sem diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$, $n = 20$).

O peso inicial médio das ratas antes do início do tratamento com dexametasona foi similar entre os 4 grupos experimentais. Durante o tratamento com a dexametasona houve redução do peso corpóreo nos grupos DEX e VCD+DEX, comparado aos seus respectivos controles (CTL e VCD). As diferenças foram observadas a partir do 3º dia de tratamento no grupo VCD+DEX e somente no último dia de tratamento no grupo DEX (Figura 7A; $p < 0.05$, $n = 20$). No dia da eutanásia a redução foi de aproximadamente 9% e 10% nos grupos DEX e VCD+DEX, respectivamente, comparado aos seus respectivos controles. As ratas VCD+DEX ainda tiveram uma redução do peso corpóreo nos últimos 2 dias de tratamento em relação ao grupo DEX (Figura 7A; $p < 0,05$, $n = 20$). Os grupos CTL e VCD mantiveram o peso corpóreo similar ao longo do período avaliado. Antes do início do tratamento com dexametasona não houve alterações da ingestão alimentar entre os 4 grupos experimentais. Ao final do experimento a redução na ingestão alimentar foi de 23% no grupo DEX e de 21% no grupo VCD+DEX comparados aos seus respectivos controles (Figura 7B; $p < 0.05$, $n = 20$). Esses dados mostram a ausência de efeito do tratamento com 4-VCD *per se* sobre o crescimento corpóreo e ingestão alimentar. O tratamento com dexametasona promove redução destes parâmetros e os animais VCD submetidos ao tratamento com dexametasona não apresentaram diferenças significantes em relação aos animais tratados apenas com dexametasona.

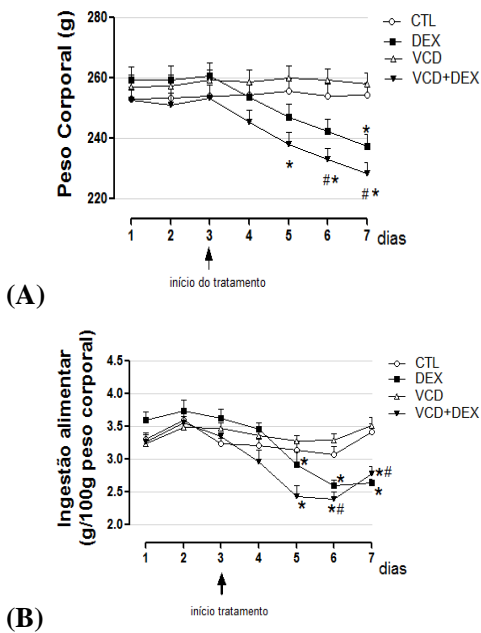


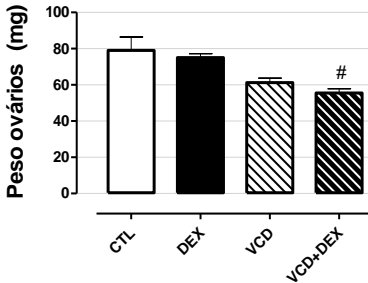
Figura 7: Tratamento com dexametasona em ratos controle e tratados com 4-VCD promove redução da massa corporal e da ingestão alimentar. **(A)** Os valores médios de peso corporal durante tratamento com dexametasona nos 4 grupos. Note redução significativa do peso corporal nos grupos tratados com dexametasona ao longo do tratamento. **(B)** Ingestão alimentar. Observe a redução na ingestão alimentar significativa a partir do 2º dia entre os grupos VCD+DEX vs. VCD. (*) diferença significativa por efeito da dexametasona e (#) diferença significativa por efeito do 4-VCD. ANOVA com *pós-teste* Tukey. ($p < 0,05$, $n = 20$).

4.1.2 Progesterona plasmática e massa ovariana

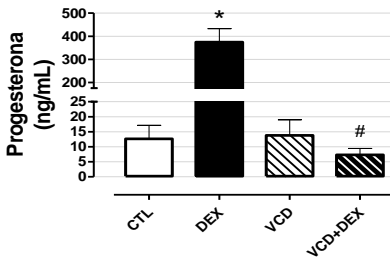
A determinação da massa dos ovários revelou efetividade do tratamento com o 4-VCD a julgar pelos valores médios dos ovários: $79 \pm 7,5$, $75 \pm 2,2$, $61 \pm 2,5$ e $55 \pm 2,3$ mg para os grupos CTL, DEX, VCD e VCD+DEX, respectivamente ($p < 0,05$ VCD+DEX vs. DEX) (Figura 8A, $n = 4$ pares).

As concentrações de progesterona foram determinadas a fim de se observar o efeito do tratamento com 4-VCD sobre a atividade ovariana, relacionada aos hormônios provenientes da maturação folicular. As ratas VCD não tiveram alterações nos valores circulantes de progesterona comparada as ratas CTL (Figura 8; $p < 0,05$, $n = 10$). As ratas DEX tiveram um aumento expressivo de progesterona plasmática

($374,4 \pm 58,5$ ng/mL) vs. CTL ($12,6 \pm 4,5$ ng/mL). O grupo VCD+DEX, contudo, manteve a concentração de progesterona plasmática aos níveis do grupo CTL e VCD demonstrando a perda de função ovariana por efeito do 4-VCD.



(A)



(B)

Figura 8: *Massa ovariana e progesterona plasmática em ratas tratadas com 4-VCD e dexametasona.* (A) A massa ovariana reduziu significativamente no grupo VCD+DEX comparado a seu controle DEX, por efeito do 4-VCD ($p < 0,05$, $n = 4$ pares). (B) Observe o aumento da progesterona plasmática no grupo DEX e a ausência de incremento no grupo VCD+DEX. (*) diferença significativa por efeito da dexametasona e (#) diferença significativa por efeito do 4-VCD. ANOVA com *pós-teste* Tukey. ($p < 0,05$, $n = 10$).

4.1.3 Glicose sanguínea, insulina e lactato plasmáticos e glicogênio hepático

No dia da eutanásia os animais tratados com dexametasona apresentaram aumento significativo da glicemia: 87 ± 1 , 135 ± 21 , 89 ± 2 e 125 ± 11 mg/dL para os grupos CTL, DEX, VCD e VCD+DEX, respectivamente (Figura 9A; $p < 0,05$, $n = 10$). O incremento dos valores de glicose sanguínea foram acompanhados por aumento significativo dos valores de insulina plasmática nos grupos DEX e VCD+DEX: $0,15 \pm 0,03$, $2,0 \pm 0,3$, $0,16 \pm 0,02$ e $1,5 \pm 0,2$ ng/mL para os grupos CTL,

DEX, VCD e VCD+DEX, respectivamente (Figura 9B; $p < 0,05$, $n = 10$). A presença de resistência à insulina foi constatada através do índice HOMA nos grupos tratados com dexametasona: $0,8 \pm 0,2$, $13,1 \pm 2,5$, $0,8 \pm 0,1$ e $9,8 \pm 1,6$ para os grupos CTL, DEX, VCD e VCD+DEX, respectivamente (Figura 9C; $p < 0,05$, $n = 10$).

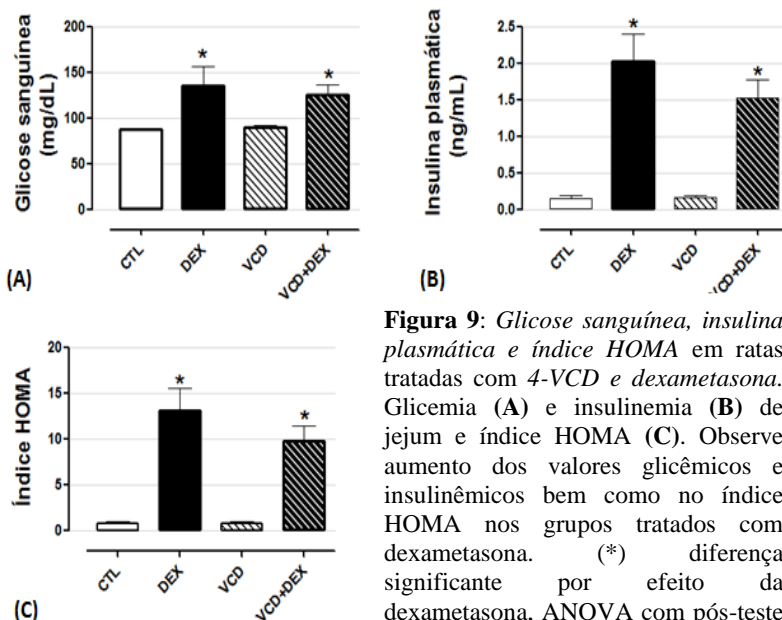


Figura 9: Glicose sanguínea, insulina plasmática e índice HOMA em ratas tratadas com 4-VCD e dexametasona. Glicemia (A) e insulinemia (B) de jejum e índice HOMA (C). Observe aumento dos valores glicêmicos e insulinêmicos bem como no índice HOMA nos grupos tratados com dexametasona. (*) diferença significativa por efeito da dexametasona, ANOVA com pós-teste Tukey. ($p < 0,05$ $n = 10$).

Observamos que as ratas tratadas com dexametasona apresentaram aumento significativo nas concentrações plasmáticas de lactato (Figura 10A, $p < 0,05$, $n = 10$). Os valores de lactato foram $58,5 \pm 7,9$, $100,1 \pm 13,7$, $57,1 \pm 4,6$ e $72,9 \pm 11,9$ mg/dL para os grupos CTL, DEX, VCD e VCD+DEX, respectivamente. Assim como na glicemia e insulinemia, a lactatemia não esteve alterada nos grupos tratados com 4-

VCD e não houve nenhum impacto do 4-VCD quando combinado com dexametasona.

Os GCs estimulam a síntese da enzima glicogênio sintase (DeFronzo, 2004, Porte et al., 2006), podendo favorecer o aumento da produção e do armazenamento do glicogênio hepático. O conteúdo de glicogênio hepático aumentou de forma significativa apenas nos grupos tratados com dexametasona (Figura 10B, $p < 0,05$, $n = 10$) enquanto o tratamento com 4-VCD não causou nenhum efeito *per se* ou combinado com a dexametasona. Os valores foram $0,23 \pm 0,04$, $4,56 \pm 0,19$, $0,24 \pm 0,04$ e $4,37 \pm 0,23$ mg/100mg tecido.

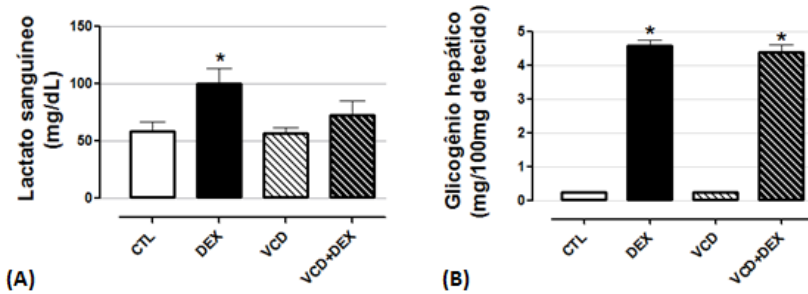


Figura 10: Lactatemia e glicogênio hepático em ratos CTL, VCD, DEX e VCD+DEX. (A) Lactato sanguíneo e (B) Conteúdo de glicogênio hepático. (*) diferença significativa por efeito da dexametasona, usando ANOVA com pós teste de Tukey. ($p < 0,05$, $n = 10$).

4.1.4 Tolerância à glicose e secreção de insulina in vivo

A avaliação da tolerância à glicose pelo ipGTT revelou incremento significativo nos valores de glicose sanguínea nos grupos DEX e VCD+DEX aos 20 min e 40 min após administração do bolus de glicose em relação aos seus respectivos controles (Figura 11A; $p < 0,05$, $n = 10$). As ratas VCD também apresentaram aumento significativo dos

valores de glicose sanguínea comparado ao grupo CTL (minutos 20 e 40) ($p < 0,05$, $n = 10$). Todos os grupos tiveram normalização dos valores glicêmicos 2 h após administração do *bolus* de glicose. Os valores referentes à área sob a curva (ASC) da glicose durante o ipGTT foram maiores nos grupos DEX e VCD+DEX (1072 ± 82 e 1228 ± 25 $\text{mg.dL}^{-1} \cdot 120\text{min}^{-1}$ respectivamente) comparado a seus controles (CTL 667 ± 50 e VCD 1029 ± 50 $\text{mg.dL}^{-1} \cdot 120\text{min}^{-1}$) (Figura 11B, $p < 0,05$, $n = 5-10$). Em relação aos controles, as ratas tratadas com 4-VCD também apresentaram diferença significativa em relação às ratas CTL. A secreção de insulina *in vivo*, constatada a partir dos valores de insulina plasmática no minuto 20 do ipGTT revelou aumento significativo nos grupos tratados DEX e VCD+DEX comparado aos respectivos controles (Figura 11C, $p < 0,05$, $n = 10$). Esses dados reproduzem os achados na literatura a respeito do efeito diabetogênico do GC sobre a tolerância à glicose e demonstra um efeito negativo do tratamento com 4-VCD sobre a tolerância à glicose.

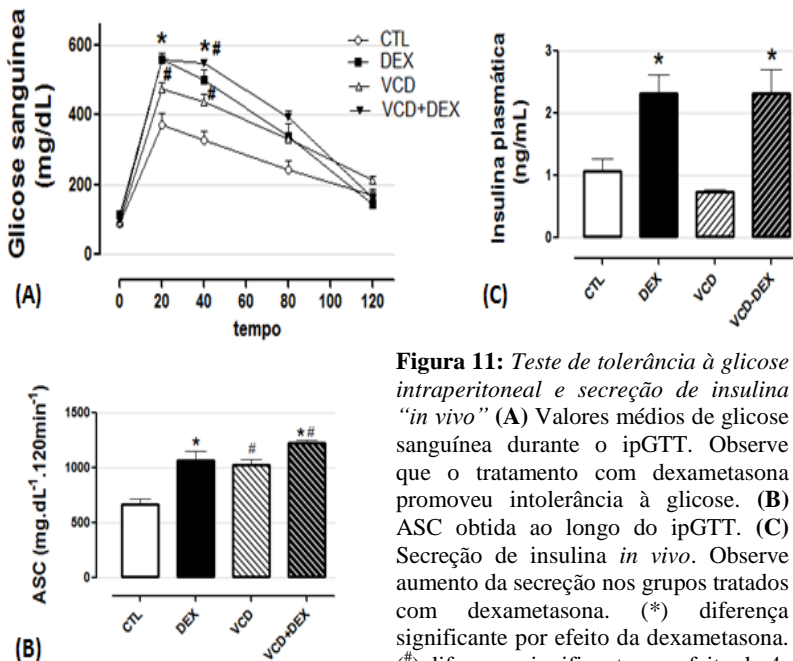


Figura 11: Teste de tolerância à glicose intraperitoneal e secreção de insulina “*in vivo*” (A) Valores médios de glicose sanguínea durante o ipGTT. Observe que o tratamento com dexametasona promoveu intolerância à glicose. (B) ASC obtida ao longo do ipGTT. (C) Secreção de insulina *in vivo*. Observe aumento da secreção nos grupos tratados com dexametasona. (*) diferença significativa por efeito da dexametasona. (#) diferença significativa por efeito do 4-VCD, ANOVA teste com pós-teste de Tukey. ($p < 0,05$, $n = 5$).

Seguimos com o desafio glicêmico oral, que avalia a capacidade do organismo reestabelecer suas concentrações basais de glicose sanguínea com a participação da secreção do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1). Assim como no ipGTT, os animais dos grupos DEX e VCD+DEX apresentaram valores glicêmicos elevados após 20 min do desafio com *bolus* de glicose em relação aos seus respectivos grupos controles. Os valores de glicose sanguínea foram 158 ± 12 , 296 ± 36 , 158 ± 10 e 247 ± 10 mg/dL para os grupos CTL, DEX, VCD e VCD+DEX, respectivamente (Figura 12A; $p < 0,05$, $n = 5$). A secreção de insulina *in vivo*, assim como no ipGTT foi maior nos grupos DEX e VCD+DEX em relação aos seus respectivos controles e similar entre os

grupos CTL e VCD (Figura 12B; $p < 0,05$, $n = 5$). Em conjunto, estes dados revelam uma hipersecreção de insulina compensatória a RI instalada nos grupos tratados com dexametasona que não é capaz evitar intolerância à glicose e uma resposta glicêmica desafio-específica nas ratas tratadas com VCD apenas.

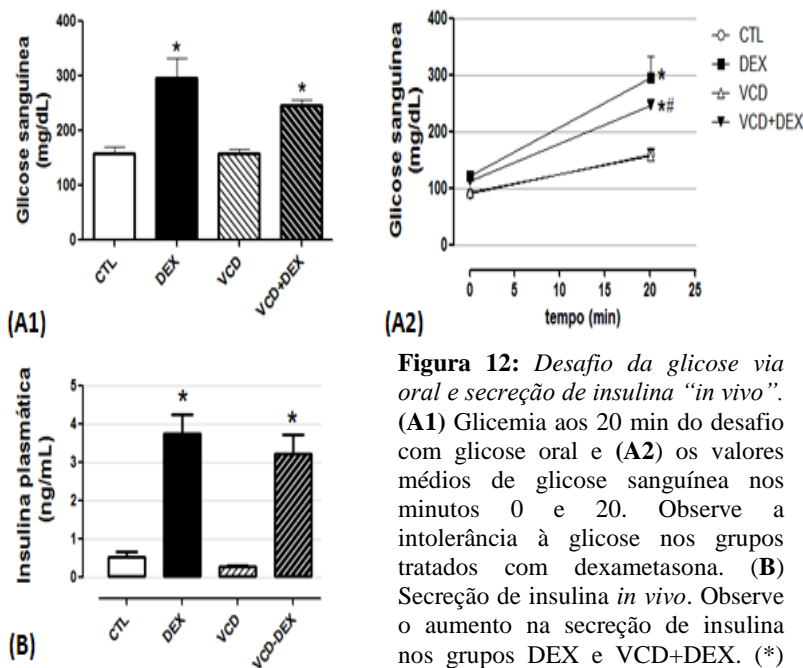


Figura 12: Desafio da glicose via oral e secreção de insulina “in vivo”. (A1) Glicemia aos 20 min do desafio com glicose oral e (A2) os valores médios de glicose sanguínea nos minutos 0 e 20. Observe a intolerância à glicose nos grupos tratados com dexametasona. (B) Secreção de insulina *in vivo*. Observe o aumento na secreção de insulina nos grupos DEX e VCD+DEX. (*) diferença significativa por efeito da dexametasona. Teste ANOVA com pós-teste de Tukey. ($p < 0,05$, $n = 5$).

4.1.5 Parâmetros lipídicos plasmáticos e hepáticos

Alterações no metabolismo lipídico também estão associadas a modificações na homeostase glicêmica (Novelli et al, 1999; Rafacho et al. 2008; Santos et al., 2014). O tratamento com 4-VCD *per se* não

resultou em nenhuma alteração nas concentrações de triacilglicerol e nem predispôs a maiores alterações quando combinada ao tratamento com dexametasona (Figura 13A, $n=10$). Os animais DEX e VCD+DEX, entretanto, tiveram maiores concentrações de triacilglicerol plasmático comparado aos seus respectivos controles ($p<0,05$, $n=10$). Os animais DEX e VCD+DEX tiveram um incremento de 121% e 74%, respectivamente, comparado aos seus respectivos controles. Em relação ao colesterol plasmático total, não houve nenhuma alteração entre os 4 grupos avaliados (Figura 13B, NS, $n=10$). A quantificação do conteúdo de triacilglicerol hepático revelou aumento significante por efeito do tratamento com dexametasona. Incrementos de 275% (DEX *vs.* CTL) e 172% (VCD+DEX *vs.* VCD) foram observados (Figura 13C; $p<0,05$, $n=10$).

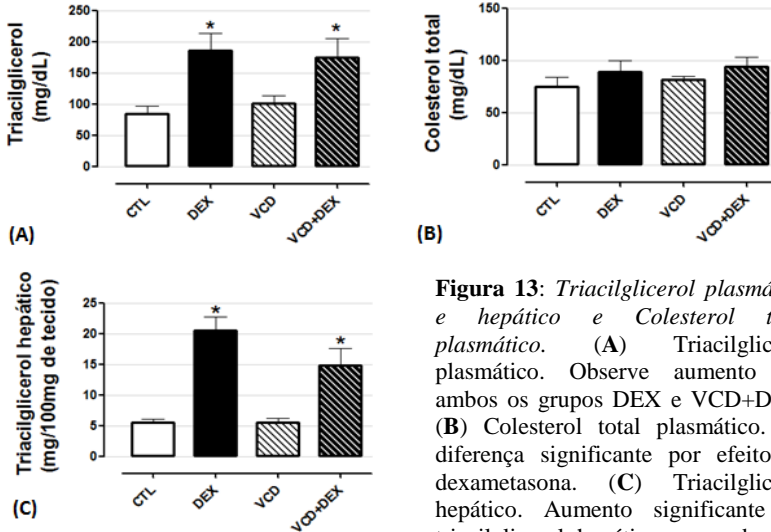


Figura 13: Triacilglicerol plasmático e hepático e Colesterol total plasmático. (A) Triacilglicerol plasmático. Observe aumento em ambos os grupos DEX e VCD+DEX. (B) Colesterol total plasmático. (*) diferença significante por efeito da dexametasona. (C) Triacilglicerol hepático. Aumento significante do triacilglicerol hepático em ambos os grupos DEX e VCD+DEX (*) diferença significante por efeito da dexametasona. Teste ANOVA com pós-teste de Tukey. ($p<0,05$, $n=10$).

4.1.6 Liberação de glicerol em tecido adiposo

O aumento das concentrações de triacilglicerol plasmático pode estar associado ao incremento das taxas de lipólise periférica, um contexto normalmente presente durante a RI (Jocken and Blaak, 2008). A liberação de glicerol basal no tecido adiposo perigonadal esteve similar entre todos os grupos (Figura 14; $n=10$ fragmentos por grupo). A taxa de lipólise estimulada com 20 $\mu\text{mol/L}$ de isoproterenol foi maior em todos os grupos em relação a suas respectivas liberações de glicerol basais, porém, não houveram diferenças significantes entre os 4 grupos: $13,2 \pm 3,2$; $15,3 \pm 3,2$; $12,8 \pm 4,3$ e $14,4 \pm 2,8$ $\mu\text{g/mg/1h}$ para os grupos CTL, DEX, VCD e VCD+DEX, respectivamente.

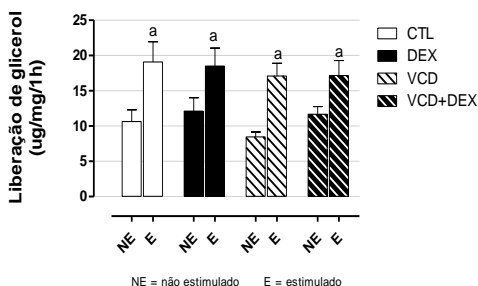


Figura 14: Lipólise em TAB perigonadal. Liberação de glicerol induzido por isoproterenol. Observe maior liberação de glicerol sob estimulação em comparação com o estado basal (a) (teste t de Mann Whithnev. $p < 0.05$. $n=10$).

4.1.7 Massa dos órgãos

Alterações de adiposidade podem ser observadas em condições de menopausa e/ou de RI (Muio & Newgard, 2006; Alberti et al., 2006). No presente estudo, não houve alteração na massa de nenhuma das gorduras estudadas (retroperitoneal, perigonadal e omental) (Figura 15A-C, $n=10$). Houve aumento significativo de 59% (DEX vs. CTL) e 58% (VCD+DEX vs. VCD) na massa do fígado (Figura 15D, $p < 0,05$,

$n=10$). A massa do baço dos grupos DEX e VCD+DEX foi menor na ordem de 39% e 30%, respectivamente, em relação aos seus respectivos controles (Figura 15E, $p<0,05$, $n=10$). As glândulas adrenais hipotrofiaram após o tratamento com dexametasona (grupos DEX e VCD+DEX), sendo significante apenas no grupo DEX vs. CTL.

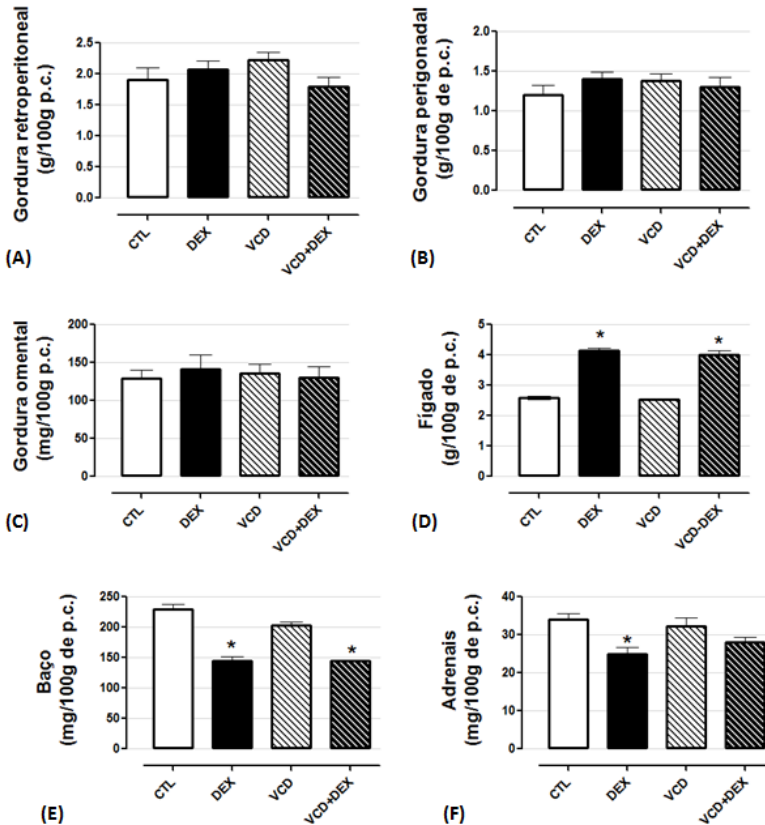


Figura 15: Massa dos órgãos. (A–F) Massa dos órgãos após tratamento com 4-VCD e dexametasona e seus respectivos controles. Não houveram diferenças significantes entre as gorduras omental, perigonadal e retroperitoneal. O fígado mostrou um aumento significativo nos grupos DEX e VCD+DEX, por efeito da dexametasona (*); o baço e as adrenais tiveram uma redução da massa nos mesmos grupos. Teste ANOVA seguido de pós teste Tukey. ($p < 0.05$, $n=10-15$).

4.1.8 Morfometria do pâncreas

A redução da sensibilidade à insulina normalmente é acompanhada por uma resposta compensatória que inclui o aumento na massa de células β pancreáticas (Kahn et al., 2006). Verificamos se a menopausa induzida pelo 4-VCD poderia influenciar a resposta compensatória que sabidamente ocorre em modelos experimentais submetidos ao tratamento com dexametasona (Rafacho et al., 2008; Santos et al., 2014). A Figura 16 A-H mostra uma visão geral do tecido pancreático nos quatro grupos com imunomarcagem para células β .

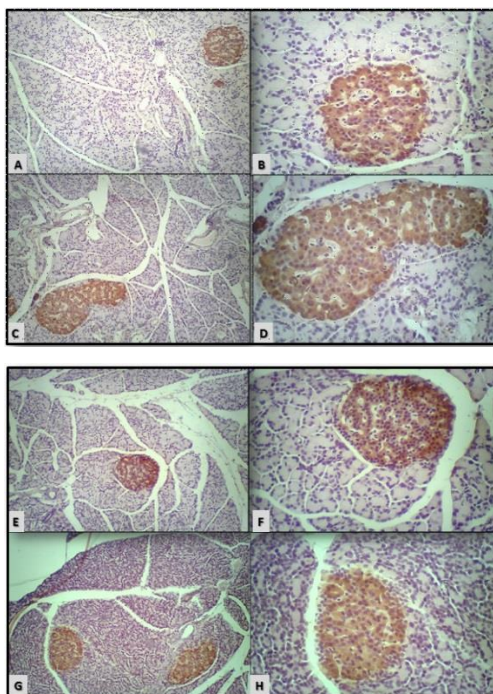


Figura 16: *Morfologia pancreática e massa de células β .* As figuras A e B representam o grupo CTL, C e D representam o grupo DEX, E e F representam o grupo VCD e G e H representam o grupo VCD+DEX. As imagens A, C, E e G representam o corte histológico num aumento de 4x e as imagens B, D, F e H mostram detalhe das ilhotas coradas num aumento de 10x. (Coloração: imunomarcagem para insulina e coloração de fundo com hematoxilina)

O tecido exócrino não apresentou nenhuma alteração aparente nos grupos experimentais em relação ao pâncreas do grupo CTL. Em relação à massa média do pâncreas, foram obtidos para o grupo CTL $1,0 \pm 0,02$ g, DEX $0,83 \pm 0,03$ g, VCD $1,0 \pm 0,07$ g e VCD+DEX $0,7 \pm 0,03$ g, com diferença significativa entre os grupos DEX e VCD+DEX em relação aos seus respectivos controles ($p < 0,05$, $n = 7$). Quanto a massa de células β , o tratamento com 4-VCD não resultou em nenhuma alteração comparado ao grupo CTL. Na Figura 17 observa-se um aumento de 53% na massa de células β nos animais DEX *versus* animais CTL ($p < 0,05$, $n = 5$). O mesmo não foi notado no grupo VCD+DEX que apresentou valores similares da massa de células β aos do grupo VCD. Ainda, houve redução da resposta compensatória adaptativa promovido pelo tratamento com a dexametasona no grupo VCD+DEX a julgar pela redução da massa das células β .

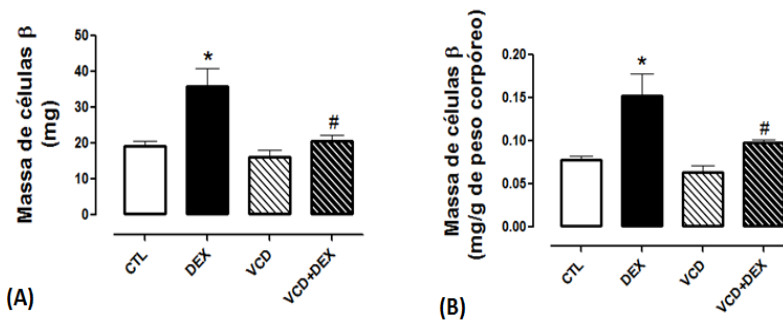


Figura 17: Massa absoluta e relativa (normalizada pelo peso) de células β em ratos tratadas com 4-VCD e dexametasona. Observe o um aumento significativo da massa absoluta de células β pancreáticas nos grupos DEX *vs.* CTL por efeito da dexametasona (*). Diferença significativa por efeito do 4-VCD (#) entre os animais DEX *vs.* VCD+DEX, mostrando um efeito atenuado nos animais tratados com 4-VCD. Não houve diferença significativa entre os grupos VCD e VCD+DEX. ($p < 0,05$, $n = 5$).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo visou elucidar os eventuais efeitos da menopausa precoce, induzida pela administração de 4-VCD, sobre a homeostase glicêmica e se a condição de menopausa precoce tornaria as ratas mais susceptíveis e/ou vulneráveis aos efeitos diabetogênicos dos GCs. O 4-VCD, na dosagem proposta neste estudo, tem mostrado ação ovariotóxica seletiva em roedores (Merchenthaler et al., 2014) preservando o ciclismo e a flutuação irregular hormonal, mimetizando a transição entre a perimenopausa e a menopausa (Keck et al., 2007). Dos parâmetros relacionados à homeostase glicêmica somente a tolerância à glicose parece ter sido comprometida por efeito do 4-VCD e será discutido adiante. De forma geral, os demais parâmetros não foram afetados e/ou exacerbados pela administração de VCD seja em ratas controles ou tratadas com dexametasona, respectivamente. Os grupos DEX e VCD+DEX demonstraram 1) redução no peso corpóreo e redução na ingestão alimentar; 2) hiperglicemia, 3) hiperinsulinemia, 4) hipertriacilgliceridemia, 5) aumento no conteúdo de glicogênio hepático, 6) intolerância à glicose e 7) alterações nas massas dos órgãos fígado, baço e adrenais. Os resultados obtidos com as ratas tratadas com dexametasona são corroborados por outros estudos em que o tratamento com dexametasona ocorre na mesma dose e tempo de administração (Caperuto et al. 2006, Nunes et al., 2013, Motta, et al., 2014; Rafacho et al. 2008a; Rafacho et al. 2011, Saad, et al. 1993, Santos, et al., 2014) bem como em condições de dose e tempo distintas (Burén et al., 2008, Novelli et al., 1999).

Os dados morfológicos obtidos em nosso estudo a partir da massa dos ovários corrobora para o efeito ovariotóxico do 4-VCD e nos permite sugerir uma perda de função ovariana que repercute na instalação de menopausa precoce em nosso modelo. Estudos prévios com ratas e camundongas já demonstraram o efeito ovariotóxico do 4-VCD. A administração do 4-VCD (80 mg/kg peso corpóreo) por 30 dias consecutivos provoca a perda de 81% de folículos primordiais em ratas um mês após o término do tratamento (Flaws et al., 1994) e 40% quando administrado por 15 dias consecutivos e eutanasiadas em 24 horas após o término do tratamento, também em ratas (Springer et al., 1996). Diversos estudos relatam que a administração de 4-VCD a 160 mg/kg de peso corpóreo por 15 dias consecutivos resulta na lesão e conseqüente perda dos folículos pré-antrais em ratas e utilizam deste protocolo para assegurar um contexto patológico em que a perda da função ovariana proporciona estudos tanto de perimenopausa como de menopausa precoce dependendo do período investigado (Hoyer et al., 2001a; Hoyer et al., 2001b; Mayer et al., 2002; Romero-Aleshire et al., 2009; Reis et al., 2014; Merchenthaler et al., 2014). Em nosso estudo, utilizando 160 mg/kg peso corpóreo por 15 dias consecutivos, obtivemos além da mesma dose e período de tratamento com o 4-VCD, uma redução significativa da concentração de progesterona plasmática nos animais VCD+DEX, considerando 173 dias após o tratamento com o 4-VCD, que será discutido adiante.

O tratamento com 4-VCD não resultou em nenhuma alteração de crescimento corpóreo, ingestão alimentar e parâmetros sanguíneos e plasmáticos basais. As ratas DEX e VCD+DEX, contudo, demonstraram significativa redução da massa corpórea e da ingestão alimentar ao

longo do período de tratamento. Esses dados reproduzem trabalhos prévios em que avaliaram os efeitos da dexametasona em ratos Wistar com a dosagem de 1mg/Kg de peso corpóreo, por 5 dias consecutivos (Rafacho et al., 2008a, Liu et al., 2011, Costa et al., 2012, Chimin et al., 2014, Motta et al., 2014, Santos et al., 2014, Warchol et al., 2014). As ratas DEX e VCD+DEX tiveram uma diminuição na ingestão alimentar de aproximadamente 22% comparada a seus controles. Da mesma forma, Nunes et al. (2013) observaram uma redução na ingestão alimentar de aproximadamente 40% em ratos comparado ao grupo controle. A redução da ingestão alimentar por ação do tratamento com dexametasona também é observada em ratos de 3 e 12 meses de idade na ordem de 15% e 10%, respectivamente e em ratas de 3 e 12 meses de idade na ordem de 11% e 8%, respectivamente (Santos et al., 2014). Outros estudos com administração de hidrocortisona (De Vos et al., 1995) e dexametasona (Konno et al., 2008) pela via subcutânea também relataram redução no peso corpóreo e na ingestão alimentar. O tratamento com dexametasona normalmente resulta em hiperinsulinemia (Rafacho et al., 2011) e hiperleptinemia (Chimin et al., 2014). A insulina e a leptina tem ação anorexígena importante sobre o hipotálamo contribuindo para o grau de saciedade do animal (Horvath, 2005, Liu et al., 2011; Warchol et al. 2014). A elevação das concentrações de insulina plasmática nos grupos DEX e VCD+DEX podem explicar em partes o efeito anorexígeno nestes grupos. A perda de peso nesses grupos pode ainda ser explicada pelo possível aumento da diurese. Thunhorst e colaboradores (2007) demonstraram que após o tratamento com dexametasona em ratos há maior volume acumulado de urina, sugerindo que parte da perda de peso após o tratamento com

dexametasona parece ser devido ao balanço hídrico negativo. A condição de menopausa precoce parece não ter nenhum impacto relevante *per se* (ratas VCD) ou associada ao tratamento com dexametasona (ratas VCD+DEX) sobre o comportamento alimentar que resulte em ganho ou perda de peso corpóreo, ou em atenuação ou exacerbação dos efeitos desencadeados pelo GC. O estradiol parece ter um efeito anorexígeno em várias espécies de animais (Geary e Asarian, 1999, Geary, 2001, Asarian e Geary, 2006, Roepke, 2009) como demonstra estudos com ratas ooforectomizadas (Chai et al. 1999) e com a eventual redução que se espera do estradiol plasmático nas ratas VCD e VCD+DEX deveríamos ter um favorecimento do ganho de peso que não foi o caso no presente estudo reforçando o forte efeito anorexígeno da insulina e da leptina. Em um estudo realizado com camundongas não foi demonstrado alteração da ingestão alimentar nas fêmeas tratadas com 4-VCD em relação ao grupo controle, mostrando que a redução nas concentrações circulantes de estradiol não necessariamente repercutem sobre o controle da ingestão alimentar de longo prazo (Romero-Aleshire et al., 2009).

Os dados de glicose sanguínea e de insulina plasmática não foram alterados por efeito do tratamento com 4-VCD. Nosso estudo mostrou a presença de hiperglicemia e hiperinsulinemia nas ratas submetidas ao tratamento com dexametasona. Nossos resultados reproduzem dados prévios em modelos com utilização de GC em ratos adultos (Novelli et al., 1999; Caldefie-Chézet et al., 2001; Nunes et al. 2013; Gonçalves-Neto et al., 2014, Motta et al., 2014). Santos et al. (2014), demonstraram que ratas e ratos com 12 meses de idade não tiveram nenhum comprometimento dos valores basais de glicose

sanguínea e insulina plasmática, apontando para o fato de que a provável redução das funções ovarianas (que inicia aproximadamente aos 12 meses numa rata normal) não sejam suficientes para causar um desbalanço na homeostase glicêmica basal. Os efeitos diabetogênico dos GCs são amplamente conhecidos e a hiperglicemia presente nas ratas DEX e VCD+DEX se dão, principalmente, pelas consequências de uma RI inadequadamente compensada. Assim, a hiperglicemia pode ser resultante de uma somatória de eventos que incluem a redução na captação de glicose estimulada pela insulina em tecidos periféricos e o aumento da atividade gliconeogênica hepática (Rizza et al., 1982; Rooney et al., 1994; Asensio et al., 2004, Motta et al., 2014). A menopausa precoce induzida pelo tratamento com 4-VCD não promoveu maior vulnerabilidade ao metabolismo basal como pôde ser visto nas ratas VCD+DEX. Entretanto, em contextos mais severos, a menopausa associada à administração de 4-VCD pode predispor camundongos a maior susceptibilidade à estreptozotocina, por exemplo. Animais diabéticos por administração de estreptozotocina são mais hiperglicêmicos quando estão em menopausa precoce induzida pela administração de 4-VDC (Keck et al. 2007). Esse estudo desmonstrou que camundongas tratadas com 4-VCD na mesma dosagem de nosso estudo tiveram valores similares ao grupo controle, mas àquelas submetidas à estreptozotocina tiveram valores glicêmicos mais acentuados do que os animais tratados apenas com estreptozotocina. Assim, não descartamos a hipótese de que a menopausa precoce esteja isenta de predispor os indivíduos a maiores complicações, dependendo do insulto metabólico associado.

As ratas VCD não apresentaram alterações nos valores de insulinemia basais. Já os grupos tratados com dexametasona apresentaram uma marcante hiperinsulinemia. Isso se dá por um efeito compensatório bem conhecido durante a RI em que as células β pancreáticas respondem à demanda metabólica com hipersecreção de insulina (Rafacho et al. 2008). Nossos dados obtidos com o cálculo HOMA reiteram a RI nos grupos DEX e VCD+DEX e vai de encontro com trabalhos prévios (Saad et al., 1995, Weinstein et al., 1998, Bandeira F, et al., 2003, Wallace et al., 2004, Ruzzin et al., 2005, Motta et al., 2014). Embora o tratamento com 4-VCD não tenha modificado a sensibilidade à insulina *per se* ou quando associados ao GC no presente trabalho é sabido que em contextos mais fisiológicos (ex., camundongos submetidos à dieta hiperlipídica) este composto pode acentuar a RI (Romero-Aleshire et al. 2009),

O tratamento com 4-VCD predispõe as ratas a certa vulnerabilidade no que se refere à tolerância à glicose. Apesar de não apresentarem nenhuma alteração nos parâmetros basais (glicemia e insulinemia), as ratas VCD se mostraram intolerantes à glicose, somente no desafio intraperitoneal. Como o ipGTT demanda secreção de insulina, verificamos a secreção de insulina *in vivo*, e embora não tenham sido observadas diferenças nos valores de insulina plasmática entre ratas VCD e CTL, os valores no grupo VCD foram apenas 66% daqueles observados no grupo CTL. Essa pequena redução, embora não significativa, pode ter contribuído para este grau de intolerância à glicose. Obviamente, outros fatores que incluem a ação da insulina e/ou de hormônios gonadais no fígado e em tecidos periféricos, não avaliados no presente estudo, poderiam contribuir para esta intolerância. Neste

sentido, foi demonstrado que a intolerância à glicose presente em camundongas tratadas com 4-VCD em regime de dieta hiperlipídica se normaliza quando as mesmas recebem reposição de estradiol (Romero-Aleshire et al., 2009). O grupo VCD+DEX teve a intolerância à glicose mais acentuada em relação do grupo DEX, sem que tenha tido alterações nos valores de insulina plasmática. Isso aponta para efeitos periféricos que dependem menos da secreção de insulina e mais provavelmente de sua ação. As ratas tratadas com dexametasona apenas reproduziram o efeito diabetogênico dos GCs sobre a tolerância à glicose como já observado em outros estudos (Nunes et al., 2013, Motta et al., 2014, Gonçalves-Neto et al., 2014) incluindo ratas com 12 meses de idade (Santos et al., 2014). O teste de tolerância à glicose oral, que inclui a participação da liberação de incretinas (ex., GLP-1) é um teste mais fisiológico por simular a absorção natural da glicose. Por este teste não foi observada nenhuma alteração dos valores glicêmicos 20 min após a ingestão de um *bolus* de glicose por efeito do tratamento com 4-VCD, revelando a importância da manutenção deste eixo durante a menopausa. Apesar desta ausência de efeito do 4-VCD durante desafio de glicose oral, não podemos descartar que a longo prazo, a condição de menopausa corrobore para o agravamento do metabolismo da glicose como já é observado em alguns contextos como na obesidade (Romero-Aleshire et al., 2009). Diante da complexidade do tema, estudos centrados na resposta secretória de insulina, seus mecanismos de ação em tecidos periféricos em contextos associados à redução dos hormônios ovarianos e/ou aumento dos hormônios gonadotróficos merecem mais atenção.

O tratamento com 4-VCD não promoveu nenhuma alteração *per se* ou quando associado ao tratamento com dexametasona sobre os parâmetros lipídicos plasmáticos. As ratas VCD e VCD+DEX também não apresentaram nenhuma alteração quanto a quantidade e distribuição de tecidos adiposo. As ratas tratadas com dexametasona, contudo, tiveram aumento expressivo nas concentrações de triacilglicerol. Os glicocorticoides podem aumentar as concentrações plasmáticas de triacilglicerol por diminuição da atividade da lipoproteína lipase (LPL) (Bagdade et al., 1976, Franco-colin et al., 2000) e aumentar a concentração plasmática de AGL por ativação da lipase hormônio sensível (LHS) (Slavin et al., 1994). A dislipidemia favorece a RI por comprometer a sinalização periférica à insulina (Carvalho et al., 2006), evidente nos grupos DEX e VCD+DEX.

As células β pancreáticas são fonte exclusiva de insulina para a demanda metabólica e por isso são fundamentais no controle da homeostase glicêmica. Quando avaliamos a massa de células β pancreáticas não encontramos diferenças entre os grupos CTL e VCD. Em acordo com trabalhos prévios (Rafacho et al., 2010, Rafacho et al., 2011, Santos et al., 2014), a massa de células β nas ratas DEX aumentou significativamente. Esse aumento da massa de células β é uma adaptação natural para tentar compensar a RI provocada pelo tratamento com o GC. Isso ocorre em maior grau por meio de hiperplasia e em menor grau por meio de hipertrofia celular das células β (Rafacho et al., 2009). Essa hiperplasia pode ser explicada, em partes, pelo próprio efeito que a insulina exerce de forma endócrina e/ou autócrina no processo de proliferação celular (Ernst et al., 2011). No grupo VCD+DEX não ocorreu a mesma resposta compensatória. Essa

incapacidade de expandir a massa de células β corrobora para os dados de intolerância à glicose observado neste grupo. A provável depleção folicular causada pelo 4-VCD, ao resultar na diminuição dos valores de progesterona e estradiol plasmáticos, pode estar contribuindo para o comprometimento da proliferação de células β . No envelhecimento e na menopausa a expansão da massa de células β em animais e em seres humanos diminui consideravelmente devido a redução nas taxas de mitose e neogênese destas células (Teta et al., 2005, Dhawan et al., 2007, Meier et al., 2008, Pearl et al., 2010). Esses trabalhos sugerem a importância dos hormônios gonadais nas respostas adaptativas pancreáticas. De acordo com os nossos dados, podemos inferir que esta menor capacidade compensatória (expansão na massa de células β) observada no grupo VCD+DEX levaria à maiores comprometimentos da homeostase glicêmica se mantidos por um período mais prolongado. Assim, estudos visando os mecanismos subjacentes a esta perda de capacidade compensatória merecem maior atenção.

Nossas ratas VCD não tiveram alteração dos valores de progesterona plasmática. Outros estudos demonstraram redução nos valores de progesterona plasmática em ratas tratadas com 4-VCD por 15 dias e avaliados 80 dias após interrupção do tratamento (Reis et al., 2014), semelhante ao que ocorre em mulheres na menopausa (Reyes et al. 1977, Santoro et al. 2008). O fato das ratas VCD em nosso estudo terem apresentado valores similares aos animais CTL pode ser explicado, ao menos em parte, pelo fato de não sabermos em que fase do ciclo estral se encontravam já que não acompanhamos a ciclicidade. Por outro lado, há evidências que suportam os nossos resultados. Camundongas tratadas com 4-VCD foram acompanhadas quanto aos

valores de progesterona plasmática ao longo os ciclos estrais e ficou constatado que não houve nenhuma alteração comparada aos animais controle (Lohffet al. 2005). Outro fator que poderia contribuir para a inalteração da progesterona circulante nas ratas VCD estaria na produção compensatória de progesterona por tecidos periféricos (tecido adiposo e adrenais) (Mizutani et al. 1994, Hueston e Deak, 2014). De forma geral, os valores flutuantes de estrogênio e progesterona não podem ser utilizados como marcadores confiáveis para determinação de perimenopausa e menopausa precoce em mulheres (Overlie et al., 2005).

O aumento exacerbado de progesterona plasmática em nossos animais DEX pode ter ocorrido por algum efeito direto dos GCs sobre a síntese e secreção de hormônios gonadais. A progesterona é também um precursor de corticosterona e pode ser liberada a partir das glândulas adrenais de ambos os sexos, em resposta ao estresse (Hueston e Deak, 2014). Estudos de cultura celular demonstraram a associação direta entre os hormônios FSH e os glicocorticóides (Adashi et al. 1981). Os autores verificaram que o tratamento de células ovarianas da granulosa *in vitro* com FSH resultou em aumentos substanciais na secreção de progesterona, e a dexametasona *per se* foi tão eficaz quanto ao FSH. Outro estudo *in vitro* com folículos maduros oriundos de mulheres tratadas com gonadotrofinas demonstrou que o cortisol pode estimular a secreção de estradiol e progesterona pelas células da granulosa sem envolver a interação com o receptor de FSH (Ben-Rafall et al. 1988). Os autores sugeriram que além das gonadotrofinas e hormônios ovarianos, o cortisol pode também estar diretamente envolvido na ativação de células da granulosa. Como as ratas VCD+DEX não tiveram aumento das concentrações de progesterona plasmática, podemos sugerir que o 4-

VCD foi eficaz em promover a depleção folicular ao ponto de impedir qualquer incremento na presença de GC.

Nosso estudo não quantificou as concentrações plasmáticas de estradiol e também não explorou os hormônios gonadotróficos (FSH e LH) bem como a testosterona. Esse é um tema complexo, haja vista que outros estudos não conseguiram observar redução do estradiol plasmático no modelo 4-VCD em ratas com 80 dias de vida, equivalente a fase de perimenopausa, mas sugeriram que outras alterações hormonais induzidas pela depleção folicular influenciam nos sintomas de transição da menopausa. Outros androgênios como a testosterona também parecem diminuir com a idade, na transição da menopausa (Burger et al., 1995, Chen et al., 2006), resultado também verificado no modelo 4-VCD (Reis et al., 2014). Essa redução de testosterona pode ser explicada pelo fato de que em grande parte os androgênios são produzidos por conversão de androstenediona nas células da teca (Van Weerden et al., 1992) e pode estar relacionada com a depleção folicular induzida por 4-VCD (Reis et al., 2014).

Podemos concluir que ratas em menopausa precoce induzida pelo tratamento com 4-VCD não desenvolvem nenhuma alteração entre os principais parâmetros que compõem a homeostase glicêmica (glicemia, insulinemia, lipidemia, sensibilidade à insulina), exceto por uma modesta intolerância à glicose que ocorre na ausência da secreção de GLP-1. A associação da menopausa precoce com a dexametasona não resulta em nenhuma exacerbação das alterações provocadas pelo GC (hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, RI), mas compromete o incremento compensatório da massa de células β frente a RI imposta pelo GC.

6. PERSPECTIVAS

Algumas questões não resolvidas merecem investigações adicionais para compreensão dos efeitos do tratamento com 4-VCD sobre:

- *a tolerância à glicose*: 1) secreção de insulina em ilhotas isoladas; 2) efeitos diretos do 4-VCD sobre a ação da insulina em tecidos periféricos (hepático, muscular e tecido adiposo); 3) efeitos do E2 e progesterona sobre a secreção de insulina e tecidos periféricos quando associados aos GCs.
- *o crescimento das células β* : efeito direto do 4-VCD na proliferação e morte das células β e do E2 e progesterona combinada aos GC.

Ainda, estudos elaborados com 4-VCD jovens e idosas e/ou emparelhadas com ratas senis seriam importantes para dissociar os efeitos da redução das funções ovarianas daqueles atribuídos ao envelhecimento.

DIFICULDADES ENCONTRADAS

Houve dificuldade para encontrar kites de ELISA de custo acessível e com sensibilidade compatível as concentrações de E2 presentes em ratas. Como se vê na Figura complementar 1, obtivemos valores incompatíveis com a sensibilidade do método e, portanto, não representam a real concentração de E2 nos animais.

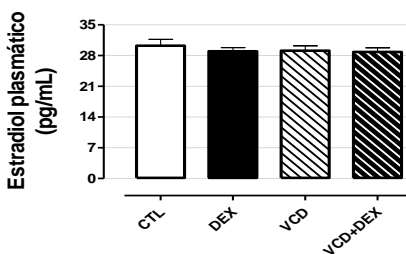


Figura Complementar 1: Estradiol plasmático em pg/mL das ratas tratadas com 4-VCD e dexametasona

REFERÊNCIAS

ADASHI EY, JONES P, HSUEH AJW. Synergistic Effect of Glucocorticoids on the Stimulation of Progesterone Production by Follicle-Stimulating Hormone in Cultured Rat Granulosa Cells. **Endocrinology**, v.109, n.6, p.1888-1894, 1981

AGIL, A, et al. Short-term exercise approaches on menopausal symptoms, psychological health, and quality of life in postmenopausal women. **Obstetrics and Gynecology International**, v.274261, 7 p., 2010.

ALBERTI KG, ZIMMET P, SHAW J. Metabolic syndrome: a new world-wide definition: a consensus statement from the International Diabetes Federation. **Diabet Med**. v.2, p.469-80, 2006.

AMERICAN HEART ASSOCIATION; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an **American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement Circulation**. v.112, p.2735-52, 2005.

ANDREWS, RC, WALKER BR. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clin Sci**, v.96, p.513-525, 1999.

ASARIAN L, GEARY N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. **Horm Behav.**, v.42, p.461-71, 2002.

ASENSIO C, MUZZIN P, ROHNER-JEANREANUD F. Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. **Int.J Obes Relat Metab Disord.**; v.28, n.4, p.S45-S52, 2004.

BAGDADE, J D, YEE E, ALBERTS J, PYKALISTO OJ. Glucocorticoids and triglyceride transport: effects on triglyceride secretion rates, lipoprotein lipase, and plasma lipoproteins in the rat. **Metabolism**, New York, v.25, n.5, p.533– 542, 1976.

BANDEIRA F, Macedo G, CALDAS G, Griz L, FARIA MS: Endocrinologia e Diabetes Mellitus. São Paulo, Brazil: Medsi; 2003.

BATTISTINI M, FREEMAN EW, GRISSO JA, SAMMEL M, HOLLANDER L, GARCIA-ESPANA B. Pilot study of racial differences and longitudinal changes in inhibin B in the late reproductive years. **Fertil StenL**, v.77, p.193-195. 37, 2002.

BELCHETZ PE; PLANT TM, NAKAI *Y et al.* Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. **Science**, v.202, p. 631-3, 1978.

BEN-RAFALL Z, BENADIVA CA, GARCIA, CJ, FLICKINGER, GL. Cortisol stimulation of oestradiol and progesterone secretion by human granulosa cells is independent of follicle-stimulating hormone effects. **Fertil StenL**, 49, 813-816, 1988.

BESHAY VE, CARR, BR. Clinical Reproductive Medicine and Surgery: a practical guide. Springer Science+Business Media, New York, 2013.

BODOR N, BUCHWALD P. Corticosteroid design for the treatment of asthma: structural insights and the therapeutic potential of soft corticosteroid. **Curr Pharm.**, v.25, p.3241-3260, 2006.

BRAND, JS, et. al. Age at Menopause, Reproductive Life Span, and Type 2 Diabetes Risk - Results from the EPIC-InterActstudy. Cardiovascular and Metabolik Risk, **Diabetes Care**, v. 36, 1012-1019, 2013.

BUCOLO, G. and DAVID, H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. **Clin.Chem.**v.19, p.476-482, 1973.

BULUM, S.E., ADASHI, E.Y. The physiology and pathology of the female reproductive axis. In: Larsen, P.R., Kronenberg, H.M., Melmed, S., Polonsky, K.S. Williams Textbook of **Endocrinology**, Saunders, Philadelphia, USA, 2003.

BURÉN J. et al. Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. **Arch Biochem Biophys.** v. 474, n. 1, p. 91-101, 2008

BURGER HG, DUDLEY EC, HOPPER JL, SHELLEY JM, GREEN A, SMITH, A, DENNERSTEIN L, MORSE C. The endocrinology of the menopausal transition: a cross-sectional study of a population-based sample. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.80, p.3537-3545, 1995.

BURSZTEIN S, SAPHAR P, SINGER P, ELWYN DH. A mathematical analysis of indirect calorimetry measurements in acutely ill patients. **Am J Clin Nutr**; 50: 227-230. 1989.

BUTLER L, SANTORO N. The Reproductive Endocrinology of the Menopausal Transition. **Steroids.** v.76, p.627–635, 2011.

CALDEFIE-CHÉZET F, MOINARD C, MINET-QUINARD R, GACHON F, CYNOBER L, VASSON M. Dexamethasone treatment induces long-lasting hyperleptinemia and anorexia in old rats. **Metabolism**, v.50, p.1054–1058, 2001.

CARVALHO, MHC, COLAÇO, A L, FORTES ZB. André Luiz Colaço Zuleica Bruno Fortes. Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.50 n.2, 2006

CASIGLIA E, et al. Lack of influence of menopause on blood pressure and cardiovascular risk profile: a 16-year longitudinal study concerning a cohort of 568 women. **J Hypertens.**, v.14, p.729-36, 1996.

CASIGLIA E, et al. Blood pressure and metabolic profile after surgical menopause: comparison with fertile and naturally-menopausal women. **J Hum Hypertens.**, v.14, p. 799-805, 2000.

CAPERUTO, L.C.; et al. Distinct Regulation of IRS Proteins in Adipose Tissue from Obese Aged and Dexamethasone-Treated Rats. **Endocrine**, v.29, n.3, p.391-398, 2006.

CESARETTI , MARIO LUÍS RIBEIRO, KOHLMANN, OSVALDO JUNIOR. Modelos Experimentais de Resistência à Insulina e Obesidade: Lições Aprendidas. **Arq Bras Endocrinol Metab** v.50 n.2, 2006.

CHAI JK, BLAHA V, MEGUID MM, LAVIANO A, YANG Z, VARMA M. Use of orchietomy and testosterone replacement to explore meal number-to-meal size relationship in male rats. **Am J Physiol.**, v.276, p.1366-73, 1999.

CHEN, J., SOWERS, M.R., MORAN, F.M., MCCONNELL, D.S., GEE, N.A., GREENDALE, G.A., WHITEHEAD, C., KASIM-KARAKAS, S.E., LASLEY, B.L., Circulating bioactive androgens in midlife women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.91, p.4387-4394. 2006.

CHIMIN, P., FARIAS TODA, S., TORRES-LEAL, F. L. BOLSONI-LOPES, A., CAMPAÑA, A.B., ANDREOTTI, S., et al. Chronic glucocorticoid treatment enhances lipogenic activity in visceral adipocytes of male Wistar rats. **Acta Physiol. (Oxf.)**, v.211, p. 409–420, 2014.

COLLINS TJ. “ImageJ para microscopia” **BioTechniques**. v.43, n. 1, p.25-30. 2007.

COSTA, M, M.; et al. Reduction of insulin signalling pathway IRS-1/IRS-2/AKT/mTOR and decrease of epithelial cell proliferation in the prostate of glucocorticoid-treated rats. **Int. J. Exp. Path.**, v. 93, p.188-195, 2012.

DHAWAN S, GEORGIA S, BHUSHAN A. Formation and regeneration of the endocrine pancreas. **Curr.Opin.Cell.Biol.**, v.19, p.634–645, 2007.

DeFRONZO RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Med Clin North Am.** v.88, n.4, p.787-835, 2004.

DELBENDE C, et al. Glucocorticoid, transmitters and stress. **Br J Psychiatry Suppl.**, v.160, p. 24-35, 1992.

D’EON TM, SOUZA SC, ARONOVITZ M, OBION MS, FRIED SK, GREENBERG AS, Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of

lipogenic and oxidative pathways. **J Biol Chem.**, v.43, p.35983-35991, 2005.

DE VOS P, SALADIN R, AUWERX J and STAELS B: Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. **J Biol Chem** v.270, p.15958-15961, 1995.

DIAS, DS et al. Impacto do Envelhecimento nas Disfunções Metabólicas e Cardiovasculares em Modelo Experimental de Menopausa. **Rev Bras Cardiol.**v.24, n.5, p.392-399, 2011.

DIENER, JRC. Calorimetria indireta. **Rev Ass Med Brasil;** v.43, n.3, p.245-253, 1997.

DOERR, JK, HOOSER SB, SMITH BJ & SIPES IG. Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene and related olefins in B6C3F1 mice: role of diepoxides. **Chem.Res.Toxicol.**, v.8, p.963-969, 1995.

DUL A, WONG E. Menopause transition. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.**, v.23, n.1, p.25-32, 2009.

ELAVSKY, S. Physical activity, menopause, and quality of life: the role of affect and self-worth across time. **Menopause.** v.16, p.265-271, 2009.

ELWYN, D.H., KINNEY, J.M., ASKANAZI, J. Energy expenditure in surgical patients. **Surg Clin North Am.**, v.61, p.545-56, 1981.

ERNST, S., DEMIRCEI, C., VALLE, S., et al. Mechanisms in the adaptation of maternal β -cells during pregnancy. **Diabetes Manag (Lond).** 2011.

FARIA C.D., LONGUI C.A. Molecular aspects of glucocorticoid sensitivity. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.50, p.983-995, 2006.

FLAWS JA, DOERRJK, SIPES G, HOYER PB. Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide. **Reprod.Toxicol.** v.8, p.509-514, 1994.

FORD, E.S., WILL, J.C., FORD, M.A.P., MOKDAD, A.H. Health insurance status and cardiovascular disease risk factors among 50-64-

year-old U.S. women: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **J Womens Health**. v.7, p.997-1006, 1998.

FRANCO-COLIN, M.; TELLEZ-LOPEZ, A. M.; QUEVEDO-CORONA, L.; RACOTTA, L. Effects of longterm high-sucrose and dexamethasone on fat depots, liver fat, and lipid fuel fluxes through the retroperitoneal adipose tissue splanchnic area in rats. **Metabolism**, New York, v. 49, n. 10, p. 1289-1294, 2000.

FREEDMAN MR, HORWITZ BA, STEM JS. Effect of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on development of obesity. **Am J Physiol** v.250, p. R595-R607, 1986.

FREEMAN EW, GRACIA CR, SAMMEL MD, LIN H, LIM LC, STRAUSS JF III. Association of anti-mullerian hormone levels with obesity in late reproductive-age women. **Fertil Steril**, v.87, p.101-106, 2007.

FREEMAN, M.E. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: KNOBIL, E.; NEILL J.D. (Eds.). The physiology of reproduction. New York:Raven, p.613-658, 1994.

GREENE, J. G. Constructing a standard climacteric scale. **Maturitas**, v.61, 78-84, 2008.

GEARY N. Sex differences in disease anorexia. **Nutrition**, v.17, n.6, 499-507. 2001.

GEARY N, ASARIAN L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. **Physiol Behav.**, v.67, p.141-7, 1999.

GENEVIEVE NEAL-PERRY, MD, PHD, EDWARD NEJAT, MD, and CARY DICKEN, MD. The Neuroendocrine physiology of female reproductive aging: an update. **Maturitas**. v.67, n.1, p.34–38, 2010.

GONCALVES-NETO, LM. FERREIRA, FBD. SOUZA, L, SANTOS, C, BOSCHERO, AC, FACUNDO, VA, SANTOS, ARS, NUNES, EA, RAFACHO, A. Disruption of glucose tolerance caused by glucocorticoid excess in rats is partially prevented, but not attenuated,

by arjunolic acid. **Indian journal of experimental biology**; v.52, n.10, p. 972-982, 2014.

GREENE, J. G. Constructing a standard climacteric scale. **Maturitas**, v. 61, 78-84, 2008.

HARLOW SD, GASS M, HALL JE, et al., for the STRAW + 10 Collaborative Group. Executive Summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: Addressing the Unfinished Agenda of Staging Reproductive Aging. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** v.97, n.4, p.1159-1168, 2012.

HARIRI LP¹, LIEBMANN ER, MARION SL, HOYER PB, DAVIS JR, BREWER MA, BARTON JK. Simultaneous optical coherence tomography and laser induced fluorescence imaging in rat model of ovarian carcinogenesis. **Cancer Biol Ther.** v.10, n.5, p.438-47, 2010.

HELD, G. et al. Rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphomas. **Expert Rev Anticancer Ther**, v.6, p.1175-1186, 2006.

HOAR W, HICKMAN CP. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: General comparative physiology. 2nd ed. New Jersey, **Prentice-Hall**, p.260-5, 1975.

HORVATH TL. The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. **Nature Neuroscience**, v.8, p. 561–565, 2005.

HOYER, P. B., AND SIPES, I. G.. Assessment of follicle destruction in chemical-induced ovarian toxicity. Annu. Rev. **Pharmacol. Toxicol.** v.36, p.307–331, 1996.

HOYER PB, CANNADY EA, KROEGER NA, SIPES G. Mechanisms of ovotoxicity induced by environmental chemicals: 4-vinylcyclohexene diepoxide as a model chemical, p. 73–81. In: Dansette PM, editor. Biological Reactive Intermediates VI. New York (NY): **Kluwer Academic Plenum Publishers**. 2001 (a).

HOYER PB, DEVINE PJ, HU X, THOMPSON KE, SIPES IG. Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene diepoxide: a mechanical model. **Toxicol Pathol**, v.29, p. 91–99, 2001 (b).

HU, X., CHRISTIAN, P.J., THOMPSON, K.E., SIPES, I.G. & HOYER, P.B. Apoptosis induced in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide is associated with activation of the caspase cascades. **Biol Reprod**, v. 65, n.1, p. 87-93, 2001.

HUESTON CM, DEAK T. On the time course, generality, and regulation of plasma progesterone release in male rats by stress exposure. **Endocrinology**. v.155, n.9, p.3527-37, 2014.

HUFF J. Carcinogenicity bioassays of bisphenol A, 4-vinylcyclohexene diepoxide, and 4-vinylcyclohexene. **Toxicol Sci**. v.64, p.282–283, 2001.

HUSSEIN M.A. New treatment strategies for multiple myeloma. **Semin Hematol**, v.41, p. 2-8, 2004.

JANSSEN I, Powell LH, Kazlauskaitė R, Dugan SA. Testosterone and visceral fat in midlife women: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN) fat patterning study. **Obesity** (Silver Spring) v.18, p.604-10, 2010.

JOCKEN, J.W., and BLAAK, E.E. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol. Behav.* v.94, n.2, p.219–230, 2008.

KADMIEL, M.; CIDLOWSKI, J.A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends Pharmacol Sci**, v.34, n.9, p.518-530, 2013.

KAHN SE, HULL RL, UTZSCHNEIDER KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**. v.14, p.840-6, 2006.

KAO, SW; SIPES, G; HOYER, PB. Early effects of ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n.1, p. 67–75, 1999.

KAPLAN SL, GRUMBACH MM, AUBERT ML. The ontogenesis of pituitary hormones and hypothalamic factors in the human fetus:

maturation of the central nervous system, regulation of the anterior pituitary function. **Recent Prog Horm Res** ; v.32, p.161-243, 1976.

KECK, M, ROMERO-ALESHIRE, MJ, HOYER PB et al. Hormonal status affects the progression of STZ-induced diabetes and diabetic renal damage in the VCD mouse model of menopause. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.293, p.F193-F199, 2007.

KERMATH, B.A., GORE, A.C., Neuroendocrine control of the transition to reproductive senescence: lessons learned from the female rodent model. **Neuroendocrinology**, v.96, p. 1-12, 2012.

KONNO J, YOSHIDA S, INA A, OHMOMO H, SHUTOH F, NOGAMI Hand HISANO S. Upregulated expression of neuropeptide Y in hypothalamic-pituitary system of rats by chronic dexamethasone administration. **Neurosci Res.**, v.60, p.259-265, 2008.

LADYMAN, Sharon R. GRATAN, David R. JAK-STAT and feeding. **Landes Bioscience review** v.2, e23675, 2013.

LAMBALK, C.B. Neuroendocrinology of Female Reproduction. In: Pinchera, A. et al (eds.) *Karbala J. Med.* Vol.3, n.3,4, 2010. Endocrinology and Metabolism, McGraw-Hill International Ltd., London, v.43, 2001.

LI LI; MESSINA, J.L., Acute Insulin Resistance Following Injury. **Trends Endocrinol Metab.** v.20, n.9, p.429–435, 2009.

LIMA FB; BETHEA CL. Ovarian steroids decrease DNA fragmentation in the serotonin neurons of non-injured rhesus macaques. **Mol. Psychiatry**, v.15, p.657–668, 2010.

LIU Y, DING J, BUSH TL, LONGENECKER JC, NIETO FJ, GOLDEN SH, et al. Relative androgen excess and increased cardiovascular risk after menopause: a hypothesized relation. **Am J Epidemiol.** v.154, p.489-94, 2001.

LIU YAN, JIAN-HUA SHI, WEN-HUA DU, et al. Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide expression in the hypothalamus of rats No. 3, P.R. China, 2011.

LO, S.; RUSSELL, J. C. AND TAYLOR, A. W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J. Appl. Physiol.**, v.28, n.2, p. 234-6, 1970.

LONGUI CA. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. **Jornal de Pediatria**. 83(5 Suppl):163-171, 2007.

LOHFF, J.C., CHRISTIAN, P.J., MARION, S.L., ARRANDALE, A., HOYER, P.B. Characterization of cyclicity and hormonal profile with impending ovarian failure in a novel chemical-induced mouse model of perimenopause. **Comp. Med.** v.55, p.523-527, 2005.

MACHADO, UBIRATAN FABRES MACHADO, SCHAAN, BEATRIZ D., SERAPHIM, PATRÍCIA M. Transportadores de Glicose na Síndrome Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 50, n.2, 2006.

MARCOVECCHIO ML, CHIARELLI F. The effects of acute and chronic stress on diabetes control. **Sci Signal**, v.23, n.5, p.247, 2012.

MATTHEWS, D.R.; et al. 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.

MAYER LP, PEARSALL NA, CHRISTIAN PJ, DEVINE PJ, PAYNE CM, MCCUSKEY MK, MARION SL, SIPES G, HOYER PB. 2002. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. **Reprod Toxicol**, v.16, p.775-781.

MAYER LP, DEVINE PJ, DYER CA, HOYER PB. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biol Reprod**, v.71, p.130-138, 2004.

MAZZIOTTI, Gherardo; GAZZARUSO, Carmine; GIUSTINA, Andrea. Diabetes in Cushing syndrome: basic and clinical aspects. Trends in **Endocrinology & Metabolism**, v.22, n. 12, 499 - 506, 2011.

MEIER JJ, BUTLER AE, SAISHO Y, et al. β -cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of β -cell mass in humans. **Diabetes**. v.57, p.1584-1594. 2008.

MERCHENTHALER I, LANE MV, ZHAN M, HOYER PB The 4-Vinylcyclohexene Diepoxide (VCD)-Treated Rat Provides A Unique Preclinical Model to Study Peri-Menopausal Hot Flashes. **J Endocrinol Diabetes Obes**, v.2, n.2, p. 1028, 2014.

MIES-FILHO A. Reprodução dos animais. 6 ed. Porto Alegre, Sulina, 1987.

MIZUTANI T, NISHIKAWA Y, ADACHI H, ENOMOTO T, IKEGAMI H, KURACHI H, NOMURA T, MIYAKE A., Identification of estrogen receptor in human adipose tissue and adipocytes. **J Clin Endocrinol Metab**, v.78, 950-954, 1994.

MOLITCH, M.E. Neuroendocrinology and the neuroendocrine system. In: Goldman, L. and Ausiello, D. Cecil **Textbook of Medicine**. 22nd ed. Saunders, Philadelphia, v.235, n.22, 1357-66, 2004.

MORMÈDE, P, ANDANSON S, AUPÉRIN B, BEERDA B, GUÉMÉNÉ D et al. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology & Behavior**, v. 92, p. 317–339, 2007.

MOTTA K, BARBOSA AM, BOBINSKI F, BOSCHERO AC, RAFACHO, A. JNK and IKK β phosphorylation is reduced by glucocorticoids in adipose tissue from insulin-resistant rats. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.145, p.1-12, 2015.

MUOIO DM & NEWGARD CB. Obesity-related derangements in metabolic regulation. **Annu Rev Biochem**, v.75, p. 367, 2006.

NOVELLI, M., et al. Insufficient adaptive capability of pancreatic endocrine function in dexamethasone-treated ageing rats. **J. Endocrinol**. v.162, p. 425–432, 1999.

NUNES, EA, et al. Glucose intolerance induced by glucocorticoid excess is further impaired by co-administration with β -hydroxy- β -methylbutyrate in rats. **Appl. Physiol. Nutr. Metab**, v.38, p.1137-1146, 2013.

OVERLIE I, MORKRID L, ANDERSSON AM, et al. Inhibin A and B as markers of menopause: a five-year prospective longitudinal study of hormonal changes during the menopausal transition. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v.84, n.3, p.281-5, 2005.

PARK YW, ZHU S, PALANIAPPAN L, HESHKA S, CARNETHON MR, HEYMSFIELD SB. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. **Arch Intern Med.**, v.163, p.427-36, 2003.

PEARL S, KUSHNER JA, BUCHHOLZ BA, et al. Significant human β -cell turnover is limited to the first three decades of life as determined by in vivo thymidine analog incorporation and radiocarbon dating. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.95, p.E234–E239, 2010.

PINHEIRO CH, et al. Exercício Físico Previne Alterações Cardiometabólicas induzidas pelo Uso Crônico de glicocorticóides. **Arq Bras Cardiol**; v.93, n.3 p. 400-408, 2009.

POLOSANTIS O.B. Ophthalmological applications of hydrocortisone ointment. **Klin Med**, v. 77 p. 40-41, 1999.

PORTE D. Central regulation of energy homeostasis. **Diabetes** v.55, p.S155-S160, 2006.

RAFACHO A et al. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. **Can J Physiol Pharmacol**, v.85, p.536-545, 2007.

RAFACHO, A.; et al. Functional Alterations in Endocrine Pancreas of Rats With Different Degrees of Dexamethasone-Induced Insulin Resistance. **Pancreas**, v.36, n.3, p.284-293, 2008a.

RAFACHO, A. et al. Increased pancreatic islet mass is accompanied by activation of the insulin receptor substrate-2/serine-threonine kinase pathway and augmented cyclin D2 protein levels in insulin-resistant rats. **Int. J. Exp. Path.**, v.89, p.264-275, 2008b.

RAFACHO A, et al. High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.296 p.E681-689, 2009.

RAFACHO A, et al. The adaptive compensations in endocrine pancreas from glucocorticoid-treated rats are reversible after the interruption of treatment. **Acta Physiol**, v.200, p. 223–235, 2010.

RAFACHO A, et al. Morphofunctional alterations in endocrine pancreas of short- and long-term dexamethasone-treated rats. **HormMetab Res**, v.43, p.275-281, 2011.

REICHLIN, Seymour. Neuroendocrinology of the Pituitary Gland. Toxicologic pathology by the **Society of Toxicologic Pathologists**, v.10, n.2, p.250-255, 1989.

REICHLIN Seymour. Neuroendocrinology. *In*: Wilson JD, Foster DW (eds.) **Williams Textbook of Endocrinology**. 8 ed. Philadelphia: WB Saunders Company, p.135-220, 1992.

REIS, FM; REZENDE, CP. Aplicações das dosagens de inibinas em Ginecologia e Obstetrícia **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**. v.31 n.12, 2009.

REIS FM, PESTANA-OLIVEIRA NB, LEITE CMC, LIMA FBD, et al. Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopause-animal model induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats. **Psychoneuroendocrinology** v.49, 130-140, 2014.

REYES FI, WINTER JS, FAIMAN C. Pituitary-ovarian relationships preceding the menopause. I. A cross-sectional study of serum follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin, estradiol, and progesterone levels. **Am. J. Obstet. Gynecol**. v.129, p. 557-564, 1977.

REYNOLDS RM, WALKER BR. (2003). Human insulin resistance: the role of glucocorticoids. **Diabetes Obes Metab** 5: 5-12

RHEN, T, CIDLOWSKI, JA. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids - New Mechanisms for Old Drugs. **N Engl J Med**, v.353, p.1711-1723, 2005.

RIZZA, RA, MANDARINO, LJ, GERICH, J. Cortisol-induced insulin resistance in man: impaired suppression of glucose production and stimulation of glucose utilization due to a postreceptor defect of insulin action. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 54, p.131-138, 1982.

RIZZO MC, SOLÉ D. Inhaled corticosteroids in the treatment of respiratory allergy: safety vs. efficacy. **J Pediatr**, v.82, p.S198-205, 2006.

RODRIGUES AM, SUP LICY, HL, RADOMINSKI, RB. Controle Neuroendócrino do Peso Corporal:Implicações na Gênese da Obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab**, vol 47 n. 4, 2003.

RODRIGUES, MLV, MARCONDES, FK, SPADARIBRATFISCH, RC. Relationship between sensitivity to adrenaline, plasma corticosterone level and estrous cycle in rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v. 73, n. 5, p. 602-607, 1995.

ROEPKE TA. Oestrogen modulates hypothalamic control of energy homeostasis through multiple mechanisms. **J Neuroendocrinol**. v.21, n.2, p.141-50, 2009.

ROGERS, NH & ROY, GS. Brown- to- white transition in subcutaneous fat: linking aging and disease. **AGING**, v.4, n.11, p.728-729, 2012.

ROMERO-ALESHIRE MJ et al.Loss of ovarian function in the VCD mouse-model of menopause leads to insulin resistance and rapid progression into metabolic syndrome. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 2009; v.297, p.R587-R592, 2009.

ROONEY, D. P., et al. The effect of cortisol on glucose}glucose-6-phosphate cycle activity and insulin action. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v.77, p. 1180-1183, 1994.

ROSENFELD RL, BARNES RB, CARA JF, LUCKY AW. Dysregulation of cytochrome P450c 17 alpha as the cause of polycystic ovarian syndrome. **Fertil Steril**. 1990; v.53, n.5, p.785-91, 1990.

RUZZIN J, WAGMAN AS, JENSEN J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the

effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. **Diabetologia**, v. 48, p.2119–2130, 2005.

SAAD, MJA. et al. Modulation of Insulin Receptor, Insulin Receptor Substrate-1, and Phosphatidylinositol 3-Kinase in Liver and Muscle of Dexamethasone-treated Rats. **Clin. Invest**, v.92, p.2065-2072, 1993.

SANTORO N, ROSENBERG J, ADEL T, SKURNICK JH. Characterization of reproductive hormonal dynamics in the perimenopause. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 4, p.1495-501, 1996.

SANTORO N, CRAWFORD SL, LASLEY WL, LUBORSKY JL, MATTHEWS KA, MCCONNELL, et al. Factors related to declining luteal function in women during the menopausal transition. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 93, p.1711-1721, 2008.

SANTOS CL, RAFACHO A, BOSQUEIRO JR. Effects of dexamethasone administration in vivo on glycaemia, insulinaemia and circulating substrates are dependents of time of treatment. **Biosci. J.**, v.23, n.3, p. 101-110, 2007.

SANTOS C, FERREIRA FBD, GONÇALVES-NETO LM, TABOGA SR, BOSCHERO AC, RAFACHO A. Age- and gender-related changes in glucose homeostasis in glucocorticoid-treated rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v.92, p.867–878, 2014.

SARTORELLI DS, FLORINDO AA, CARDOSO MA. Necessidade de energia e avaliação do gasto energético. Capítulo 4 p. 56-77. In: CARDOSO, M. A. **Nutrição Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 345p. 2006.

SCHACKE, H, DOCKE, WD, & ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther.** v. 96, n. 1, p. 23-43, 2002.

SCHNEIDER CA, RASBAND WS, ELICEIRI KW. NIH Image to ImageJ: 25 anos de análise de imagem. **Métodos Nat.** v.9, n.7, p. 671-675, 2012.

SEYFFARTH AS e BRESSAN J. Os alimentos: calorias, macronutrientes e micronutrientes. **Sociedade Brasileira de Diabetes** – Manual de Nutrição: Departamento de Nutrição e Metabologia da SBD, 2009.

SENGUPTA, P. A Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How Old is it in Comparison with Human Age? **Biomedicine International**, v.2, p. 81-89, 2011.

SHIBLI-RAHHAL A, VAN BEEK M, SCHLECHTE JA. Cushing's syndrome. **Clin. Dermatol**, v.24, p.260-265, 2006.

SIMPKINS JW, YANG SH, WEN Y, SINGH M. Estrogens, progestins, menopause and neurodegeneration: basic and clinical studies. **Cell Mol Life Sci.**, v.62, p.271–280, 2005.

SINGH M, Dykens JA, SIMPKINS JW. Novel mechanisms for estrogen-induced neuroprotection. **Exp Biol Med**, v.231, n.5, p.514–521, 2006.

SLAVIN BG, ONG JM, KERN PA. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. **J. Lipid. Res.**, v.35, p.1535- 1541, 1994.

SMITH, MS, FREEMAN, ME , NEILL, JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotrofin and steroids levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, Baltimore, v. 96, n. 1, p. 219-226, 1975.

SOWERS MR, ZHENG H, MCCONNELL D, NAN B, HARLOW S, RANDOLPH JF JR. Follicle stimulating hormone and its rate of change in defining menopause transition stages. **J Clin Endocrinol Metab**, v.93, p.3958-3964, 2008.

SPRINGER LN, MCASEY, FLAWS JA, TILLY JL, SIPES IG, HOYER PB. Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.139, p.394–401, 1996.

STAHN C, BUTTGEREIT F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. **Nat.Clin. Pract. Rheumatol.**, v.4, p. 525–533, 2008.

SU HI, SAMMEL MD, FREEMAN EW, LIN H, DEBLASIS T, GRACIA CR. Body size affects measures of ovarian reserve in late reproductive age women. **Menopause**, v.15 p.857-861, 2008.

SUZUKI S, BROWN CM, WISE PM. Mechanisms of neuroprotection by estrogen. **Endocrine**, v.29, n.2, p.209–215, 2006.

TCHERNOF A, DESMEULES A, RICHARD C, LABERGE P, DARIS M, MAILLOUX J, RHEAUME C, DUPONT P, 2004. Ovarian hormone status and abdominal visceral adipose tissue metabolism. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, p.3425-3430, 2004.

TETA M, LONG SY, WARTSCHOW LM, RANKIN MM, KUSHNER JA. Very slow turnover of β -cells in aged adult mice. **Diabetes**, v.54, p.2557–2567, 2005.

THIBAULT C, LEVASSEUR MC, HUNTER RHF. Reproduction in mammals and man. 5a Ed. Editora Ellipses, 1993.

THIERY JC, MARTIN GB. Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep- a review **Reproduction, Fertility and Development**, v.3, n.2, p.137–173, 1991.

THOMPSON KE, BOURGUET SM, CHRISTIAN PJ, BENEDICT JC, SIPES IG, FLAWS JA, HOYER PB. Differences between rats and mice in the involvement of the aryl hydrocarbon receptor in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss. **Toxicol Appl Pharmacol**. v.203, p.114–123, 2005.

THUNHORST, RL; BELTZ, TG; JOHNSON, AK. Glucocorticoids increase salt appetite by promoting water and sodium excretion. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.293, n.3, p.1444-1451, 2007.

TIANO JP & MAUVAIS-JARVIS F. Importance of oestrogen receptors to preserve functional β -cell mass in diabetes. **Nature Reviews Endocrinology**, v.8, p.342-351, 2012

TOTH MJ, TCHERNOF A, SITES CK, POEHLMAN ET. Effect of menopausal status on body composition and fat distribution. **Int J Obes.Relat.Metab.Disord.**, v.24, p.226-31, 2000.

TRUMP D, LAU YK. Chemotherapy of prostate cancer: present and future. **CurrUrol Rep**, v.4, p.229-232, 2003.

VAN DE KERKHOF PC, VISSERS WH. The topical treatment of psoriasis. *Skin PharmacolAppl* **Skin Physiol**, v.6, p.69-83, 2003.

VAN WEERDEN WM, BIERINGS HG, VAN STEENBRUGGE GJ, DE JONG FH, SCHRODER FH. Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. **Life Sciences**. v.50, p.857-861, 1992.

VAUGHAN, M. The production and release of glycerol by adipose tissue incubated *in vitro*. **J. Biol. Chem.**, v.237, p.3354-8, 1962.

WALLACE TM, LEVY JC, MATTHEWS DR. Use and abuse of HOMA modeling. **Diabetes Care**, v.27, p.1487-95, 2004.

WARCHEŁ M, et al. The role of ghrelin, leptin and insulin in foetal development. **Ann Agric Environ Med.**, v.21, (n.2, p. 349-352, 2014.

WEIBEL ER. Stereological methods. Practical methods for biological morphometry. v.1, London: **Academic Press**, 415 p., 1979.

WEINSTEIN SP, et al. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. **Metabolism**, v.47, n.1, p.3-6, 1998.

WESTERTERP, KRH. Food quotient, respiratory quotient, and energy balance. American Society for Clinical Nutrition. **Ini J** , v.57, p.759S-65S, 1993.

WISE PM. Neuroendocrine influences on aging of the female reproductive system. **Front. Neuroendocrinol**, v.12, p.323-356, 1991.

WU FCW, BUTLER GE, KELNAR CJH et al. Patterns of pulsatile luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in prepubertal (midchildhood) boys and girls and patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (Kafimann's syndrome): a study using

an ultrasensitive time-resolved immunofluorometric assay. **Clin Endocrinol Metab**, v.72, n.6, p.1229-1237, 1991.

WU JM, et. al. Ovarian Aging and Menopause: Current Theories, Hypotheses, and Research Models. **Experimental Biology and Medicine**, v.230, p.818-828, 2005.

YAU JLW, SECKL JR. Local amplification of glucocorticoids in the aging brain and impaired spatial memory. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v.29, p.4-24, 2012.