



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCOS ANTÔNIO DIAS

**EFEITOS DA ADRENALECTOMIA NAS ALTERAÇÕES
INDUZIDAS PELA OVARIECTOMIA NA HOMEOSTASE
ENERGÉTICA EM RATAS**

Londrina
2022

MARCOS ANTÔNIO DIAS

**EFEITOS DA ADRENALECTOMIA NAS ALTERAÇÕES
INDUZIDAS PELA OVARIECTOMIA NA HOMEOSTASE
ENERGÉTICA EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas na Universidade Estadual de Londrina, Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

D541e Dias, Marcos Antônio.
Efeitos da adrenalectomia nas alterações induzidas pela ovariectomia na homeostase energética em ratas / Marcos Antônio Dias. - Londrina, 2022.
60 f. : il.

Orientador: Ernane Torres Uchôa.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Ovário - Tese. 2. Glândulas suprarrenais - Tese. 3. Corticosterona - Tese. 4. Anabolismo - Tese. I. Uchôa, Ernane Torres. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 574

MARCOS ANTÔNIO DIAS

**EFEITOS DA ADRENALECTOMIA NAS ALTERAÇÕES
INDUZIDAS PELA OVARIECTOMIA NA HOMEOSTASE
ENERGÉTICA EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas na Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 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. Gisele Lopes Bertolini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Alexandre José Carrilho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Profa. Dra. Gisele Lopes Bertolini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Alexandre José Carrilho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de agosto de 2022.

Dedico ao meu pai Antônio (*in memoriam*), a minha mãe Arlete, a minha esposa Tânia e a minha filha Taís.

Agradecimentos

Inicialmente agradeço aos meus pais, Antônio (*in memoriam*) e Arlete por toda a longa formação pessoal e profissional que me propiciaram, bem como, a minha irmã Adriana e ao meu irmão Rafael. Agradeço a minha esposa Tânia e minha filha Taís pelo apoio incondicional durante esta jornada. Um enorme obrigado ao Prof. Dr. Ernane Uchoa, meu orientador, pelo suporte, pelas conversas, pelo companheirismo e pela amizade. Gostaria de agradecer a todos os colegas de laboratório que sempre estiveram disponíveis e prontos a ajudar.

À professora Cássia Thaïs pelos conselhos, aos professores membros das bancas de qualificação e de defesa do mestrado que aceitaram colaborar na análise deste trabalho, e a todo grupo de professores da pós-graduação que dedicam seu tempo na formação de novos profissionais. A todos os funcionários da UEL e aos meus colegas neurocirurgiões do Hospital Universitário – UEL, que sempre me deram suporte nos momentos mais difíceis dessa travessia.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes.”

Sir. Isaac Newton

DIAS, M. A. **Efeitos da adrenalectomia nas alterações induzidas pela ovariectomia na homeostase em ratas.** 2022. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

A ovariectomia (OVX) promove hiperfagia e aumento do peso corporal e a adrenalectomia (ADX) promove redução da ingestão de alimentos e diminuição do peso corporal, sendo a ADX capaz de atenuar a obesidade em diferentes modelos experimentais. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da adrenalectomia e do tratamento com corticosterona em ratos fêmeas intactas e ovariectomizadas na ingestão alimentar, peso corporal, tecidos adiposos viscerais, teste de tolerância à glicose (GTT), concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, triacilglicerol e colesterol, bem como no estresse oxidativo em tecidos adiposos viscerais e hepáticos. Para isso, ratas Wistar (220-240g) foram divididas nos seguintes grupos experimentais: 1) animais submetidos a cirurgias fictícias de ADX e OVX (sham/não-OVX); 2) animais submetidos à ADX e cirurgia fictícia de animais OVX (ADX/não-OVX), 3) submetidos à ADX com tratamento com corticosterona (25 mg/L) e cirurgia fictícia de OVX (ADX+B/não-OVX), 4) animais submetidos à cirurgia fictícia de ADX e à OVX (sham/OVX), 5) animais submetidos à ADX e OVX (ADX/OVX), 6) animais submetidos a ADX com tratamento com corticosterona e à OVX (ADX+B/OVX). Os dados do presente estudo mostram que a OVX aumentou a ingestão de alimentos, peso corporal, área de adipócitos e peso de tecido adiposo retroperitoneal, concentrações plasmáticas de colesterol, glicemia após GTT, além de reduzir as moléculas antioxidantes no fígado e tecido adiposo retroperitoneal, onde foram observados níveis aumentados de malondialdeído (MDA). A ADX foi capaz de atenuar essas respostas metabólicas e os parâmetros de estresse oxidativo induzidos pela OVX, e o tratamento de corticosterona foi parcialmente eficaz na reversão dos efeitos da ADX. Assim, pode-se concluir que corticosteroides participam dos efeitos anabólicos induzidos pela OVX, que estão associados ao estresse oxidativo no fígado e tecido adiposo visceral.

Palavras-chave: ovário; glândulas suprarrenais; corticosterona; anabolismo.

DIAS, Marcos Antônio. **Effects of adrenalectomy on ovariectomy-induced changes in homeostasis in rats**. 2022. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Ovariectomy (OVX) promotes hyperphagia and increase in body weight, and adrenalectomy (ADX) promotes reduction of food intake and body weight, ADX being able to attenuate obesity in different experimental models. Thus, the present study aimed to investigate the effects of adrenalectomy and corticosterone treatment on intact and ovariectomized female rats on food intake, body weight, visceral adipose tissues, glucose tolerance test (GTT), plasma concentrations of free fatty acids, triacylglycerol and cholesterol, as well as on oxidative stress in the liver and visceral adipose tissues. For this, female Wistar rats (220-240g) were divided into the following experimental groups: 1) animals submitted to fictitious surgeries of ADX and OVX (sham/non-OVX); 2) animals submitted to ADX and fictitious surgery of OVX (ADX/non-OVX), 3) animals submitted to ADX with treatment with corticosterone (25 mg/L) and to fictitious surgery of OVX (ADX+B/non-OVX), 4) animals submitted to sham surgery of ADX and to OVX), 5) animals submitted to ADX and OVX (ADX/OVX), 6) animals submitted to ADX with treatment with corticosterone and to OVX (ADX+B/OVX). Data from the present study show that ovariectomy increased food intake, body weight, area of adipocytes and weight of retroperitoneal adipose tissue, plasma concentrations of cholesterol, glycemia after GTT, in addition to reduce antioxidant molecules in the liver and retroperitoneal adipose tissue, where increased levels of malondialdehyde (MDA) were observed. Interestingly ADX was able to attenuate these OVX-induced metabolic responses and oxidative stress parameters, and corticosterone treatment was partially effective in reversing the effects of ADX. Thus, it can be concluded that corticosteroids participate on the anabolic effects induced by OVX, which are associated with oxidative stress in liver and visceral adipose tissue.

Key words: ovary; adrenal glands; corticosterone; anabolism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Algumas das ações dos estrôgenos sobre o controle energético, agindo sobre a distribuição corporal dos tecidos adiposos, contribuindo para o aumento do consumo de glicose e finalmente nos sistemas antioxidantes (MEDINA-CONTRERAS et al., 2020). LPL: lipoproteína lipase; $\beta 1$ e $\beta 2$ adrenorreceptores; AT: tecido adiposo; ERO: espécies reativas de oxigênio; LDL: lipoproteína de baixa densidade; AMPK: proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina20
- Figura 2** - A redução dos estrôgenos levando a hiperfagia associado ao sedentarismo, com consequente obesidade visceral, estado inflamatório, aumento do estresse oxidativo, resistência a insulina, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica que culminam em uma síndrome metabólica, que evolutivamente levam a um aumento dos índices de doenças vasculares e diabetes melittus tipo 2 (MEDINA-CONTRERAS et al., 2020).....21
- Figura 3** - Representação dos mecanismos de controle da produção de ERO em células miocárdicas em condições fisiológicas (A) e patológicas (B). Em condições fisiológicas, as quantidades de ERO são produzidas principalmente pelo sistema mitocondrial (respiração celular), as ERO produzidas inicialmente são metabolizadas pela SOD, e a seguir pela catalase ou glutathione. No ambiente patológico, as concentrações aumentadas de ERO, como por aumento da produção da NOX, exigem aumento da sua metabolização e caso isso não ocorra, pode levar a uma lesão celular (van der Pol et al., 2019).....23
- Figura 4** - Delineamento e análises realizadas durante o período experimental. GTT: teste de tolerância à glicose; ADX: adrenalectomia; Sham: cirurgia fictícia; OVX: ovariectomia; CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais em experimentação.....25
- Figura 5** - Delineamento experimental do teste de tolerância à glicose (GTT).....30

- Figura 6** - Peso do útero (g/100g) de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX). Os dados são expressos como \pm EPM, # (OVX vs não-OVX) e * correspondentes a $P < 0,05$, grupo (n= 5-12).....37
- Figura 7** - (A) Ingestão alimentar (g/100g), (B) ingestão de fluídos (mL/100g), (C) ganho de peso corporal (g), (D) índice de Lee (g1/3/cm) de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos de animais sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX). Os dados são expressos como \pm EPM, # (OVX vs não-OVX) e * correspondentes a $P < 0,05$, grupo (n= 5-12).....38
- Figura 8** - (A) Teste de tolerância à glicose (GTT) e (B) área sob a curva (AUC) de GTT de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX). Os dados são expressos como média \pm EPM, # (OVX vs não-OVX) e * correspondentes a $P < 0,05$, grupo (n= 6-12). Foi administrado glicose à 25% por via intraperitoneal na concentração de 1,0 g/kg de peso corporal para cada animal.....40
- Figura 9** - Concentrações plasmáticas de (A) triacilgliceróis (mg/dL), (B) colesterol (mg/dL), (C) corticosterona (ug/dL), (D) ácidos de graxos livres (umoles/dL) de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX). Os dados são expressos como média \pm EPM, # (OVX vs não-OVX) e * correspondentes a $P < 0,05$, grupo (n= 6-12).....41
- Figura 10** - Peso (g) e área de adipócitos (μm^2) de tecidos adiposos perirrenal e perigonadal (A,C) e retroperitoneal (B,D,E) de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos

sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX). Os dados são expressos como \pm EPM, # (OVX vs não-OVX) e * correspondentes a $P < 0,05$, grupo (n=6-12). Em (E) fotomicrografias representativas (ampliação de 100x) de tecido adiposo retroperitoneal, marcados com hematoxilina-eosina, de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX). 43

Figura 11 - (A) MDA (nmol/mg de proteína), (B) CAT (mM/mg de proteína), (C) GSH (μ g/mg de proteína), (D) GST (mM/mg de proteína) no tecido hepático de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX). Os dados são expressos como média \pm EPM, # (OVX vs não-OVX) e * correspondentes a $P < 0,05$, grupo (n= 7-12).....44

Figura 12 - (A) MDA (nmol/mg de proteína), (B) CAT (mM/mg de proteína), (C) GSH (μ g/mg de proteína), (D) GST (mM/mg de proteína) no tecido adiposo retroperitoneal de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX). Os dados são expressos como média \pm EPM, # (OVX vs não-OVX) e * correspondentes a $P < 0,05$, grupo (n= 7-12).....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADX	Adrenalectomia
AGL	Ácidos graxos livres
Akt	Proteína quinase B
AgRP	Peptídeo relacionado ao Agouti
AT	Tecido adiposo
AUC	Área sob a curva
BAT	Tecido adiposo marrom
CAT	Catalase
CCK	Colecistocininas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais em Experimentação
CIF	Departamento de Ciências Fisiológicas
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
E	Estradiol
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GR	Receptor para glicocorticoide
GSK3	Enzima glicogênio sintase quinase-3
GSH	Glutationa reduzida
GST	Glutationa S-transferase
GTT	Teste de tolerância à glicose
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
IM	Intramuscular
IMC	Índice de massa corporal
IP	Intraperitoneal
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LPL	Lipase lipoproteica
MDA	Malondialdeído
MR	Receptor para mineralocorticoide
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVX	Ovariectomia
POMC	Pró-opiomelanocortina

PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
SAG	Síntese de ácidos graxos
Sham	Cirurgia fictícia de OVX
SNC	Sistema nervoso central
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VO	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA.....	15
1.2	REGULAÇÃO DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA.....	16
1.3	GLICOCORTICOIDES.....	18
1.4	FUNÇÃO HORMONAL OVARIANA E OBESIDADE	19
1.5	ESTRESSE OXIDATIVO	21
2	JUSTIFICATIVA	23
3	OBJETIVOS	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	25
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	25
4.3	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	27
4.3.1	ADRENALECTOMIA	27
4.3.2	OVARIECTOMIA	28
4.4	DETERMINAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR, LÍQUIDA E DO PESO	29
4.5	ESFREGAÇO VAGINAL.....	29
4.6	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)	29
4.7	DISTÂNCIA NASO-ANAL	30
4.8	EUTANÁSIA	30
4.9	DOSAGENS PLASMÁTICAS	31
4.9.1	COLESTEROL TOTAL.....	31
4.9.2	TRIACILGLICERÓIS	31
4.9.3	ÁCIDOS GRAXOS LIVRES	32
4.9.4	CORTICOSTERONA PLASMÁTICA	32
4.9.5	ÍNDICE DE LEE	33
4.9.6	PROCESSAMENTO E ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO ADIPOSEO	33
4.10	ESTRESSE OXIDATIVO	34
4.10.1	NORMALIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS	34

4.10.2	MALONDIALDEIDO (MDA).....	34
4.10.3	CATALASE	35
4.10.4	GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST).....	35
4.10.5	GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	35
5	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	36
6	RESULTADOS	37
7	DISCUSSÃO	46
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
	ANEXOS	62
	ANEXO A - TERMO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA	62

1 - Introdução

As alterações do peso corporal em humanos podem ocorrer por diversas razões, uma delas é a ingestão calórica superior ou inferior àquela requisitada pelo organismo. Outros motivos abrangem estados fisiológicos tais como menopausa, estados patológicos, incluindo os distúrbios de ordem endocrinológica e neurofisiológica, além de efeitos adversos de medicamentos como os glicocorticoides. Sabemos que adaptações fisiológicas ocorrem na presença de flutuações do peso corporal, com o intuito de limitar tanto o ganho quanto a perda de massa corpórea (MORTON; MEEK; SCHWARTZ, 2014).

Independentemente da ingestão alimentar diária ser menor ou maior àquela necessária para o organismo, ocorre ativação de um processo regulatório ativo, denominado homeostase energética (MORTON et al., 2006; SCHWARTZ et al., 2000). Por meio deste processo, o consumo e o gasto calórico pelo organismo são equilibrados, mantendo a estocagem energética ausente de alterações discrepantes que possam ser prejudiciais ao indivíduo. Os mecanismos responsáveis por essa coordenação e manutenção do equilíbrio energético são complexos, e atualmente existem lacunas quanto à sua total compreensão. Sabe-se que alterações substanciais nesses mecanismos juntamente com a presença ou não de fatores hereditários e ambientais podem levar o indivíduo a comorbidades, tais como anorexia ou obesidade (Oliveros et al., 2014).

1.1 - Obesidade e Síndrome Metabólica

A obesidade é caracterizada como um aumento acentuado do peso ideal, sendo atualmente um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, podendo atuar como fator de risco para distúrbios metabólicos, tais como: diabetes mellitus do tipo 2, doenças cardiovasculares, dislipidemias e resistência à insulina. Estatísticas recentes indicam que o sobrepeso/obesidade estão em ascensão global ininterrupta, com o número de pessoas com excesso de peso corporal ultrapassando 2 bilhões, ou seja, cerca de 30% da população mundial (CABALLERO, 2019; GLOBAL BURDEN OF DISEASE, 2017; OGDEN et al., 2007). Pesquisas indicam que a obesidade vem crescendo de forma alarmante no Brasil, de modo que o número de brasileiros obesos

saltou de 11,8% para 18,9%, de 2006 a 2016, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A etiopatôgenese da obesidade é pluralizada e complexa. Ela está associada a predisposições genéticas, fatores ambientais e psicossociais, que afetam mediadores fisiológicos do aporte e consumo de energia, os quais estão intimamente ligados ao sistema endócrino (ABESO, 2016; BLÜHER, 2019). A obesidade favorece o desenvolvimento de múltiplas alterações metabólicas que caracterizam a “síndrome metabólica”, cujo critério diagnóstico obrigatório é a presença de obesidade aferida pela circunferência abdominal, além das demais características que são auxiliares no diagnóstico: alterações na glicemia, baixas concentrações de HDL colesterol, hipertrigliceridemia e hipertensão arterial (ABESO, 2016).

A síndrome metabólica engloba um conjunto de fatores de risco relacionados à obesidade trocular ou abdominal, à resistência à insulina e hipertensão arterial sistêmica, os quais contribuem para a perda da homeostase e conferem coletivamente maior morbidade e mortalidade em homens e mulheres. Recentemente, a síndrome metabólica tem sido o melhor preditor para o risco de doença cardiovascular e seu diagnóstico está associado ao aumento de aproximadamente duas vezes para doença cardiovascular e cinco vezes ou mais para o diabetes mellitus tipo 2 (CALDWELL et al., 2019). Segundo Oliveira e colaboradores, em um estudo transversal de base populacional, a incidência de síndrome metabólica atualmente no Brasil corresponde a 38,5% da população adulta, e mais especificamente 41,8% no grupo das mulheres brasileiras (OLIVEIRA et al., 2020; SAMSON; GARBER, 2014; XANTHAKIS et al., 2015).

1.2 - Regulação da Homeostase Energética

São diversos os fatores que regulam o aporte de energia corporal. Vários sinais periféricos são integrados no sistema nervoso central (SNC), especificamente no hipotálamo, e possibilitam a detecção da presença do alimento no trato gastrointestinal, bem como a densidade energética do organismo (MOLINA, 2007a). Dentre esses fatores periféricos, alguns hormônios são fundamentais para a sinalização no que se refere a apetite e saciedade, e no SNC, modulam a expressão dos neuropeptídeos hipotalâmicos, regulando o comportamento alimentar e o peso corporal (MOLINA, 2007a). A leptina, sintetizada no tecido adiposo branco, atua em

receptores expressos no hipotálamo para reduzir a ingestão alimentar e regular a homeostase energética (KIM; MOUSTAID-MOUSSA, 2000). Além disso, a leptina promove aumento do gasto de energia mediado pelo sistema simpático, diminuição do conteúdo de triacilgliceróis pelo aumento na oxidação dos ácidos graxos, diminuição na atividade lipogênica da insulina levando ao favorecimento da lipólise, dentre outros (MOLINA, 2007a).

Por outro lado, a insulina, produzida pelas células beta pancreáticas, periféricamente apresenta-se como principal hormônio anabólico, atuando de forma a aumentar a captação de glicose e a queda da glicemia. Além disso, ela estimula a síntese de glicogênio no fígado e no músculo, e o metabolismo de lipídios. Outra função da insulina é estimular a síntese de ácidos graxos e de triglicerídeos nos tecidos. Ao contrário, a perda parcial ou completa da ação deste hormônio resulta em hiperglicemia, dislipidemias e diabetes mellitus (KAUL et al., 2013).

A leptina e a insulina são cruciais na regulação do balanço energético, sendo eles secretados em proporção à massa adiposa. Em vista disso, indivíduos obesos possuem concentrações elevadas desses hormônios. No entanto, estudos demonstram que há um déficit de sua ação devido à resistência resultante de suas altas concentrações séricas (HALPERN et al., 2004; WOODS et al., 1998).

Há situações fisiológicas em que a resistência à insulina encontra-se aumentada (puberdade, gestação e senilidade), bem como condições patológicas, tais como diabetes, obesidade e síndrome metabólica, associadas ao desequilíbrio do sistema regulatório da insulina. Nestas situações, ocorre aumento da produção hepática de glicose por neoglicogênese e redução da captação periférica de glicose, e, como consequência, as glicemias de jejum e pós-prandial se elevam. Este desequilíbrio pode ser induzido por mudanças hormonais, bem como excesso de tecido adiposo corporal. No diabetes associado à obesidade, as concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres circulantes provenientes da lipólise estão elevados; desta forma, o adipócito é um dos elementos principais do mecanismo de resistência insulínica associado à obesidade e inflamação crônica do tecido adiposo. As células beta-pancreáticas respondem à hiperglicemia com hipersecreção de insulina, o que leva ao diabetes tipo 2 (ABESO, 2016; LEE; PARK; CHOI, 2022).

Em relação aos hormônios do córtex adrenal, tanto o excesso de glicocorticoides (cortisol e corticosterona) quanto de mineralocorticoides (aldosterona) se relaciona ao processo de resistência insulínica e obesidade. O excesso de

glicocorticoides ativa receptores mineralocorticoides e, desta forma, os efeitos são superpostos, resultando em um possível estado hiperglicêmico, causando estresse oxidativo elevado, ativando vias inflamatórias que levam a maior risco cardiovascular (MAZZUCO, 2018; ZHOU et al., 2016). O uso de glicocorticoides foi associado a aumentos acentuados da glicemia de jejum, da insulina de jejum e do modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR), sugerindo que o uso de glicocorticoides pode estar correlacionado com resistência insulínica (ZHOU et al., 2016).

1.3 - Glicocorticoides

Como dito, um grupo de hormônios com importante papel na regulação da homeostase energética são os glicocorticoides, que podem ser encontrados na forma natural ou sintética. Dentre os endógenos, o principal glicocorticoide é o cortisol em humanos, que tem função equivalente à corticosterona em roedores (MAZZUCO; HERRERA; FONSCECA, 2008).

Na biossíntese do cortisol, as glândulas adrenais são estimuladas pelo lobo anterior da hipófise por meio do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A liberação do ACTH é pulsátil, com cerca de 7 a 15 episódios por dia, sendo regulada pelo hipotálamo, através da secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (MOLINA, 2007b). A função do ACTH é regular o crescimento e a secreção do córtex das adrenais, sendo os glicocorticoides sua principal secreção, além de hormônios mineralocorticoides e esteroides sexuais (CANALI; KRUEL, 2001). Além da secreção de glicocorticoides para corrente sanguínea ser pulsátil, esta segue um ritmo circadiano, sendo sensível à luz, ao sono, ao estresse psicológico e a estados patológicos (MOLINA, 2007b).

Os glicocorticoides são lipofílicos e difundem-se facilmente através das membranas celulares e, por isso, sua distribuição corporal apresenta-se em alta escala (MOLINA, 2007b). Os glicocorticoides, em seus tecidos-alvos, têm ação pleiotrópica. Quando em excesso, eles atuam de forma antagônica à insulina, inibindo o efeito estimulador desta na captação de glicose e seu efeito supressor na produção hepática de glicose; o conjunto destas atividades culmina em um aumento da glicemia plasmática, auxiliando na prevenção da hipoglicemia em jejum (CURI; PROCOPIO, 2017). Os glicocorticoides são primordiais à vida, de modo que em humanos

adrenalectomizados, ou seja, aqueles cujas glândulas adrenais foram removidas, a sobrevivência sem reposição hormonal após a cirurgia seria breve, devido à ação do glicocorticoide refletir de forma marcante em quase todos os aspectos do metabolismo, com um efeito global catabólico (BUENO, 2011).

Os glicocorticoides regulam ou sustentam grande variedade de funções no organismo, como por exemplo, o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, a resposta adaptativa ao estresse e a imunomodulação (AIRES, 2012a). Na homeostase energética, os glicocorticoides aumentam o apetite e o peso corporal em roedores (STOPA et al., 2019) e humanos (TATARANNI et al., 1996; ZAKRZEWSKA et al., 1999). Além disso, concentrações plasmáticas de glicocorticoides apresentam-se elevadas em diferentes modelos de obesidade (SPENCER; TILBROOK, 2011). Curiosamente, a remoção bilateral das glândulas adrenais, por meio da adrenalectomia (ADX), é capaz de reduzir a hiperfagia e a obesidade nesses diferentes modelos animais, mesmo quando o hiperadrenocorticismismo não foi a etiologia principal da obesidade (BRUCE et al., 1982; DUBUC; WILDEN, 1986; MAKIMURA et al., 2000; YUKIMURA; BRAY; WOLFSEN, 1978).

1.4 - Função hormonal ovariana e obesidade

Assim como os glicocorticoides, os esteroides ovarianos também controlam a homeostase energética (figura 1), e a ativação de mecanismos antioxidantes e antiinflamatórios. Estudos demonstram que em ratas submetidas à ovariectomia (OVX) com a consequente queda abrupta das concentrações plasmáticas de hormônios ovarianos, observa-se aumento de tecido adiposo visceral e da ingestão alimentar, sugerindo um possível papel desses esteroides no sobrepeso e na síndrome metabólica (DA ROCHA et al., 2011; RICHARD et al., 1991). Em humanos, seja em pacientes ovariectomizadas, seja em mulheres em menopausa fisiológica sem reposição hormonal, a ausência da função ovariana também pode levar à obesidade (AL-SAFI; POLOTSKY, 2015; OUERGHI; RIVEST; RICHARD, 1992). Esse período do ciclo reprodutivo feminino é motivo de estudos pela grande abrangência epidemiológica na população feminina mundial e, principalmente, devido aos riscos que o excesso de adiposidade corporal pode promover, com consequente desenvolvimento de obesidade e síndrome metabólica (DA ROCHA et al., 2011; KARVONEN-GUTIERREZ; PARK; KIM, 2016; MONTEIRO; RIETHER; BURINI,

2004).

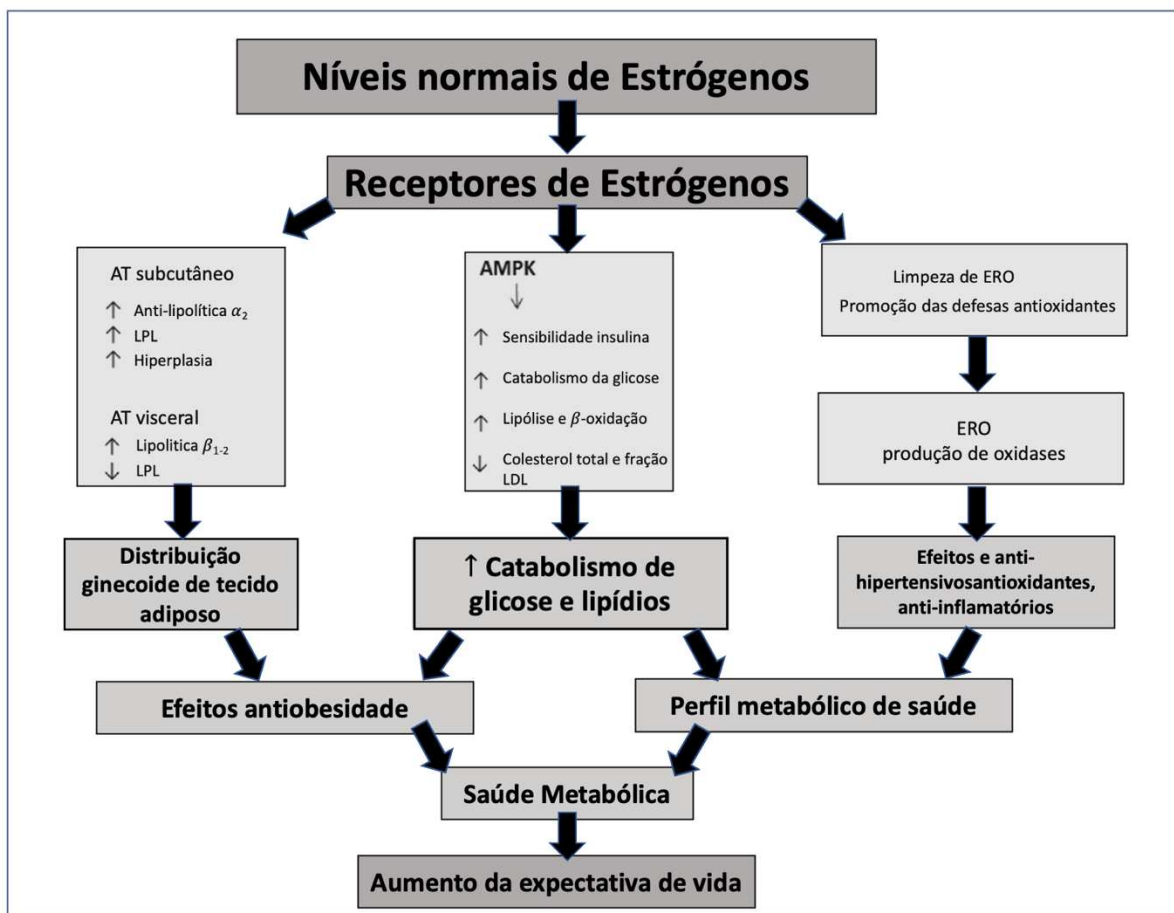


Figura 1 – Algumas das ações dos estrógenos sobre o controle energético, agindo sobre a distribuição corporal dos tecidos adiposos, contribuindo para o aumento do consumo de glicose e finalmente atuando em prol dos sistemas antioxidantes (MEDINA-CONTRERAS et al., 2020). LPL: lipoproteína lipase; β_1 e β_2 adrenorreceptores; AT: tecido adiposo; ERO: espécies reativas de oxigênio; LDL: lipoproteína de baixa densidade; AMPK: proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina.

Na menopausa, o declínio dos hormônios ovarianos causa aumento das concentrações circulantes de colesterol total, dos triacilgliceróis e dos ácidos graxos livres e redução de HDL, juntamente com o estado inflamatório, onde pode ocorrer o aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO), que pode levar ao estresse oxidativo (figura 2) (COSTA-BEBER et al., 2021; DA ROCHA et al., 2011; HERMOSO et al., 2016; MEDINA-CONTRERAS et al., 2017; PRATCHAYASAKUL; CHATTIPAKORN; CHATTIPAKORN, 2014; STUBBINS et al., 2012)

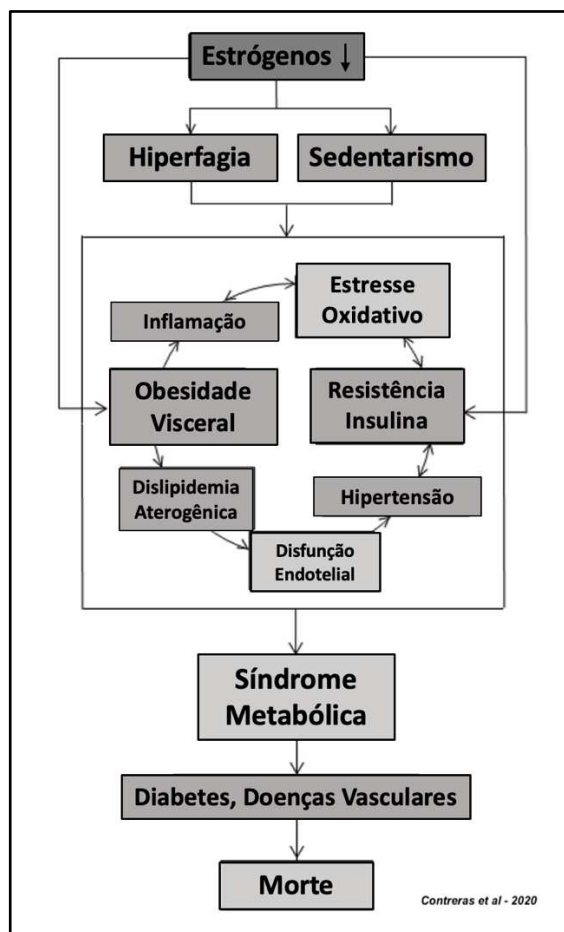


Figura 2 - A redução dos estrógenos levando a hiperfagia associada ao sedentarismo, com consequente obesidade com predomínio visceral, estado inflamatório, aumento do estresse oxidativo, resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica que podem levar a síndrome metabólica, que evolutivamente levam a um aumento dos índices de doenças vasculares e diabetes melittus tipo 2 (MEDINA-CONTRERAS et al., 2020).

1.5 - Estresse Oxidativo

O desequilíbrio entre a formação e a depuração das espécies reativas do metabolismo de O_2 (espécies reativas de oxigênio - ERO), seja por diminuição dos antioxidantes endógenos ou pelo aumento da geração de ERO, caracteriza o estresse oxidativo. Este estado favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas ou estruturas celulares, podendo levar a lesões celulares irreversíveis, que resulta de uma condição na qual perde-se o equilíbrio entre as concentrações de ERO e os sistemas antioxidantes (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 1993, 2018; SIES; BERNDT; JONES, 2017).

Um dos marcadores do aumento do estado oxidativo é a formação do malondialdeído (MDA), medido pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) (HA et al., 2006; MEDINA-CONTRERAS et al., 2020; TULAY AKCAY, 2000). O MDA é um

aldeído de cadeia curta, e a sua formação ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos, assim a sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos, sendo um dos marcadores do estresse oxidativo (BONNES-TAOUREL; GUÉRIN; TORREILLES, 1992). Outro marcador do estresse oxidativo de interesse é a redução da glutathiona reduzida, que está presente em diversos tecidos e sistemas, como por exemplo na metabolização hepática de fármacos na fase 2, onde promove as reações de oxidação, redução e hidrólise de fármacos e de moléculas de ERO. Assim, esta pode indicar uma possível correlação entre a diminuição das atividades de enzimas antioxidantes, como a glutathiona peroxidase, e o aumento dos níveis de bases nucleicas lesadas pelo estresse oxidativo (ARAI et al., 1999). Outra importante enzima antioxidante é a catalase, que é uma peroxidase, ou seja, possui a função de degradar o peróxido de hidrogênio, agindo como uma molécula receptora de elétrons durante a reação de peroxidação (DA ROCHA et al., 2011). E, finalmente, um grupo também importante é o da glutathiona S-transferase (GST), um grupo de isoenzimas multigênicas que participa na biotransformação hepática da fase 2, onde ocorrem as reações de conjugação para a inativação de um xenobiótico que não tenha sido metabolizado pela fase 1 (citocromo P450) (SALINAS; WONG, 1999).

Em condições fisiológicas, ocorre formação de ERO, produzidas no ambiente intracelular em pequenas quantidades, principalmente pelas mitocôndrias (cadeia de elétrons), NADPH oxidase (NOX), xantina oxidase (XO) e óxido nítrico sintase (NOS). A respiração mitocondrial converte o oxigênio à água, resultando na produção de pequenas quantidades de superóxido (O_2^-) como subproduto. Como resposta fisiológica, a superóxido dismutase (SOD) inicia a metabolização destas ERO, eliminando O_2^- e o convertendo em H_2O_2 . A partir deste ponto, tanto a catalase quanto a glutathiona peroxidase (GPx) irão metabolizar a H_2O_2 em água e oxigênio. GPx utiliza duas moléculas de glutathiona (GSH) como doadores de elétrons na redução de H_2O_2 a água, produzindo glutathiona oxidada (GSSG) no processo. Uma vez que GPx oxida GSH em GSSG, GSH redutase (GR) pode reduzir GSSG de volta a GSH às custas de NADPH (doador de hidrogênio), formando o ciclo redox GSH. A proporção de GSH para GSSG determina em grande parte o potencial redox intracelular (figura 3) (HA, 2004; VAN DER POL et al., 2019)

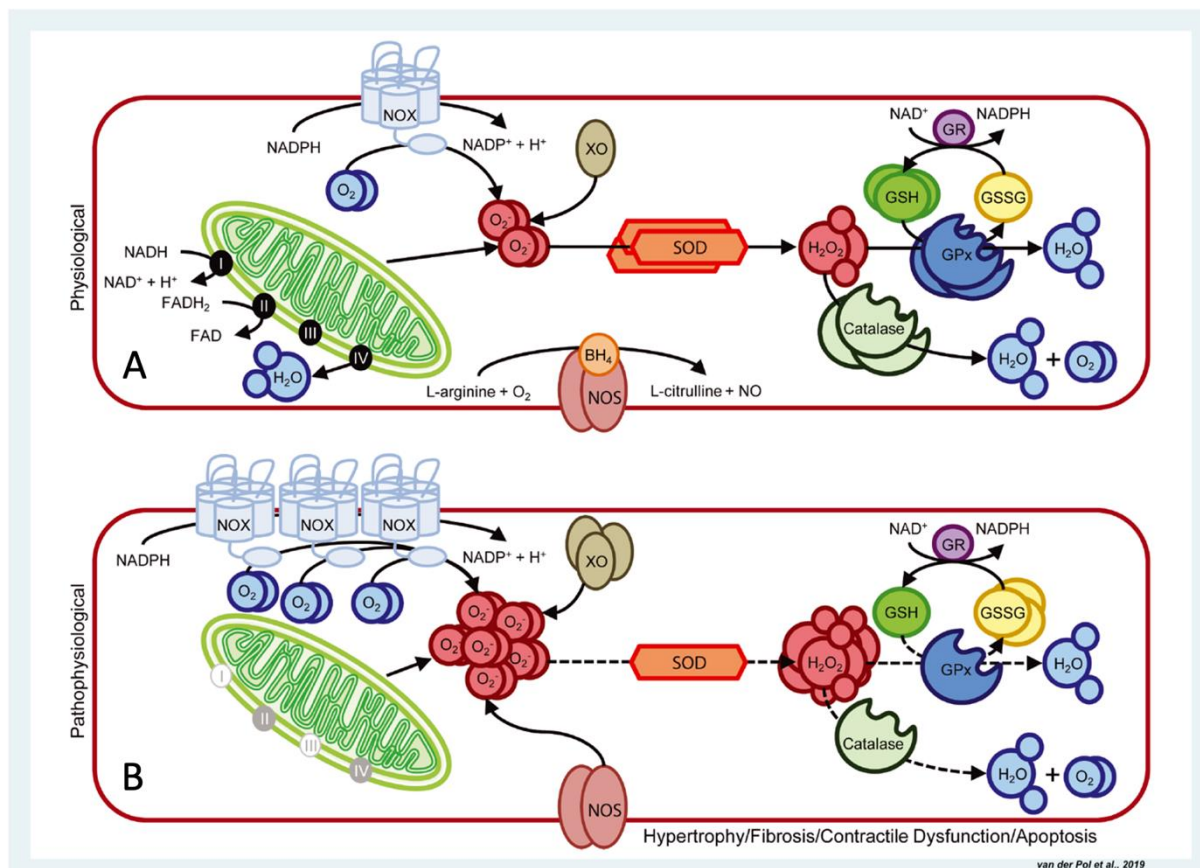


Figura 3 - Representação dos mecanismos de controle da produção de ERO em células miocárdicas em condições fisiológicas (A) e patológicas (B). Em condições fisiológicas, as quantidades de ERO são produzidas principalmente pelo sistema mitocondrial (respiração celular), as ERO produzidas inicialmente são metabolizadas pela SOD e, a seguir, pela catalase ou glutaciona. No ambiente patológico, as concentrações aumentadas de ERO, como por aumento da produção da NOX, exigem aumento da sua metabolização e, caso isso não ocorra, pode levar a uma lesão celular (VAN DER POL et al., 2019).

2 - Justificativa

Considerando o exposto anteriormente, a queda do estradiol possui relação direta com a obesidade, com a resistência à insulina, com o aumento do tecido adiposo visceral e levando, por fim, à síndrome metabólica, bem como ao estresse oxidativo. Uma vez que ADX reverte diversos efeitos anabólicos em modelos de obesidade, e que a perda da função ovariana é um modelo que leva ao aumento de peso corporal e suas comorbidades, torna-se relevante a compreensão do papel dos glicocorticoides nas alterações na homeostase energética causadas pela remoção dos ovários, bem como sua associação com o estresse oxidativo.

3 - Objetivos

3.1 - Objetivos gerais:

Avaliar o papel dos glicocorticoides nas alterações de homeostase energética, causados pela remoção dos ovários em ratas.

3.2 - Objetivos específicos:

Avaliar os efeitos da ADX nas respostas induzidas pela OVX nos seguintes parâmetros:

- Parâmetros biométricos (ganho de peso corporal, peso uterino, índice de Lee, ingestão alimentar e de fluido);
- Tolerância à glicose (teste de tolerância à glicose - GTT);
- Adiposidade (peso e histologia do tecido adiposo branco visceral);
- Parâmetros metabólicos plasmáticos (colesterol total, triacilgliceróis e ácidos graxos livres);
- Parâmetros de estresse oxidativo no fígado e tecido adiposo (MDA, GSH, GST e CAT).

4 - Material e Métodos

4.1 - Animais experimentais

Foram utilizadas ratas adultas da linhagem Wistar (n=106) pesando entre 220-240g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os animais foram mantidos em caixas com 4 animais no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, com controle da luminosidade em ciclos 12 horas (claro/escuro) e temperatura ambiente de 22 ± 2 °C, e líquidos e alimentação monitorados e sem restrições, com duração de 14 dias no total, uma vez que houve aumento da taxa de mortalidade após períodos superiores a 14 dias (dados não publicados). Todos os experimentos com animais foram realizados a partir das 14h no Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo do CIF/UEL. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em experimentação (CEUA) da UEL sob o protocolo número 16085.2015.20 – ofício: 200/2015 (Anexo).

4.2 - Protocolo experimental

O protocolo experimental avaliou os efeitos da adrenalectomia e do tratamento com glicocorticoide nas respostas induzidas pela ovariectomia sobre a ingestão alimentar, ingestão de líquidos, peso corporal, índice de Lee, teste de tolerância à glicose e parâmetros metabólicos plasmáticos e teciduais, conforme o delineamento e análises realizadas durante o período experimental (Figura 4).

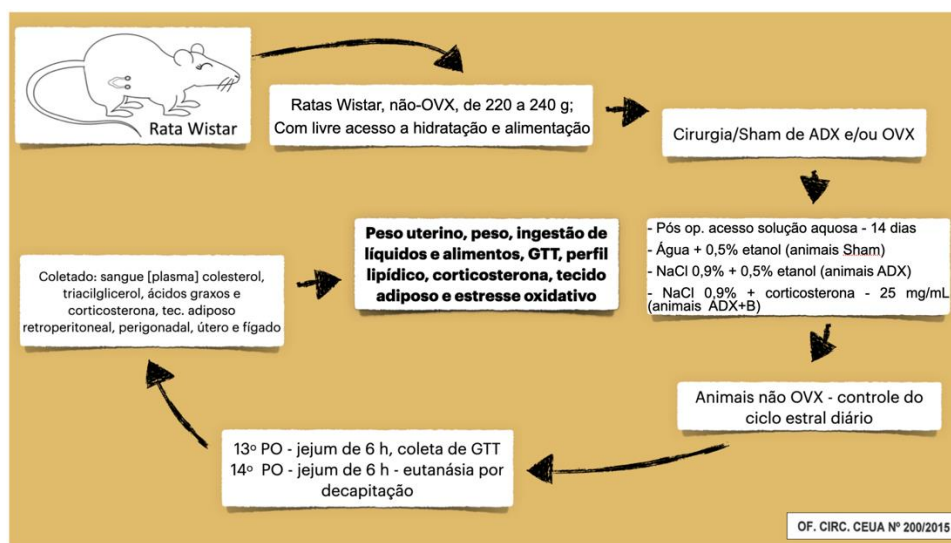


Figura 4 - Delineamento e análises realizadas durante o período experimental. **GTT**: teste de tolerância à glicose; **ADX**: adrenalectomia; **Sham**: cirurgia fictícia; **OVX**: ovariectomia; **CEUA**: Comissão de Ética

no Uso de Animais em experimentação.

O presente protocolo pretendeu verificar se a ADX alterou os efeitos promovidos pela OVX na ingestão alimentar, ingestão de líquidos, peso corporal, índice de Lee, teste de tolerância à glicose e dosagens bioquímicas plasmáticas e teciduais, além de analisar se a reposição com glicocorticoide foi capaz de reverter os efeitos da ADX.

A hipótese do presente protocolo foi avaliar se a ADX reduziu as respostas induzidas pela OVX, e se a reposição com glicocorticoide foi capaz de reverter os efeitos da ADX. Para tanto, foram constituídos os seguintes grupos experimentais:

- I. **Grupo sham/não-OVX:** animais submetidos às cirurgias fictícias da ADX e OVX, tendo como única fonte de líquido água corrente contendo etanol 0,5% (n= 7);
- II. **Grupo ADX/não-OVX:** animais submetidos à ADX e à cirurgia fictícia da OVX, tendo como líquido ofertado, exclusivamente a solução de NaCl 0,9% contendo etanol 0,5% (n= 13);
- III. **Grupo ADX+B/não-OVX:** animais submetidos à cirurgia de ADX e cirurgia fictícia de OVX, tendo como único líquido ofertado à solução de NaCl 0,9%, com corticosterona (Sigma-Aldrich®, 25 mg/L) diluída em etanol 0,5% (n= 14);
- IV. **Grupo sham/OVX:** animais submetidos à cirurgia fictícia de ADX e a cirurgia de OVX sendo mantidos com acesso livre a água corrente contendo etanol 0,5%, como única fonte de líquido (n= 24);
- V. **Grupo ADX/OVX:** animais submetidos à ADX e OVX, sendo mantidos com acesso à solução de NaCl 0,9% contendo etanol 0,5%, como única fonte de líquido (n= 24);
- VI. **Grupo ADX+B/OVX:** animais submetidos à ADX e OVX, tendo como líquido ofertado a solução de NaCl 0,9%, com corticosterona (Sigma-Aldrich®, 25 mg/L) diluída em etanol 0,5% (n= 24).

Os animais tiveram livre acesso à alimentação e aos fluidos de

ingestão desde o primeiro dia experimental (imediatamente após o efeito do anestésico) até o dia da eutanásia, exceto para realização do GTT e eutanásia, como descrito a seguir.

Os animais foram submetidos à cirurgia de ovariectomia (OVX) ou cirurgia fictícia da OVX (não-OVX), bem como à cirurgia de adrenalectomia (ADX) ou cirurgia fictícia da ADX (*sham*) no dia 1. Após as cirurgias, as ratas foram mantidas com acesso à solução de água corrente contendo etanol 0,5%, ou NaCl 0,9% contendo etanol 0,5%, ou NaCl 0,9% contendo corticosterona (25 mg/L) diluída em etanol 0,5% durante 14 dias. A concentração da corticosterona foi determinada com base em estudo do nosso grupo (UCHOA; ANTUNES-RODRIGUES; ELIAS, 2010). Todos os animais foram pesados e a quantidade de alimento ingerido avaliada diariamente, pelo período de 14 dias. As ratas não-ovariectomizadas tiveram o esfregaço vaginal colhido diariamente às 8h da manhã para o acompanhamento do estágio do ciclo estral. No 13º dia, os animais foram mantidos em jejum a partir das 08h, e às 14h foi realizado o teste de tolerância à glicose (GTT). No 14º dia, os animais foram mantidos em jejum a partir das 8h, e foram submetidos à eutanásia, por decapitação às 14h. O sangue foi coletado para avaliação das concentrações plasmáticas de colesterol, triacilgliceróis, ácidos graxos livres e corticosterona. O tecido adiposo visceral (retroperitoneal e perigonadal) e tecido hepático foram retirados e pesados. No caso dos grupos não-OVX, foram consideradas apenas as ratas que estavam em diestro no dia do GTT e da eutanásia.

4.3 - Procedimentos cirúrgicos

No primeiro dia de experimento, os animais dos grupos anteriormente descritos foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos que consistiram em cirurgia de ADX, cirurgia fictícia da ADX (*sham*), cirurgia de OVX e cirurgia fictícia da OVX (não-OVX); como apresentado abaixo:

4.3.1 - Adrenalectomia

A cirurgia de ADX foi realizada em animais anestesiados por via intraperitoneal (ip) com dose de 100 mg/kg de cetamina (Agner União, 10%) e 20 mg/kg de cloridrato de xilazina (Anasedan®; Vetbrands, 2%) e, uma vez o estado anestesiado obtido, foi

realizada uma incisão bilateral em dois tempos sobre a pele na região dorsal infratorácica, tendo como ponto de referência o ângulo entre a última costela e a coluna vertebral. Depois de dissecada a musculatura paravertebral, o plano cirúrgico seguiu até o espaço retro abdominal permitindo a identificação dos rins. Nos animais ADX, com auxílio de uma pinça, o tecido adiposo perirrenal foi exteriorizado e a glândula adrenal foi seccionada. Imediatamente após esses procedimentos, as incisões foram suturadas por planos e higienizadas com álcool 70%. Nos animais *sham* (controle da ADX), foi realizada a adrenalectomia fictícia, sendo os procedimentos anteriores executados; no entanto, não ocorreu a remoção das glândulas adrenais. Os animais receberam tratamento profilático com antibiótico (pentabiótico, Fort Dodge®; 0,1 ml/animal, IM) e analgesia pós-cirúrgica com paracetamol (100 mg/kg, VO) em dose única. Posteriormente, foram colocados em caixas contendo ração e fluídos com tratamento dos seus respectivos grupos, aquecidos e, 2h após, foram levados para Biotério Setorial do CIF/UEL, onde permaneceram os 14 dias do período experimental (SIQUEIRA, 2009).

4.3.2 - Ovariectomia

Imediatamente após a realização da cirurgia ADX ou sua respectiva cirurgia fictícia (*sham*), ainda com animal anestesiado sob o mesmo protocolo medicamentoso descrito acima, foi realizada a cirurgia de OVX ou sua cirurgia fictícia a partir da mesma abertura da cirurgia de ADX ou *sham*. Dessa forma, foi feita a identificação do tecidos adiposos perigonadais e, posteriormente, a remoção dos ovários. Após esse procedimento, realizou-se a sutura por planos cirúrgicos; o local da sutura de pele foi higienizado com álcool 70%. Para cirurgia fictícia da OVX (não-OVX) seguiu-se todos os procedimentos acima descritos, com exceção da remoção dos ovários. Após os procedimentos, todos os animais receberam tratamento profilático com antibiótico (pentabiótico, Fort Dodge®; 0,1 mL/animal, IM) e analgesia pós-cirúrgica com paracetamol (100 mg/kg, VO) em dose única. Posteriormente, os animais foram colocados em caixas contendo fluídos com tratamento, ração e aquecidos. Após 2h, foram levados para Biotério do CIF/UEL, onde permaneceram os 14 dias do período experimental (PINHEIRO et al., 1996).

4.4 - Determinação da ingestão alimentar, líquida e do peso

Diariamente, do 1° ao 14° dia de experimento, as 8h da manhã, foi avaliado o peso corporal dos animais. A partir do 2° até o 14° dia de experimento, também às 8h da manhã, também foi quantificado o consumo de ração.

A ração ofertada para cada roedor foi na quantidade de 100 g/dia (Nuvilab CR-1, Nuvital®), sendo as sobras retiradas após 24h da oferta e, a partir da diferença entre a oferta e sobra de ração, foi calculada a quantidade diária de alimento ingerido e expressa em g/100 g de peso corpóreo. O peso corporal foi expresso em gramas (g).

A avaliação da ingestão de fluídos foi realizada a cada três dias e foi calculada pela diferença entre a oferta e sobra de fluido, sendo os resultados expressos em mL/100 g de peso corpóreo.

4.5 - Esfregaço vaginal

Diariamente, às 8h da manhã (a partir do segundo dia de protocolo), o ciclo estral das ratas foi acompanhado por meio da técnica de esfregaço vaginal. Para tanto, foi usada uma ponteira de calibre e volume adequados, previamente higienizada com água destilada; após, a pipeta foi cuidadosamente introduzida na vagina de cada animal com um pequeno volume de solução salina 0,9%. A solução foi liberada e posteriormente sugada contendo o fluido vaginal, sendo este colocado em uma lâmina de vidro para visualização a fresco no microscópio óptico (objetiva de 10x), permitindo a identificação da fase do ciclo. Esse procedimento foi realizado em todas as ratas, exceto nas ratas OVX (PINHEIRO et al., 1996).

4.6 - Teste de tolerância à glicose (GTT)

No 13° dia de protocolo, os animais foram submetidos à restrição alimentar a partir das 8h e alocados em uma sala isolada de grandes ruídos para aclimação. No período da tarde (às 14h) do mesmo dia, deu-se início ao GTT (figura 5). Primeiramente, foi feito um pequeno corte na extremidade da cauda do animal, para obtenção de uma gota de sangue, aferindo assim, a glicemia basal (tempo 0) com auxílio da fita teste do aparelho Accu-Check Andvantage II® de determinação de glicemia sanguínea. Após esse procedimento, foi realizada a administração de glicose (25% ip) na concentração de 1,0 g/kg de peso corporal de animal, seguido da

realização de dosagens da glicemia sanguínea pelo mesmo método nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de glicose. Após os 120 minutos, a ração e fluido com tratamento correspondente foram recolocados nas caixas dos animais.

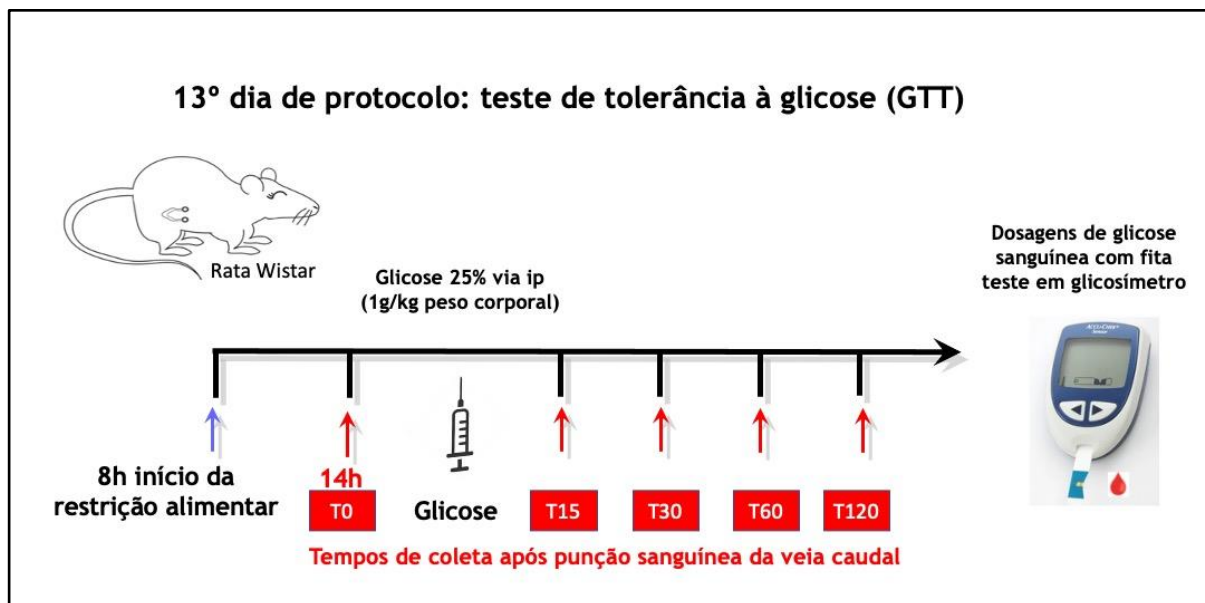


Figura 5 - Delineamento experimental do teste de tolerância à glicose (GTT). IP: intraperitoneal.

4.7 - Distância naso-anal

No 14º dia de experimento, por volta das 8h da manhã, com o auxílio de uma régua em centímetros, foi realizada a medição da distância naso-anal de cada animal.

4.8 - Eutanásia

No 14º dia, os animais foram colocados em jejum de 6h e alocados em um ambiente controlado de luz e ruídos. Todos os animais utilizados nos experimentos foram eutanasiados por decaptação (a partir das 14h do mesmo dia) e, imediatamente após, foi coletado o sangue em tubos heparinizados e centrifugados a 3000 rpm por 20 minutos a 4 °C para a obtenção do plasma, que foi separado em alíquotas e armazenado a -20 °C para posteriores dosagens. Os tecidos adiposos perirrenal e perigonadal, retroperitoneal, os fígados e úteros foram removidos e pesados e todos os tecidos foram armazenados em freezer -80 °C.

4.9 - Dosagens Plasmáticas

4.9.1 - 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 conforme Allain e colaboradores, onde, os ésteres de colesterol são hidrolisados a colesterol livre pela hidrolase do éster de colesterol. O colesterol livre produzido é oxidado pela colesterol oxidase no metabólito (colest-4-en-3-one) com a produção simultânea de peróxido de hidrogênio, que se acopla por oxidação com a 4-aminoantipirina e o fenol que na presença de peroxidase produz um cromógeno com absorção máxima em 500 nm (ALLAIN et al., 1974).

O produto da reação apresenta coloração rósea, sendo a sua intensidade de cor diretamente proporcional à quantidade de colesterol total existente na amostra. Foram utilizados um volume padrão de 10 µL de colesterol a concentração de 200 mg/dL ou amostra de plasma de cada animal, em tubos contendo 1 mL de reativo, onde este isoladamente era o controle branco. Após homogeneização por agitação, os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C por 5 minutos. 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.

4.9.2 – Triacilgliceróis

A determinação espectrofotométrica das concentrações plasmáticas de triacilgliceróis foi realizada utilizando o kit comercial BioLiquid Triglicérides GPO-Trinder Commercial Kit (Laborclin), no qual, inicialmente o triacilglicerol é convertido em glicerol + ácidos graxos pela ação da enzima lipase, a seguir o glicerol é associado ao ATP, levando ao glicerol-3-fosfato + ADP, reação essa mediada pela glicerolquinase. Na sequência, o glicerol-3-fosfato é associado ao O₂, no que resulta em di-hidroxiacetona fosfato + H₂O₂ (reação mediada pela glicerol-1-fosfato-oxidase (GPO) e por fim, H₂O₂ + 4AAP (4-aminoantipirina) + ácido 3,5-dicloro-2-hidroxi-

benzeno sulfônico (DHBS) resultando em quinoneimina + 2H₂O (reação mediada pela peroxidase), a quinoneimina é o indicador colorimétrico a ser lido pelo espectrofotômetro. Assim, o teste enzimático e colorimétrico para a dosagem dos triacilgliceróis no soro ou plasma, obtém-se uma coloração do produto final diretamente proporcional à quantidade de triacilgliceróis existente na amostra (TIETZ; FINLEY; PRUDEN, 1995). Foram pipetados 10 µL de padrão de triacilgliceróis (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 minutos. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu® Mod. UV-1201) no comprimento de onda de 500 nm. Os resultados obtidos da concentração plasmática de triacilgliceróis foram expressos em mg/dL.

4.9.3 - Ácidos graxos livres

Por meio do método espectrofotométrico de Falholt e colaboradores (FALHOLT; LUND; FALHOLT, 1973), realizou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro (Shimadzu® Mod. UV-1201) no comprimento de onda de 550 nm. Para isso, foram utilizadas 100 µL das amostras de plasma para realizar duas extrações, seguidas de agitação, aspiração da fase superior e centrifugação. Para o padrão, foram utilizados 50 µL 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 cobre-trietanolamina (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 trietanolamina 1 M (TEA) em 3,0 mL da fase superior]. Os resultados obtidos da concentração plasmática de ácidos graxos livres foram expressos em µmoles/dL.

4.9.4 - Corticosterona plasmática

A concentração de corticosterona plasmática foi determinada por fluorimetria. Este método baseia-se na fluorescência da corticosterona em ácido sulfúrico. Para execução do método, o padrão é feito a partir de 1 mg de corticosterona dissolvida em

10 mL de etanol absoluto. Foi utilizado um volume 200 µL de amostra de plasma de cada animal, juntamente com 6 mL de diclorometano, com posterior agitação e aspiração da fase superior, possibilitando a partição e extração da corticosterona. Posteriormente, 500 µL de NaOH 0,1 N foram adicionados à amostra para lavagem, seguido por agitação e aspiração da fase superior; após, 500 µL de água destilada foram adicionados, agitando posteriormente. Para o branco, 4 mL de diclorometano foram utilizados. Na segunda etapa do método, 5, 10 e 20 µL de solução de trabalho (0,5 mL de solução padrão e etanol) foram adicionados aos tubos da solução padrão, e 1 mL de (H₂SO₄ : etanol) foi acrescentado à todos os tubos para uma segunda extração, seguido por agitação e repouso de 20 minutos. A leitura foi realizada em fluorímetro, com excitação 477 nm, emissão 520 nm e sensibilidade 11. As concentrações obtidas de corticosterona plasmática foram expressas em µg/dL (GUILLEMIN et al., 1958).

4.9.5 - Índice de Lee

Usando os dados do peso corporal do último dia do experimento e a distância naso-anal, foram obtidos os dados do índice de Lee de cada animal, dividindo-se a raiz cúbica do peso corporal, em gramas, pelo comprimento naso-anal em centímetros (BERNARDIS; PATTERSON, 1968).

4.9.6 - Processamento e análise histológica do tecido adiposo

Após a eutanásia, foi realizada a retirada do tecido adiposo retroperitoneal, perirrenal e perigonadal, um fragmento de cada tecido foi separada e fixada em solução de paraformaldeído (4%) por 48 a 72 horas. Em seguida, o material foi mantido em solução de álcool 70%, sob refrigeração. O tecido retirado foi recortado em fragmentos com aproximadamente 0,5 cm³. Os fragmentos foram colocados, separadamente, em cassetes histológicos devidamente identificados, armazenados em solução de álcool 70% e novamente mantidos sob refrigeração. Foram realizados cortes de 12 µm de espessura, assim obtidos quatro cortes por lâmina, não seriados,

com intervalo de 5 cortes entre os mesmos. Após a microtomia, as lâminas permaneceram por 24 a 72 horas na estufa a 36 °C. A coloração foi realizada com hematoxilina-eosina (HE), seguindo protocolo de rotina do laboratório. Após a montagem, as lâminas ficaram em estufa a 36 °C por 72 horas para secagem final. Para a captura das imagens dos adipócitos, utilizou-se o software Motic Images Plus® 3.0 – (Motic – Hong Kong) e para a análise do volume e quantidade de adipócitos (com o objetivo de evidenciar hipertrofia e hiperplasia) foi utilizado o software Image J – (National Institutes of Health - NIH – EUA). As áreas dos adipócitos nos tecidos adiposos retroperitoneal, perigonadal e perirrenal foram espessas em μm^2 (CHEN; FARESE, 2002; PARLEE et al., 2014).

4.10 - Estresse oxidativo

4.10.1 - Normalização da concentração de proteínas das amostras

Inicialmente, todas as amostras de tecido hepático e tecido adiposo retroperitoneal foram submetidos à análise quantitativa de proteínas, para subsequente normalização a 1 mg/mL de proteína com uso do método de Bradford, que consiste na determinação de uma quantificação inicial das proteínas totais para cada tecido com o uso do corante de “coomassie brilliant blue” BG-250 em pH fisiológico medidas em espectrofotômetro (Shimadzu® Mod. UV-1201) a uma absorvância de 595 nm e, finalmente, as concentrações de proteínas das amostras foram normalizadas - Os resultados foram expressos em mg/mL de proteína – resultados não apresentados (BRADFORD, 1976; COMPTON; JONES, 1985).

4.10.2 - Malondialdeído (MDA)

Os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbiturico (TBARS) foram avaliados de acordo com o descrito por Federici e colaboradores (FEDERICI; SHAW; HANDY, 2007). A concentração de MDA, um produto intermediário da peroxidação lipídica, foi determinada a partir da diferença das absorvâncias lidas em 535 e 572 nm

(Multiskan GO; Thermo Scientific, Vantaa, Finland). Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

4.10.3 - Catalase

A atividade enzimática da CAT foi determinada nos tecidos estudados pela degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Após a determinação da concentração de proteínas (normalizadas 1,0 mg/ml em PBS), 297 µl de meio de reação foi colocado em microplaca de UV4 (em triplicata) para medida em espectrofotômetro (Shimadzu® Mod. UV-1201) a uma abosorbância de 240 nm, analisando o consumo de O₂ a cada 15 segundos por um tempo total de 60 segundos. Os resultados obtidos da atividade enzimática da catalase foram expressos em mM/mg de proteína (AEBI, 1984).

4.10.4 - Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da Glutathione-S-transferase nos tecidos estudados foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu® Mod. UV-1201) a uma abosorbância de 340 nm combinada com o CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), de acordo com Keen e colaboradores (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976), com base na respectiva conjugação com a glutathione, e os resultados da atividade da GST foram expressos em mM/mg de proteína (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976).

4.10.5 - Glutathione reduzida (GSH)

Glutathione reduzida (GSH) foi avaliada nos tecidos adiposos e hepático. Os níveis de GSH foram determinados com DITIOBIS-5,5-(2-Nitro-ácido benzoico) em sobrenadante de homogenato de coração evidenciados pela formação de coloração amarela. Os níveis de GSH foram avaliados por leitura em espectrofotômetro (Shimadzu® Mod. UV-1201) a uma abosorbância de 412 nm e os resultados da atividade da GSH foram expressos em µg/mg de proteína (HISSIN; HILF, 1976; SEDLAK; LINDSAY, 1968; SIERVO et al., 2015).

5 - Tratamento Estatístico

A distribuição normal (*Shapiro-Wilk test*) e a homogeneidade (*Levene's test*) dos dados foram testados; os dados que não passaram pelo teste de normalidade (colesterol e corticosterona) foram “log” transformados, passando assim, pelo teste de normalidade. Os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) two-way Anova, seguido de teste de Student Newman-Keuls. Os gráficos foram montados no programa Graph Pad Prism 9.3.1[®] (GraphPad Software, LLC, CA, EUA) e os cálculos e testes estatísticos foram realizados no Sigma Plot 11.0[®] (Systat Software Inc., UK). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

6 - Resultados

Os efeitos da adrenalectomia e do tratamento com glicocorticoide em animais ovariectomizados foram observados na ingestão de alimentos, no peso corporal, no índice Lee, nos tecidos adiposos brancos viscerais, e na tolerância à glicose e resposta glicêmica à sobrecarga de glicose e pelos métodos de obtenção dos parâmetros plasmáticos e teciduais.

A Figura 6 mostra o peso do útero em animais OVX e não-OVX. Como esperado, o peso uterino foi menor nos grupos OVX em comparação com os grupos não-OVX ($P < 0,05$).

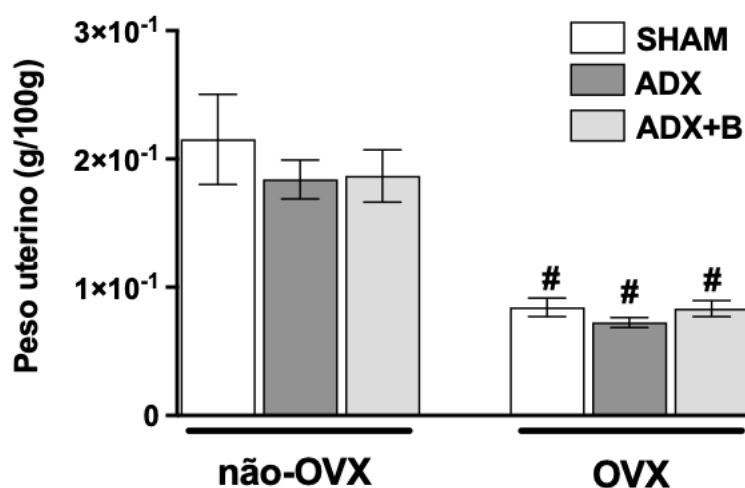


Figura 6 - Peso do útero (g/100g) de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX). Os dados são expressos como média \pm EPM, # $P < 0,05$ (OVX vs não-OVX), grupo (n= 5-12).

Como demonstra a figura 7A, no grupo de animais não-OVX, a ADX reduziu a ingestão alimentar ($P < 0,05$), e a administração da corticosterona reverteu essa resposta ($P < 0,05$). Na mesma figura, no grupo de animais que foi submetido a OVX houve um aumento da ingestão de alimentos nos animais sham, ADX e ADX+B ($P < 0,05$). Nos grupos OVX, a ADX também reduziu a ingestão alimentar ($P < 0,05$), e a administração da corticosterona reverteu essa resposta ($P < 0,05$). Como mostrado na figura 7B, a ADX e o tratamento com corticosterona (ADX+B) promoveram aumento de ingestão de fluídos nos grupos não-OVX e OVX ($P < 0,05$), os animais do grupo ADX+B não-OVX receberam em média uma dose de reposição de corticosterona de

0,43 ± 0,07 mg/100 g de peso animal e o grupo ADX+B OVX recebeu em média uma dose de corticosterona de 0,4 ± 0,08 mg/100 g de peso animal. A Figura 7C demonstra que a OVX promoveu aumento do peso corporal nos grupos de animais sham, ADX e ADX+B ($P < 0,05$), sem efeitos da ADX ou do tratamento com corticosterona (ADX+B). Não houve diferença significativa do índice Lee entre os grupos experimentais (figura 7D).

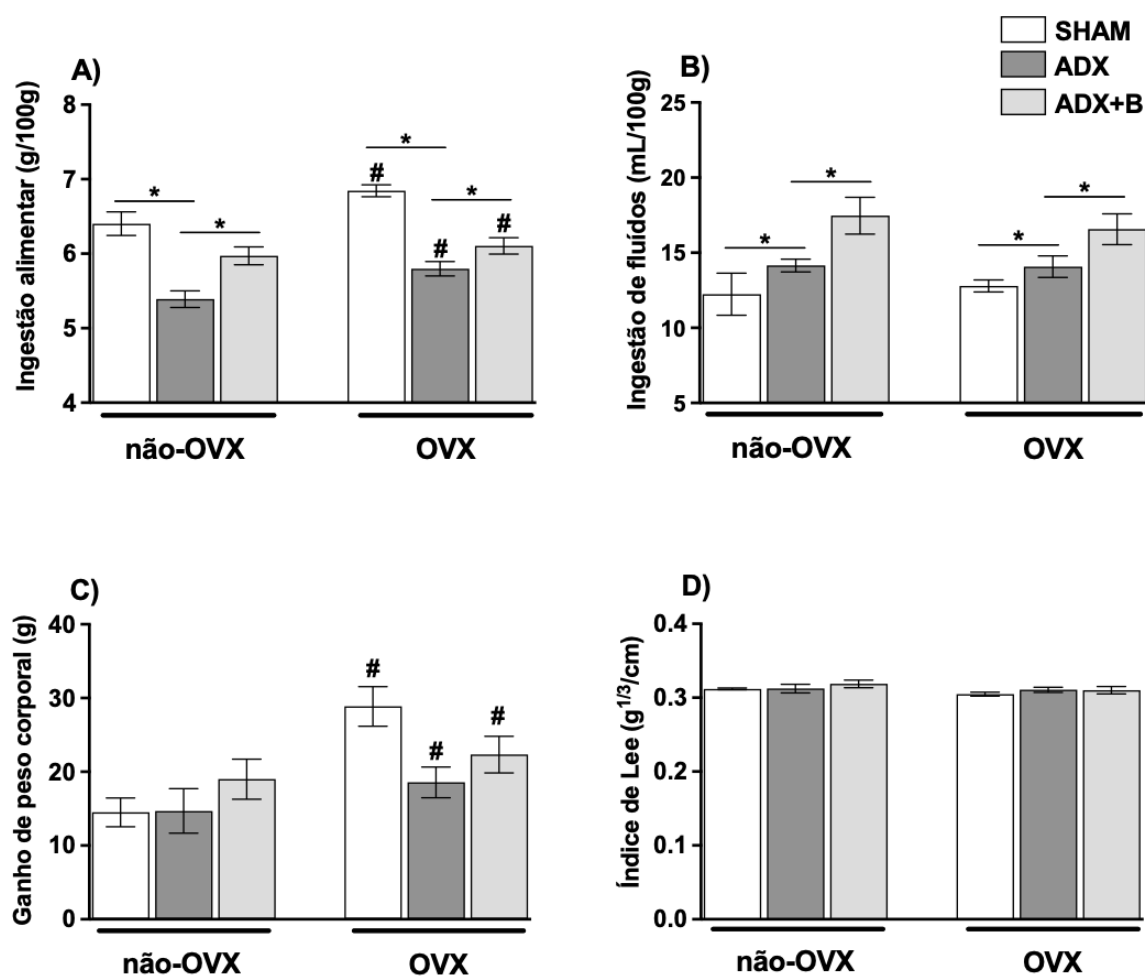


Figura 7 - (A) Ingestão alimentar (g/100g), (B) ingestão de fluídos (mL/100g), (C) ganho de peso corporal (g), (D) índice de Lee ($g^{1/3}/cm$) de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos de animais sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX). Os dados são expressos como média ± EPM, # (OVX vs não-OVX) e * correspondentes a $P < 0,05$, grupo (n= 5-12).

De acordo com a figura 8A, no estado basal, o grupo de animais ADX/OVX apresentou glicemia menor do que os animais ADX/não-OVX. Após 15 minutos de

sobrecarga de glicose, o efeito da ADX resultou em menor glicemia em animais não OVX ($P < 0,05$), e o grupo ADX/OVX apresentou glicemia maior que os animais ADX/não-OVX ($P < 0,05$). Além disso, aos 60 e 120 minutos do GTT, a glicemia do grupo sham/OVX foi maior ($P < 0,05$) do que o grupo sham/não-OVX, enquanto todos os grupos ADX, com ou sem tratamento com corticosterona, apresentaram glicemia reduzida ($P < 0,05$). Aos 120 minutos de GTT, a ADX, com ou sem tratamento com corticosterona, reduziu a glicemia tanto dos animais OVX quanto nos não-OVX ($P < 0,05$). Toda a resposta da glicemia após o GTT foi integrada na área sob a curva (AUC). A OVX promoveu o aumento da glicemia em animais sham ($P < 0,05$), e a ADX reduziu a glicemia em comparação com animais sham em ambos os grupos não-OVX e OVX ($P < 0,05$), mas não se observou efeitos do tratamento com corticosterona (figura 8B).

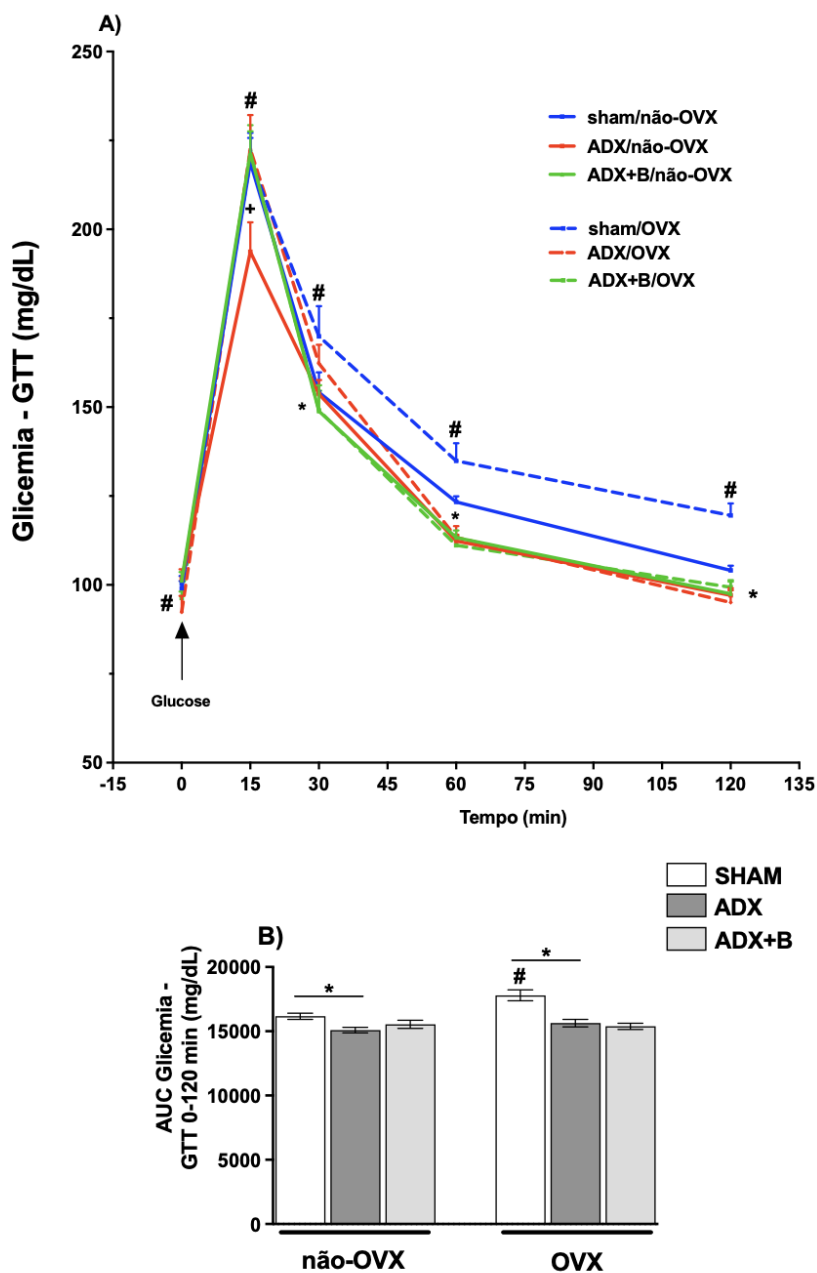


Figura 8 - (A) Teste de tolerância à glicose (GTT) e (B) área sob a curva (AUC) de GTT de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX). Os dados são expressos como média \pm EPM, # (OVX vs não-OVX) e * correspondentes a $P < 0,05$, grupo (n= 6-12). Foi administrado glicose à 25% por via intraperitoneal na concentração de 1,0 g/kg de peso corporal para cada animal.

Na figura 9A e 9D, observou-se que não houve diferença entre os grupos relativos as concentrações de triacilgliceróis e de concentrações de plasmáticas de

ácidos graxos livres, respectivamente. Por outro lado, na figura 9B, houve aumento nas concentrações plasmáticas de colesterol total após a OVX em animais sham, ADX e ADX+B se comparados com seus respectivos grupos nos animais não-OVX ($P < 0,05$). Além disso, o grupo ADX+B/OVX também apresentou concentrações mais elevadas de colesterol total do que o grupo ADX/OVX ($P < 0,05$) (Figura 9B). A ADX, na figura 9C, com ou sem tratamento com corticosterona, mostrou concentrações mais baixas de corticosterona plasmática nos animais não-OVX e OVX ($P < 0,05$). Este parâmetro também foi reduzido pela OVX nos animais sham quando comparados com o grupo de animais não-OVX ($P < 0,05$).

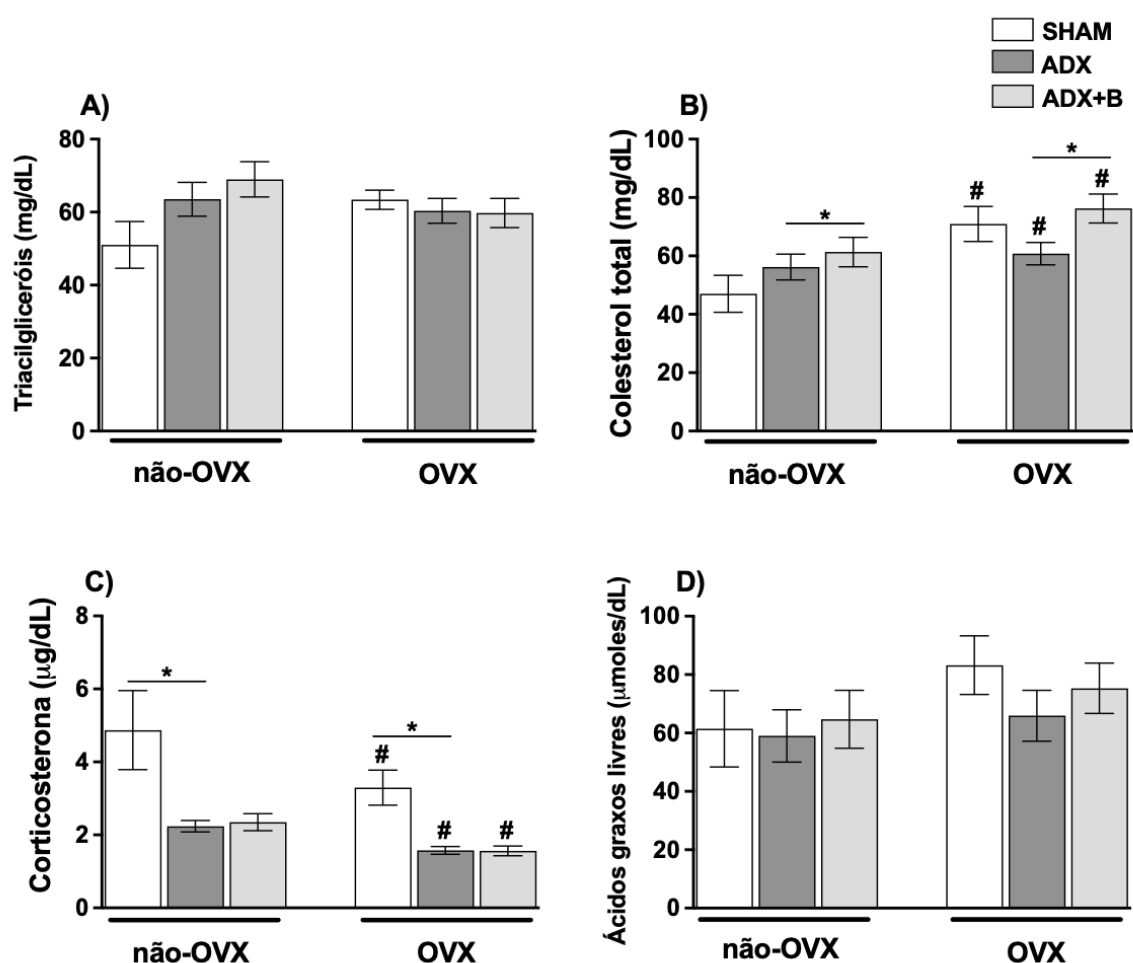


Figura 9 – Concentrações plasmáticas de (A) triacilgliceróis (mg/dL), (B) colesterol (mg/dL), (C) corticosterona (ug/dL), (D) ácidos de graxos livres (umoles/dL) de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX). Os dados são expressos como média \pm EPM, # (OVX vs não-OVX) e * correspondentes a $P < 0,05$, grupo (n= 6-12).

A Figura 10A demonstra que a OVX levou a redução de peso dos tecidos adiposos perirrenal + perigonadal nos grupos ADX e ADX+B, e tanto a ADX quanto o tratamento com corticosterona (ADX+B) reduziram o peso deste tecido adiposo quando comparados aos respectivos grupos não-OVX. Na Figura 10C, observa-se que não houve diferenças entre os grupos na área de adipócitos destes mesmos depósitos de tecido adiposo. No tecido adiposo retroperitoneal, a OVX aumentou tanto o peso quanto a área dos adipócitos (Figuras 10B, D e E), e a ADX reduziu esses parâmetros no grupo de animais OVX, e área de adipócitos de animais não-OVX. O tratamento com corticosterona reverteu os efeitos da ADX na redução da área de adipócitos em animais não-OVX e o peso no grupo de animais OVX.

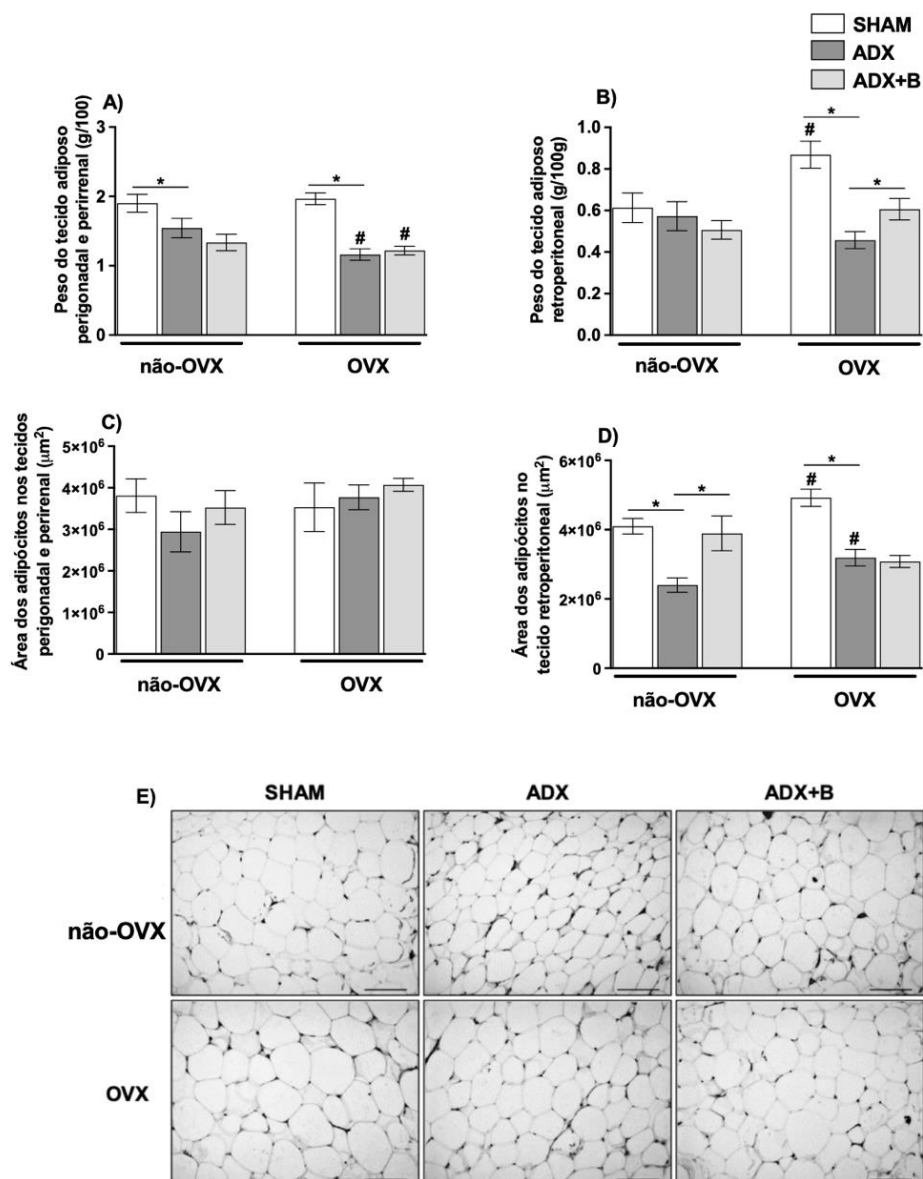


Figura 10 - Peso (g/100g) e área dos adipócitos (μm^2) dos tecidos adiposos perirrenal + perigonadal (A,C) e retroperitoneal (B,D,E) de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX). Os dados são expressos como média \pm EPM, # (OVX vs não-OVX) e * correspondentes a $P < 0,05$, grupo (n=6-12). Em (E) fotomicrografias representativas (aumento de 100x) de tecido adiposo retroperitoneal, marcados com hematoxilina-eosina, de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX).

Os resultados do estresse oxidativo no tecido hepático são apresentados na figura 11, o que mostra que não houve diferença no teor de MDA no fígado entre os grupos (figura 11A). A ADX promoveu redução nas concentrações de CAT (figura 11B) em animais não-OVX ($P < 0,05$), e o tratamento com corticosterona não reverteu esse efeito. Já a OVX reduziu os níveis de CAT no fígado de animais sham ($P < 0,05$), e a ADX reverteu esse efeito ($P < 0,05$). As concentrações de CAT no fígado dos grupos ADX e ADX+B foram maiores em animais OVX do que não-OVX ($P < 0,05$). Como mostrado na figura 11C, não houve alteração nas concentrações de GSH nos grupos não-OVX. A OVX reduziu a concentração de GSH no fígado de animais sham e ADX, mas não no grupo ADX+B, que apresentou níveis mais altos ($P < 0,05$) de GSH do fígado do que animais ADX. O tratamento com corticosterona promoveu a redução ($P < 0,05$) de GST no fígado de animais não-OVX e OVX, em comparação com o grupo ADX ($P < 0,05$). OVX diminuiu ($P < 0,05$) os níveis de GST em animais sham e ADX (figura 11D).

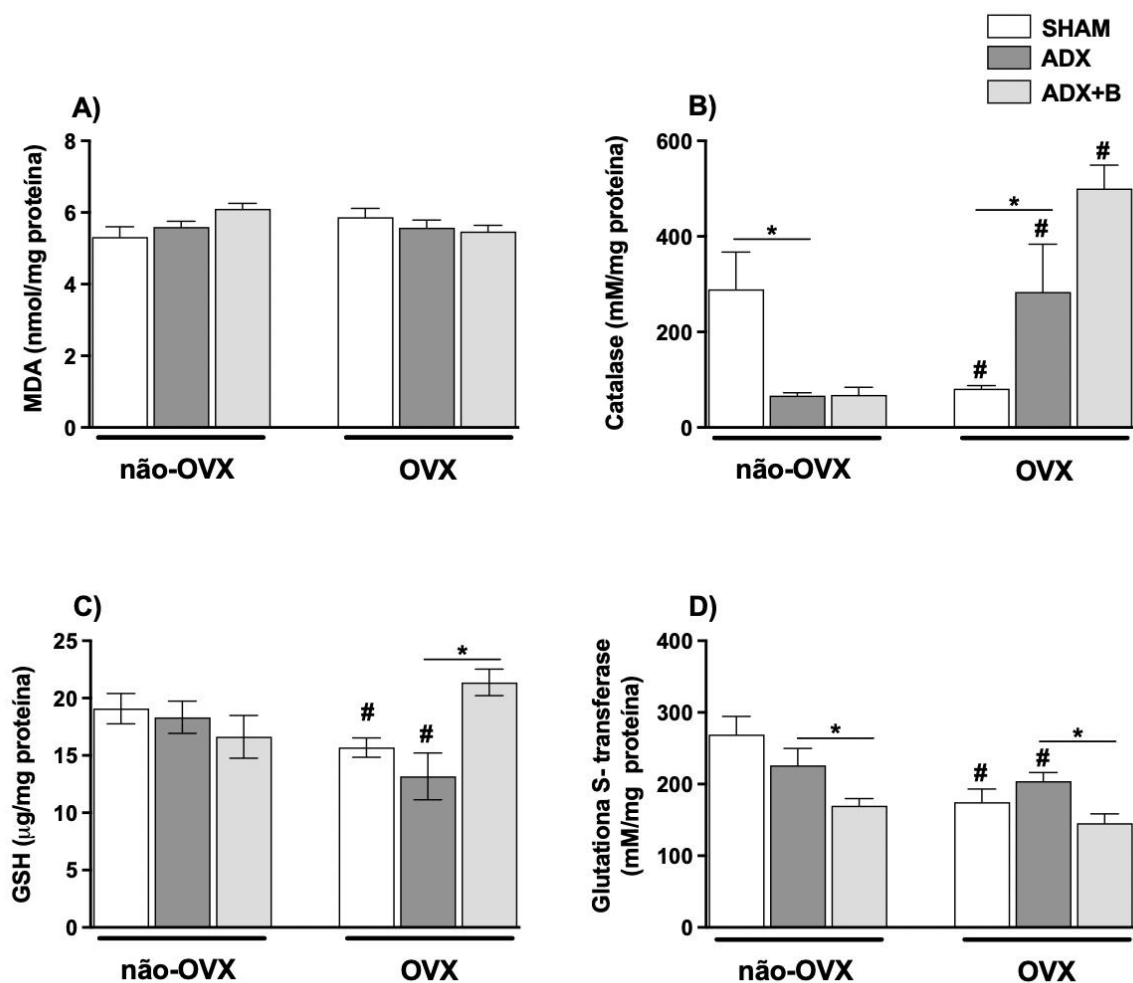


Figura 11 - (A) MDA (nmol/mg de proteína), (B) CAT (mM/mg de proteína), (C) GSH ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína), (D) GST (mM/mg de proteína) no tecido hepático de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX). Os dados são expressos como média \pm EPM, # (OVX vs não-OVX) e * correspondentes a $P < 0,05$, grupo ($n = 7-12$).

A Figura 12A demonstra que a OVX induziu aumento nas concentrações de MDA no tecido adiposo retroperitoneal de animais sham e ADX, e redução no grupo que foi tratado com corticosterona (ADX+B), que apresentou níveis mais baixos de MDA, em comparação com os animais ADX. A OVX reduziu ($P < 0,05$) níveis de CAT no tecido adiposo retroperitoneal em animais sham, ADX e ADX+B, sem diferenças entre os três grupos (figura 12B). A Figura 12C mostra que a OVX diminuiu ($P < 0,05$) as concentrações de GSH no tecido adiposo retroperitoneal em animais sham e ADX

quando comparado com os mesmos grupos dos animais não-OVX. E, finalmente, a OVX aumentou os níveis de GST em animais sham e a ADX reduziu essa resposta ($P < 0,05$) (figura 12D).

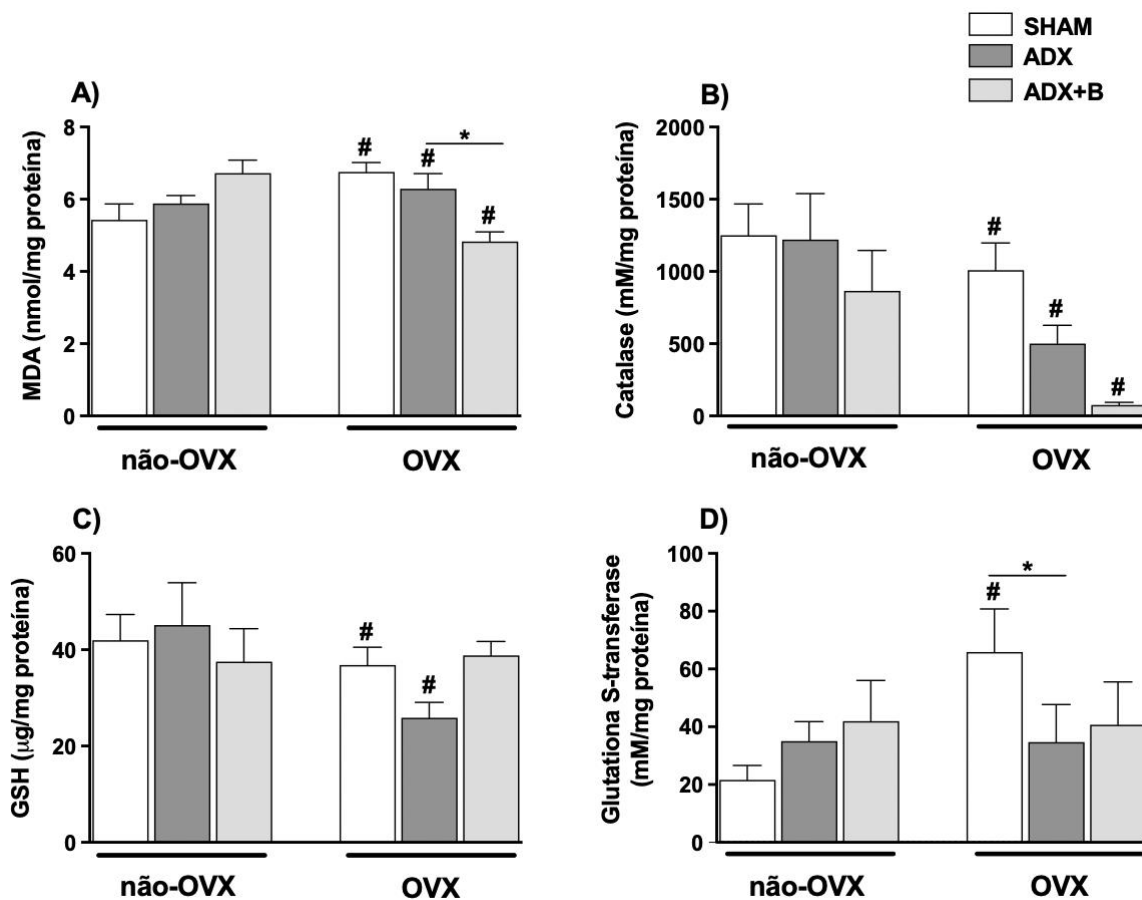


Figura 12 - (A) MDA (nmol/mg de proteína), (B) CAT (mM/mg de proteína), (C) GSH (μg/mg de proteína), (D) GST (mM/mg de proteína) no tecido adiposo retroperitoneal de animais não-OVX ou OVX, que foram subdivididos em grupos sham (sham/não-OVX ou sham/OVX), ADX (ADX/não-OVX ou ADX/OVX) ou ADX+B (ADX+B/não-OVX ou ADX+B/OVX). Os dados são expressos como média ± EPM, # (OVX vs não-OVX) e * correspondentes a $P < 0,05$, grupo (n= 7-12).

7 - Discussão

Os dados do presente estudo mostram que a ovariectomia aumentou a ingestão de alimentos, o ganho de peso corporal, área de adipócitos e peso de tecido adiposo retroperitoneal, concentrações plasmáticas de colesterol e glicemia no GTT. A ADX foi capaz de atenuar essas respostas induzidas pela OVX, e o tratamento com corticosterona foi parcialmente eficaz na reversão dos efeitos da ADX. Curiosamente, essas alterações metabólicas induzidas pela OVX foram associadas com desequilíbrio oxidativo no fígado e tecido adiposo retroperitoneal, e a ADX atenuou parte desses efeitos.

A eficácia da OVX foi confirmada pelo menor peso do útero em todos os animais que foram submetidos à OVX. A OVX tem sido amplamente usada para induzir a depleção dos hormônios ovarianos, e assim mimetizar o modelo de síndrome metabólica da menopausa em animais experimentais (MEDINA-CONTRERAS et al., 2020). A maioria dos estudos usando o modelo de OVX para estudar a homeostase energética realizou sua análise várias semanas ou meses após a OVX (COSTA-BEBER et al., 2021; MEDINA-CONTRERAS et al., 2020; PRATCHAYASAKUL; CHATTIPAKORN; CHATTIPAKORN, 2014; YEH et al., 2021); assim, o presente trabalho mostra que os efeitos anabólicos da OVX, e seus efeitos colaterais como desequilíbrio oxidativo, ocorrem nas primeiras semanas após a OVX.

Assim, o aumento do ganho de peso corporal, associado ao aumento da ingestão de alimentos após a OVX em animais sham, está de acordo com relatos na literatura, que mostram que a deficiência de hormônios ovarianos, especialmente estrogênios, leva ao aumento da ingestão alimentar e do peso corporal (ROBERTS; KENNEY; MOOK, 1972; TARTTELIN; GORSKI, 1973). A relação dos estrogênios com tais efeitos é corroborada pelos experimentos de Silva e colaboradores que demonstraram que o tratamento com estrogênio em animais OVX leva a menor consumo alimentar e ganho de peso corporal, associada à redução da expressão dos neuropeptídeos orexígenos neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado ao agouti (AgRP), e aumento da expressão do neuropeptídeo anorexígeno hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no hipotálamo (SILVA et al., 2010). Outro aspecto a ser considerado é o índice de Lee, que é equivalente ao índice de massa corporal (IMC) para humanos e é uma ferramenta muito importante e rápida para detectar a obesidade em modelos experimentais utilizando roedores (BERNARDIS;

PATTERSON, 1968); no entanto, este parâmetro não foi alterado no presente trabalho, devido possivelmente ao curto período de tempo deste protocolo experimental.

Além da ingestão alimentar e do ganho de peso corporal, o aumento da área de adipócitos e do peso relativo do tecido adiposo branco retroperitoneal e das concentrações plasmáticas de colesterol plasmático induzido pela OVX corroboram dados da literatura (BABAEI et al., 2010; NIGRO et al., 2014; SAENGSIKISUWAN et al., 2009a; WOHLERS; SPANGENBURG, 2010). No rato, o tecido adiposo visceral é composto pelos depósitos retroperitoneal, perirrenal, perigonadal e mesentérico (LUONG; HUANG; LEE, 2019). A obesidade é caracterizada pela remodelação do tecido adiposo associada à hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos. Assim, a hipertrofia dos adipócitos no tecido adiposo retroperitoneal induzida pela OVX pode ser devido às mudanças no metabolismo deste depósito, como aumento da via da lipogênese, pelo aumento da expressão e atividade da enzima lipogênica lipase lipoproteica (LPL), indicando uma alta capacidade do tecido adiposo retroperitoneal na captação de ácidos graxos livres derivados da lipoproteína (BOLDARINE et al., 2020; MAURIÈGE et al., 2000; PICARD et al., 2000), além de maior expressão da ácido graxo sintase, uma enzima lipogênica envolvida na síntese de ácidos graxos, e da proteína de ligação de ácidos graxos 4 (FABP4), uma proteína de transporte para ácidos graxos e também um facilitador do transporte, absorção e metabolismo lipídico (LEU et al., 2017). Além disso, o aumento do tecido adiposo visceral em animais OVX também pode ser atribuído à menor atividade da via de oxidação de ácidos graxos (BOLDARINE et al., 2020), e é possível que o aumento da concentração de colesterol plasmático em resposta a OVX seja devido ao aumento da fração de colesterol LDL (NIGRO et al., 2014; SAENGSIKISUWAN et al., 2009b).

A homeostase glicêmica foi avaliada pelo teste de tolerância à glicose, e a hiperglicemia observada em animais OVX em resposta à sobrecarga de glicose pode ser devido à resistência à insulina induzida pela ausência de hormônios ovarianos (MACDONALD et al., 2015). Neste contexto, a redução da tolerância à glicose observada em animais OVX tem sido associada a um prejuízo na captação de glicose mediada pela insulina no músculo esquelético (SAENGSIKISUWAN et al., 2009b), e diminuição da via de sinalização de insulina, transporte e utilização de glicose (MIN et al., 2018; OLATUNJI et al., 2019).

O estresse oxidativo tem sido associado à obesidade e síndrome metabólica (FURUKAWA et al., 2004; MASLOV et al., 2019). No presente estudo, a obesidade induzida pela OVX e as alterações metabólicas estão associadas à redução de sistemas antioxidantes como catalase, glutatona e glutatona S-transferase no fígado, além da diminuição da catalase e da glutatona no tecido adiposo retroperitoneal, associado ao aumento de MDA neste tecido adiposo. De fato, a OVX tem se mostrado capaz de promover aumento do estresse oxidativo hepático, diminuindo mediadores antioxidantes no fígado (ABBAS; ELSAMANOUDY, 2011; DA ROCHA et al., 2011). Por outro lado, a maioria dos estudos relata desequilíbrio oxidativo induzido pela OVX no tecido adiposo perigonadal (YEH et al., 2021), mas não em tecido retroperitoneal, exceto pelo trabalho de AMENGUAL-CLADERA e colaboradores (2012), que não observou desbalanço oxidativo no tecido adiposo retroperitoneal após a OVX. Assim, é provável que a intolerância à glicose e maior adiposidade observada após a OVX esteja relacionada com o desequilíbrio oxidativo no fígado e tecido adiposo retroperitoneal.

Diferentes estudos têm demonstrado que a maioria dos modelos experimentais de obesidade apresentam altas concentrações de corticosterona circulante, e que alterações metabólicas podem ser atenuadas ou revertidas pela ADX (BRUCE et al., 1982; DUBUC; WILDEN, 1986; MAKIMURA et al., 2000; YUKIMURA; BRAY; WOLFSEN, 1978), indicando que os glicocorticoides contribuem para a obesidade nesses modelos experimentais. No presente trabalho, os animais OVX apresentaram concentrações mais baixas de corticosterona plasmática, como demonstrado em relatos anteriores (DESHAIES et al., 1997; MCCORMICK, 2011), mas a ADX também foi capaz de atenuar as alterações metabólicas induzidas pela OVX, sugerindo que glicocorticoides também são necessários para a obesidade induzida pela falha da função ovariana. De fato, a OVX induz maior expressão de receptores para glicocorticoides (GR) e de receptores de mineralocorticoides (MR) no hipotálamo, especialmente no núcleo paraventricular (PVN) (MATYŠKOVÁ et al., 2010; SILVA et al., 2010), que pode compensar as concentrações mais baixas de corticosterona após a OVX e, conseqüentemente, justificar que a ADX também é capaz de atenuar alterações metabólicas induzidas pela OVX. De acordo com estes efeitos, as concentrações teciduais locais de glicocorticoides dependem não apenas das concentrações circulantes do hormônio, mas também da conversão de 11-dehidrocorticosterona para corticosterona em roedores, através da ação da enzima

11 β -hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 1 (11 β HSD1) (PAULSEN et al., 2008). Diante disso, a interação entre hormônios gonadais e os glicocorticoides pode ser evidenciada pela regulação da expressão aumentada da 11 β HSD1 no tecido adiposo visceral induzido pela OVX, o que pode contribuir para o efeito estimulante da OVX na hipertrofia do tecido adiposo retroperitoneal (ANDERSSON et al., 2010; PAULSEN et al., 2008).

Como já mencionado, o presente estudo mostra que o incremento da ingestão alimentar, o ganho de peso corporal, a adiposidade do tecido adiposo retroperitoneal, as concentrações plasmáticas de colesterol, bem como a intolerância à glicose foram atenuadas e até revertidas pela ADX. De fato, alguns achados na literatura já haviam demonstrado correlações entre a glândula adrenal e esteroides ovarianos, indicando que a ADX foi capaz de reverter parâmetros metabólicos da obesidade, como ingestão em excesso, peso corporal, hipertrigliceridemia, adiposidade e atividade de LPL no tecido adiposo retroperitoneal, que foram induzidos pela OVX química ou física (DESHAIES et al., 1997; GRUNT, 1964; OUEGHI; RIVEST; RICHARD, 1992), sugerindo, portanto, uma participação de corticoides na obesidade induzida pela falha da função ovariana. De fato, o bloqueio específico do MR, mas não do GR, poderia atenuar os efeitos induzidos pela OVX, principalmente no aumento de tecido adiposo, evidenciando que a ocupação do MR por corticosteroides facilita os efeitos da OVX no equilíbrio energético (DESHAIES et al., 1997). Além disso, sabe-se que os glicocorticoides atuam como fator importante no controle do comportamento alimentar, estimulando a ingestão alimentar e o ganho de peso corporal em diferentes espécies (KARATSOREOS et al., 2010; TATARANNI et al., 1996; ZAKRZEWSKA et al., 1999); assim, a hipofagia e o menor ganho de peso corporal causados pela ADX corroboram dados da literatura que mostram que, em ratos machos, a ADX reduz a ingestão de alimentos e o ganho de peso corporal, e esses efeitos são pelo menos parcialmente revertidos pela reposição de corticosteroides. Esta hipofagia em resposta a ADX está associada à expressão reduzida de neuropeptídeos orexigênicos, como o NPY e o AgRP, e aumento da expressão de neuropeptídeos anorexigênicos, como o CRH e a ocitocina (AIRES, 2012b; UCHOA et al., 2009b, 2010, 2012) .

O presente estudo é pioneiro para mostrar que a ADX é capaz de amenizar a intolerância à glicose induzida pela OVX, evidenciando que os glicocorticoides podem contribuir para o prejuízo da homeostase de glicose causada pela falha da função ovariana. De fato, TURKENKOPF e colaboradores (1991) demonstraram que a ADX

foi capaz de reduzir a intolerância à glicose, hiperglicemia e hiperinsulinemia induzida por diferentes modelos de obesidade. Neste contexto, a ADX melhorou a sensibilidade à insulina no fígado e músculo de camundongos hiperglicêmicos e hiperinsulinêmicos (HALUZÍK et al., 2002), além de melhorar a fosforilação da AKT induzida pela insulina no músculo esquelético (LONG et al., 2003). Assim, a espironolactona, um conhecido antagonista do MR, melhorou a obesidade induzida pela OVX e a resistência à insulina, pelo menos em parte, pela supressão da glicogênio sintase quinase-3 (GSK3), uma quinase serina/treonina amplamente expressa que pode servir como modulador negativo da ação de insulina na síntese de glicogênio (OLATUNJI et al., 2019).

Os efeitos da adrenalectomia e, conseqüentemente, dos glicocorticoides no estresse oxidativo são controversos, uma vez que a literatura traz alguns estudos mostrando que a adrenalectomia ou bloqueio de receptores de corticosteroides pode amenizar o desequilíbrio oxidativo em diferentes tecidos (OHTAKE et al., 2014; RAMÍREZ et al., 2009; TAKAHASHI et al., 2015; TAKESHITA et al., 2015), enquanto outros estudos mostram que a ADX pode piorar esse efeito (HAMADI et al., 2016; SHUTO et al., 2009). No presente estudo, a ADX foi capaz de reverter a redução da catalase hepática induzida pela OVX, sem alterações em outros parâmetros no fígado ou tecido adiposo retroperitoneal, sugerindo um possível efeito protetor da ADX no estresse oxidativo induzido pela OVX pela modulação da catalase hepática. Em concordância, os efeitos dos corticosteroides na interrupção da homeostasia glicêmica e lipídica relacionada ao desbalanço oxidativo foram mostrados, uma vez que o bloqueio GR e MR foi capaz de atenuar a perda da regulação de glicose induzida por contraceptivos orais e acúmulo lipídico hepático, associado à melhor defesa antioxidante no fígado (BADMUS; OLATUNJI, 2019). Assim, pode-se sugerir que a ADX previne o prejuízo da homeostase de glicose induzida pela deficiência de hormônios gonadais, pelo menos em parte, por atenuar o estresse oxidativo no fígado.

A não reversão das concentrações de corticosterona plasmática e, conseqüentemente, a falta de efeitos do tratamento com corticosterona para animais ADX em alguns parâmetros, foram achados inesperados. A menor ingestão de fluidos pode ser descartada, uma vez que o grupo ADX com tratamento de corticosterona apresentou maior ingestão de fluidos. Uma possível explicação é o horário da coleta de sangue no período da tarde, já que o animal tem o hábito de dormir durante o dia, e praticamente não bebe líquido durante o dia, o que pode levar a uma redução nas

concentrações plasmáticas de corticosterona (UCHOA et al., 2009a, 2019). No entanto, a reposição com corticosterona mostrou-se, pelo menos em parte, eficaz em reverter ou atenuar os efeitos da ADX, uma vez que alguns parâmetros foram parcial ou totalmente restaurados em animais ADX+B. Em animais OVX, a falta de efeitos do tratamento da corticosterona também pode ser atribuída à baixa concentração de corticosterona utilizada como tratamento, uma vez que DESHAIES e colaboradores (1997) demonstraram que os efeitos da OVX no ganho de tecido adiposo e no metabolismo lipídico foram restaurados pelo tratamento com corticosterona em altas concentrações em ratos ADX, mas não quando utilizada uma baixa concentração de corticosterona. Adicionalmente, além dos corticosteroides, a progesterona também pode ser necessária para restaurar as alterações induzidas pela ADX, uma vez que o tratamento com progesterona aumentou a ingestão de alimentos e promoveu ganho de peso corporal em animais submetidos à ADX e a OVX (ROBERTS; KENNEY; MOOK, 1972), e a progesterona também aumentou a ingestão alimentar de ratas adrenalectomizadas na fase pré-puberal, mas não em ratas ovariectomizadas de qualquer outra idade (ROSS, 1974).

Em conclusão, os achados do presente estudo indicam que a ovariectomia aumenta a ingestão de alimentos, o ganho de peso corporal, a adiposidade do tecido adiposo retroperitoneal, as concentrações plasmáticas de colesterol total e a glicemia no GTT, além de promover desequilíbrio oxidativo no fígado e no tecido adiposo retroperitoneal. Curiosamente, a ADX foi capaz de atenuar essas respostas induzidas pela OVX, e o tratamento com corticosterona reverteu parcialmente os efeitos da ADX. Assim, os corticosteroides participam dos efeitos anabólicos induzidos pela OVX, que estão associados ao estresse oxidativo no fígado e tecido adiposo visceral.

8 - Referências Bibliográficas

ABBAS, A. M.; ELSAMANOUDY, A. Z. Effects of 17 β -estradiol and antioxidant administration on oxidative stress and insulin resistance in ovariectomized rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 89, n. 7, p. 497–504, jul. 2011.

ABESO. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2016 4ª edição**. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Anais...**São Paulo: 2016.

AEBI, H. Catalase in vitro. Em: [s.l: s.n.]. p. 121–126.

AIRES, M. M. Glândula Adrenal. Em: AIRES, M. M. (Ed.). **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2012a. v. 1p. 1086–1086.

AIRES, M. M. Bases neurais dos comportamentos motivados e das emoções. Em: AIRES, M. M. (Ed.). **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2012b. v. 1p. 356–356.

ALLAIN, C. C. et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical chemistry**, v. 20, n. 4, p. 470–5, abr. 1974.

AL-SAFI, Z. A.; POLOTSKY, A. J. Obesity and Menopause. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 29, n. 4, p. 548–553, maio 2015.

AMENGUAL-CLADERA, E. et al. Retroperitoneal white adipose tissue mitochondrial function and adiponectin expression in response to ovariectomy and 17 β -estradiol replacement. **Steroids**, v. 77, n. 6, p. 659–665, maio 2012.

ANDERSSON, T. et al. Estrogen Reduces 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Liver and Visceral, but Not Subcutaneous, Adipose Tissue in Rats. **Obesity**, v. 18, n. 3, p. 470–475, mar. 2010.

ARAI, M. et al. Mitochondrial Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Plays a Major Role in Preventing Oxidative Injury to Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 8, p. 4924–4933, fev. 1999.

BABAEI, P. et al. Effects of ovariectomy and estrogen replacement therapy on visceral adipose tissue and serum adiponectin levels in rats. **Menopause International**, v. 16, n. 3, p. 100–104, 18 set. 2010.

BADMUS, O. O.; OLATUNJI, L. A. Involvement of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in lipid accumulation and depressed G6PD activity in the livers of rats treated

with postpartum oral estrogen-progestin. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 392, n. 8, p. 913–924, 23 ago. 2019.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **The Journal of endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527–528, abr. 1968.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288–298, 27 maio 2019.

BOLDARINE, V. T. et al. Ovariectomy modifies lipid metabolism of retroperitoneal white fat in rats: a proteomic approach. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 319, n. 2, p. E427–E437, 1 ago. 2020.

BONNES-TAOUREL, D.; GUÉRIN, M. C.; TORREILLES, J. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? **Biochemical pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 985–8, 1 set. 1992.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRUCE, B. K. et al. Effects of adrenalectomy and corticosterone administration on hypothalamic obesity in rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 243, n. 2, p. E152–E157, 1 ago. 1982.

BUENO, J. R. Cortisol e exercício: efeitos, secreção e metabolismo. **Revista Brasileira de Fisiologia do Exercício**, v. 10, n. 3, p. 178, 10 set. 2011.

CABALLERO, B. Humans against Obesity: Who Will Win? **Advances in Nutrition**, v. 10, n. suppl_1, p. S4–S9, jan. 2019.

CALDWELL, M. et al. Prospects for the Primary Prevention of Myocardial Infarction and Stroke. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, n. 3, p. 207–214, 18 maio 2019.

CANALI, E. S.; KRUEL, L. F. M. Hormonal responses to exercise. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 15, n. 2, p. 141, 20 dez. 2001.

CHEN, H. C.; FARESE, R. V. Determination of adipocyte size by computer image analysis. **Journal of lipid research**, v. 43, n. 6, p. 986–9, jun. 2002.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 369–374, dez. 1985.

COSTA-BEBER, L. C. et al. Ovariectomy enhances female rats' susceptibility to metabolic, oxidative, and heat shock response effects induced by a high-fat diet and fine particulate matter. **Experimental Gerontology**, v. 145, 1 mar. 2021.

CURI, R.; PROCOPIO, J. Hormônios Adrenais. Em: GUANABARA KOOGAN (Ed.). **Fisiologia Básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: [s.n.]. v. 1p. 712–728.

DA ROCHA, J. T. et al. Effects of diphenyl diselenide on lipid profile and hepatic oxidative stress parameters in ovariectomized female rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 5, p. 663–669, maio 2011.

DESHAIES, Y. et al. Interaction of corticosterone and gonadal steroids on lipid deposition in the female rat. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 273, n. 2, p. E355–E362, 1 ago. 1997.

DUBUC, P. U.; WILDEN, N. J. Adrenalectomy reduces but does not reverse obesity in ob/ob mice. **International Journal of Obesity**, v. 10, n. 2, p. 91–8, 1986.

FALHOLT, K.; LUND, B.; FALHOLT, W. An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fatty acids in plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 46, n. 2, p. 105–111, jun. 1973.

FEDERICI, G.; SHAW, B.; HANDY, R. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 415–430, 30 out. 2007.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 15 dez. 2004.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 1, p. 13–27, 6 jul. 2017.

GRUNT, J. A. Effects of Adrenalectomy and Gonadectomy on Growth and Development in. **Endocrinology**, v. 75, p. 446–51, set. 1964.

GUILLEMIN, R. et al. Measurement of free corticosteroids in rat plasma: physiological validation of a method. **Endocrinology**, v. 63, n. 3, p. 349–358, set. 1958.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Invited Review Free Radicals in Disease Processes: A Compilation of Cause and Consequence. **Free Radical Research Communications**, v. 19, n. 3, p. 141–158, 7 jan. 1993.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 502, n. 2, p. 183–186, jul. 2018.

HA, B. J. Oxidative stress in ovariectomy menopause and role of chondroitin sulfate. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 8, p. 867–872, ago. 2004.

HA, B. J. et al. The role of Salicornia herbacea in ovariectomy-induced oxidative stress. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 7, p. 1305–1309, 2006.

HALPERN, Z. S. C. C. et al. Determinantes fisiológicos do controle do peso e apetite. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 31, n. 4, p. 150–153, 2004.

HALUZÍK, M. et al. Serum leptin levels in patients with primary hyperaldosteronism before and after treatment: relationships to insulin sensitivity. **Journal of Human Hypertension**, v. 16, n. 1, p. 41–45, 1 jan. 2002.

HAMADI, N. et al. Increased pro-inflammatory cytokines, glial activation and oxidative stress in the hippocampus after short-term bilateral adrenalectomy. **BMC Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 61, 1 dez. 2016.

HERMOSO, D. A. M. et al. Melatonin protects female rats against steatosis and liver oxidative stress induced by oestrogen deficiency. **Life Sciences**, v. 157, p. 178–186, 15 jul. 2016.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 214–226, jul. 1976.

KARATSOREOS, I. N. et al. Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: A potential model of the metabolic syndrome in mouse. **Endocrinology**, v. 151, n. 5, p. 2117–2127, 1 maio 2010.

KARVONEN-GUTIERREZ, C. A.; PARK, S. K.; KIM, C. **Diabetes and Menopause. Current Diabetes Reports**, 2016.

KAUL, K. et al. Introduction to Diabetes Mellitus. Em: [s.l: s.n.]. p. 1–11.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **The Journal of biological chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–8, 25 out. 1976.

KIM, S.; MOUSTAID-MOUSSA, N. **Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte**. Journal of Nutrition. **Anais...dez.** 2000.

- LEE, S.-H.; PARK, S.-Y.; CHOI, C. S. Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 46, n. 1, p. 15–37, 31 jan. 2022.
- LEU, S.-Y. et al. Raspberry Ketone Reduced Lipid Accumulation in 3T3-L1 Cells and Ovariectomy-Induced Obesity in Wistar Rats by Regulating Autophagy Mechanisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 50, p. 10907–10914, 20 dez. 2017.
- LONG, W. et al. Adrenalectomy enhances the insulin sensitivity of muscle protein synthesis. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 284, n. 1, p. E102–E109, 1 jan. 2003.
- LUONG, Q.; HUANG, J.; LEE, K. Y. Deciphering White Adipose Tissue Heterogeneity. **Biology**, v. 8, n. 2, p. 23, 11 abr. 2019.
- MACDONALD, T. L. et al. Exercise training is an effective alternative to estrogen supplementation for improving glucose homeostasis in ovariectomized rats. **Physiological Reports**, v. 3, n. 11, p. e12617, nov. 2015.
- MAKIMURA, H. et al. Adrenalectomy reverses obese phenotype and restores hypothalamic melanocortin tone in leptin-deficient ob/ob mice. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1917–1923, 1 nov. 2000.
- MASLOV, L. N. et al. Is oxidative stress of adipocytes a cause or a consequence of the metabolic syndrome? **Journal of Clinical & Translational Endocrinology**, v. 15, p. 1–5, mar. 2019.
- MATYŠKOVÁ, R. et al. Estradiol Supplementation Helps Overcome Central Leptin Resistance of Ovariectomized Mice on a High Fat Diet. **Hormone and Metabolic Research**, v. 42, n. 03, p. 182–186, 4 mar. 2010.
- MAURIÈGE, P. et al. Effect of a long-term percutaneous adrenal steroid treatment on rat adipose tissue metabolism. **International Journal of Obesity**, v. 24, n. S2, p. S148–S150, 24 jun. 2000.
- MAZZUCO, T. L. The Relationship between Obesity, Insulin Resistance and Aldosterone Levels. **Current Research in Diabetes & Obesity Journal**, v. 6, n. 1, 6 mar. 2018.
- MAZZUCO, T. L.; HERRERA, A. C.; FONSCECA, E. A. I. Interesse do Estudo dos Tumores Adrenocorticais em Patologia Experimental e Clínica. Em: WATANABE, M. A. E. (Ed.). **Tópicos em Patologia Experimental**. 1. ed. [s.l.] EDUEL, 2008. v. 1p. 177–200.

- MCCORMICK, C. M. Effect of neonatal ovariectomy and estradiol treatment on corticosterone release in response to stress in the adult female rat. **Stress**, v. 14, n. 1, p. 82–87, 28 jan. 2011.
- MEDINA-CONTRERAS, J. et al. Ovariectomized rodents as a menopausal metabolic syndrome model. A minireview. . 1 dez. 2020, p. 261–276.
- MEDINA-CONTRERAS, J. M. L. et al. Effects of topical capsaicin combined with moderate exercise on insulin resistance, body weight and oxidative stress in hypoestrogenic obese rats. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 5, p. 750–758, 1 maio 2017.
- MIN, W. et al. The decline of whole-body glucose metabolism in ovariectomized rats. **Experimental Gerontology**, v. 113, p. 106–112, nov. 2018.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Obesidade cresce 60% em dez anos no Brasil**.
- MOLINA, E. P. Integração endócrina do balanço energético e do equilíbrio eletrolítico. Em: MCGRAW-HILL (Ed.). **Fisiologia Endócrina**. 2. ed. São Paulo: [s.n.]. v. 1p. 259–262.
- MOLINA, E. P. Glândula supra-renal. Em: MCGRAW-HILL (Ed.). **Fisiologia Endócrina**. 2. ed. São Paulo: [s.n.]. v. 1p. 132–132.
- MONTEIRO, R. DE C. DE A.; RIETHER, P. T. A.; BURINI, R. C. Efeito de um programa misto de intervenção nutricional e exercício físico sobre a composição corporal e os hábitos alimentares de mulheres obesas em climatério. **Revista de Nutrição**, 2004.
- MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. . set. 2006, p. 289–295.
- MORTON, G. J.; MEEK, T. H.; SCHWARTZ, M. W. **Neurobiology of food intake in health and disease**. **Nature Reviews Neuroscience**, 2014.
- NIGRO, M. et al. A change in liver metabolism but not in brown adipose tissue thermogenesis is an early event in ovariectomy-induced obesity in rats. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 2881–91, ago. 2014.
- OGDEN, C. L. et al. The Epidemiology of Obesity. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2087–2102, maio 2007.
- OHTAKE, M. et al. Glucocorticoids activate cardiac mineralocorticoid receptors in adrenalectomized Dahl salt-sensitive rats. **Nagoya journal of medical science**, v. 76, n. 1–2, p. 59–72, fev. 2014.
- OLATUNJI, L. A. et al. Ameliorative effect of low-dose spironolactone on obesity and insulin resistance is through replenishment of estrogen in ovariectomized rats.

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, v. 97, n. 1, p. 65–74, jan. 2019.

OLIVEIRA, L. V. A. et al. Prevalência da Síndrome Metabólica e seus componentes na população adulta brasileira. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 11, p. 4269–4280, nov. 2020.

OLIVEROS, E. et al. The Concept of Normal Weight Obesity. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 56, n. 4, p. 426–433, jan. 2014.

OUERGHY, D.; RIVEST, S.; RICHARD, D. Adrenalectomy attenuates the effect of chemical castration on energy balance in rats. **Journal of Nutrition**, v. 122, n. 2, p. 369–373, 1 fev. 1992.

PARLEE, S. D. et al. Quantifying Size and Number of Adipocytes in Adipose Tissue. Em: [s.l: s.n.]. p. 93–122.

PAULSEN, S. K. et al. Upregulation of Adipose 11- β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Expression in Ovariectomized Rats Is due to Obesity Rather Than Lack of Estrogen. **Obesity**, v. 16, n. 4, p. 731–735, abr. 2008.

PICARD, F. et al. Effects of the estrogen antagonist EM-652.HCl on energy balance and lipid metabolism in ovariectomized rats. **International Journal of Obesity**, v. 24, n. 7, p. 830–840, 25 jul. 2000.

PINHEIRO, A. et al. **Fisiologia das Gônadas Femininas**. Disponível em: <http://members.tripod.com/~Medman_1/ovariectomia.html>.

PRATCHAYASAKUL, W.; CHATTIPAKORN, N.; CHATTIPAKORN, S. C. Estrogen restores brain insulin sensitivity in ovariectomized non-obese rats, but not in ovariectomized obese rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 63, n. 6, p. 851–859, 2014.

RAMÍREZ, V. et al. Adrenalectomy prevents renal ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 297, n. 4, p. F932–F942, out. 2009.

RICHARD, D. et al. Reversible increase in energy deposition following castration induced by a gonadotropin releasing hormone agonist. **International Journal of Obesity**, v. 15, n. 2, p. 155–61, fev. 1991.

ROBERTS, S.; KENNEY, N. J.; MOOK, D. G. Overeating induced by progesterone in the ovariectomized, adrenalectomized rat. **Hormones and Behavior**, v. 3, n. 3, p. 267–276, set. 1972.

ROSS, G. Progesterone and the ovarian-adrenal modulation of energy balance in rats. **Hormones and Behavior**, v. 5, n. 1, p. 43–62, mar. 1974.

SAENGSIRISUWAN, V. et al. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 58, n. 1, p. 38–47, jan. 2009a.

SAENGSIRISUWAN, V. et al. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 58, n. 1, p. 38–47, jan. 2009b.

SALINAS, A. E.; WONG, M. G. Glutathione S-transferases--a review. **Current medicinal chemistry**, v. 6, n. 4, p. 279–309, abr. 1999.

SAMSON, S. L.; GARBER, A. J. Metabolic Syndrome. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 43, n. 1, p. 1–23, mar. 2014.

SCHWARTZ, M. W. et al. **Central nervous system control of food intake. Nature**, 2000.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192–205, 1968.

SHUTO, M. et al. Endogenous and Exogenous Glucocorticoids Prevent Trimethyltin From Causing Neuronal Degeneration of the Mouse Brain In Vivo: Involvement of Oxidative Stress Pathways. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 110, n. 4, p. 424–436, 2009.

SIERVO, G. E. M. L. et al. Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: Influence of lipid peroxidation but not testosterone. **Toxicology**, v. 330, p. 1–8, abr. 2015.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 715–748, 20 jun. 2017.

SILVA, L. E. C. M. E. C. M. et al. Estradiol-induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 8, p. 759–766, ago. 2010.

SIQUEIRA, C. S. **Influência da adrenalectomia bilateral nos eventos neurodegenerativos no modelo de parkinsonismo experimental pela 6-OHDA nigral. Enfoque aos mecanismos parácrinos gliais envolvidos na neuroproteção e cicatrização.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.

SPENCER, S. J.; TILBROOK, A. The glucocorticoid contribution to obesity. **Stress**, v. 14, n. 3, p. 233–246, 6 maio 2011.

STOPA, L. R. S. et al. Sex differences in glucocorticoids-induced anabolic effects in rats. **Physiology & Behavior**, v. 209, p. 112587, out. 2019.

STUBBINS, R. E. et al. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 58–66, 2012.

TAKAHASHI, N. et al. The production of coagulation factor VII by adipocytes is enhanced by tumor necrosis factor- α or isoproterenol. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 5, p. 747–754, 15 maio 2015.

TAKESHITA, Y. et al. Blockade of glucocorticoid receptors with RU486 attenuates cardiac damage and adipose tissue inflammation in a rat model of metabolic syndrome. **Hypertension Research**, v. 38, n. 11, p. 741–750, 9 nov. 2015.

TARTTELIN, M. F.; GORSKI, R. A. The effects of ovarian steroids on food and water intake and body weight in the female rat. **Acta endocrinologica**, v. 72, n. 3, p. 551–568, mar. 1973.

TATARANNI, P. A. et al. Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 271, n. 2 Pt 1, p. E317-25, ago. 1996.

TIETZ, N. W.; FINLEY, P. R.; PRUDEN, E. L. **Clinical Guide to Laboratory Tests**. 3. ed. Filadélfia: Saunders, 1995. v. 1

TULAY AKCAY, Y. D. R. K. Effects of Hormone Replacement Therapy on Lipid Peroxides and Oxidation System in Postmenopausal Women. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 59, n. 1, p. 1–5, 14 jan. 2000.

TURKENKOPF, I. J. et al. Zucker and Wistar diabetic fatty rats show different response to adrenalectomy. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 261, n. 4, p. R912–R919, 1 out. 1991.

UCHOA, E.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. Corticotrophin-Releasing Factor Mediates the Hypophagia after Adrenalectomy through an Increased Satiety-Related Responses. Em: [s.l: s.n.].

UCHOA, E. T. et al. Hypophagia induced by glucocorticoid deficiency is associated with an increased activation of satiety-related responses. **Journal of Applied Physiology**, 2009a.

- UCHOA, E. T. et al. Hypothalamic oxytocin neurons modulate hypophagic effect induced by adrenalectomy. **Hormones and Behavior**, v. 56, n. 5, p. 532–538, nov. 2009b.
- UCHOA, E. T. et al. Corticotrophin-releasing factor mediates hypophagia after adrenalectomy, increasing meal-related satiety responses. **Hormones and Behavior**, v. 58, n. 5, p. 714–719, nov. 2010.
- UCHOA, E. T. et al. Glucocorticoids are required for meal-induced changes in the expression of hypothalamic neuropeptides. **Neuropeptides**, v. 46, n. 3, p. 119–124, jun. 2012.
- UCHOA, E. T. et al. Adrenalectomy impairs insulin-induced hypophagia and related hypothalamic changes. **Journal of Endocrinology**, 2019.
- VAN DER POL, A. et al. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. **European Journal of Heart Failure**, v. 21, n. 4, p. 425–435, 19 abr. 2019.
- WOHLERS, L. M.; SPANGENBURG, E. E. 17 β -estradiol supplementation attenuates ovariectomy-induced increases in ATGL signaling and reduced perilipin expression in visceral adipose tissue. **Journal of Cellular Biochemistry**, p. n/a-n/a, 2010.
- WOODS, S. C. et al. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. . 29 maio 1998, p. 1378–83.
- XANTHAKIS, V. et al. Relations between subclinical disease markers and type 2 diabetes, metabolic syndrome, and incident cardiovascular disease: the Jackson Heart Study. **Diabetes care**, v. 38, n. 6, p. 1082–8, jun. 2015.
- YEH, J.-H. et al. Effects of Dietary Fatty Acid Composition on Lipid Metabolism and Body Fat Accumulation in Ovariectomized Rats. **Nutrients**, v. 13, n. 6, p. 2022, 11 jun. 2021.
- YUKIMURA, Y.; BRAY, G. A.; WOLFSEN, A. R. Some Effects of Adrenalectomy in the Fatty Rat. **Endocrinology**, v. 103, n. 5, p. 1924–8, nov. 1978.
- ZAKRZEWSKA, K. E. et al. Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. **Diabetes**, v. 48, n. 2, p. 365–370, 1 fev. 1999.
- ZHOU, P.-Z. et al. Relationship Between Glucocorticoids and Insulin Resistance in Healthy Individuals. **Medical Science Monitor**, v. 22, p. 1887–1894, 3 jun. 2016.

9 - Apêndice

Anexo: Termo da Comissão de Ética no Uso de Animais em experimentação (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina.



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 200/2015

Londrina, 08 de Outubro de 2015.

Prezado Pesquisador,

Certificamos que o projeto intitulado "**Participação dos glicocorticoides nas respostas induzidas pela ovariectomia na homeostase energética**", protocolo CEUA nº **16085.2015.20**, 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/UDEL), em reunião realizada em **22/09/2015**.

O projeto tem como objetivo avaliar o efeito da adrenalectomia nas respostas induzidas pela ovariectomia na homeostase energética. Para isso os animais serão divididos em grupos experimentais e receberão fluidos de ingestão que variarão de acordo com o grupo: água corrente contendo etanol 0,5% para os grupos submetidos à cirurgia fictícia da adrenalectomia (sham ADX), NaCl 0,9% contendo etanol 0,5% para os grupos submetidos à cirurgia de adrenalectomia (ADX) e NaCl 0,9%, contendo corticosterona (25mg/L) diluída em etanol 0,5% para os grupos submetidos à cirurgia de adrenalectomia com reposição com corticosterona (ADX+B). As ratas não-ovariectomizadas terão o esfregaço vaginal colhido diariamente para o acompanhamento do estágio do ciclo estral. No 15º dia todos os animais serão eutanasiados por decapitação. Serão avaliados parâmetros metabólicos plasmáticos (glicose, ácidos graxos livres, colesterol, corticosterona, insulina e leptina), ingestão alimentar, ganho de peso corporal, peso de tecido adiposo e branco visceral, análise histomorfométrica de tecido adiposo branco visceral, tolerância à glicose e índice de Lee.

Vigência do Projeto	01/10/2015 a 30/09/2018
Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	144
Peso/idade	230-250g
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central da UEL
Amostras a serem coletadas	Sangue, cérebro, tecido adiposo

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

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

Waldiceu Ap. Verri Júnior

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Júnior
Coordenador da CEUA/UDEL

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa

Coordenador do Projeto

Departamento de Ciências Fisiológicas / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para André Junior da Conceição (Chefe da DP-IC/PROPPG), Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL), Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas