



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAMILA FRANCIELE DE SOUZA

**ESTUDO DOS EFEITOS DA OVARIECTOMIA E PAPEL DOS  
ESTRÓGENOS NAS RESPOSTAS INDUZIDAS PELOS  
GLICOCORTICOIDES NA HOMEOSTASE ENERGÉTICA**

---

Londrina  
2018



Sociedade Brasileira de Fisiologia  
SBFis



Programa Multicêntrico  
de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CAMILA FRANCIELE DE SOUZA

**Estudo dos efeitos da ovariectomia e papel dos estrógenos  
nas respostas induzidas pelos glicocorticoides na  
homeostase energética**

---

Londrina  
2018

CAMILA FRANCIELE DE SOUZA

**ESTUDO DOS EFEITOS DA OVARIECTOMIA E PAPEL DOS  
ESTRÓGENOS NAS RESPOSTAS INDUZIDAS PELOS  
GLICOCORTICOIDES NA HOMEOSTASE ENERGÉTICA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, na Universidade Estadual de Londrina, PR, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa

Coorientadora: Profa. Dra. Cássia Thaïs Bussamra Vieira Zaia

Londrina  
2018

CAMILA FRANCCIELE DE SOUZA

**ESTUDO DOS EFEITOS DA OVARIECTOMIA E PAPEL DOS  
ESTRÓGENOS NAS RESPOSTAS INDUZIDAS PELOS  
GLICOCORTICÓIDES NA HOMEOSTASE ENERGÉTICA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, na Universidade Estadual de Londrina, PR, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Graziela Scianti Ceravolo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Tânia Longo Mazzuco  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 05 de março de 2018.

Dedico este trabalho à minha família, principalmente aos meus pais Luiz e Sônia e a minha irmã Carla, por sempre apoiarem, incentivarem e lutaram junto comigo, para que os meus sonhos se tornassem realidade.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me proporcionado saúde, bênçãos e forças para que eu pudesse atravessar esta jornada e fazê-la se tornar realidade.

Agradeço ao meu orientador, Prof Dr Ernane, por todo carinho, paciência, disponibilidade, confiança e por me ensinar tanto e de uma forma tão doce. Sou muito grata a Deus por ter me abençoado com ele como orientador e ombro amigo. Muito obrigada por tudo. Com certeza, essa experiência do mestrado foi muito mais calma e gratificante por tê-lo ao lado, e que venham novos desafios e anos de trabalho, parceria e cumplicidade. Obrigada!

À profª Drª Thaís Zaia, por toda ajuda desde o primeiro dia, sempre amável, amiga, preocupada e disponível para tudo! Obrigada por todo o ensinamento e exemplo de pessoa, tanto profissional como pessoal! Obrigada!

A todo o pessoal do Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo, eu deixo meu muito obrigada, por sempre estarem dispostos a ajudar e ensinar no que fosse preciso. Cheguei como um peixe fora da água e hoje eu tenho certeza que ganhei mais do que amigos de trabalho, mas sim pessoas que carregarei comigo o resto da vida! Larissa, Geisi, Andressa, Marcela, Letícia, Carol, Gabi, Fabiano e João, não tenho palavras para vocês! Pessoas maravilhosas que me fizeram muito mais feliz durante esses dois anos, obrigada por todos os momentos compartilhados! .

Aos meus pais, pois sem eles nada disso seria possível. Obrigada pelo apoio incondicional, pelo amor, pela paciência, e por entrarem de cabeça junto comigo no meu sonho e então lutarem, se sacrificarem e fazerem de tudo para que se tornasse possível. A minha caminhada não teria sido tão colorida e pacífica como foi, se eu não contasse sempre com a ajuda e o colo de vocês. Nem todas as palavras de gratidão desse mundo seriam suficientes para expressar o meu agradecimento à vocês. Obrigada e obrigada! Vocês são a minha base, meu espelho e a razão que me faz querer sempre ser melhor, crescer e lutar pelos meus objetivos. Orgulhá-los é o que eu mais quero, sempre!

À minha irmã, por sempre estar disposta a me ouvir, por sonhar comigo e ser minha parceria nas alegrias e tristezas. Obrigada por sempre confiar na minha capacidade quando eu mesma já não o fazia. Obrigada por tudo!

Aos meu avós e toda minha família fica aqui meu muito obrigada, por

sempre estarem na torcida pelo meu sucesso e por todo carinho e amor.

Às minha amigas de apartamento, eu só tenho a agradecer por todo carinho, paciência, dedicação e companheirismo durante todo esse tempo. Obrigada e obrigada!

Ao meu namorado, Flávio, por aguentar diariamente as minhas reclamações, choros, desesperos e por sempre acreditar e confiar no meu potencial. Obrigada por cada palavra de incentivo e carinho quando eu achava que nada mais iria dar certo. Obrigada por ter sido e ser meu ponto de equilíbrio!

Aos docentes, discentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, no auxílio para a realização deste trabalho.

“Que comece agora! E que seja  
permanente essa vontade  
de ir além do que me espera.”

Caio Fernando de Abreu

SOUZA, C. F. **Estudo dos efeitos da ovariectomia e papel dos estrógenos nas respostas induzidas pelos glicocorticoides na homeostase energética.** 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

Tanto os glicocorticoides como a ovariectomia (OVX) são capazes de aumentar o apetite e o ganho de peso corporal em roedores, podendo levar a obesidade, e a reposição com estradiol é capaz de atenuar as alterações induzidas pela OVX. Sabe-se que os animais obesos são mais sensíveis aos efeitos anabólicos dos glicocorticoides do que os animais magros. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da ovariectomia e o papel protetor do estradiol nas respostas induzidas ao tratamento prolongado com corticosterona ou dexametasona na homeostase energética. Para isso, os ratos Wistar fêmeas (230-250 g) submetidos à cirurgia *sham* ou OVX, compondo grupos SHAM, OVX e OVX+E, receberam Água-ETOH ou corticosterona (15 mg/L), e água ou dexametasona (0,5 µg/L) como único fluido durante 28 dias de tratamento. O grupo OVX+E, desde o primeiro dia, foi tratado diariamente com estradiol (10 µg/0,2 mL/rata SC). A OVX induziu o aumento do ganho de peso corporal, ingestão alimentar, glicemia após o teste de tolerância à glicose (GTT), peso de tecido adiposo retroperitoneal e colesterol plasmático, com redução no peso do útero. O tratamento com glicocorticoides foi capaz de induzir, nos animais OVX, aumento do ganho de peso corporal, ingestão alimentar, resposta glicêmica após GTT (protocolo dexametasona), peso de tecido adiposo retroperitoneal, triglicerídeos plasmáticos (protocolo corticosterona) em relação ao tratamento com água, praticamente sem efeitos no grupo SHAM. O tratamento com estradiol nos animais OVX aboliu esses efeitos induzidos pelos glicocorticoides, além de diminuir o ganho de peso corporal, resposta glicêmica após GTT, o acúmulo de tecido adiposo, e aumentou o peso dos úteros, e as concentrações plasmáticas de triglicerídeos e ácidos graxos livres. Esses dados demonstram que a proteção contra efeitos anabólicos induzidos pelos glicocorticoides nas fêmeas é eliminada pela OVX e o estradiol pode prevenir essas respostas, sugerindo que o estradiol tem um papel protetor nas respostas metabólicas induzidas por glicocorticoides em ratas ovariectomizadas.

**Palavras-chave:** Corticosterona. Dexametasona. Ovário. Estrogênios. Homeostase energética.

SOUZA, C. F. **Study of the effects of ovariectomy and the role of estrogens on glucocorticoid-induced responses on energy homeostasis.** 63 p. Dissertation (Master's Degree in ) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

### ABSTRACT

Both glucocorticoids and ovariectomy (OVX) increase appetite and body weight gain in rats, leading to obesity, and estrogen replacement attenuates OVX-induced changes. It is known that obese animals are more responsive to the anabolic effects of glucocorticoids than lean ones. This study aimed to evaluate the effects of ovariectomy and the protective role of estradiol on the responses induced by prolonged treatment with corticosterone or dexamethasone on energy homeostasis. For this, female Wistar rats (230-250 g) subjected to sham or OVX surgery, composing the SHAM, OVX and OVX+E groups, received water-ETOH or corticosterone (15 mg/L) and water or dexamethasone (0.5 µg/L) as drinking fluid for 28 days. The OVX+E group was daily treated with estradiol (10 µg/0.2 mL/rat SC) since the first day. OVX induced enhancement of body weight gain, food intake, glycemia after glucose tolerance test (GTT), weight of retroperitoneal adipose tissue, and plasma cholesterol, with reduction on uterus weight. Treatment with glucocorticoids was able to induce, in OVX animals, increases on body weight gain, food intake, glycemic response after GTT (dexamethasone), weight of retroperitoneal adipose tissue, plasma triglycerides (corticosterone) compared with water treatment, with minor effects on SHAM group. Estradiol treatment in OVX rats abolished these effects induced by glucocorticoids, in addition it decreased body weight gain, glycemic response after GTT and fat accumulation, and increased weight of uterus, triglycerides and free fatty acids plasma levels. These data demonstrate that protection against glucocorticoids-induced anabolic responses in females is eliminated by ovariectomy and estradiol can prevent these responses, suggesting that estradiol has a protective role on the metabolic responses induced by glucocorticoids in ovariectomized rats.

**Key-Words:** Corticosteron. Dexamethasone. Ovary. Estrogens. Energy homeostasis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Neuropeptídeos hipotalâmicos. Os neurônios NPY/AgRP e POMC/CART no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), adjacente ao terceiro ventrículo, são regulados pela insulina e leptina e se projetam para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e para a área hipotalâmica lateral (LHA) e área perifornical (PFA), enviando informações a respeito do estoque energético do organismo. NPY: neuropeptídeo Y; AgRP: proteína relacionada ao agouti; POMC: proopiomelanocortina; CART: transcrito regulado por cocaína e anfetamina (modificado de SCHWARTZ et al., Nature)..... 16
- Figura 2.** Diferenças intersexuais e efeito da OVX no ganho de peso corporal e percentual de tecido adiposo de camundongos em resposta à dieta hiperlipídica (HONG et al., 2009)..... 18
- Figura 3.** Diferenças intersexuais e papel dos estrógenos em resposta à dieta hiperlipídica em camundongos (STUBBINS et al., 2012)..... 18
- Figura 4.** Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Hormônio liberador de corticotropina (CRH), produzido pelo hipotálamo estimula a produção e secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) na adeno-hipófise. O ACTH atuará no córtex glândula adrenal para promover a síntese e liberação dos hormônios esteroides adrenais. Os glicocorticoides (cortisol) liberados para a circulação sistêmica inibem a síntese e liberação de CRH e ACTH do hipotálamo e hipófise, respectivamente, em um exemplo clássico de *feedback* negativo (modificado de Medical Physiology- A systems approach, 2011)..... 20
- Figura 5.** Receptor de glicocorticoide e sinalização. Transdução de sinal por GR. Os glicocorticoides atravessam a membrana celular e se ligam ao complexo GR/Hsp90. Após a ligação, Hsp90 é liberada e GR é translocado para o núcleo, onde pode se ligar ao DNA por meio de ERG e iniciar a transcrição. GR: receptor de glicocorticoide; Hsp90: proteínas de choque térmico e estabilizadoras; ERG: elementos responsivos aos glicocorticoides (modificado de GARABEDIAN et al., F100 Research, 2017)..... 21
- Figura 6.** Delineamento experimental ..... 23

<b>Figura 7.</b>	Método de aplicação de injeção subcutânea em ratos (MALKOVIKING, S.,2013) .....	25
<b>Figura 8.</b>	Delineamento e análises realizadas durante o período experimental .....	26
<b>Figura 9.</b>	Delineamento experimental do GTT .....	28
<b>Figura 10.</b>	Ganho de peso corporal (A, B) e ingestão alimentar (C, D) dos grupos SHAM e OVX, tratados com (A, C) Água-ETOH ou corticosterona (CORT: 15 mg/L, N = 10 -21), e (B, D) Água ou dexametasona (DEXA: 0,5 µg / L, N = 5-14). Os dados são expressos como média ± EPM. * P <0,05 .....	32
<b>Figura 11.</b>	Ganho de peso corporal (A, B) e ingestão alimentar (C, D) dos grupos OVX e OVX+E, tratados com (A, C) Água- ETOH ou corticosterona (CORT: 15 mg/L, N = 10 -21) e (B, D) Água ou dexametasona (DEXA: 0,5 µg / L, N = 5-14). Os dados são expressos como média ± EPM. * P <0,05.....	32
<b>Figura 12.</b>	Teste de tolerância à glicose (GTT) (A, B) e área sob a curva (AUC) de GTT (C, D) dos grupos SHAM e OVX, que foram tratados com (A, C) Água-ETOH ou corticosterona (CORT: 15 mg / L, N = 8-20) e (B, D) Água ou dexametasona (DEXA: 0,5 µg / L, N = 5-14). Os dados são expressos como média ± EPM. a: P <0,05 vs SHAM; b: P <0,05 vs Água ou Água-ETOH. * P <0,05.....	35
<b>Figura 13.</b>	Teste de tolerância à glicose (GTT) (A, B) e área sob a curva (AUC) de GTT (C, D) dos grupos OVX e OVX+E, que foram tratados com (A, C) Água-ETOH ou corticosterona (CORT: 15 mg / L, N = 8-20), e (B, D) Água ou dexametasona (DEXA: 0,5 µg / L, N = 5-14). Os dados são expressos como média ± EPM. a: P <0,05 vs OVX; b: P <0,05 vs água ou Água- ETOH. * P <0,05.....	36
<b>Figura 14.</b>	Concentrações plasmáticas de colesterol total (A, B), triglicerídeos (C, D) e ácidos graxos livres (E, F) dos grupos SHAM e OVX, tratados com (A, C) Água- ETOH ou corticosterona (CORT: 15 mg/L, N = 10 -21), e (B, D) Água ou dexametasona (DEXA: 0,5 µg / L, N = 5-14). Os dados são expressos como média ± EPM. * P <0,05 .....	40

<b>Figura 15.</b>	Concentrações plasmáticas de colesterol total (A, B), triglicerídeos (C, D) e ácidos graxos livres (E, F) dos grupos OVX e OVX+E, tratados com (A, C) Água- ETOH ou corticosterona (CORT: 15 mg/L, N = 10 -21), e (B, D) Água ou dexametasona (DEXA: 0,5 µg / L, N = 5-14). Os dados são expressos como média ± EPM. * P <0,05 .....	41
<b>Figura 16.</b>	Sumário dos efeitos dos glicocorticoides nos parâmetros avaliados em ratas do grupo SHAM, OVX e OVX+E .....	50

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Peso dos tecidos adiposos retroperitoneal (g), perirrenal e perigonadal (g) e peso do útero (g) dos animais SHAM e OVX tratados com Água- ETOH ou corticosterona (CORT) .....38
- Tabela 2.** Peso dos tecidos adiposos retroperitoneal (g), perirrenal e perigonadal (g) e peso do útero (g) dos animais SHAM e OVX tratados com Água ou dexametasona (DEXA).....38
- Tabela 3.** Peso dos tecidos adiposos retroperitoneal (g), perirrenal e perigonadal (g) e peso do útero (g) dos animais OVX e OVX+E tratados com Água-ETOH ou corticosterona (CORT) .....39
- Tabela 4.** Peso dos tecidos adiposos retroperitoneal (g), perirrenal e perigonadal (g) e peso do útero (g) dos animais OVX e OVX+E tratados com Água ou dexametasona (DEXA).....39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 $\beta$ -HSD	11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AgRP	Proteína relacionada ao Agouti
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
AUC	Área sobre a curva
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
CORT	Corticosterona
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DEXA	Dexametasona
E	Estradiol
ERG	Elementos responsivos aos glicocorticoides
ETOH	Etanol
GR	Receptores de glicocorticoides
GTT	Teste de tolerância à glicose
LHA	Área hipotalâmica lateral
LPL	Lipoproteína lípase
MR	Receptores de mineralocorticoides
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial de Saúde
OT	Ocitocina
OVX	Ovariectomia
PFA	Área perifornical
POMC	Proopiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RE	Receptores de estrógenos
<i>sham</i>	Cirurgia fictícia da OVX
SNC	Sistema nervoso central
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VLDL	Lipoproteínas de colesterol de baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	CONTROLE NEUROENDÓCRINO DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA .....	15
1.2	ESTRÓGENOS E OBESIDADE .....	16
1.3	GLICOCORTICOIDES.....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	22
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	23
3.2	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	23
3.2.1	Avaliação do efeito da OVX e dos estrógenos no tratamento com glicocorticoides no ganho de peso corporal, ingestão alimentar, índice de LEE, teste de tolerância à glicose (GTT), peso do tecido adiposo branco visceral e útero e parâmetros metabólicos plasmáticos.....	25
3.3	ESFREGAÇÃO VAGINAL E CICLO ESTRAL.....	26
3.4	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....	27
3.5	ANESTÉSICOS E TRATAMENTOS PROFILÁTICOS.....	27
3.6	DROGAS UTILIZADAS.....	27
3.7	GTT .....	28
3.8	EUTANÁSIA.....	28
3.9	RETIRADA DE TECIDO ADIPOSO E ÚTERO .....	28
3.10	COLETA DE SANGUE .....	28
3.11	DOSAGENS PLASMÁTICAS .....	29
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	31
4.1	EFEITOS DA OVX E DO ESTRADIOL NAS ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO TRATAMENTO COM GLICOCORTICOIDES NO GANHO DE PESO CORPORAL, INGESTÃO ALIMENTAR, ÍNDICE DE LEE, GTT, PESO DO TECIDO ADIPOSO BRANCO VISCERAL E ÚTERO E PARÂMETROS METABÓLICOS PLASMÁTICOS.....	31
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	42

<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>
	<b>ANEXO</b> Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL.....	<b>63</b>

## 1. INTRODUÇÃO

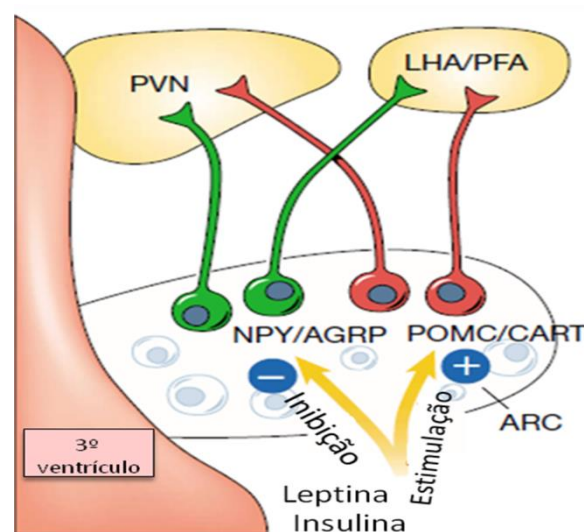
### 1.1 Controle neuroendócrino da homeostase energética

A presença de um equilíbrio interno entre os diversos sistemas fisiológicos do organismo, a fim de garantir a sobrevivência do indivíduo, refere-se à homeostase. O sistema nervoso central (SNC) encontra-se envolvido na manutenção da homeostase, sendo que o hipotálamo é um dos principais responsáveis por essa regulação, como por exemplo, na homeostase energética (LEVINE, 2000). O desequilíbrio na homeostase energética pode levar ao desenvolvimento do quadro de obesidade e suas comorbidades (GUH et al, 2009).

A obesidade, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem se mostrado grave problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Nos últimos tempos, tem sido dada maior atenção para o estudo dos fatores que levam tanto à obesidade como a outras doenças decorrentes dos distúrbios da alimentação. No Brasil 53,8% da população encontra-se com excesso de tecido adiposo corporal, sendo que a prevalência dentre os homens é 57,7% e em mulheres 50,5% (BRASIL. Ministério da Saúde, 2016). Devido a isso, a melhor compreensão a respeito da fisiologia do controle de peso corporal e ingestão alimentar tem se tornado assunto recorrente, de grande importância e de questionamentos, uma vez que, alcançar a homeostase energética depende de múltiplos fatores (TASKER, 2006).

Nesse contexto, sabe-se que os neurônios dos núcleos hipotalâmicos expressam neuropeptídeos orexígenos, como neuropeptídeo Y (NPY), orexina, hormônio concentrador de melanina e proteína relacionada ao Agouti (AgRP) (MORLEY et al., 1987; SAKURAI et al., 1998; EBIHARA et al., 1999) e neuropeptídeos anorexígenos, tais como a proopiomelanocortina (LU et al., 1994, FAN et al., 1997), o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (KRISTENSEN et al., 1998), o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (ARASE et al., 1988) e a ocitocina (OT) (ARLETTI et al., 1989), fundamentais para a regulação da homeostase energética. Esses neuropeptídeos são regulados por fatores periféricos, como a insulina e a leptina (SCHWARTZ et al., 2000; FIGLEWICZS, 2003), que sinalizam ao SNC informações indicadoras do estoque energético do organismo.

A leptina é produzida de maneira proporcional aos estoques de tecido adiposo, e sinaliza ao SNC, promovendo a inibição da ingestão alimentar e o aumento do gasto energético (MAFFEI et al., 1995; CONSIDINE & CARO, 1996). A insulina também exerce papel importante no controle da homeostase energética e suas concentrações plasmáticas encontram-se aumentadas após uma refeição, ou seja, em uma situação de equilíbrio energético positivo (BAGDADE et al., 1967), sinalizando tal estado ao SNC, de modo a reduzir a ingestão alimentar e o peso corporal (WOODS et al., 1979). Assim, por meio desses sinais de adiposidade, o organismo envia respostas ao SNC que irão regular o gasto energético ou a alimentação (SIMS & LORDEN, 1986), a fim de garantir o equilíbrio interno de modo que se alcance a homeostase (figura 1).



**Figura 1.** Neuropeptídeos hipotalâmicos. Os neurônios NPY/AgRP e POMC/CART no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), adjacente ao terceiro ventrículo, são regulados pela insulina e leptina e se projetam para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e para a área hipotalâmica lateral (LHA) e área perifornical (PFA), enviando informações a respeito do estoque energético do organismo. NPY: neuropeptídeo Y; AgRP: proteína relacionada ao agouti; POMC: proopiomelanocortina; CART: transcrito regulado por cocaína e anfetamina (modificado de SCHWARTZ et al., Nature, 2000).

## 1.2 Estrógenos e obesidade

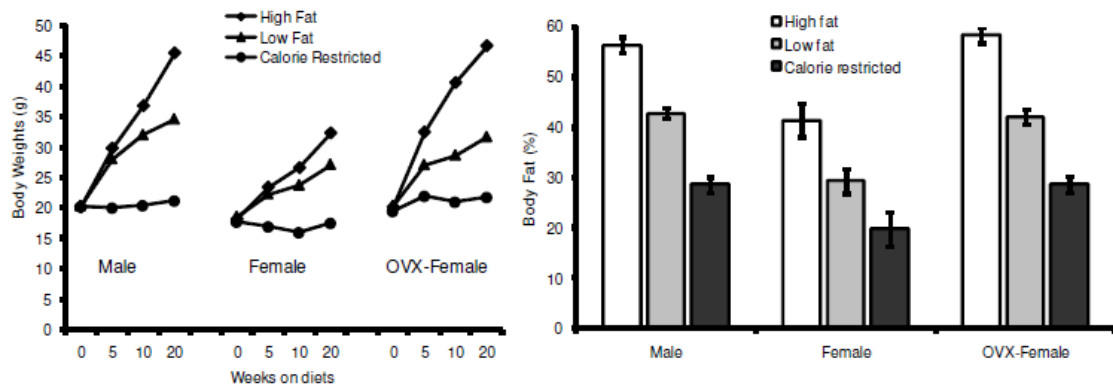
Sabe-se que há maior tendência ao acúmulo de tecido adiposo na região abdominal em homens, sendo que nas mulheres há maior predisposição do tecido adiposo se depositar subcutaneamente. As diferenças ocupacionais entre homens e mulheres, como por exemplo, os diferentes empregos, atividade física, composição

corporal, padrões de ingestão alimentar e diferenças reprodutivas, podem mascarar as diferenças intersexuais na susceptibilidade a obesidade (Power & SCHULKIN, 2008). Há diferenças entre a incidência de doenças metabólicas relacionadas com a obesidade em homens e mulheres. A partir dos 50 anos, a prevalência de desordens metabólicas em mulheres aumenta drasticamente, período concomitante com o aparecimento da menopausa, a cessação permanente da menstruação, como resultado da perda da função folicular ovariana (FORD, 2005). Após 12 meses consecutivos de amenorreia, ou seja, ausência da menstruação, sem nenhuma causa patológica ou fisiológica, a menopausa é considerada natural. A menopausa é um fenômeno complexo que pode ser vivenciado de diferentes maneiras pelas mulheres (GJELSVIK et al., 2011). A cirurgia de ovariectomia (OVX) em roedores é utilizada experimentalmente como um dos métodos para mimetizar a menopausa em fêmeas, a fim de se observar os efeitos da falta dos esteroides ovarianos circulantes na homeostase energética.

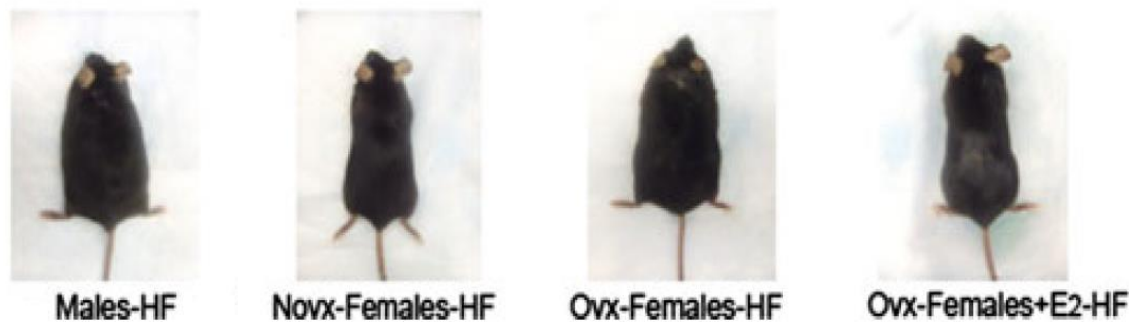
Assim, os esteroides ovarianos são importantes fatores na regulação da homeostase energética, particularmente os estrógenos. Sabe-se que os estrógenos podem levar à diminuição da ingestão alimentar, e na sua ausência, como pode se observar experimentalmente após OVX, ou fisiologicamente na menopausa, há aumento da ingestão alimentar e do ganho de peso corporal, sendo este correlacionado com um saldo positivo do equilíbrio energético (ASARIAN & GEARY, 2002). Dessa forma, pode-se observar em humanos durante a menopausa a ocorrência de mudanças corporais, como o aumento de tecido adiposo na composição corpórea, principalmente na área abdominal (TREMOLLIÈRES et al., 1996).

Interessantemente, Hong e colaboradores (2009) demonstraram que camundongos machos apresentam maior susceptibilidade ao ganho de peso corporal e de tecido adiposo em resposta à dieta hipercalórica, do que fêmeas intactas, porém a OVX as torna tão susceptíveis a desenvolverem o quadro de obesidade quanto os machos, demonstrando que a proteção contra a obesidade em fêmeas é eliminada pela OVX (figura 2). Adicionalmente, foi evidenciado o papel protetor dos estrógenos no desenvolvimento de obesidade, bem como nas suas comorbidades, como resistência insulínica e dislipidemias, induzidos pela dieta

hiperlipídica em camundongos, machos (ZHU et al., 2014), fêmeas intactas (LITWAK et al., 2014) e ovariectomizadas (RIANT et al., 2009; MATYSKOVÁ et al., 2010; STUBBINS et al. a, b, 2012; ZHU et al., 2013) (figura 3). Deste modo, a terapia de reposição com estrógenos é capaz de atenuar e até mesmo reverter vários parâmetros metabólicos que são alterados devido à perda da função ovariana, observadas na menopausa ou induzidos pela OVX (SALPETER et al., 2006; RICHARD et al., 1991; BUTERA, 2010; SILVA et al., 2010).



**Figura 2.** Diferenças intersexuais e efeito da OVX no ganho de peso corporal e percentual de tecido adiposo de camundongos em resposta à dieta hiperlipídica (HONG et al., Nutr. J., 2009).



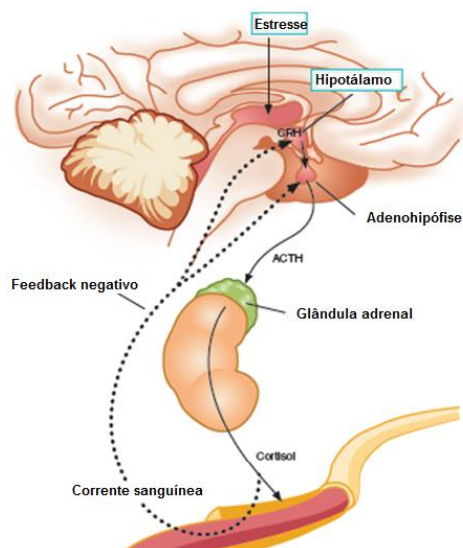
**Figura 3.** Diferenças intersexuais e papel dos estrógenos em resposta à dieta hiperlipídica em camundongos (STUBBINS et al., Eur. J. Nutr., 2012a).

### 1.3 Glicocorticoides

Além dos estrógenos, a homeostase energética e a ingestão alimentar podem ser controladas por outros fatores periféricos, sendo um deles os glicocorticoides, produzidos pelas glândulas adrenais. Localizadas nos polos superiores dos rins, as glândulas adrenais são formadas pela medula e córtex adrenal. A medula está relacionada com o sistema nervoso simpático e é responsável por secretar os

hormônios epinefrina e norepinefrina. Os principais hormônios do córtex da adrenal são os mineralocorticoides e os glicocorticoides (KANCZKOWSK et al.,2017). Os mineralocorticoides atuam principalmente na regulação do volume dos líquidos extracelulares, principalmente por ação nos íons sódio e potássio; já os glicocorticoides apresentam efeitos nos metabolismos de carboidratos, proteínas e lipídios, bem como no sistema imune (AYRES, 2012).

Os glicocorticoides são originados da cascata do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, sendo regulados pelo CRH, produzido pelo hipotálamo e pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), sintetizado e secretado pela adeno-hipófise (DINNEEN et al., 1993; KELLER-WOOD & DALLMAN, 1984) (figura 4). Dessa forma, os glicocorticoides são capazes de reduzir a síntese e liberação de CRH e do ACTH (DIORIO et al.,1993) por retroalimentação negativa. O cortisol em humanos e a corticosterona em roedores são exemplos de glicocorticoides endógenos, e importantes reguladores da ingestão e do gasto energético, por meio da ação em neuropeptídeos hipotalâmicos (CAVAGNINI et al., 2000). Sabe-se que glicocorticoides aumentam o apetite e o peso corpóreo em seres humanos e roedores (TATARANNI et al., 1996; ZAKRZEWSKA et al., 1999), e seu excesso pode aumentar a adiposidade central, como visto na síndrome de Cushing (REBUFFÉ-SCRIVE et al., 1988; BUJALSKA et al., 1999; LEE et al., 2013), além de contribuir para a resistência à insulina e leptina.

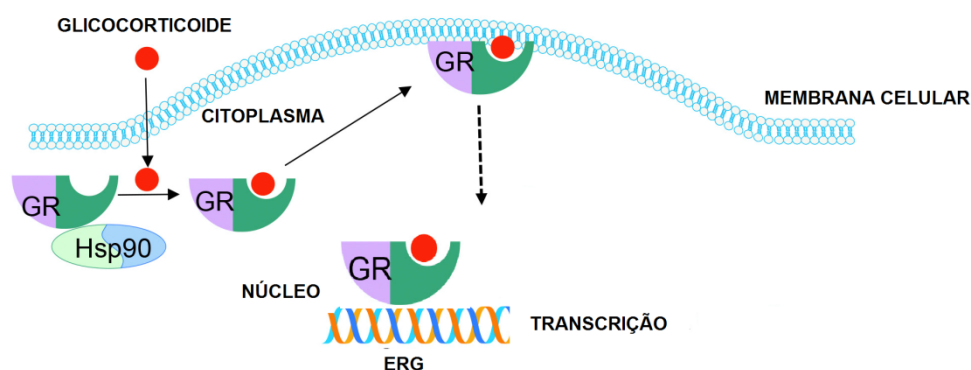


**Figura 4.** Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Hormônio liberador de corticotropina (CRH), produzido pelo hipotálamo estimula a produção e secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) na adeno-hipófise. O ACTH atuará no córtex glândula adrenal para promover a síntese e liberação dos hormônios esteroides adrenais. Os glicocorticoides (cortisol) liberados para a circulação sistêmica inibem a síntese e liberação de CRH e ACTH do hipotálamo e hipófise, respectivamente, em um exemplo clássico de *feedback* negativo (modificado de Medical Physiology- A systems approach, 2011).

Adicionalmente, observou-se que as concentrações plasmáticas de glicocorticoides estão aumentadas em diferentes modelos de obesidade e que a retirada bilateral das glândulas adrenais, denominada adrenalectomia, é capaz de reduzir a hiperfagia e a obesidade nesses diferentes modelos de obesidade (BRUCE et al., 1982; YUKIMURA et al., 1978; DUBUC & WILDEN, 1986; MAKIMURA et al., 2000). Reciprocamente, camundongos e ratos obesos apresentam maior sensibilidade aos efeitos anabólicos dos glicocorticoides do que animais magros (TOKUYAMA & HIMMS-HAGEN, 1987, 1989; FREEDMAN et al., 1986; SHPILBERG et al., 2012).

Os receptores de glicocorticoides (GR), membros da superfamília de receptores nucleares, estão amplamente distribuídos no cérebro e tecidos periféricos e medeiam os efeitos fisiológicos dos glicocorticoides (OAKLEY & CIDLOWSKI, 2011). Os glicocorticoides estão presentes na corrente sanguínea na forma ligada a proteínas plasmáticas, porém penetram na célula na sua forma livre. Os GR se encontram no citoplasma ligados a um complexo de proteínas de choque térmico e proteínas estabilizadoras (hsp90), e ao ligar-se a uma molécula de glicocorticoide

formam um complexo estável e liberam as proteínas de choque térmico e estabilizadoras. O complexo glicocorticoide-receptor é dimerizado, entra no núcleo e se liga a elementos responsivos aos glicocorticoides (ERG), regulando a transcrição gênica (figura 5) (GARABEDIAN et al., 2017). Os receptores de mineralocorticoides (MR) e os GR possuem estruturas similares, e ainda os GR possuem isoformas distintas como a  $\alpha$  e  $\beta$ . A corticosterona, glicocorticoide endógeno, se liga efetivamente e ativa ambos os subtipos de receptores, MR e GR, já a dexametasona, glicocorticoide sintético, atua predominantemente no GR e a aldosterona no MR. O MR possui uma alta afinidade pelos glicocorticoides e está relacionado com a ingestão e deposição de lipídeos ao longo do ciclo circadiano, e o GR possui uma baixa afinidade pelos glicocorticoides, controlando principalmente a ingestão de carboidratos nas primeiras horas do dia. (TEMPEL et al, 1994).



**Figura 5.** Receptor de glicocorticoide e sinalização. Transdução de sinal por GR. Os glicocorticoides atravessam a membrana celular e se ligam ao complexo GR/Hsp90. Após a ligação, Hsp90 é liberada e GR é translocado para o núcleo, onde pode se ligar ao DNA por meio de ERG e iniciar a transcrição. GR: receptor de glicocorticoide; Hsp90: proteínas de choque térmico e estabilizadoras; ERG: elementos responsivos aos glicocorticoides (modificado de GARABEDIAN et al., F100 Research, 2017).

Dessa forma, sabe-se que há diferenças na susceptibilidade à obesidade entre machos e fêmeas, e que a perda da função ovariana pode levar à obesidade e suas comorbidades, de modo que os estrógenos desempenham um papel protetor no desenvolvimento da obesidade. Além disso, está bem estabelecido na literatura que os glicocorticoides apresentam um importante efeito anabólico e que animais obesos são mais responsivos a tais efeitos dos glicocorticoides do que animais magros. Logo, torna-se relevante o estudo dos efeitos da OVX e o papel dos estrógenos nos efeitos anabólicos dos glicocorticoides.

## 2. OBJETIVOS

### *Objetivos gerais:*

Avaliar os efeitos da OVX e o papel do estradiol nas respostas anabólicas induzidas pelos glicocorticoides.

### *Objetivos específicos:*

Avaliar os efeitos da OVX e do estradiol nas respostas induzidas pelo tratamento prolongado com corticosterona ou dexametasona nos seguintes parâmetros:

- Ganho de peso corporal, ingestão alimentar e índice de Lee
- Teste de tolerância à glicose.
- Peso do tecido adiposo branco visceral e útero.
- Parâmetros metabólicos plasmáticos (colesterol total, triglicérides e ácidos graxos livres).

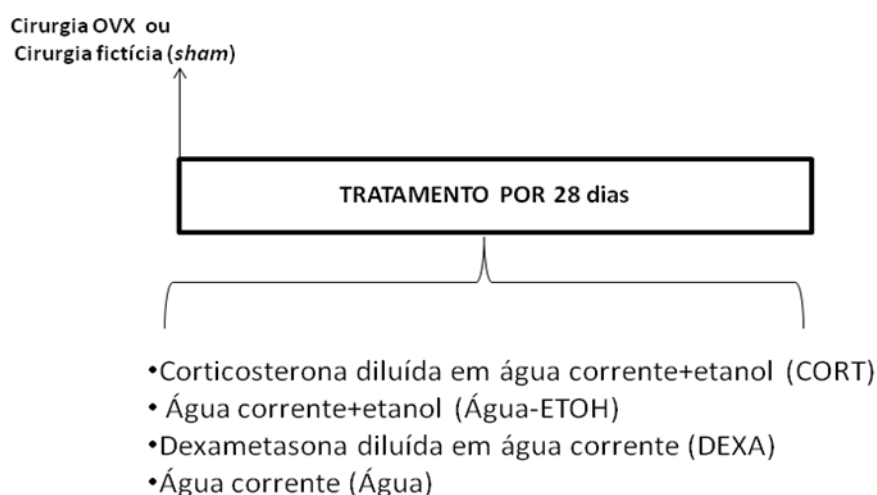
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais Experimentais

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (n=180) pesando entre 230-250g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os animais foram mantidos em caixas coletivas (3 animais/caixa) no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, com ambiente de luz (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura ( $22 \pm 2$  °C) controlados, e água e alimentação à vontade, exceto nos experimentos que envolveram restrição alimentar, como detalhado abaixo. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo do CIF/UEL a partir das 14h. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em experimentação da UEL (Número do protocolo 14638.2016.42, ANEXO).

#### 3.2 Protocolos experimentais

Para a realização dos protocolos, os animais foram submetidos à OVX ou cirurgia fictícia da OVX (*sham*) no dia 1, e tratados com corticosterona diluída em água corrente + etanol 0,5% ou água corrente + etanol 0,5%, e dexametasona diluída em água corrente ou água corrente, conforme especificado abaixo, durante 28 dias consecutivos à cirurgia.



**Figura 6.** Delineamento experimental

Protocolo corticosterona (CORT):

- Grupo de cirurgia fictícia (sham) da OVX / Água-ETOH: ratas controle receberam água corrente contendo etanol 0,5%, como única fonte de líquido;
- Grupo de cirurgia fictícia (sham) da OVX / CORT: ratas controle receberam água corrente contendo corticosterona (15mg/L) diluída em etanol 0,5% como única fonte de líquido;
- Grupo OVX / Água-ETOH: ratas ovariectomizadas receberam água corrente contendo etanol 0,5%, como única fonte de líquido;
- Grupo OVX / CORT: ratas ovariectomizadas receberam água corrente contendo corticosterona (15mg/L) diluída em etanol 0,5% como única fonte de líquido;
- Grupo OVX+E / Água-ETOH: ratas ovariectomizadas e tratadas com cipionato de estradiol (10µg/0,2 mL/rata) receberam água corrente contendo etanol 0,5% como única fonte de líquido;
- Grupo OVX+E / CORT: ratas ovariectomizadas e tratadas com cipionato de estradiol (10µg/0,2 mL/rata) receberam água corrente contendo corticosterona (15mg/L) diluída em etanol 0,5% como única fonte de líquido.

Protocolo dexametasona (DEXA):

- Grupo de cirurgia fictícia (sham) da OVX / Água: ratas controle receberam água corrente como única fonte de líquido;
- Grupo de cirurgia fictícia (sham) da OVX / DEXA: ratas controle receberam água corrente contendo dexametasona (0,5 µg/L) como única fonte de líquido.
- Grupo OVX / Água: ratas ovariectomizadas receberam água corrente como única fonte de líquido;
- Grupo OVX / DEXA: ratas ovariectomizadas receberam água corrente contendo dexametasona (0,5 µg/L) como única fonte de líquido;
- Grupo OVX+E / Água: ratas ovariectomizadas e tratadas com cipionato de estradiol (10µg/0,2 mL/rata) receberam água corrente como única fonte de líquidos;
- Grupo OVX+E / DEXA: ratas ovariectomizadas e tratadas com cipionato de estradiol (10µg/0,2 mL/rata) receberam água corrente contendo dexametasona (0,5 µg/L) como única fonte de líquido.

Durante o período de tratamento, os animais submetidos à cirurgia de OVX ou cirurgia fictícia, receberam desde o primeiro dia do experimento, via subcutânea 0,2mL de óleo de milho ou cipionato de estradiol (10 µg/0,2 mL/rata) diariamente no dorso. As ratas do grupo SHAM receberam óleo de milho, ao passo que metade das ratas ovariectomizadas recebeu óleo de milho, constituindo o grupo OVX e a outra metade recebeu o cipionato de estradiol, constituindo o grupo OVX+E. A dose de cipionato de estradiol foi selecionada com base em doses anteriormente utilizadas na literatura (LEITE et al., 2016), e as concentrações de corticosterona e dexametasona foram escolhidas com base em estudos piloto do nosso laboratório (dados não apresentados).

SHAM: Óleo de milho (0,2 mL/rata) via SC

OVX: Óleo de milho (0,2 mL/rata) via SC

OVX+E: Cipionato de estradiol (10 µg/0,2 mL/rata) via SC



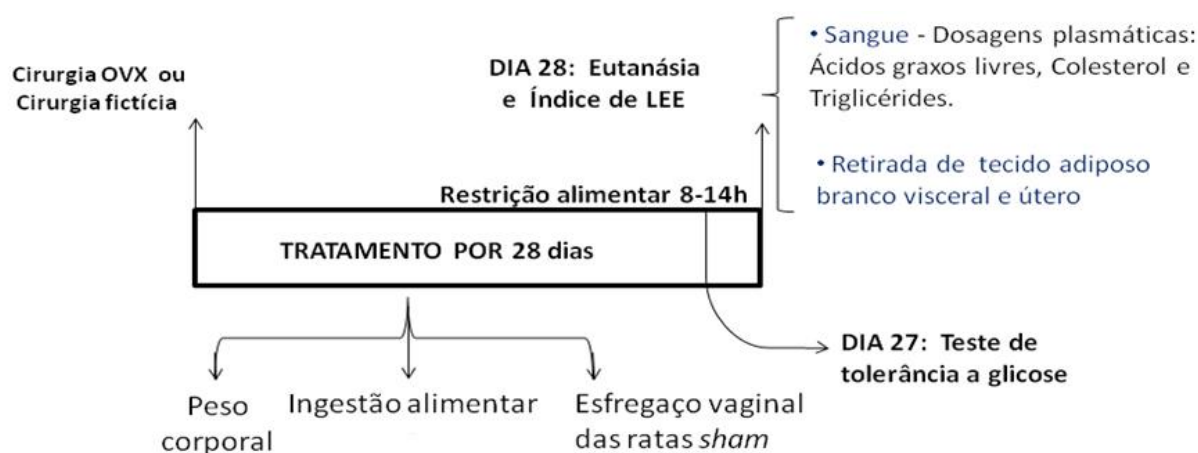
**Figura 7.** Método de aplicação de injeção subcutânea em ratos (MALKOVIKING, S.,2013).

### ***3.2.1 Avaliação do efeito da OVX e dos estrógenos no tratamento com glicocorticoides no ganho de peso corporal, ingestão alimentar, índice de LEE, teste de tolerância à glicose (GTT), peso do tecido adiposo branco visceral e útero e parâmetros metabólicos plasmáticos.***

Todos os animais foram diariamente pesados, e a quantidade de alimento ingerida foi avaliada, também diariamente, pelo período de 28 dias após a cirurgia. Os animais receberam ração para roedores (Nuvilab CR1, Nuvital®), e as sobras foram retiradas após 24 horas. Da diferença entre a oferta e sobra de alimentos, foi calculada a quantidade diária de alimento ingerido e expressa em g/100 g peso corpóreo.

No 27º dia após a cirurgia, os animais foram mantidos em restrição alimentar a partir das 8h, e às 14h foi realizado o GTT. Ao final do experimento os animais retornaram para suas caixas contendo fluidos e alimentação à vontade.

No 28º dia, os animais foram mantidos em restrição alimentar a partir das 8h, e foi calculada a relação entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento nasoanal do animal para a medida do índice de Lee (BERNARDIS & PETERSON, 1968). Os animais foram eutanasiados por decapitação às 14h, e o sangue foi coletado para avaliação das concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, triglicerídeos e colesterol total, e o tecido adiposo visceral e útero foram retirados e pesados.



**Figura 8.** Delineamento e análises realizadas durante o período experimental.

### 3.3 Esfregaço vaginal e ciclo estral

O esfregaço vaginal das ratas SHAM foi colhido diariamente às 8h da manhã para o acompanhamento do estágio do ciclo estral durante todo o experimento. Para a coleta da secreção vaginal utilizou-se uma pipeta Pasteur de 1 mL de ponta fina (1,0 mm de diâmetro) contendo 0,2 mL de salina 0,9%, para a introdução no canal vaginal. O material coletado foi colocado em uma lâmina histológica, e analisado a fresco em microscópio óptico de luz em aumento de 10x. A partir das proporções e os tipos de células (epiteliais nucleada, leucócitos, cornificadas ou queratinizadas), foram classificadas as fases do ciclo estral em que a fêmea se encontrava, sendo: no proestro, predomínio de células epiteliais nucleadas, a fase de estro foi identificada pela presença em maior proporção de células queratinizadas, o diestro 1 caracterizada pela células cornificadas e outras nucleadas, já acompanhadas de um grande número de leucócitos, e o diestro 2 foi identificado pela presença de leucócitos. Foram consideradas apenas as ratas que estavam em diestro I no dia dos experimentos (GTT e eutanásia).

### 3.4 Procedimento cirúrgico

Ratas foram submetidas à cirurgia de OVX bilateral ou cirurgia *sham*. Tanto a OVX como a cirurgia *sham* foram realizadas por meio de incisões bilaterais na pele e pequenas secções bilaterais através da camada muscular no ângulo entre a última costela e a coluna vertebral. Os animais *sham* foram submetidos ao procedimento cirúrgico semelhante, mas sem remoção dos ovários. Após o acesso à cavidade peritoneal, o ovário foi encontrado rodeado por uma quantidade variável de tecido adiposo. A conexão entre a trompa de falópio e o corno uterino foi seccionado e o ovário retirado, de acordo com o método descrito por Lasota e Danowska-Klonowsk (2004). Após a sutura, os animais receberam tratamento profilático com antibiótico e analgésico, como descrito abaixo, sendo recolocados nas caixas contendo fluidos e alimentação à vontade, onde permaneceram até o dia dos experimentos.

### 3.5 Anestésicos e tratamentos profiláticos

Para as cirurgias, os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina (100 mg/kg, Agener União, Apucarana, PR, Brasil 10%) associada com xilazina (20 mg/kg, Anasedan®, Vetbrands, Jacareí, Brasil, 2%), e logo após as cirurgias, os animais foram tratados com dose única de paracetamol (200 mg/mL, i.p.; dose de 200 mg/kg de peso corpóreo) e antibiótico para tratamento profilático (Pentabiótico Veterinário, Fort Dodge; 1.200.000 UI de Penicilinas: 0,1 mL/100 g peso corporal ou 24.000 UI/ 100 g peso corporal, i.m).

### 3.6 Drogas utilizadas

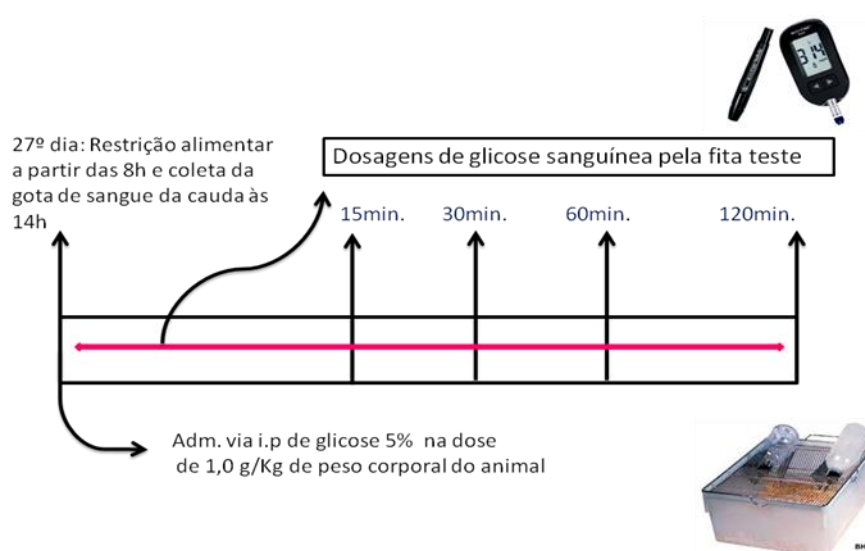
- *Cipionato de estradiol (Pfizer)*: as ratas submetidas à cirurgia de OVX receberam diariamente 0,2 mL via subcutânea de uma solução contendo cipionato de estradiol (10 µg/0,2 mL/rata) ou apenas óleo de milho (0,2mL/rata), e as ratas *sham* receberam apenas óleo de milho (0,2mL/rata).

- A *corticosterona (Sigma-Aldrich)* foi o glicocorticoide endógeno utilizado e teve como veículo de diluição o etanol 0,5%, sendo administrada por via oral na concentração de 15 mg/L, e a mistura de corticosterona com etanol diluída em água corrente foi ofertada aos animais como única fonte de líquidos.

- A *dexametasona (Ache)* foi o glicocorticoide exógeno utilizado, sendo diluída em água corrente e administrada por via oral na concentração de 0,5 µg/L. Foi ofertada aos animais como única fonte de líquidos.

### 3.7 GTT

Às 14h do dia 27 do protocolo experimental foi coletada uma gota de sangue da cauda para determinação da glicemia por meio da fita teste do aparelho Accu-Check Advantage II de determinação de glicose sanguínea. Esta primeira dosagem representou a glicemia basal. Imediatamente após, foi realizada a administração por via intraperitoneal de glicose 5% na dose de 1,0 g/kg de peso corporal de animal. A partir de então, foram realizadas dosagens de glicose sanguínea pela fita teste nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de glicose. Transcorridos os 120 minutos, os animais retornaram para suas caixas com alimentação e fluidos a vontade.



**Figura 9.** Delineamento experimental do GTT

### 3.8 Eutanásia

Todos os animais foram eutanasiados por decapitação ao final de cada experimento, no dia 28, em restrição alimentar de 6h.

### 3.9 Retirada de tecido adiposo e útero

Imediatamente após a decapitação, o tecido adiposo visceral, compreendendo as subdivisões perigonadal, perirrenal e retroperitoneal, foi retirado bem como o útero, para pesagem (g)

### 3.10 Coleta de sangue

Imediatamente após a decapitação, o sangue foi coletado em tubos heparinizados. Após a centrifugação, a 2500 r.p.m. e 4°C, durante 20 minutos, o

plasma foi separado em alíquotas e armazenado a -20 °C para posteriores dosagens de colesterol total, triglicérides e ácidos graxos livres.

### 3.11 Dosagens plasmáticas

#### *- Colesterol total:*

A determinação espectrofotométrica das concentrações plasmáticas de colesterol total foi realizada utilizando o kit comercial BioLiquid Colesterol (Laborclin, PR). O kit utilizado baseia-se na reação enzimática de Allain e colaboradores (1974). O produto final da reação apresenta coloração rósea e sua intensidade de cor é diretamente proporcional à quantidade de colesterol total existente na amostra. Foram pipetados 10 µL de padrão de colesterol (200 mg/dL) ou amostra de plasma, em tubos contendo 1 mL de reativo, para o branco apenas utilizou-se 1 mL de reativo. Após homogeneização por agitação, os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C por 5 min. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu Mod. UV-1201) no comprimento de onda de 500 nm. Os resultados obtidos da concentração plasmática de colesterol total foram expressos em mg/dL.

#### *-Triglicérides:*

A determinação espectrofotométrica das concentrações plasmáticas de triacilgliceróis foi realizada utilizando o kit comercial BioLiquid Triglicérides GPO-Trinder Commercial Kit (Laborclin, PR). O kit utiliza o teste enzimático e colorimétrico para o doseamento de triglicérides no soro ou plasma, sendo a coloração do produto final diretamente proporcional à quantidade de triglicérides existente na amostra. Foram pipetados 10 µL de padrão de triglicérides (200 mg/dL) ou amostra de plasma, e para o branco apenas utilizou-se 1 mL de reativo. Após homogeneização por agitação, os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C por 5 min. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu Mod. UV-1201) no comprimento de onda de 500 nm. Os resultados obtidos da concentração plasmática de triglicérides foram expressos em mg/dL.

#### *- Ácidos graxos livres:*

Por meio do método espectrofotométrico de Falholt et al. (1973), realizou-se a leitura dos resultados, utilizando-se o espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm, os resultados obtidos para a determinação dos ácidos graxos livres foram

expressos em  $\mu\text{moles} / \text{dL}$ . Para isso, foram utilizadas 100  $\mu\text{L}$  das amostras de plasma para realizar duas extrações, seguidas de agitação, aspiração da fase superior e centrifugação. Para o padrão, foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  de ácido palmítico (2 mmolar) em 1,0 mL de tampão de fosfato (pH 6,4) e 6,0 mL de solução extratora, o branco apresentava apenas a solução extratora. Na primeira extração, foram utilizados 1,0 mL de tampão de fosfato (pH 6,4) e 6,0 mL da solução contendo clorofórmio, heptano e metanol e, na segunda extração, 2,0 mL de Cu TEA (pH 8,1). Logo após, foram adicionados 1,0 mL do reagente de cor (DPC: 4% de 1,5-difenilcarbazidipenilcarbazona em 0,1 mL de TEA 1M) em 3,0 mL da fase superior.

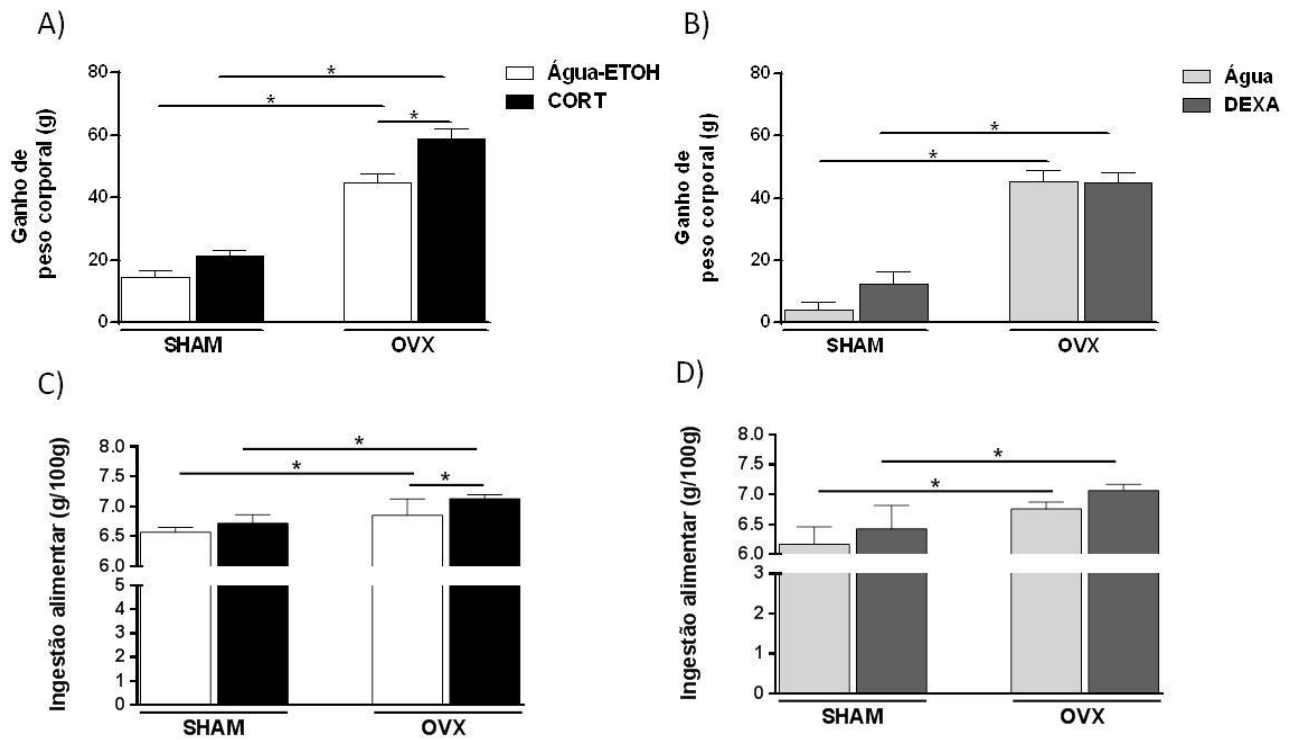
### **3.12 Análise estatística**

Foi testada a distribuição normal (Shapiro-Wilk test) e a homogeneidade (Levene's test) dos dados de cada variável. Quando necessário, os dados foram log-transformados para normalizar sua distribuição, e os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA), two-way Anova, seguido de teste de Student Newman-Keuls. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média (EPM). O nível de significância adotado foi de 5%. As análises estatísticas foram realizadas no Programa Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc.), e os gráficos no software Prism 6 (Graph Pad Software Inc., CA, EUA).

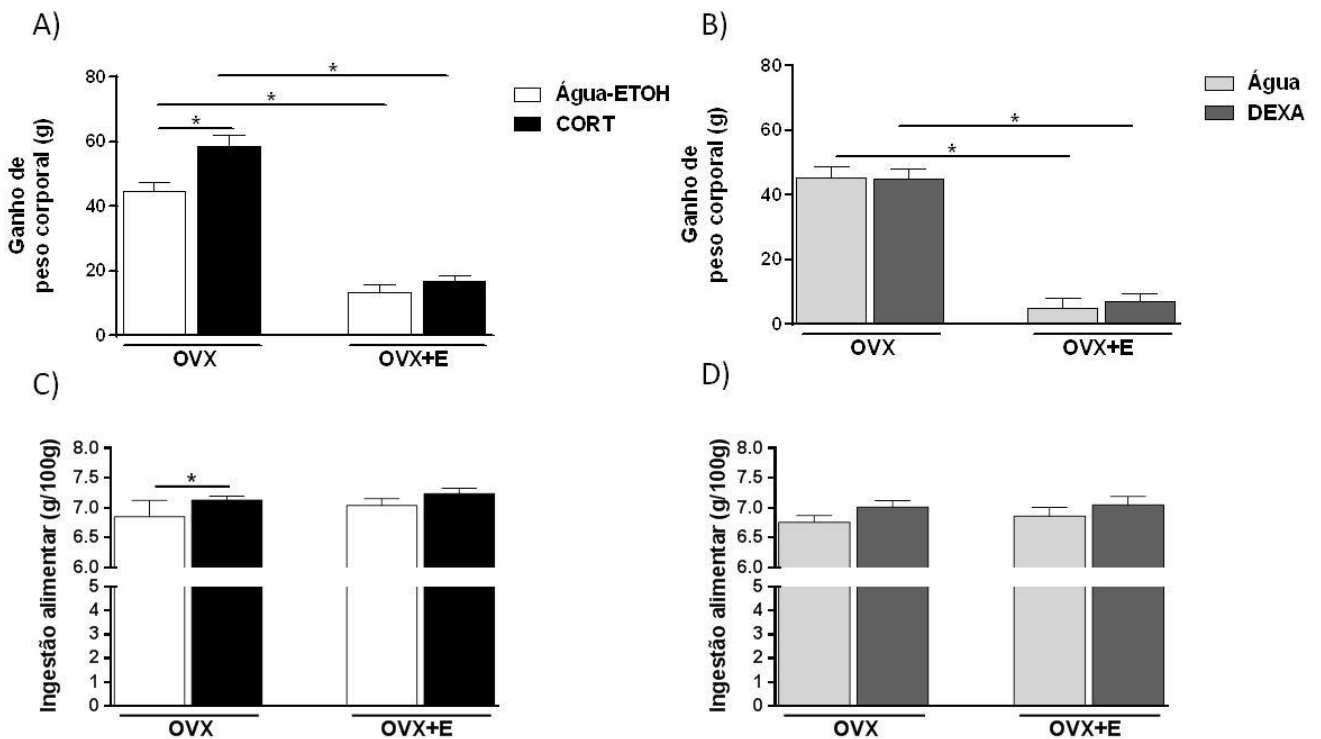
## 4. RESULTADOS

*4.1. Efeitos da OVX e do estradiol nas alterações induzidas pelo tratamento com glicocorticoides no ganho de peso corporal, ingestão alimentar, índice de Lee, GTT, peso do tecido adiposo branco visceral e útero e parâmetros metabólicos plasmáticos:*

A figura 10 apresenta os resultados de ganho de peso corporal e ingestão alimentar dos animais submetidos às cirurgias *sham* ou OVX, tratados com corticosterona 15 mg/L (A, C), ou dexametasona na concentração de 0,5µg/L (B, D). Todos os grupos OVX apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) ganho de peso corporal e ingestão alimentar em relação aos seus respectivos grupos SHAM. O tratamento com corticosterona induziu o aumento ( $P < 0,05$ ) no ganho de peso corporal e ingestão alimentar apenas em animais OVX, não demonstrando apresentar efeitos no grupo SHAM. O tratamento com o glicocorticoide exógeno, dexametasona, não alterou os parâmetros de ganho de peso corporal e ingestão alimentar nos grupos SHAM ou OVX. Em relação aos resultados obtidos para os grupos OVX e OVX+E observou-se que o tratamento com estradiol reduziu ( $P < 0,05$ ) o ganho de peso corporal, e tanto a CORT como a DEXA não alteraram o ganho de peso corporal e a ingestão alimentar em animais OVX tratados com estradiol (figura 11).



**Figura 10.** Ganho de peso corporal (A, B) e ingestão alimentar (C, D) dos grupos SHAM e OVX, tratados com (A, C) Água-ETOH ou corticosterona (CORT: 15 mg/L, N = 10 -21), e (B, D) Água ou dexametasona (DEXA: 0,5 µg / L, N = 5-14). Os dados são expressos como média ± EPM. \* P <0,05.

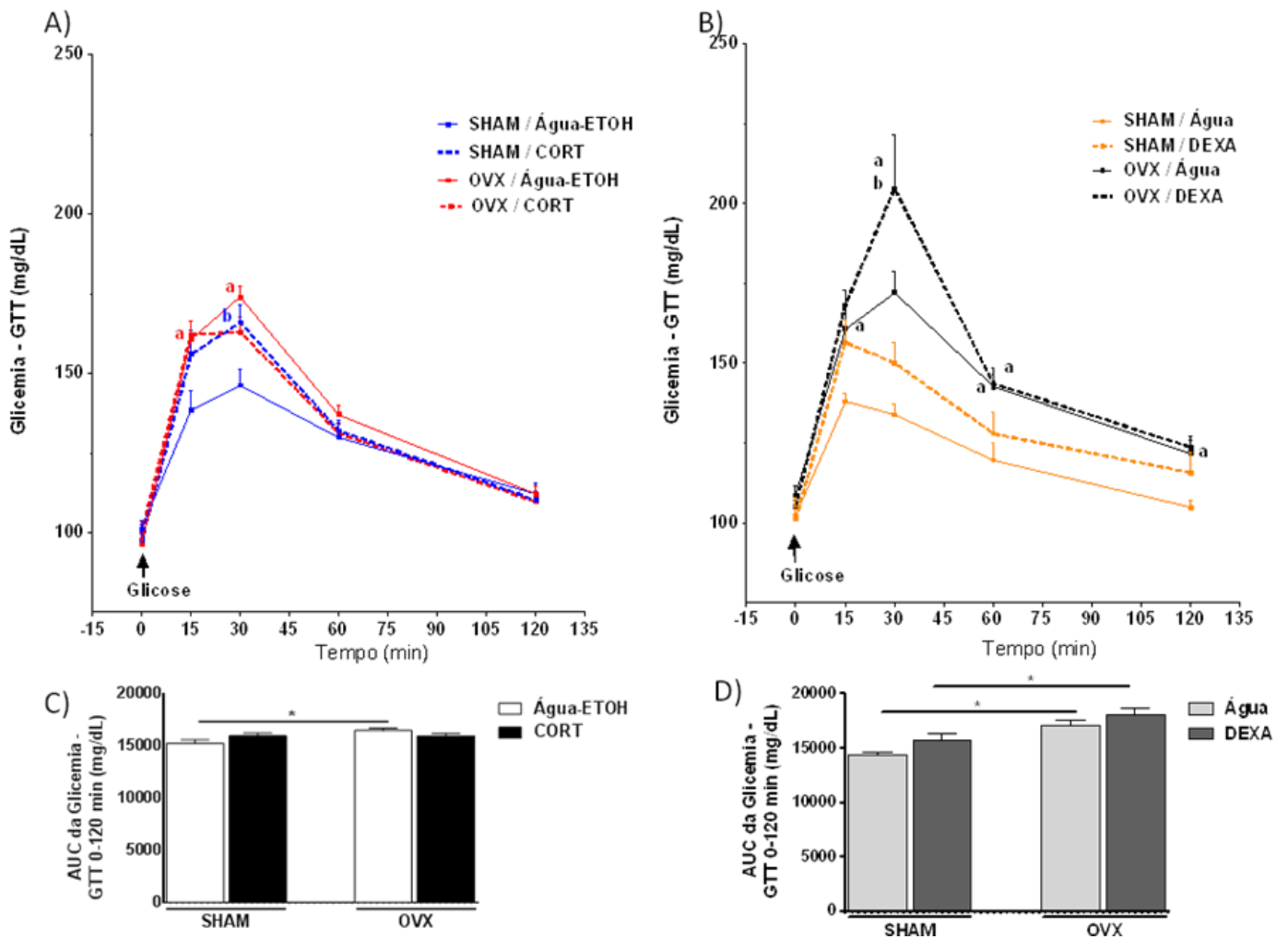


**Figura 11.** Ganho de peso corporal (A, B) e ingestão alimentar (C, D) dos grupos OVX e OVX+E, tratados com (A, C) Água- ETOH ou corticosterona (CORT: 15 mg/L, N = 10 -21) e (B, D) Água ou dexametasona (DEXA: 0,5 µg / L, N = 5-14). Os dados são expressos como média ± EPM. \* P <0,05.

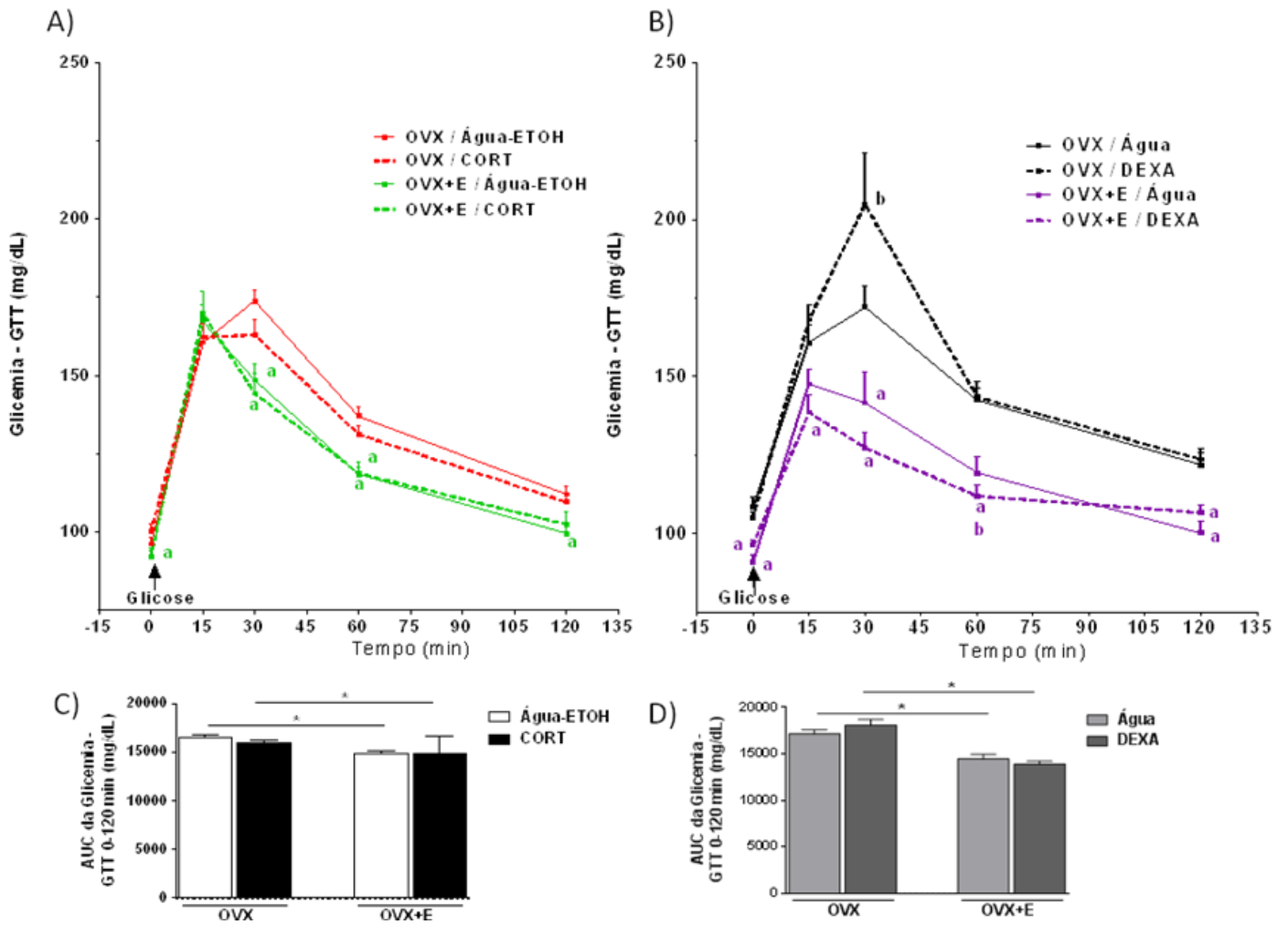
No protocolo de corticosterona, não houve diferença no índice de Lee ( $g^{1/3}/cm$ ) entre os grupos ( $n = 10-21$ ; SHAM/Água-ETOH:  $0,291 \pm 0,003$  vs OVX/Água-ETOH:  $0,291 \pm 0,002$ , SHAM/CORT:  $0,289 \pm 0,004$  vs OVX/CORT:  $0,291 \pm 0,002$ ), mas no protocolo de dexametasona, os animais OVX tratados com DEXA apresentaram maior índice de Lee ( $P < 0,05$ ) em comparação com seu respectivo grupo SHAM ( $n = 5-11$ ; SHAM/Água:  $0,308 \pm 0,003$  vs OVX/Água:  $0,315 \pm 0,002$ , SHAM/DEXA:  $0,306 \pm 0,005$  vs OVX/DEXA:  $0,318 \pm 0,003$ ), não apresentando diferenças entre os grupos SHAM/Água e OVX-Água, bem como entre o tratamento Água e DEXA. Houve diminuição ( $P < 0,05$ ) no índice Lee ( $g^{1/3}/cm$ ) dos animais OVX+E de ambos os protocolos [OVX/Água-ETOH:  $0,290 \pm 0,002$  vs OVX+E/Água-ETOH:  $0,280 \pm 0,002$ ; OVX/CORT:  $0,291 \pm 0,002$  vs OVX+E/CORT:  $0,285 \pm 0,002$  ( $n = 14-17$ ) OVX/Água:  $0,315 \pm 0,002$  vs OVX+E/Água:  $0,301 \pm 0,002$ ; OVX/DEXA:  $0,318 \pm 0,003$  vs OVX+E/DEXA:  $0,301 \pm 0,002$  ( $n = 10-11$ )], sem efeitos dos glicocorticoides em todos os grupos.

Os resultados do GTT demonstraram que o protocolo de tratamento com corticosterona, não apresentou diferenças entre os grupos, na glicemia basal dos animais, mas após 15 e 30 min da sobrecarga de glicose, os animais OVX/Água-ETOH apresentaram maior glicemia ( $P < 0,05$ ) do que o grupo SHAM/Água-ETOH. Além disso, a glicemia dos animais SHAM tratados com CORT foi maior no tempo de 30 min do GTT do que o grupo SHAM/Água-ETOH. Para o protocolo de dexametasona, os animais OVX/Água apresentaram glicemia aumentada ( $P < 0,05$ ) nos tempos de 15, 60 e 120 min de GTT em comparação com o grupo SHAM/Água. Nos pontos de 30 e 60 min do GTT, o grupo OVX/DEXA apresentou maior glicemia ( $P < 0,05$ ) em comparação com os animais SHAM/DEXA. A dexametasona foi capaz de induzir o aumento da glicemia ( $P < 0,05$ ) no tempo de 30 min de GTT em animais OVX, em comparação com o tratamento água neste grupo. Toda a resposta do GTT foi integrada na área sobre a curva (AUC) do GTT, que demonstrou que, no protocolo com corticosterona, os animais OVX tratados com Água/ETOH apresentaram valores maiores ( $P < 0,05$ ) da AUC do GTT do que o respectivo grupo SHAM. No protocolo de dexametasona, houve aumento da AUC do GTT dos grupos OVX tratados com água ou DEXA em comparação com os respectivos animais SHAM (figura 12).

O GTT dos grupos OVX e OVX+E demonstrou que os animais do grupo OVX+E, protocolo de corticosterona, apresentaram menores valores ( $P < 0,05$ ) da glicemia basal e após a sobrecarga de glicose, em relação aos grupos OVX. Tais diferenças foram significativamente diferentes para o protocolo com CORT nos tempos 30 e 60 min para os animais Água/ETOH e CORT, e em 120 min para o tratamento com Água/ETOH. Os animais OVX+E também tiveram valores menores ( $P < 0,05$ ) de glicemia do que os grupos OVX no protocolo de dexametasona. Nos tempos de 0, 30 e 120 min, os animais OVX+E tratados com água ou DEXA apresentaram glicemia reduzida em comparação com os respectivos grupos OVX. A DEXA aumentou (30 min) e diminuiu (60 min) a glicemia nos grupos OVX e OVX+E, respectivamente. Por fim, nos tempos 15 e 60 min, apenas os animais OVX+E/DEXA apresentaram valores menores de glicemia do que os grupos OVX/DEXA. Esses resultados do GTT foram integrados na AUC do GTT, que demonstra que os animais OVX+E apresentaram valores reduzidos de AUC do GTT em comparação com os grupos OVX em ambos os protocolos (figura 13).



**Figura 12.** Teste de tolerância à glicose (GTT) (A, B) e área sob a curva (AUC) de GTT (C, D) dos grupos SHAM e OVX, que foram tratados com (A, C) Água-ETOH ou corticosterona (CORT: 15 mg / L, N = 8-20) e (B, D) Água ou dexametasona (DEXA: 0,5µg / L, N = 5-14). Os dados são expressos como média ± EPM. a: P <0,05 vs SHAM; b: P <0,05 vs Água ou Água-ETOH. \* P <0,05.



**Figura 13.** Teste de tolerância à glicose (GTT) (A, B) e área sob a curva (AUC) de GTT (C, D) dos grupos OVX e OVX+E, que foram tratados com (A, C) Água-ETOH ou corticosterona (CORT: 15 mg / L, N = 8-20), e (B, D) Água ou dexametasona (DEXA: 0,5µg / L, N = 5-14). Os dados são expressos como média ± EPM. a: P <0,05 vs OVX; b: P <0,05 vs Água ou Água- ETOH. \* P <0,05.

Para os resultados do peso dos tecidos adiposos viscerais, observou-se que, em comparação com o tratamento Água ou Água-ETOH, ambos os tratamentos, corticosterona e dexametasona, não apresentaram efeitos no peso do tecido adiposo branco retroperitoneal nos grupos SHAM, no entanto, ambos os tratamentos foram efetivos em induzir o aumento ( $P < 0,05$ ) no peso de tecido adiposo retroperitoneal em animais OVX, os quais apresentaram valores significativamente maiores ( $P < 0,05$ ) em comparação com os seus respectivos animais SHAM. A corticosterona e a dexametasona não alteraram o peso de tecidos adiposos perigonadais e perirrenais nos grupos SHAM ou OVX, mas observou-se uma diminuição ( $P < 0,05$ ) desses parâmetros em animais OVX/Água-ETOH em relação ao SHAM/Água-ETOH do protocolo de corticosterona, não apresentando diferenças no protocolo com dexametasona. O peso do útero dos animais OVX foi menor ( $P < 0,05$ ) do que os grupos SHAM em ambos os tratamentos, sem efeitos dos glicocorticoides nesses parâmetros (tabelas 1 e 2).

As Tabelas 3 e 4 apresentam que o tratamento com a corticosterona e a dexametasona induziram o aumento ( $P < 0,05$ ) no peso do tecido adiposo retroperitoneal em animais OVX, porém esses efeitos não foram observados nos grupos OVX+E. O estradiol diminuiu significativamente ( $P < 0,05$ ) o peso dos tecidos adiposos retroperitoneal, perigonadal e perirrenal dos animais tratados com corticosterona, em comparação com o respectivo grupo OVX, sem diferenças entre os grupos no peso destes tecidos adiposos no protocolo da dexametasona. Houve aumentos significativos ( $P < 0,05$ ) nas médias dos pesos do útero de todos os grupos OVX+E, em comparação com animais OVX, sem efeitos dos glicocorticoides.

**Tabela 1.** Peso dos tecidos adiposos retroperitoneal (g), perirrenal e perigonadal (g) e peso do útero (g) dos animais SHAM e OVX tratados com Água- ETOH ou corticosterona (CORT).

	<b>SHAM/ Água-ETOH</b>	<b>SHAM/ CORT</b>	<b>OVX/ Água-ETOH</b>	<b>OVX/ CORT</b>
<b>Tecido adiposo retroperitoneal (g)</b>	2,25 ± 0,14	1,90 ± 0,15	2,32±0,14	2,88±0,23 #*
<b>Tecido adiposo perirrenal e perigonadal (g)</b>	5,50±0,24	5,16±0,48	4,41±0,41 #	5,00±0,56
<b>Peso do útero (g)</b>	0,45±0,03	0,42±0,02	0,19±0,01#	0,20±0,02 #

Dados expressos como média ± EPM. \*P <0,05 Água-ETOH vs CORT, #P<0,05 SHAM vs OVX. CORT: 15 mg/L, N=10-21.

**Tabela 2.** Peso dos tecidos adiposos retroperitoneal (g), perirrenal e perigonadal (g) e peso do útero (g) dos animais SHAM e OVX tratados com Água ou dexametona (DEXA).

	<b>SHAM/ Água</b>	<b>SHAM/ DEXA</b>	<b>OVX/ Água</b>	<b>OVX/ DEXA</b>
<b>Tecido adiposo retroperitoneal (g)</b>	1,68±0,16	1,50±0,17	1,65±0,16	2,35±0,15 #*
<b>Tecido adiposo perirrenal e perigonadal (g)</b>	4,60±0,91	4,20±0,63	3,65±0,23	3,76±0,35
<b>Peso do útero (g)</b>	0,46±0,06	0,39±0,04	0,16±0,01 #	0,17±0,01 #

Dados expressos como média ± EPM. \*P <0,05 Água vs DEXA, # P <0,05 SHAM vs OVX. DEXA: 0,5 µg/L, N=5-14.

**Tabela 3.** Peso dos tecidos adiposos retroperitoneal (g), perirrenal e perigonadal (g) e peso do útero (g) dos animais OVX e OVX+E tratados com Água-ETOH ou corticosterona (CORT).

	OVX/ Água-ETOH	OVX/ CORT	OVX+E/ Água-ETOH	OVX+E/ CORT
<b>Tecido adiposo retroperitoneal (g)</b>	2,32 ± 0,14	2,88±0,23 *	2,29 ± 0,19	2,02±0,16 #
<b>Tecido adiposo perirrenal e perigonadal (g)</b>	4,41±0,41	5,00±0,56	3,86±0,35	3,68±0,26 #
<b>Peso do útero (g)</b>	0,185±0,013	0,201±0,017	1,275±0,12 #	1,305±0,11 #

Dados expressos como média ± EPM. \* $P < 0,05$  Água-ETOH vs CORT, # $P < 0,05$  OVX vs OVX+E. CORT: 15 mg/L, N=12-17.

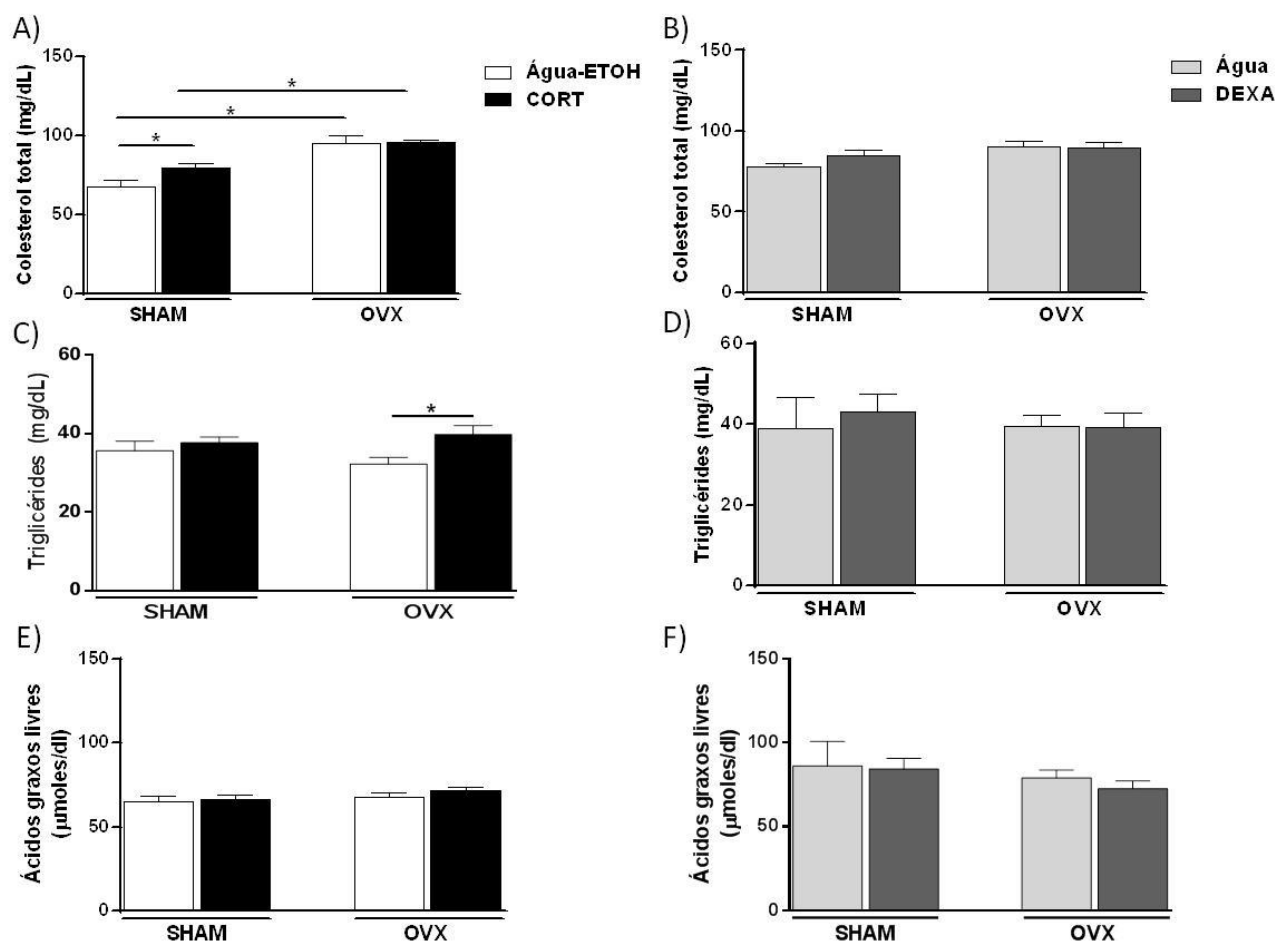
**Tabela 4.** Peso dos tecidos adiposos retroperitoneal (g), perirrenal e perigonadal (g) e peso do útero (g) dos animais OVX e OVX+E tratados com Água ou dexametasona (DEXA).

	OVX/ Água	OVX/ DEXA	OVX+E/ Água	OVX+E/ DEXA
<b>Tecido adiposo retroperitoneal (g)</b>	1,65±0,16	2,35±0,15 *	1,76±0,25	1,93±0,20
<b>Tecido adiposo perirrenal e perigonadal (g)</b>	3,65±0,23	3,76±0,35	3,02±0,30	3,48±0,29
<b>Peso do útero (g)</b>	0,16±0,01	0,17±0,01	0,92±0,12 #	0,87±0,12 #

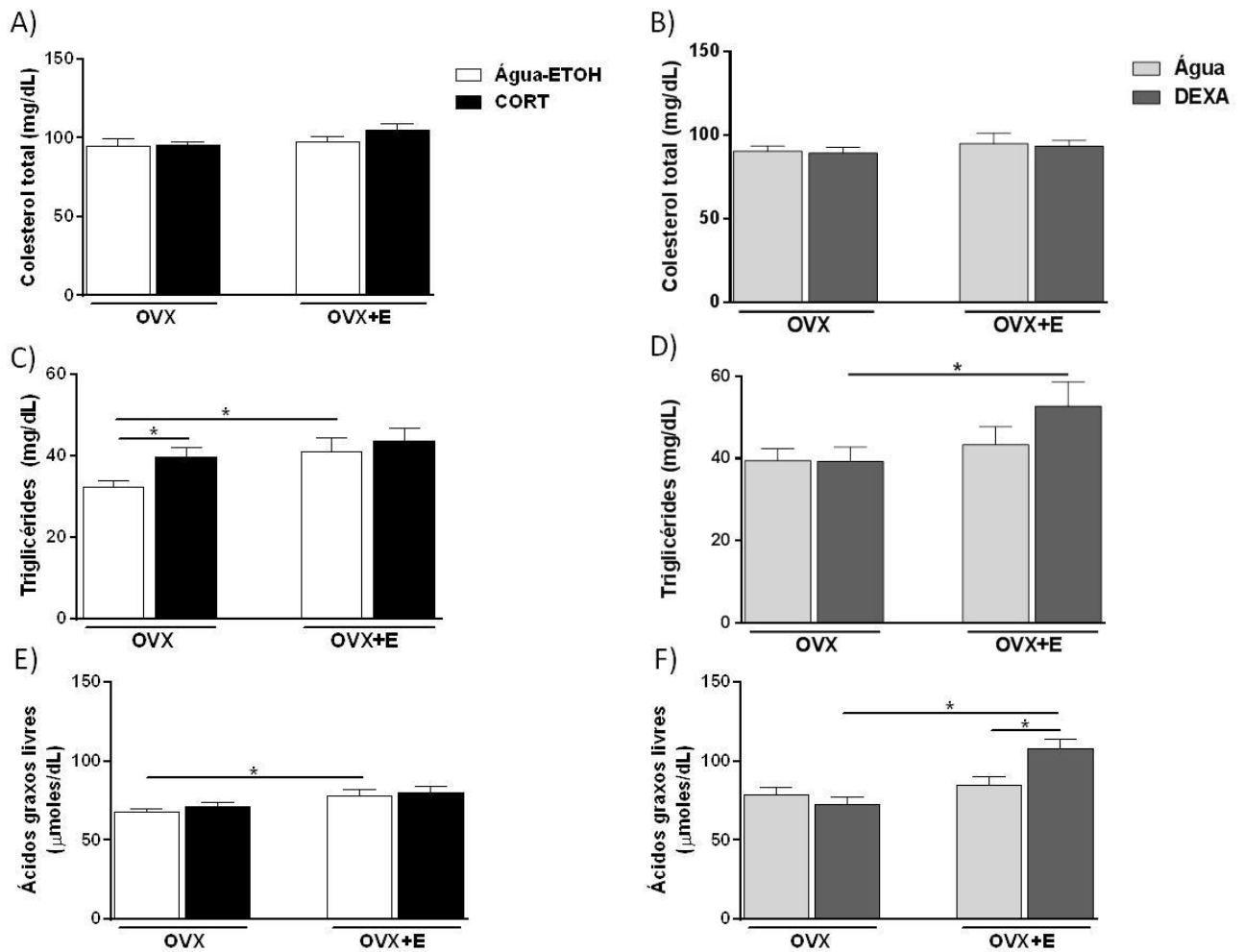
Dados expressos como média ± EPM. \* $P < 0,05$  Água vs DEXA, #  $P < 0,05$  OVX vs OVX+E. DEXA: 0,5 µg/L, N=5-14.

Na figura 14 observou-se que, no protocolo de tratamento com corticosterona, houve aumento ( $P < 0,05$ ) das concentrações plasmáticas de colesterol total no grupo SHAM e triglicérides nos animais OVX em resposta à corticosterona. Além disso, no protocolo com corticosterona, a OVX induziu ao aumento ( $P < 0,05$ ) das concentrações plasmáticas de colesterol total tanto nos tratamentos Água/ETOH e CORT, sem diferenças entre os grupos nas concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicérido no protocolo de dexametasona. Não houve diferenças entre os grupos experimentais em relação às concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres.

Os resultados dos grupos OVX e OVX+E demonstrou que não houve diferença significativa na concentração plasmática de colesterol total entre os grupos, em ambos os protocolos. Como já foi descrito, a corticosterona aumentou ( $P < 0,05$ ) as concentrações plasmáticas de triglicerídeos em animais OVX, não apresentando efeitos nos animais OVX+E. O estradiol induziu o aumento ( $P < 0,05$ ) nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos em animais tratados com Água/ETOH e DEXA, nos protocolos de corticosterona e dexametasona, respectivamente. Houve aumento nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres nos grupos OVX+E/Água-ETOH em comparação com os animais OVX/Água-ETOH, no protocolo de corticosterona. Animais OVX+E tratados com DEXA apresentaram maiores das concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres em relação ao respectivo grupo OVX (figura 15).



**Figura 14.** Concentrações plasmáticas de colesterol total (A, B), triglicerídeos (C, D) e ácidos graxos livres (E, F) dos grupos SHAM e OVX, tratados com (A, C e E) Água- ETOH ou corticosterona (CORT: 15 mg/L, N = 10 -21), e (B, D e F) Água ou dexametasona (DEXA: 0,5 μg / L, N = 5-14). Os dados são expressos como média ± EPM. \*  $P < 0,05$ .



**Figura 15.** Concentrações plasmáticas de colesterol total (A, B), triglicerídeos (C, D) e ácidos graxos livres (E, F) dos grupos OVX e OVX+E, tratados com (A, C e E) Água- ETOH ou corticosterona (CORT: 15 mg/L, N = 10 -21), e (B, D e F) Água ou dexametasona (DEXA: 0,5 μg / L, N = 5-14). Os dados são expressos como média ± EPM. \* P <0,05.

## 5. Discussão

O presente trabalho investigou se a OVX é capaz de aumentar a sensibilidade aos efeitos anabólicos do tratamento prolongado com glicocorticoides em ratas, e se o estradiol possui papel protetor contra esses efeitos metabólicos. De fato, observou-se que o tratamento durante vinte e oito dias com os glicocorticoides corticosterona ou dexametasona foi capaz de induzir efeitos anabólicos nos animais OVX, em relação ao ganho de peso corporal, ingestão alimentar, glicemia após GTT e peso do tecido adiposo retroperitoneal, não sendo essas respostas observadas nos animais tratados com estradiol.

O aumento no ganho de peso corporal, ingestão alimentar, intolerância à glicose, peso de tecido adiposo retroperitoneal e na concentração de colesterol total plasmático induzido pela OVX corroboram com dados clássicos da literatura (WADE & GRAY, 1978; ASARIAN & GEARY, 2002). Os hormônios ovarianos possuem importante papel no metabolismo, no ganho de peso corporal, e na regulação do apetite (DELLA TORRE et al., 2014; HIRSCHBERG, 2012; HONG et al., 2009; KAAJA, 2008; YOU et al., 2004). O equilíbrio energético e o gasto de energia em ratas são influenciados pelos estrógenos e seus efeitos tanto periféricos como no SNC (BUTERA, 2010). O ciclo estral dos roedores dura aproximadamente 4-5 dias, sendo que as diferentes fases que o compõem são caracterizadas por diferenças histológicas na citologia vaginal. As fases são: o diestro 1, diestro 2, proestro e estro, e também diferem entre si em relação a concentração de estradiol presente, assim, tem-se que o estradiol começa a aumentar em diestro 2, possui um pico em proestro, e diminui sua concentração em estro. Essas alterações nas concentrações plasmáticas de estradiol também levam a diferentes comportamentos alimentares, uma vez que há uma maior ingestão nas fases diestro 1 e diestro 2, menor em proestro e estabilizando em estro (ASARIAN & GEARY, 2002; SCHEDIN et al, 2000).

Neste contexto, sabe-se que os esteroides ovarianos podem atuar no cérebro alterando o comportamento de ingestão alimentar e a mobilidade voluntária do animal, de modo que a maior ingestão alimentar induzida pela OVX pode estar relacionada com o aumento de neuropeptídeos hipotalâmicos orexígenos e com a diminuição da expressão de neuropeptídeos anorexígenos (SILVA et al., 2010),

influenciando dessa forma no percentual de adiposidade (WADE & GRAY,1979). A OVX aumenta a susceptibilidade ao ganho de peso corporal uma vez que há falta da proteção hormonal levando ao maior acúmulo de tecido adiposo (HONG et al., 2009). O efeito clássico da OVX em promover o aumento do peso corporal e do tecido adiposo visceral pode ser devido à maior atividade da enzima lipogênica lipoproteína lípase (LPL) no tecido adiposo retroperitoneal (PICARD et al., 2000; MAURIÈGE et al., 2000). Além disso, valores mais elevados da concentração plasmática de colesterol total após a OVX, observados em nossos resultados, podem ser atribuídos à maior concentração plasmática de lipoproteínas de colesterol de baixa densidade (SAENGSIRISUWAN et al., 2009). Adicionalmente, a diminuição na tolerância à glicose observada nos animais OVX pode estar associada a um defeito na captação de glicose no músculo esquelético mediada pela insulina (SAENGSIRISUWAN et al., 2009).

Por outro lado, a diminuição do peso uterino em resposta à OVX confirma que a OVX suprimiu com sucesso a produção endógena de esteroides ovarianos, que são conhecidos por possuírem papéis tróficos no útero (ROGERS et al., 2009), e ainda o estradiol em animais OVX é capaz de reverter esse efeito (MODDER et al., 2004), o qual também foi observado no presente trabalho, indicando que o tratamento com estradiol utilizado foi efetivo. Dessa maneira, o tratamento com estradiol atenuou vários parâmetros metabólicos que são alterados pela perda de função ovariana, que é observada na menopausa ou induzida pela OVX, como diminuição do ganho de peso corporal, da intolerância à glicose e do acúmulo de tecido adiposo, estando de acordo com dados anteriores da literatura (SALPETER et al., 2006; RICHARD et al., 1991; BUTERA, 2010; SILVA et al., 2010; SAENGSIRISUWAN et al., 2009; MACDONALDS et al., 2015).

O estrogênio atua via dois receptores nucleares,  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo o  $\alpha$  responsável por mediar a redução da massa de tecido adiposo e o principal receptor expresso nos adipócitos (DAHLMAN et al., 2006; HEINE et al., 2000; DIEUDONNE et al.,2004). Indivíduos obesos possuem menor quantidade de receptores de estrógeno (RE)  $\alpha$  no tecido adiposo do que indivíduos magros, suportando a hipótese de que o estrogênio participa do controle do peso (NILSSON et al.,2007). Estudos em roedores, com deleções específicas do RE $\alpha$ , apontam que esses animais se tornam

obesos, intolerantes à glicose, hiperinsulinêmicos e apresentam menor gasto energético. Ainda, ratos tratados com agonista do RE  $\alpha$ , mas não com o  $\beta$ , possuem menor peso corporal (ROESCH, 2006). Os efeitos promovidos pela deleção do RE $\alpha$  ou da OVX são similares, corroborando com o fato de que o RE $\alpha$  regula o metabolismo energético em roedores (RIBAS et al.,2010). Sabe-se ainda que a perda do RE $\alpha$  no sistema nervoso central induz a hiperfagia e a diminuição do gasto energético (XU et al.,2011). Estudo recente utilizando ratos OVX observou que a estimulação do receptor de estradiol é capaz de prevenir o ganho de peso corporal, resistência à insulina e melhorar o sistema metabólico num geral. No entanto, ainda há diversos mecanismos não elucidados envolvidos na homeostase energética em animais OVX (CHALVON-DEMERSAY et al.,2017).

A falta de efeitos do estradiol na concentração do colesterol total no plasma pode ser resultado do aumento de lipoproteínas de colesterol de alta densidade (SAENGSIRISUWAN et al., 2009). O tecido adiposo armazena o excesso de energia na forma de triglicerídeos, sendo que os ácidos graxos livres são o produto de liberação de energia à medida que o organismo a necessita (LEE et al, 2013). Em relação ao aumento da concentração de triglicerídeos no plasma em animais OVX+E, Salpeter e colaboradores (2006) demonstraram que, em mulheres pós-menopáusicas tratadas durante pelo menos 8 semanas com reposição estrogênica via oral, o estradiol levou ao aumento dos triglicerídeos plasmáticos. Corroborando esse achado, Nigro e colaboradores (2014) evidenciaram que concentrações plasmáticas mais elevadas de triglicerídeos induzidas pela reposição com estradiol podem ser devidas ao aumento da produção ou secreção de lipoproteínas de colesterol de baixa densidade (VLDL), as quais transportam triglicerídeos e colesterol do fígado para o músculo e tecido adiposo em situações de balanço energético positivo.

Embora alguns estudos tenham relatado que o estradiol classicamente reduz a concentração plasmática de ácidos graxos livres após OVX, tanto em seres humanos como em roedores (PANSINI et al, 1990; KORICANAC et al., 2008), o trabalho atual demonstrou que o estradiol aumentou os ácidos graxos livres circulantes em animais OVX. No entanto, outros estudos indicam que as concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres não são alteradas pelo estradiol

(MACDONALD et al., 2017) e que o estradiol induz o aumento, dependente da dose, na atividade de enzimas lipogênicas no fígado, acetil CoA carboxilase e ácido graxo sintase, que são enzimas chave na produção de ácidos graxos (MANDOUR et al., 1977), dando suporte aos nossos resultados. Assim, as discrepâncias dos efeitos do estradiol sobre os ácidos graxos livres circulantes na literatura podem ser explicadas pelas diferenças no tempo e na dose do tratamento realizado, diferenças entre espécies animais bem como na dieta utilizada.

Estudos demonstraram que existe uma interação dos glicocorticoides com os esteroides ovarianos, uma vez que a adrenalectomia foi capaz de reverter a obesidade e algumas alterações metabólicas induzidas pela OVX química e física (OUERGUI et al., 1992; DESHAIES et al., 1997), sugerindo um papel permissivo dos glicocorticoides na obesidade induzida pela falha na função ovariana. Os glicocorticoides são importantes reguladores da energia e do gasto energético (CAVAGNINI et al., 2000), aumentando o apetite e o ganho de peso corporal em humanos e roedores e conseqüentemente levando ao desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades (TATARANNI et al., 1996; ZAKRZEWSKA et al., 1999). Sabe-se que os glicocorticoides possuem um importante papel no acúmulo de tecido adiposo visceral, sendo esse tecido mais susceptível às ações anabólicas dos glicocorticoides (REBUFFÉ-SCRIVE et al., 1990; BJORTORNP, 2001; CAMPBELL et al., 2011; LEE et al., 2013).

O estímulo da gliconeogênese é a ação dos glicocorticoides mais conhecida no metabolismo de carboidratos (EXTON, 1979; KRAUS-FRIEDMANN, 1984), além de reduzir a captação de glicose e sua utilização pelo músculo esquelético e tecido adiposo branco (DI DALMAZI et al., 2012). Esses efeitos são importantes para a adaptação metabólica durante períodos de estresse como o jejum, quando a glicemia tem que ser preservada, pois é fonte de energia primária para o cérebro (CHARMANDARI et al., 2005). A insulina, um hormônio secretado pelas células  $\beta$  pancreáticas, exerce efeitos opostos nesses processos fisiológicos, inibindo a gliconeogênese hepática e promovendo a utilização de glicose no músculo esquelético e no tecido adiposo branco. Assim, para exercer suas respostas, os glicocorticoides precisam antagonizar as ações da insulina. A exposição crônica aos glicocorticoides resulta em resistência à insulina e hiperglicemia (DI DALMAZI et

al.,2012; KUO et al.,2013; ANDREWS & WALKER,1999). Os glicocorticoides também proporcionam o aumento das reservas de glicogênio pelas células hepáticas permitindo assim, que haja a mobilização de glicose por outros hormônios em situações de necessidade, enquanto que no músculo esquelético desempenham um papel permissivo na glicogenólise induzida por catecolaminas ou inibem a síntese de glicogênio estimulada por insulina (STALMANS & LALOUX,1979; EXTON et al.,1972; RUZZIN et al.,2005). No que se diz respeito aos efeitos dos glicocorticoides no metabolismo de proteínas, estes causam diminuição da síntese de proteínas e aumento da proteólise, a fim de proporcionar o aumento nos aminoácidos livres que podem servir como substratos para a gliconeogênese no fígado e ajudar a manter as concentrações de glicose no sangue (BODINE & FURLOW, 2015).

Os glicocorticoides estimulam a diferenciação dos adipócitos e promovem a adipogênese, além de ativar a enzima LPL, predominante no tecido adiposo visceral, inibindo a mobilização de lipídeos na presença de insulina e permitindo o acúmulo de triglicerídeos e tecido adiposo visceral (AIRES, 2012; BJÖRNTORP, 1996,2001). Além disso, os glicocorticoides podem ativar a enzima lipolítica lipase hormônio sensível, atingindo dessa forma seus efeitos lipolíticos agudos, principalmente no tecido adiposo subcutâneo (DIVERTIE et al, 1991). A partir do tecido adiposo, o cortisol é capaz de mobilizar ácidos graxos, elevando sua concentração no plasma e sua utilização para a geração de energia. As concentrações intracelulares locais de glicocorticoides são reguladas pelas duas isoformas da enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (11 $\beta$ -HSD). Quando ocorre a hiperexpressão da isoforma 11- $\beta$ HSD tipo 1 nos adipócitos viscerais, a qual gera glicocorticoide ativo a partir de metabolitos inativos, há maior concentração de glicocorticoide ativo no tecido adiposo, além de conseqüentemente promover a obesidade visceral (MASUZAKI et al., 2001). Karatsoreos e colaboradores (2010) demonstraram que a exposição crônica a corticosterona (25  $\mu$ g / mL) na água potável induziu aumento do peso corporal, da ingestão alimentar e do acúmulo de tecido adiposo na região mesentérica. Asensio e colaboradores (2004) infundiram intracerebroventricularmente em ratos normais dexametasona por 3 dias e observaram um aumento acentuado na ingestão alimentar e no peso corporal desses animais. No entanto, esses estudos foram realizados em animais do sexo

masculino, sendo raros os estudos que avaliam o papel dos glicocorticoides na homeostase energética em animais do sexo feminino.

Assim, o estudo atual é pioneiro na avaliação dos efeitos dos glicocorticoides na homeostase energética em fêmeas, demonstrando que ambos os glicocorticoides basicamente não apresentaram efeitos nos parâmetros avaliados em ratas *sham*. Por outro lado, os glicocorticoides aumentaram o ganho de peso corporal, a ingestão alimentar, resposta glicêmica após GTT (protocolo de tratamento com dexametasona), peso do tecido adiposo retroperitoneal, triglicerídeos plasmáticos (protocolo de tratamento com corticosterona) em ratas OVX e o tratamento com estradiol foi capaz de prevenir esses efeitos induzidos pelos glicocorticoides. De fato, esses resultados estão de acordo com os dados da literatura, que demonstram que ratos e camundongos obesos são mais sensíveis aos efeitos dos glicocorticoides do que os animais magros, no que se diz respeito ao aumento da ingestão alimentar, ganho de peso corporal, deposição de tecido adiposo, atividade reduzida do tecido adiposo marrom, resistência à insulina intolerância à glicose (TOKUYAMA & HIMMS-HAGEN, 1987, 1989; FREEDMAN et al., 1986; SHPILBERG et al., 2012). No entanto, este é o primeiro estudo a demonstrar que, como em outros modelos experimentais de obesidade, a obesidade induzida por OVX também aumenta a suscetibilidade aos efeitos metabólicos dos glicocorticoides e que essas respostas são evitadas pelo estradiol.

Além de aumentar o ganho de peso corporal, a ingestão alimentar, e a adiposidade visceral em animais OVX, o estudo atual também mostrou que os animais tratados com glicocorticoides por 28 dias apresentaram tolerância à glicose prejudicada e maiores concentrações plasmáticas de triglicerídeos, estando de acordo com dados da literatura em animais machos (CHIMIN et al., 2014). Está bem estabelecido na literatura que os glicocorticoides induzem o aumento da ingestão alimentar devido à maior expressão de neuropeptídeos orexigênicos no hipotálamo e redução de neuropeptídeos hipotalâmicos anorexigênicos (ZAKRZEWSKA et al., 1999, UCHÔA et al., 2009, 2010, 2012). Neste contexto, os glicocorticoides também aumentam o ganho de peso corporal e a adiposidade visceral, e esses efeitos podem ser atribuídos à maior susceptibilidade dos tecidos adiposos viscerais às ações anabolizantes dos glicocorticoides, devido à maior quantidade e afinidade dos

receptores de glicocorticoide nesses depósitos adiposos (REBUFFÉ -SCRIVE et al., 1990; WAJCHENBERG et al., 2002), em associação com o aumento da expressão e atividade de LPL induzida por glicocorticoides, predominantemente no tecido adiposo visceral (PECKETT et al., 2011; SPENCER & TILBROOK., 2011 ; LEE et al., 2014). Além disso, os glicocorticoides são conhecidos por induzir comprometimento na tolerância à glicose, reduzindo a captação periférica de glicose, especialmente no músculo esquelético, como resultado de uma diminuição da translocação de GLUT4 para a superfície celular (BLOCK & BUSE., 1989; DIMITRIADIS et al. , 1997; HORNER et al., 1987; NOSADINI et al., 1983; RIZZA et al., 1982).

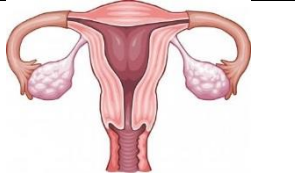
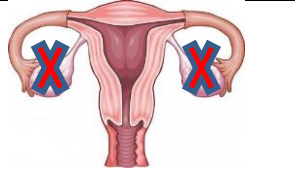

Finalmente, o aumento induzido por glicocorticoides na trigliceridemia pode ser uma consequência do aumento da produção hepática de VLDL e da remoção prejudicada de VLDL devido à baixa atividade de LPL, possivelmente nos tecidos adiposos perirrenais e perigonadais (BAGDADE et al., 1967). A diferença nas respostas dos tratamentos com dexametasona e corticosterona pode estar relacionada com a potência de cada glicocorticoide, sabendo-se que a dexametasona é 30 vezes mais potente que a corticosterona, bem como com a afinidade diferencial de cada glicocorticoide com GR e MR, uma vez que a dexametasona possui maior afinidade com GR e a corticosterona pode se ligar a ambos os receptores (TEMPEL E LEIBOWITZ, 1994). Além do GR, estudos recentes demonstraram a presença do MR no tecido adiposo (INFANTE et al.,2017).

Todos os animais do protocolo de corticosterona foram tratados com uma concentração de 15mg/L da corticosterona diluída em etanol 0,5% e, como foi descrito anteriormente observamos diferentes resultados em diversos parâmetros analisados em comparação com o protocolo de dexametasona, o qual não houve o consumo do etanol 0,5% pelos animais. Ceron e colaboradores (2018) demonstraram que uma exposição crônica ao etanol 20% por 12 semanas, pode acarretar em aumento da mortalidade dos animais induzida por sepse. Em nosso trabalho embora a concentração utilizada seja 40 vezes menor do que o utilizado por este trabalho, não podemos descartar os efeitos colaterais que podem ser promovidos pelo consumo do etanol, podendo dessa forma também estar associado com as diferentes respostas obtidas entre ambos os tratamentos.

O presente trabalho demonstrou que o estradiol teve papel protetor no aumento induzido por glicocorticoides em parâmetros metabólicos (ganho de peso corporal ingestão alimentar, resposta glicêmica no GTT, tecido adiposo e triglicerídeos plasmáticos). Este estudo pioneiro pode ser apoiado por dados anteriores da literatura que mostraram que os animais OVX são mais sensíveis ao aumento da ingestão alimentar e ao aumento de peso corporal induzido pelo estresse, que é conhecido por aumentar a liberação de glicocorticoides, e o estradiol foi capaz de impedir essas respostas (ELBASSUONI, 2014). Estudos demonstram que, os animais OVX apresentam maior susceptibilidade à dieta rica em lipídeos no aumento de peso corporal e do tecido adiposo do que as fêmeas intactas (HONG et al., 2009) e que a reposição com estradiol é capaz de abolir esses efeitos (STUBBINS et al., 2012). Por conseguinte, o papel protetor dos estrógenos no desenvolvimento da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica, bem como as suas comorbidades, como resistência à insulina e dislipidemias, foram demonstrados não apenas em animais OVX (RIANT et al., 2009; MATYSKOVÁ et al. 2010, ZHU et al., 2013), mas também em machos (ZHU et al., 2014) e fêmeas intactas (LITWAK et al., 2014). O aumento da capacidade de resposta aos efeitos anabólicos dos glicocorticoides em animais OVX e o efeito protetor do estradiol nessas respostas sugerem que esse efeito pode ser devido à maior expressão de GR e MR no hipotálamo após OVX, especialmente no núcleo paraventricular e uma reversão deste efeito por meio da reposição de estradiol (BURGESS & HANDA, 1993; SEALE et al., 2004).

No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na maior susceptibilidade aos efeitos anabólicos dos glicocorticoides após a OVX, e do papel protetor dos estrógenos nessas respostas.

## GLICOCORTICOIDES

			
<b>Ganho de peso corporal</b>	—————	↑	—————
<b>Ingestão alimentar</b>	—————	↑	—————
<b>Índice de LEE</b>	—————	—————	—————
<b>GTT</b>	↑	↑	—————
<b>Tecido adiposo</b>	—————	↑	—————
<b>Útero</b>	—————	—————	—————
<b>Colesterol total</b>	—————	—————	—————
<b>Triglicérides</b>	—————	↑	—————
<b>Ácidos graxos livres</b>	—————	—————	↑

**Figura 16.** Sumário dos efeitos dos glicocorticoides nos parâmetros avaliados em ratas do grupo SHAM, OVX e OVX+E.

## **6. Conclusão**

Em resumo, o presente estudo é inovador ao demonstrar que os animais OVX são mais susceptíveis a alterações metabólicas induzidas por glicocorticoides e que o estradiol tem um efeito protetor nessas respostas.

## 7. Referências

- AIRES, M. M. Glândula Adrenal. In:\_\_\_\_\_. Fisiologia 4a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 1079-1096.
- ALLAIN, C.C.; POON ,L.S.; CHAN, C.S.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol.*Clin. Chem.*, v. 20, p. 470-475, 1974.
- ANDREWS, R.C.; WALKER, B.R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clin. Sci. (Lond)*., v.96, p. 513–23, 1999.
- ARASE, K.; YORK, D.A.; SHIMIZU, H.; SHARGILL, N.; BRAY, G.A. Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am. J. Physiol.*, v. 255, p. E255-E259, 1988.
- ARLETTI, R.; BENELLI, A.; BERTOLINI, A. Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. *Pept.*, v. 10, p. 89-93, 1989.
- ARMANI, A.; MARZOLLA, V.; ROSANO, G.; CAPRIO, M. Mineralocorticoid vs glucocorticoid receptors: solo players or team mates in the control of adipogenesis? *Int. J. Obes.*, v. 38, p. 1580-1581, 2014.
- ASARIAN, L.; GEARY, N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm. Behav.*,v. 42, p. 461–471, 2002.
- ASENSIO, C.; MUZZIN, P.; ROHNER-JEANRENAUD, F. Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. *Int. J. Obes.*, v. 28, p. S45-S52, 2004.
- BAGDADE, J.D.; BIERMAN, E.L.; PORTE, D. Jr. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J. Clin. Invest.*, v. 46, p. 1549-1557, 1967.
- BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B.D. Correlation between "Lee Index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J. Endocrinol.*, v. 40, p. 527-528, 1968.
- BJÖRNTORP, P. The origins and consequences of obesity.Diabetes. *Ciba Found. Symp.*, v. 201, p. 68-80, 1996.
- BJÖRNTORP P. Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? *Obes. Rev.*, v. 2, p. 73-86, 2001.
- BLOCK, N.E.; BUSE, M.G. Effects of hypercortisolemia and diabetes on skeletal muscle insulin receptor function in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol.*, v. 256, p. E39-E48, 1989.
- BODINE,S.C.; FURLOW,D. Glucocorticoids and Skeletal Muscle. In: WANG, J.C.;HARRIS, C. **Glucocorticoid Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York: Springer, 2015.p.145-178.

BRUCE, B.K.; KING, B.M.; PHELPS, G.R.; VEITIA, M.C. Effects of adrenalectomy and corticosterone administration on hypothalamic obesity in rats. *Am. J. Physiol.*, v. 24, p. E152-E157, 1982.

BUJALSKA, I.J.; KUMAR,S.; STEWART,P.M. Does central obesity reflect “Cushing's disease of the omentum”. *Lancet.*, v. 349, p. 1210–1213,1997.

BUTERA, P.C. Estradiol and the control of food intake. *Physiol. Behav.*, v. 99, p. 175-180, 2010.

BURGESS, L.H.; HANDA, R.J. Estrogen-induced alterations in the regulation of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor messenger RNA expression in the female rat anterior pituitary gland and brain. *Mol. Cell. Neurosci.*, v. 4, p. 191-198, 1993.

CAMPBELL, J.E.; PECKETT, A.J.; D'SOUZA, A.M.; HAWKE, T.J.; RIDDELL, M.C. Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, v. 300, p. C198–C209, 2011.

CAVAGNINI, F.; CROCI, M.; PUTIGNANO, P.; PETRONI, M.L.; and INVITTI, C. Glucocorticoids and neuroendocrine function. *Int. J.Obes.Relat.Metab.Disord.*,v. 24, p. S77–S79,2000.

CERON,C.S.; DO VALE,G.T.; SIMPLICIO,J.A.; RICCI,S.T.; DE MARTINIS,B.S. DE FREITAS,A.; and TIRAPELLI,C.R. Chronic ethanol consumption increases vascular oxidative stress and the mortality induced by sub-lethal sepsis: potential role of iNOS. *Eur. J. Pharmacol.*, v.15, p.39-47,2018.

CONSIDINE, R.V.; CARO, J.F. Leptin: genes, concepts and clinical perspective. *Horm. Res.*, v. 46, p. 249-256, 1996.

CHALVON-DEMERSAY, T.; BLACHIER, F.; TOMÉ, D.; BLAIS, A. Animal Models for the Study of the Relationships between Diet and Obesity: A Focus on Dietary Protein and Estrogen Deficiency. *Front. Nutr.*, v.4, 2017.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 67, p. 259–84, 2005.

CHIMIN, P.; FARIAS, T.S.; TORRES-LEAL, F.L.; BOLSONI-LOPES, A.; CAMPAÑA, A.B.; ANDREOTTI, S.; LIMA, F.B. Chronic glucocorticoid treatment enhances lipogenic activity in visceral adipocytes of male Wistar rats. *Acta Physiol.*, v. 211,2014.

CLEGG, D.J.; BROWN, L.M.; WOODS, S.C.; BENOIT, S. C. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diab.*, v. 55,p. 978-987, 2006.

DAHLMAN-WRIGHT, K.; CAVAILLES, V.; FUQUA, S.A.; JORDAN, V.C.; KATZENELLENBOGEN, J.A.; KORACH, K.S., MAGGI, A.; MURAMATSU, M.; PARKER, M.G.; GUSTAFSSON, J.A. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol. Rev.*, v. 58,p.773–81,2006.

DELLA TORRE, S.; BENEDESI, V.; FONTANA, R.; MAGGI, A. Energy metabolism and fertility- a balance preserved for female health. *Nat. Rev. Endocrinol.*,v. 10, p. 13–23,2014.

DESHAIES, Y.; DAGNAULT, A.; LALONDE, J.; RICHARD, D. Interaction of corticosterone and gonadal steroids on lipid deposition in the female rat. *Am. J. Physiol.*, v. 273, p. E355-E362, 1997.

DI DALMAZI, G.; PAGOTTO, U.; PASQUALI, R.; VICENNATI, V. Glucocorticoids and type 2 diabetes: from physiology to pathology. *J. Nutr. Metab.*,v. 2012, p.525093, 2012.

DIEUDONNE, M.N.; LENEVEU, M.C.; GIUDICELLI, Y.; PECQUERY, R. Evidence for functional estrogen receptors alpha and beta in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, v. 286,p.C655–61, 2004.

DIMITRIADIS, G.; LEIGHTON, B.; PARRY-BILLINGS, M.; SASSON, S.; YOUNG, M.; KRAUSE, U.; BEVAN, S.; PIVA, T.; WEGENER, G.; NEWSHOLME, E.A. Effects of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. *Biochem. J.*, v. 321, p. 707-712,1997.

DINNEEN,S.; ALZAID,A.; MILES,J., and RIZZA,R. Metabolic effects of the nocturnal rise in cortisol on carbohydrate metabolism in normal humans. *J. Clin.Invest.*,v. 92,p. 2283–2290, 1993.

DIORIO, D.; VIAU, V.; MEANEY, M. J. The role of the medial prefrontal cortex (cingulated gyrus) in the regulation of hypothalamic- pituitary-adrenal responses to stress. *J. Neurosci.*, v. 13, p. 3839–3847,1993.

DIVERTIE, G.D.; JENSEN, M.D.; MILES, J.M. Stimulation of lipolysis in humans by physiological hypercortisolemia. *Diab.*, v. 40, p. 1228-1232, 1991.

DUBUC, P.U.; WILDEN, N.J. Adrenalectomy reduces but does not reverse obesity in ob/ob mice. *Int. J. Obes.*, v. 10, p. 91-98, 1986.

EBIHARA, K.; OGAWA, Y.; KATSUURA, G.; NUMATA, Y.; MASUZAKI, H.; SATOH, N.; TAMAKI, M.; YOSHIOKA, T.; MINORU, H.; MATSUOKA, N.; AIZAWA-ABE, A.; YOSHIMASA, Y.; NAKAO, K. Involvement of agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action. *Diab.*, v. 48, p. 2028-2033, 1999.

ELBASSUONI, E.A. Gender differences in ghrelin response to chronic immobilization stress in rats: possible role of estrogen. *Gen. Physiol. Biophys.*, v. 33, p. 111-120, 2014.

EXTON, J.H. Regulation of gluconeogenesis by glucocorticoids. *Monogr Endocrinol.*, v.12, p. 535–46,1979.

EXTON, J.H.; FRIEDMANN, N.; WONG, E.H.; BRINEAUX, J.P.; CORBIN, J.D.; PARK, C.R. Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, v.247, p.3579–88, 1972.

FAN, W.; BOSTON, B.A.; KESTERSON, R.A.; HRUBY, W.J.; CONE, R.D. Role of melanocortineric neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*, v. 385, p. 165-168, 1997.

FALHOLT, K.; LUND, B.; FALHOLT, W. An easy colorimetric method for routine determination of free fatty acids in plasma. *Clin. Chim. Acta.*, v. 46, p.105-111, 1973.

FIGLEWICZ, D.P. Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. *Am. J. Physiol.*, v. 284, p. R882-R892, 2003.

FORD, E.S. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the international diabetes federation among adults in the US. *Diab. Care.*, v. 28, p. 2745–2749, 2005.

FREEDMAN, M.R.; HORWITZ, B.A.; STERN, J.S. Effect of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on development of obesity. *Am. J. Physiol.*, v. 250, p. R595-607, 1986.

GARABEDIAN, M.J.; HARRIS, C.A.; JEANNETEAU, F. Glucocorticoid receptor action in metabolic and neuronal function. *F1000Research.*, v. 6, 2017.

GJELSVIK, B.; ROSVOLD, E.O.; STRAAND, J.; DALEN, I.; HUNSKAAR, S. Symptom prevalence during menopause and factors associated with symptoms and menopausal age. Results from the Norwegian Hordaland women's cohort study. *Maturitas.*, v.70, p. 383–90, 2011.

GUH, D.P.; ZHANG, W.; BANSBACK, N.; AMARSI, Z.; BIRMINGHAM, C.L.; ANIS, A.H. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC. Publ. Health.*, v.9, 2009.

HEINE, P.A.; TAYLOR, J.A.; IWAMOTO, G.A.; LUBAHN, D.B.; COOKE, P.S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 97, p.12729–34, 2000.

HIRSCHBERG, A.L. Sex hormones, appetite and eating behavior in women. *Maturitas.*, v.71, p. 248–256, 2012.

HONG, J.; STUBBINS, R.E.; SMITH, R.R.; HARVEY, A.E.; NÚÑEZ, N.P. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. *Nutr. J.*, v. 8, 2009.

HORNER, H.C.; MUNCK, A.; LIENHARD, G.E. Dexamethasone causes translocation of glucose transporters from the plasma membrane to an intracellular site in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, v. 262, p. 17696-17702, 1987.

KAAJA, R.J. Metabolic syndrome and the menopause. *Menopause Int.*, v.14, p. 21–25, 2008.

KARATSOREOS, I.N.; BHAGAT, S.M.; BOWLES, N.P.; WEIL, Z.M.; PFAFF, D.W.; MCEWEN, B.S. Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse. *Endocrinol.*, v. 151, p. 2117-2127, 2010.

KELLER-WOOD, M.E.; DALLMAN, M.F. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr. Rev.*, v. 5, p. 1–24, 1984.

KORICANAC, G.; STOJILJKOVIC, M.; RADIVOJSA, S.; ZAKULA, Z.; RIBARAC-STEPIC, N.; ISENOVIC, E.R. Effects of dexamethasone on insulin receptor in aging. *Acta Biol. Hung.*, v. 59, p. 17-29, 2008.

KANCZKOWSKI, W.; SUE, M.; BORNSTEIN, S.R. The adrenal gland microenvironment in health, disease and during regeneration. *Horm.*, v. 16, p. 251-265, 2017.

KRAUS-FRIEDMANN, N. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Physiol. Rev.*, v. 64, p. 170–259, 1984.

KRISTENSEN, P.; JUDGE, M.; THIM, L.; RIEBEL, U.; CHRISTJANSEN, K.N.; WULLF, B.B.; CLAUSEN, J.T.; JENSEN, P.B.; MADSEN, O.D.; VRANG, N.; LARSEN, P.J.; HASTRUP, S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, v. 393, p. 72-76, 1998.

KUO, T.; HARRIS, C.A.; WANG, J.C. Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 380, p. 79–88, 2013.

LASOTA, A.; DANOWSKA-KLONOWSKA, D. Experimental osteoporosis—different methods of ovariectomy in female white rats. *Rocz Akad. Med. Białymst.*, v. 49, p. 129-131, 2004.

LEE, M.J.; FRIED, S.K. The glucocorticoid receptor, not the mineralocorticoid receptor, plays the dominant role in adipogenesis and adipokine production in human adipocytes. *Int. J. Obes.*, v. 38, p. 1228-1233, 2014.

LEE, M.J.; PRAMYOTHIN, P.; KARASTERGIOU, K.; FRIED, S.K. Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1842, p. 473-481, 2014.

LEITE, C.M.; KALIL, B.; UCHOA, E.T.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L.K.; LEVINE, J.E.; ANSELMO-FRANCI, J.A. Progesterone-induced amplification and advancement of GnRH/LH surges are associated with changes in kisspeptin system in preoptic area of estradiol-primed female rats. *Brain Res.*, v. 1650, p. 30574-30581, 2016.

LEVINE, J. The hypothalamus as a major integrating center. In: Conn, P.M.; Freeman, M.E. **Neuroendocrinology in Physiology and Medicine**. Totowa: Humana Press., 2000. p. 75–93.

LITWAK, S.A.; WILSON, J.L.; CHEN, W.; GARCIA-RUDAZ, C.; KHAKSARI, M.; COWLEY, M.A.; ENRIORI, P.J. Estradiol prevents fat accumulation and overcomes leptin resistance in female high-fat diet mice. *Endocrinol.*, v. 155, p. 4447-4460, 2014.

LU, D.; WILLARD, D.; PATEL, I.R.; KADWELL, S.; OVERTON, L.; KOST, T.; LUTHER, M.; CHEN, W.; WOYCHIK, R.P.; WILKISON, W.O.; CONE, R.D. Agouti protein is an antagonist of the melanocortin-stimulating-hormone receptor. *Nature*, v. 371, p. 799-802, 1994.

MACDONALD, T.L.; MACPHERSON, R.; CASTELLANI, L.; CERVONE, D.; ANDERSON, E.; WRIGHT, D.C.; DYCK, D.J. Estradiol does not directly regulate adipose lipolysis. *Adipocyte*, v.6, p. 76-86, 2017.

MACDONALD, T.L.; RITCHIE, K.L.; DAVIES, S.; HAMILTON, M.J.; CERVONE, D.T.; DYCK, D.J. Exercise training is an effective alternative to estrogen supplementation for improving glucose homeostasis in ovariectomized rats. *Physiol. Rep.*, v. 3, p. e12617, 2015.

MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R.E.; LEE, G.H.; ZHANG, Y.; FEI, H.; KIM, S.; LALLONE, R.; RANGANATHAN, S.; et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.*, v. 1, p. 1155-1161, 1995.

MAKIMURA, H.; MIZUNO, T.M.; ROBERTS, J.; SIVERSTEIN, J.; BEASLEY, J.; MOBBS, C.V. Adrenalectomy reverses obese phenotype and restores hypothalamic melanocortin tone in leptin-deficient *ob/ob* mice. *Diab.*, v. 49, p. 1917-1923, 2000.

MANDOUR, T.; KISSEBAH, A.H.; WYNN, V. Mechanism of oestrogen and progesterone effects on lipid and carbohydrate metabolism: alteration in the insulin: glucagon molar ratio and hepatic enzyme activity. *Eur. J. Clin. Invest.*, v. 7, p. 181-187, 1977.

MASUZAKI, H.; PATERSON, J.; SHINYAMA, H.; MORTON, N.M.; MULLINS, J.J.; SECKL, J.R.; FLIER, J. S. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Sci.*, v. 294, p. 2166-2170, 2001.

MATYSKOVÁ, R.; ZELEZNÁ, B.; MAIXNEROVÁ, J.; KOUTOVÁ, D.; HALUZÍK, M.; MALETÍNSKÁ, L. Estradiol supplementation helps overcome central leptin resistance of ovariectomized mice on a high fat diet. *Horm. Metab. Res.*, v. 42, p. 182-186, 2010.

MAURIÈGE, P.; LANGIN, D.; MONTMINY, V.; MARTEL, C.; DESPRÉS, J.P.; BÉLANGER, A.; LABRIE, F.; DESHAIES, Y. Effect of a long-term percutaneous adrenal steroid treatment on rat adipose tissue metabolism. *Int. J. Obes.*, v. 24, p. S148-S150, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: Disponível em :  
<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigitel.pdf>. Acesso em: 12/11/2017.

MORLEY, J.E.; LEVINE, A.S.; GOSNELL, B.A.; KNEIP, J.; GRACE, M. Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat. *Am. J. Physiol.*, v. 252, p. R599-R609, 1987.

MODDER, U.I.; RIGGS, B.L.; SPELSBERG, T.C.; FRASER, D.G.; ATKINSON, E.J.; ARNOLD, R.; KHOSLA, S. Dose-response of estrogen on bone versus the uterus in ovariectomized mice. *Eur. J. Endocrinol.*, v. 151, p. 503-510, 2004.

MOLINA, P.E. Adrenal Gland. In: RAFF, H.; LEVITZKY, M. **Medical physiology a systems approach**. New York: Mc Graw Hill – Lange, 2011. p. 655-670.

NIGRO, M.; SANTOS, A.T.; BARTHEM, C.S.; LOUZADA, R.A. N.; FORTUNATO, R.S.; KETZER, L.A.; CARVALHO, D.P.; MEIS, L. A. Change in liver metabolism but not in brown adipose tissue thermogenesis is an early event in ovariectomy-induced obesity in rats. *Endocrinol.*, v. 155, p. 2881–2891, 2014.

NILSSON, M.; HOLST, J.J.; BJÖRCK, I.M. Metabolic effects of amino acid mixtures and whey protein in healthy subjects: studies using glucose-equivalent drinks. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 85, p. 996–1004, 2007.

NOSADINI, R.; DEL PRATO, S.; TIENGO, A.; VALERIO, A.; MUGGEO, M.; OPOCHER, G.; MANTERO, F.; DUNER, E.; MARESCOTTI, C.; MOLLO, F.; BELLONI, F. Insulin resistance in Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 57, p. 529-536, 1983.

OAKLEY, R.H.; CIDLOWSKI, J.A. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J. Biol. Chem.*, v. 286, p. 3177–3184, 2011.

OUERGHI, D.; RIVEST, S.; RICHARD, D. Adrenalectomy attenuates the effect of chemical castration on energy balance in rats. *J. Nutr.*, v. 122, p. 369-373, 1992.

PANSINI, F.; BONACCORSI, G.; GENOVESI, F.; FOLEGATTI, M.R.; BAGNI, B.; BERGAMINI, C.M.; MOLLICA, G. Influence of estrogens on serum free fatty acid levels in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 71, p. 1387-1389, 1990.

PECKETT, A.J.; WRIGHT, D.C.; RIDDELL, M.C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metab.*, v. 60, p. 1500-1510, 2011.

PICARD, F.; DESHAIES, Y.; LALONDE, J.; SAMSON, P.; LABRIE, C.; BÉLANGER, A.; LABRIE, F.; RICHARD, D. Effects of the estrogen antagonist EM-652.HCl on energy balance and lipid metabolism in ovariectomized rats. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, v. 24, p. 830-840, 2000.

POWER, M.L.; SCHULKIN, J. Sex differences in fat storage, fat metabolism, and the health risks from obesity: possible evolutionary origins. *Br. J. Nutr.*, v. 99, p. 931-40, 2008.

REBUFFÉ-SCRIVE, M.; KROTKIEWSKI, M.; ELFVERSON, J.; BJRRNTORP, P. Muscle and adipose tissue morphology and metabolism in Cushing's Syndrome. *J. Clin. Endocrinol.*, v. 67, p. 1122, 1988.

REBUFFÉ-SCRIVE, M.; BRÖNNEGARD, M.; NILSSON, A.; ELDH, J.; GUSTAFSSON, J.A.; BJÖRNTORP, P. Steroid hormone receptors in human adipose tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 71, p. 1215-1219, 1990.

RIANT, E.; WAGET, A.; COGO, H.; ARNAL, J.F.; BURCELIN, R.; GOURDY, P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinol.*, v. 150, p. 2109-2117, 2009.

RIBAS, V.; NGUYEN, M.T.; HENSTRIDGE, D.C.; NGUYEN, A.K.; BEAVEN, S.W.; WATT, M.J.; HEVENER, A.L. Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ER-deficient mice. *AJP. Endocrinol. Metab.*, v. 298, p. E304-19, 2010.

RICHARD, D.; DEKONINCK, P.; LEMAY, A.; RIVEST, S. Reversible increase in energy deposition following castration induced by a gonadotropin releasing hormone agonist. *Int J Obes.* v. 15, p. 155-161, 1991.

RIZZA, R.A.; MANDARINO, L.J.; GERICH, J.E. 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..

ROESCH, D.M. Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiol. Behav.*, v.87,p.39-44,2006.

ROGERS, N.H.; PERFIELD, J.W 2<sup>ND</sup>., STRISSEL, K.J.; OBIN, M.S.; GREENBERG, A.S. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinol.*, v. 150,p. 2161-2168, 2009.

RUZZIN, J.; WAGMAN, A.S.; JENSEN, J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. *Diabetol.*, v. 48, p. 2119-30, 2005.

SAENGSIRISUWAN, V.; PONGSEEDA, S.; PRASANNARONG, M.; VICHAIWONG, K.; TOSKULKAO, C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism.*, v. 58, p. 38-47, 2009.

SAKURAI, T.; AMEMIYA, A.; ISHII, M.; MATSUZAKI, I.; CHEMELLI, R.M.; TANAKA, H.; WILLIAMS, S.C.; RICHARDSON, J.A.; KOZLOWSKI, G.P.; WILSON, S.; ARCH, J.R.; BUCKINGHAM, R.E.; HAYNES, A.C.; CARR, S.A.; ANNAN, R.S.; MCNULTY, D.E.; LIU, W.S.; TERRETT, J.A.; ELSHOURBAGY, N.A.; BERGSMA, D.J.; YANAGISAWA, M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, v. 92, p. 573-585, 1998.

SALPETER, S.R.; WALSH, J.M.; ORMISTON, T.M.; GREYBER, E.; BUCKLEY, N.S.; SALPETER, E.E. Meta-analysis: effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Diab. Obes. Metab.*, v. 8, p. 538-554, 2006.

SCHEDIN, P.; MITRENGA, T.; KAECK, M. Estrous cycle regulation of mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and death in the Sprague- Dawley rat: a model for investigating the role of estrous cycling in mammary carcinogenesis. *J Mammary Gland. Biol. Neoplasia*, v. 5, p. 211–225, 2000.

SCHWARTZ, M.W.; STRACK, A.M.; DALLMAN, M.F. Evidence that elevated plasma corticosterone levels are the cause of reduced hypothalamic corticotrophin-releasing hormone gene expression in diabetes. *Regul. Pept.*, v. 72, p. 105-112,1997.

SCHWARTZ, M.W.; WOODS, S.C.; PORTE, D. JR.; SEELEY, R.J.; BASKIN, D.G. Central nervous system control of food intake. *Nature.*, v. 404, p.661-71, 2000.

SEALE, J.V.; WOOD, S.A.; ATKINSON, H.C.; HARBUZ, M.S.; LIGHTMAN, S.L. Gonadal steroid replacement reverses gonadectomy-induced changes in the corticosterone pulse profile and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male and female rats. *J. Neuroendocrinol.*, v. 16,p. 989-998,2004.

SHPIBERG, Y.; BEAUDRY, J.L.; D'SOUZA, A.; CAMPBELL, J.E.; PECKETT, A.; RIDDELL, M.C. A rodent model of rapid-onset diabetes induced by glucocorticoids and high-fat feeding. *Dis. Model Mech.*, v.5, p. 671-680,2012.

SILVA, L.E.; CASTRO, M.; AMARAL, F.C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L.L. Estradiol-induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 43, p. 759-766, 2010.

SIMS, J.S.; LORDEN, J.F. Effect of paraventricular nucleus lesions on body weight, food intake and insulin levels. *Behav. Brain Res.*, v. 22, p. 265– 81, 1986.

SPENCER, S.J.; TILBROOK, A. The glucocorticoid contribution to obesity. *Stress.*, v. 14,p. 233-246, 2011.

STALMANS, W.; LALOUX, M. Glucocorticoids and hepatic glycogen metabolism. *Monogr. Endocrinol.*, v. 12,p. 517–33, 1979.

STUBBINS, R.E.; HOLCOMB, V.B.; HONG, J.; NÚÑEZ, N.P. Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. *Eur. J. Nutr.*, v. 51, p. 861-70, 2012a.

STUBBINS, R.E.; NAJJAR, K.; HOLCOMB, V.B.; HONG, J.; NÚÑEZ, N.P. Estrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes Obes. Metab.*, v. 14, p. 58-66, 2012b.

TASKER, J.G. Rapid glucocorticoid actions in the hypothalamus as a mechanism of homeostatic integration. *Obes.*, v.14, p.259S–265S.,2006.

TATARANNI, P.A.; LARSON, D.E.; SNITKER, S.; YOUNG, J.B.; FLATT, J.P.; RAVUSSIN, E. Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 271, p. E317-E325, 1996.

TEMPEL, D.L.; LEIBOWITZ S.F. Adrenal Steroid Receptors: Interactions with Brain Neuropeptide Systems in Relation to Nutrient Intake and Metabolism. *J. Neuroendocrinol.*, v. 6, p. 479-511,1994.

TOKUYAMA, K.; HIMMS-HAGEN, J. Increased sensitivity of the genetically obese mouse to corticosterone. *Am. J. Physiol.*, v. 252, p E202-8, 1987.

TOKUYAMA, K.; HIMMS-HAGEN, J. Enhanced acute response to corticosterone in genetically obese (ob/ob) mice. *Am. J. Physiol.*, v. 257, p. E133-8, 1989.

TREMOLLIÈRES, F.A.; POUILLES, J.M.; RIBOT, C.A. Relative influence of age and menopause on total and regional body composition changes in postmenopausal women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.175, p.1594–600,1996.

UCHÔA, E.T.; SILVA, L.E.C.M.; CASTRO, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L.L.K. Hypothalamic oxytocin neurons modulate hypophagic effect induced by adrenalectomy. *Horm. Behav.*, v, 56, p. 532-538, 2009.

UCHÔA, E.T.; SILVA, L.E.C.M.; CASTRO, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L.L.K. Corticotrophin-releasing factor mediates the hypophagia after adrenalectomy, increasing meal-related satiety responses. *Horm. Behav.*, v. 58,p. 714-719,2010.

UCHÔA, E.T.; SILVA, L.E.C.M.; CASTRO, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L.L.K. Glucocorticoids are required for meal-induced changes in the expression of hypothalamic neuropeptides. *Neuropept.*, v. 46,p. 119-124,2012.

WADE, G.N.; GRAY, J. M. Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiol. Behav.*, v. 22,p. 583-593,1979.

WAJCHENBERG, B.L.; GIANNELLA-NETO, D.; DA SILVA, M.E.R.; SANTOS, R.F. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Horm. Metab. Res.*, v. 34,p. 616-621, 2002.

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

XU, Y.; NEDUNGADI, T.P.; ZHU, L.; SOBHANI, N.; IRANI, B.G.; DAVIS, K.E.; ZHANG, X.; ZOU, F.; GENT, L.M.; HAHNER, L.D.; KHAN, S.A.; ELIAS, C.F.; ELMQUIST, J.K.; CLEGG, D.J. Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell. Metab.*, v. 14, p. 453–65, 2011.

YOU, T.; RYAN, A.S.; NICKLAS, B.J. The metabolic syndrome in obese postmenopausal women: relationship to body composition, visceral fat, and inflammation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.89, p. 5517–5522,2004.

YUKIMURA, Y.; BRAY, G.A.; WOLFSEN, A.R. Some effects of adrenalectomy in the fatty rat. *Endocrinol.*, v. 103, p. 1924-1928, 1978.

YUKIMURA, Y.; BRAY, G.A.; WOLFSEN, A.R. Some effects of adrenalectomy in the fatty rat. *Endocrinol.*, v. 103, p. 1924-1928, 1978.

ZAKRZEWSKA, K.E.; CUSIN, I.; STRICKER-KRONGRAD, A.; BOSS, D.; RICQUER, D.; JEANRENAUD, B.; ROHNER-JEANRENAUD, F. Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diab.*, v. 48, p. 365-375, 1999.

ZHU, L.; BROWN, W.C.; CAI, Q.; KRUST, A.; CHAMBON, P.; MCGUINNESS, O.P.; STAFFORD, J.M. Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. *Diab.*, v. 62, p. 424-434, 2013.

ZHU, L.; MARTINEZ, M.N.; EMFINGER, C.H.; PALMISANO, B.T.; STAFFORD, J.M. Estrogen signaling prevents diet-induced hepatic insulin resistance in male mice with obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 306, p. E1188-E1197, 2014.

## ANEXO

## Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL



## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 208/2016

Londrina, 29 de Setembro de 2016.

Prezado Pesquisador,


Certificamos que o projeto intitulado "**Diferenças intersexuais e papel dos estrógenos nas respostas induzidas pelos glicocorticoides na homeostase energética**", protocolo CEUA nº **14638.2016.42**, sob a responsabilidade de **Ernane Torres Uchôa**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UJEL), em reunião realizada em **20/09/2016**.

O objetivo do projeto é avaliar as diferenças intersexuais e a participação dos estrógenos no tratamento prolongado com glicocorticoides na homeostase energética. Os animais serão submetidos a 6 diferentes experimentos: 1) Padronização da concentração de corticosterona com efeito anabólico em ratos machos (n = 40 machos), diferentes concentrações de corticosterona adicionada na água em 0,5% etanol por 28 dias; 2) Avaliação das diferenças intersexuais do tratamento de corticosterona com concentração selecionada no experimento 1 de corticosterona (n = 40, 20 machos e 20 fêmeas) adicionada na água em 0,5% etanol por 28 dias; 3) Avaliação do efeito da ovariectomia e da reposição com estrógeno no tratamento com corticosterona (n = 72), tratados ou não com estrógeno e corticosterona; 4) Padronização da concentração de dexametasona com efeito anabólico em ratos machos (n = 40 machos), diferentes concentrações de dexametasona adicionada na água em por 28 dias; 5) Avaliação das diferenças intersexuais do tratamento com dexametasona com concentração selecionada no experimento 4 (n = 40, 20 machos e 20 fêmeas), dexametasona adicionada na água em por 28 dias; 6) Avaliação do efeito da ovariectomia e da reposição com estrógeno no tratamento com dexametasona (n = 72), tratados ou não com estrógeno e dexametasona. Os animais serão eutanasiados por decapitação. GI 3.

Vigência do Projeto	01/08/2016 a 31/07/2019
Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	312 (120 Machos / 192 Fêmeas)
Peso/Idade	210-230g
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central / UEL
Amostras a serem coletadas	Sangue, cérebro, tecido adiposo, fígado

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UJEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

  
 Prof. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes  
 Coordenadora da CEUA/UJEL

**Ilmo. Sr.**  
**Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa**  
 Coordenador do Projeto  
 Departamento de Ciências Fisiológicas / Centro de Ciências Biológicas  
 Com cópia para Coordenação do Biotério Central / UEL; Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas e  
 Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas