



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS UFSCAR/UNESP**

LUCIANE MAGRI TOMAZ

**O TREINAMENTO RESISTIDO PROMOVE MODULAÇÕES GÊNICA E
PROTEICA DE SINALIZADORES DO METABOLISMO GLICOLÍTICO NO
FÍGADO DE RATAS OVARIETOMIZADAS**

**SÃO CARLOS
2013**

**O TREINAMENTO RESISTIDO PROMOVE MODULAÇÕES GÊNICA E
PROTEICA DE SINALIZADORES DO METABILISMO GLICOLÍTICO NO
FÍGADO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS UFSCAR/UNESP**

LUCIANE MAGRI TOMAZ

**O TREINAMENTO RESISTIDO PROMOVE MODULAÇÕES GÊNICA E
PROTEICA DE SINALIZADORES DO METABOLISMO GLICOLÍTICO NO
FÍGADO DE RATAS OVARIETOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de concentração: Fisiologia do Exercício.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez.

**SÃO CARLOS
2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

T655tr

Tomaz, Luciane Magri.

O treinamento resistido promove modulações gênica e proteica de sinalizadores do metabolismo glicolítico no fígado de ratas ovariectomizadas / Luciane Magri Tomaz. -- São Carlos : UFSCar, 2014.

43 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Fisiologia. 2. Treinamento resistido. 3. Ovariectomia. 4. Fígado. 5. Metabolismo. I. Título.


CDD: 612 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Luciane Magri Tomaz

Dia 12/07/2013

Prof. Dr. Sergio Eduardo de Andrade Perez.....

Prof. Dr. Richard Diego Leite.....

Profª. Drª. Marcia Regina Cominetti.....

Dedico esta dissertação a todas as pessoas que participaram do meu desenvolvimento científico e as que me ensinaram que a amizade não é determinada apenas por um sorriso, um carinho, tão pouco pela companhia. Mas pela inspiração espiritual sentida quando percebo que essas pessoas confiaram e acreditam no meu trabalho. Desde sempre, agradeço aos meus pais Aparecido Tomaz e Tereza Magri Tomaz que me concederam os ensinamentos básicos para uma vida de dedicação perseverança e muito, muito respeito a tudo e a todos.

Agradecimento

Aos meus pais, os quais sempre me deram suporte em todos os meus sonhos e ao mesmo tempo, me mostraram que apesar dos vários caminhos possíveis de serem trilhados, poucos seriam tão verdadeiros. Obrigada pai e mãe que sempre me guiaram para o melhor caminho, e ao deixar sempre muito claro que a minha história, quem escreve sou eu e para esta, não há borracha para corrigi-la ou recomeça-la. Obrigada por não ter ansiado nenhuma borracha até hoje.

Ao Fabiano Carvalho, tão surpreendente professor de natação, que me inspirou desde a infância e me inspira até hoje, que me ensinou através do esporte a busca incansável pelo meu melhor, que não importa quem esteja ao meu lado, o que determina o sucesso é somente o próprio esforço.

A Amanda Cristina e Yasmim Lotti, minha família são-carlense, pelos momentos fraternos e por serem muito diferenciadas.

Ao meu namorado João Paulo, pelo carinho, paciência e atenção em me ouvir falar de insulina e marcadores moleculares. Pela companhia e sintonia.

Ao meu orientador Sérgio Eduardo de Andrade Perez, pela amizade, incentivo intelectual, pelas viagens, pelo sentimento paterno, pelas conversas e principalmente, pelo conhecimento transmitido, tanto de vida quanto acadêmico.

A Marina Barbosa que em um momento determinante, chegou ao laboratório e me direcionou com maestria no desenvolvimento das técnicas laboratoriais em diferentes tipos de análise. Obrigada pelo carinho, atenção e disponibilidade.

Aos grandes amigos que cultivei no decorrer desses anos. Apesar de serem muitos, faço a necessidade de citar alguns de vocês, pela importância em especial de cada um no meu coração. Muito Obrigada Danilo Bertucci, Markus Vinícius, Guilherme Pereira, Gustavo Canevazzi e Matias Domingos.

RESUMO

A menopausa está associada ao risco aumentado de diversas alterações metabólicas que podem comprometer a qualidade de vida. A glicemia é regulada pelo fígado o qual é responsável pelo armazenamento de glicose no período pós-prandial e pelo efluxo da glicose no jejum. A ausência ou redução dos níveis de estradiol provocam liberação desregulada de insulina na circulação sanguínea e intolerância à glicose, desencadeando o processo de resistência à insulina (RI). A regulação dos níveis de glicose hepática está diretamente relacionada ao controle preciso da expressão dos genes que codificam as diferentes isoformas de proteínas de oxidação e captação de glicose. O treinamento resistido (TR) pode prevenir a RI no fígado de ratas ovariectomizadas (Ovx). No entanto ainda há poucos eventos moleculares que fundamentam o TR no modelo experimental de menopausa. **Objetivo:** investigar os efeitos da Ovx e do TR sobre a expressão gênica e proteica de biomarcadores relacionados à sinalização da insulina e oxidação da glicose no fígado de ratas. **Métodos:** Ratas Sprague Dawley adultas foram divididas em 4 grupos (n = 6 por grupo): sham operado sedentário (Sham-Sed), Ovx sedentário (Ovx-Sed), Sham-Tr e Ovx-Tr. O protocolo TR exigiu dos animais a escalada vertical de 1,1 m com pesos atados as suas caudas. Cada sessão consistiu de 4-9 escaladas, com intervalo de 2 minutos entre as escaladas, realizados 3 vezes por semana durante 10 semanas. A análise da expressão gênica foi realizada por PCR-RT pelo método $\Delta\Delta C_t$ e as análises proteicas pela técnica de Western Blotting. **Resultados:** Aumentou significativamente expressão gênica e proteica de GLUT2 e gênica de PGC-1 α , também a diminuição da quantificação proteica de Akt-p(Ser473) no grupo ovariectomizados sedentário. A diminuição da expressão gênica e proteica de GLUT2, o aumento da expressão gênica de PGC-1 α e proteica de Akt-p Ser473 nos grupos treinados em relação ao grupo controle e ovariectomizados. **Conclusão:** Os resultados demonstram que a ovariectomia promove a superexpressão de sinalizadores moleculares que induz a RI e o TR foi capaz de promover a restauração desta sinalização. Estes achados sugerem que o TR exerce efeitos notórios na modulação dos sinalizadores que podem induzir a RI em animais Ovx, por meio da restauração da expressão gênica e proteica das moléculas que sinalizam o metabolismo glicolítico.

Palavras chaves: ovariectomia, treinamento resistido, GLUT2, Akt, resistência à insulina e PGC-1 α .

ABSTRACT

Menopause is associated with higher risks of metabolic changes that may compromise women's life quality. Glicemia is regulated by the liver which is responsible for glucose storage at postprandial and for glucose efflux in a fastened state. The absence or the reduction of estradiol levels cause glucose intolerance and deregulated insulin output in bloodstream, setting of the insulin resistance process (IR). Hepatic glucose regulation is directly related to the accurate control of gene expression which encodes different isoforms of oxidation proteins and glucose input proteins. Studies suggest that Resistance Training (TR) prevents IR on ovariectomized (Ovx) rats' liver. However there are few molecular events that support TR. **Objective:** To investigate the Ovx and TR effects over protein and gene expression of biomarkers associated with insulin signalization and glucose oxidation in rats' liver. **Methods:** Adults Sprague-Dawley were divided into 4 groups (n=6 each group): Sedentary Sham-surgical (Sham-Sed); Sedentary-Ovx (Ovx-Sed); (Sham-Tr) and (Ovx-Tr). Tr protocol included 1.1 m vertical climbing with tied weight to the rats tail. Each session consisted of 4 to 9 climbing and 2 minutes of resting between the exercises. Training was performed 3 times a week during 10 weeks. Gene expression was analysed using real time quantitative PCR and protein assays by Western Blotting technic. **Results:** GLUT2 gene and protein expression and PGC-1 α gene expression increased significantly; and p-Akt Ser473 protein expression decreased in Ovx group. TR promoted a greater increase of PGC-1 α gene expression and further repair of GLUT2 gene and protein expression and p-Akt Ser473 protein expression. **Conclusions:** The results show the ovariectomy promotes overexpression of molecular markers that induced IR. These findings suggest that TR may play an important role on the IR prevention in Ovx animals through gene and protein expression repairment of the glycolytic metabolism signalling molecules.

Key Words: Ovariectomy, exercise, GLUT2, Akt, insulin resistance and PGC-1 α .

Lista de Figuras

Figura 1- Hepatócitos e mecanismos de captação da glicose	15
Figura 2 - Hepatócitos resistente à insulina.	16
Figura 3 - Esquema de distribuição das ratas e desenho experimental.....	19
Figura 4- Linha do tempo para os procedimentos cirúrgicos e treinamento das ratas.....	20
Figura 5- Escada para treinamento resistido.....	22
Figura 6- Organização da carga de carregamento.....	23
Figura 7 -Temperatura de Melt e Ct das amostras.....	26
Figura 8 - Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau-S	28
Figura 9 -Carga máxima dos grupos	29
Figura 10- Expressão genica de PGC1- α	30
Figura 11 - Expressão genica do GLUT2.....	31
Figura 12- Expressão Proteica de p-Akt Ser473.....	32
Figura 13 - Expressão proteica de GLUT2	33
Figura 14 - Mecanismo de captação de glicose induzido pelo TR.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos primers usado.....	26
Tabela 2 – Efeitos da ovariectomia e do TR sobre parâmetros tropométricos.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

RI: Resistência à insulina

AMPK: Proteína quinase ativada por monofostato de adenosina

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

OVX: Ovariectomizadas

PEPCK: Fosfoenolpiruvatocarboxicinase

RNA_m: Ácido ribonucléico mensageiro

TR: Treinamento resistido

Akt: proteína quinase B

Akt-p: proteína quinase B fosforilada

GLUT2: transportador de glicose 2

IR: receptor de insulina

IRS-1 substrato do receptor de insulina

ATP: adenosina trifosfato

PGC-1 α : coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador gama de peroxima

PI3-K: fosfatidilinositol-3-quinase

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real

Ser473: Serina 473

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. HIPÓTESE.....	18
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Animais e condições experimentais.....	19
4.2 Desenho experimental.....	19
4.3 Grupos Experimentais.....	20
4.3.1 Grupos sedentários	20
4.3.2 Grupos treinamento resistido.....	20
4.4 Procedimentos Cirúrgicos da Ovariectomia e Simulação	20
4.5 Treinamento resistido.....	21
4.5.1 Familiarização ao Treinamento.	21
4.5.2 Determinação da Carga de Carregamento.....	22
4.5.3 Sessões de Treinamento.....	22
4.6 Controle da ingestão alimentar e da massa corporal	23
4.7 Armazenamento e preparo do tecido.....	23
4.8 Quantificação da expressão gênica do GLUT2, PGC1- α e GAPDH.....	23
4.8.1 Procedimentos gerais.....	24
4.8.2 Extração do RNA total	24
4.8.3 Quantificação do RNA total	25
4.8.4 Determinação da integridade do RNA.....	25
4.8.5 Transcrição reversa	25
4.8.6 Reação em cadeia da polimerase – tempo real (PCR-RT)	25
4.9 Western Blotting.....	26
4.9.1 Quantificação das proteínas totais.....	27
4.9.2 Gel de Acrilamida	27
4.9.3 Transferência das proteínas.....	27
4.9.4 Bloqueio	28
4.9.5 Anticorpo.....	28
5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
6. RESULTADOS	29
7. DISCUSSÃO.....	34
8. CONCLUSÕES	38
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, assim como em todo o mundo, o envelhecimento da população vem ocorrendo de forma bastante acelerada. Algumas projeções indicam que em 2020 o Brasil será o sexto país do mundo em número de idosos, com um contingente superior a 30 milhões de pessoas (VERAS, 2009).

A menopausa está associada ao risco aumentado de várias alterações metabólicas que podem comprometer a qualidade de vida. Há um aumento da prevalência de todos os componentes individuais da síndrome metabólica em mulheres menopausadas (ALEXANDER; CLEARFIELD, 2006). Aproximadamente 40% das mulheres neste período procuram assistência médica para tratamento dos sintomas que as acometem (LEITE et al., 2010; NEDROW et al., 2006). Durante muitos anos pensava-se que o estradiol, tinha sua importância apenas para a fisiologia feminina e na reprodução (JENSEN, 1962). Atualmente, considera-se que sua ação é muito mais ampla do que se pensava (CHAMBON, 2005; NILSSON et al., 2001).

As respostas fisiológicas ao estradiol são mediadas por, pelo menos, dois tipos de receptores de estrogênio (ERs): ER α e ER β . As respostas fisiológicas exatas atribuídas a cada receptor, na sua maioria, são desconhecidas (KUIPER et al., 1997). Em todo caso, sabe-se que estes receptores possibilitam a modulação celular a partir do estrogênio, por ações não genômicas (SAFE; KIM, 2008). Desta forma, no caso da modulação das células beta-pancreáticas, os ERs induzem o aumento da sensibilidade das células β -pancreáticas e lipólise no tecido adiposo (CARR, 2003). Também em condições fisiológicas o estradiol desempenha um importante papel na proteção de diversos tecidos, como o cardíaco, músculo esquelético, ósseo, hepático entre outros (PEREIRA et al., 2010; PRESTES et al., 2009; SHIGUEMOTO et al., 2012). Essa proteção dos tecidos a partir do estradiol deve-se a sua atividade antioxidante, diminuindo a formação de espécies reativas de oxigênio (LEVIN, 2002; ZHU; CONNEY, 1998).

Com a diminuição dos níveis de estradiol algumas doenças crônicas se evidenciam, tais como osteoporose, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica e diabetes. O envelhecimento é um fator importante para o desenvolvimento dessas doenças tanto em homens quanto em mulheres (BARROS; MACHADO; GUSTAFSSON, 2006). A ausência desse hormônio pode induzir também a resistência à insulina (RI).

A RI é uma resposta biológica subnormal aos níveis de insulina circulante que por consequência induz um distúrbio da glicemia (CARVALHEIRA; SAAD, 2006; GELONEZE,

2006). A prevalência de RI e diabetes mellitus aumenta significativamente em mulheres menopausadas, momento em que ocorre a associação do envelhecimento e diminuição da produção de estradiol (KAAJA, 2008). A princípio ocorre um aumento da atividade das células pancreáticas em sintetizar e secretar insulina, em consequência desta atividade exacerbada ocorre também o aumento da apoptose destas células (NIKI; NAKANO, 1990). A persistência deste fenômeno promove uma hiperplasia das ilhotas pancreáticas em compensar a hiperinsulinemia, devido a grande liberação e dificuldade de armazenamento de insulina para manter a normoglicemia (LU et al., 2004). Em decorrência, os tecidos periféricos ficam resistentes à insulina, pois a regulação da homeostase intra e extracelular da glicose esta diretamente relacionada aos níveis de insulina circulante e o controle preciso dos genes que codificam as diferentes isoformas de proteínas transportadoras de glicose, as quais se expressam de maneira tecido-específico (THORENS, 1993).

O fígado é responsável pelo armazenamento de glicose no período pós-prandial, e pelo efluxo da glicose no jejum (THORENS, 1993). O controle da glicemia hepática é mediado por um transportador específico que facilita a movimentação da glicose do fígado para a corrente sanguínea e vice-versa. Neste tecido o transportador de glicose o dois (GLUT2) (BURCELIN et al., 2000; HELLWIG; JOOST, 1991).

O GLUT2 é uma isoforma com alta capacidade de transporte de glicose. Esta capacidade é um fator determinante para este tipo de transportador, assim como a sua localização transmembrana. O GLUT2 não é dependente do hormônio insulina para promover o transporte da glicose, no entanto a insulina é fundamental para promover o aumento da sensibilidade deste transportador em acelerar a capacidade e a velocidade da captação de glicose (THORENS, 1993). O GLUT2 também é dependente de insulina para determinar o sentido da atividade hepática. Quando há liberação da insulina ocorre o aumento da síntese de glicogênio hepático, a glicogênese. A liberação de glucagon estimula o hepatócito a liberar glicose à corrente sanguínea, com a finalidade de manter os níveis de glicemia dentro da normalidade por meio da glicólise e gliconeogênese. Apesar deste transporte de duplo sentido ocorrer por meio deste transportador, não há alteração da expressão gênica de GLUT2 para a alternância da atividade hepática (TOMIE FURUYA et al., 2005).

No hepatócito RI este ajuste fino da captação e liberação de glicose é reduzido. A hiperinsulinemia instalada promove intolerância à glicose, reduzindo a sensibilidade do GLUT2 á glicose. Em resposta a esse aumento da intolerância á glicose, o fígado entra em

gliconeogênese crônica, apesar dos elevados níveis de insulina e glicose plasmática. Aumenta-se o acúmulo de gordura hepática a fim de produzir cada vez mais glicose a partir dos lipídios gerando um processo de autoindução crônica, iniciado pela menopausa, RI, esteatose hepática não alcoólica e diabetes tipo 2 (CHEN et al., 2006; HUANG et al., 2010).

Para o bom entendimento da sinalização da insulina no tecido hepático é importante a compreensão molecular de como ocorre esta sinalização (figura 1). Em um hepatócito saudável a insulina se liga ao seu receptor de membrana, o receptor de insulina (IR) (PATTI; KAHN, 1998).

A ativação do IR é resultante da fosforilação dos substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) em tirosina (PESSIN; SALTIEL, 2000). A fosforilação dos IRS em tirosina cria sítios de ligação para a ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K).

A PI3K é uma proteína de regulação da mitogênese celular e de transporte de glicose estimulada pela insulina (BACKER et al., 1992). A ativação da PI3K aumenta a fosforilação da proteína quinase B (Akt).

A Akt é uma proteína que pode ser modulada por outras proteínas, é totalmente ativa apenas quando fosforilada em Treonina 309 e Serina 473 sinalizando a via da insulina. A Akt é inibida quando fosforilada em Tirosina (COFFER; JIN; WOODGETT, 1998; VANHAESEBROECK; ALESSI, 2000). Quando ativada permite o aumento da capacidade e a velocidade do GLUT2 em transportar glicose para dentro da célula.

A Akt é o ponto chave para a sinalização da insulina, pois mesmo que o tecido esteja resistente à insulina, quando fosforilada em Serina 473, promove o aumento da atividade dos transportadores de glicose (PUIGSERVER et al., 2003), além de bloquear a oxidação de lipídios por bloquear diretamente a atividade do *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1* (PGC-1 α) (LIANG; WARD, 2006; OLIVEIRA et al., 2004).

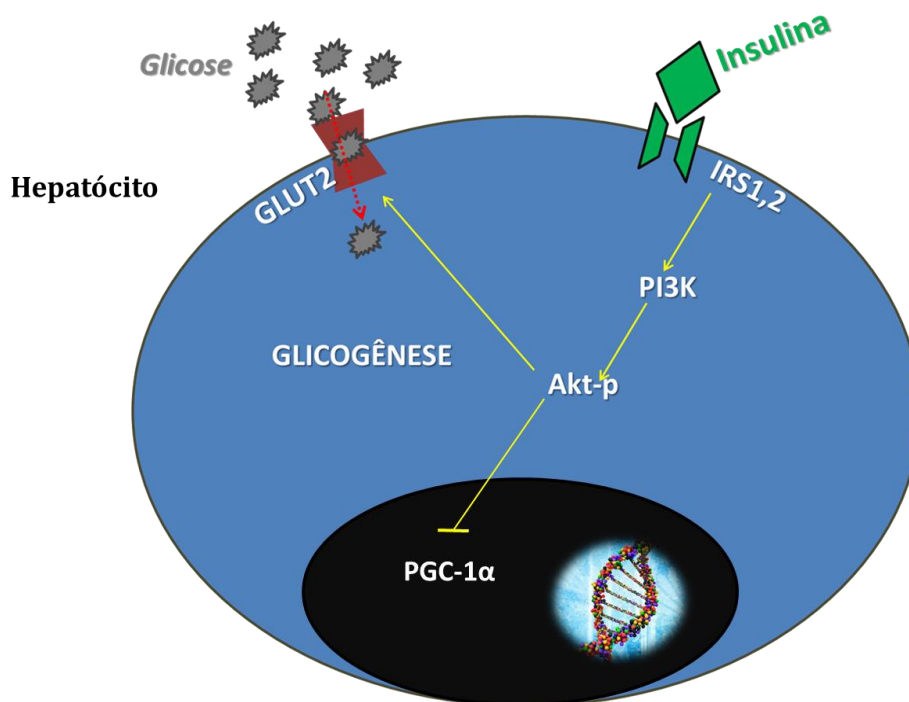


Figura 1- Hepatócitos e mecanismos de captação da glicose IRS1,2; substrato 1 e 2 do receptor de insulina, PI3K; fosfatidilinositol 3 quinase, Akt; proteína quinase B, Akt-p; proteína quinase B fosforilada em Ser473; GLUT2; transportador de glicose 2 e PGC-1 α ; peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1

Os hepatócitos resistentes à insulina tem uma predominância em sinalizar a via da gliconeogênese e glicólise devido à intolerância a glicose e a downregulation dos IR (figura 2). O IRS fosforila em Serina612 bloqueando a ativação do PI3K, em sequencia a inatividade da Akt e por fim uma diminuição da atividade dos GLUT2. Como já descrito o GLUT2 não depende da insulina para promover a captação de glicose, neste sentido ocorre o aumento da expressão gênica de GLUT2 (IM et al., 2005; MATSUBARA et al., 1995).

Alguns estudos já demonstraram a relação direta da regulação deste transportador com os fatores nucleares de hepatócitos (HNF) na regulação gênica do GLUT2 (MIQUEROL et al., 1994; SLADEK et al., 1990). Estes HNF possuem várias isoformas, cada uma com uma função específica, para este mecanismo estudado deve-se atentar para as isoformas HNF-3 β e HNF-4 α . O HNF-4 α quando modulado pela proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) pode promover um bloqueio da superexpressão de GLUT2. Já os HNF-3 β são estimulados quando a sinalização da insulina é reduzida e a Akt fosforila em tirosina(COFFER et al., 1998).

A não fosforilação da Akt em Serina 473 promove, no fígado, um aumento da expressão genica de GLUT2 e induz o aumento da atividade do PGC-1 α , devido a necessidade de promover energia para o organismo, aumentando a oxidação de lipídios

para formação de glicose hepática (JAGER et al., 2007; LI et al., 2007; LIANG; WARD, 2006).

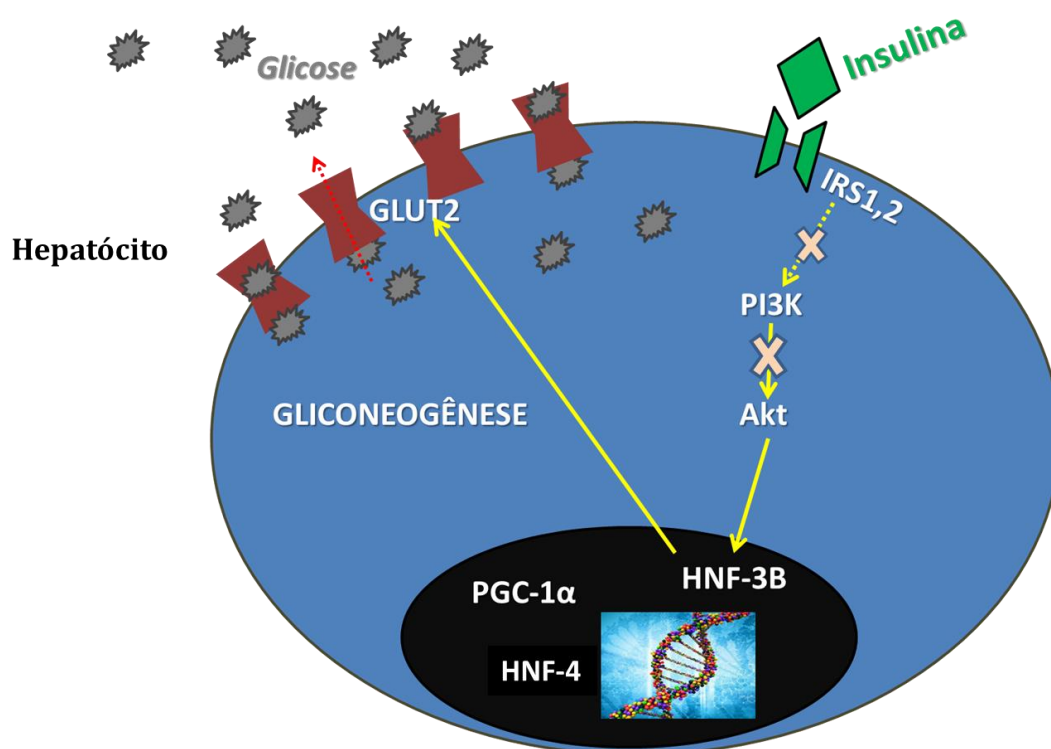


Figura 2 - Hepatócitos resistente à insulina. IRS1,2; substrato 1 e 2 do receptor de insulina, PI3K; fosfatidilinositol 3 quinase, Akt; proteína quinase B, Akt-p; proteína quinase B fosforilada em Ser 473/474; GLUT2; transportador de glicose 2, HNF-3 β ; fator nuclear do hepatócito 3 beta; HNF-4 α ; fator nuclear do hepatócito 4 e PGC-1 α ; peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1.

Vários estudos foram publicados na tentativa de reverter ou prevenir o processo de diabetes tipo 2. As evidências de maior relevância e eficácia parecem ser as terapias de reposição hormonal e exercícios de endurance e resistido. Muthusamy (2009) realizou um estudo que avaliou o impacto da terapia hormonal de testosterona e estradiol na expressão proteica da Akt e expressão gênica e proteica do transportador de glicose 4 (GLUT4) presente no músculo esquelético e tecido adiposo e GLUT2 no fígado de rato macho adulto. Neste estudo, houve restauração dos níveis da fosforilação e expressão proteica da Akt e dos dois transportadores de glucose. Este resultado indica a melhora da capacidade de oxidação da glicose em diferentes tecidos. Outros estudos demonstram que o treinamento resistido (TR) também aumenta a captação de glicose pelo músculo (ERIKSSON et al., 1998; LUCIANO et al., 2002).

Sabe-se que o exercício físico não promove alteração direta na fosforilação do IR, demonstrando a possibilidade de diferentes formas do transporte de glicose (HAYASHI; WOJTASZEWSKI; GOODYEAR, 1997).

A AMPK é uma enzima chave da resposta à contração muscular, modulada pelo exercício físico, ela promove o controle glicêmico independente de insulina (NELSON, 1990). Esse mecanismo de captação é extremamente importante na sinalização hepática à homeostase glicêmica (RHEE et al., 2003). A AMPK requer também a atividade do PGC-1 α para modular a expressão de vários componentes da biogênese mitocondrial (JAGER et al., 2007) e Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos (PPARs) fatores associados à melhora da capacidade oxidativa de glicose e lipídios (NELSON, 1990).

O PGC-1 α é principalmente expresso em tecidos com alta capacidade oxidativa de energia como o coração, o músculo esquelético, fígado, tecido adiposo marrom e cérebro. É superexpresso em condições que requerem energia, como o frio, jejum e exercício (MOOTHA et al., 2004). Alguns estudos verificaram uma relação direta com a diminuição da expressão gênica de PGC-1 α em músculo esquelético de pacientes com RI e diabéticos do tipo 2 (MOOTHA et al., 2003; PATTI et al., 2003; RICHARDSON et al., 2005).

De acordo com estas evidências pode-se propor uma relação direta entre TR e reversão da resistência à insulina. Alguns estudos realizados no nosso laboratório já demonstraram que o exercício físico exerce grande capacidade de minimizar os efeitos deletérios da deficiência do estradiol (DOMINGOS et al., 2011; LEITE et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; PRESTES et al., 2009; SHIGUEMOTO et al., 2012). Esses estudos investigaram o efeito do TR sobre o conteúdo lipídico do músculo esquelético, fígado e coração de ratas ovariectomizadas. Todos os trabalhos resultaram na redução do teor lipídico destes tecidos, o que indica a melhora metabólica dos animais ovariectomizados submetidos ao TR. O presente estudo foi elaborado com o objetivo de compreender as modulações que o TR promove no metabolismo glicolítico no fígado de ratas ovariectomizadas, além de colaborar para o melhor entendimento das alterações moleculares causadas pelo envelhecimento, sedentarismo e consequentemente RI.

2. HIPÓTESE

A hipótese desse trabalho apresenta como base fisiológica a ausência do estrogênio, causada pela ovariectomia, pode induzir RI no fígado.

O TR, principal intervenção terapêutica desse projeto, pode ser capaz de melhorar a captação de glicose, podendo evitar o desenvolvimento da RI em ratas ovariectomizadas.

3. OBJETIVOS

Verificar as alterações do metabolismo glicolítico no fígado de ratas ovariectomizadas e induzidas ao TR.

Através dos seguintes parâmetros:

- Quantificação da expressão gênica de GAPDH, PGC-1 α e GLUT2 nos grupos experimentais.
- Quantificação da expressão proteica da β -actina, p-AKT e GLUT2 nos grupos experimentais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e condições experimentais

Foram utilizadas 24 ratas Sprague Dawley, adultas, obtidas do biotério da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Araraquara, com massa corporal de chegada ao biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício de $218,34 \pm 2,49$ (média \pm erro padrão da média). Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (três ratas por gaiola) no biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício, do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), sob condições constantes de temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), umidade e iluminação em ciclo invertido (01:00-13:00h: claro; 13:00-01:00h: escuro) e com oferta de água e dieta *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (número protocolo 008/2010) e conduzidos de acordo com o guia de cuidados e manuseio de animais laboratoriais dos Estados Unidos da América (National Research Council's, 1996).

4.2 Desenho experimental

Todos os animais após chegada ao biotério do laboratório de fisiologia do exercício permaneceram por três semanas em condição de aclimatação ao biotério e ao ciclo invertido. Após este período, os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais (seis animais por grupo), a saber: 1) Sham operado sedentário (Sham-Sed); 2) Ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed); 3) Sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e 4) Ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr) como mostra a figura 3.

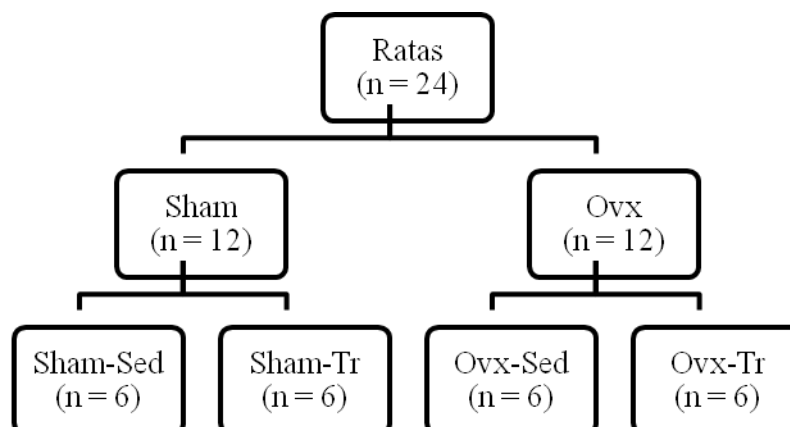


Figura 3 - Esquema de distribuição das ratas e desenho experimental

A figura 04 apresenta uma linha do tempo desde a chegada dos animais ao biotério do laboratório de fisiologia do exercício até o momento do sacrifício.

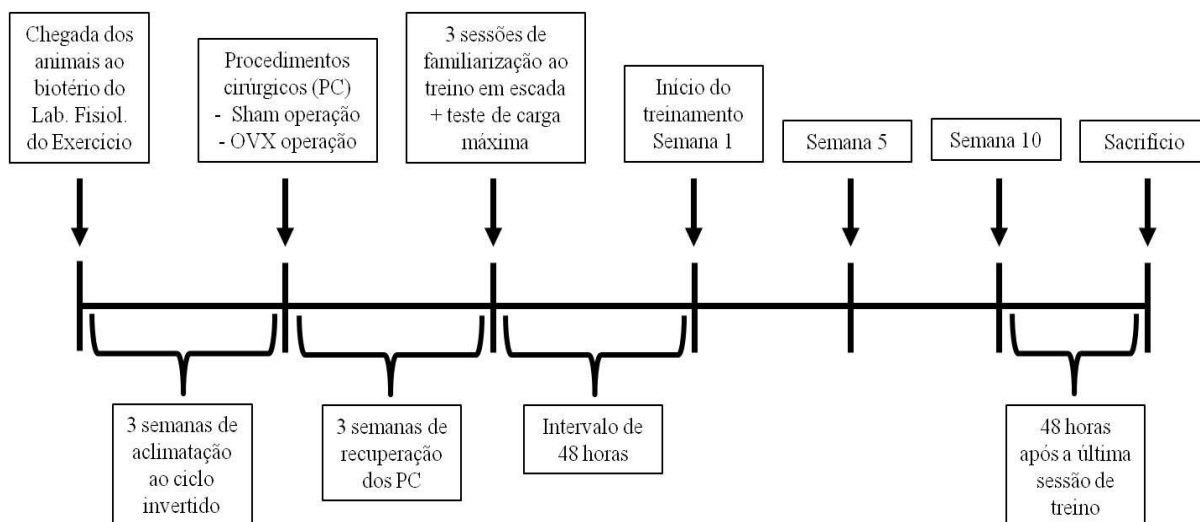


Figura 4- Linha do tempo para os procedimentos cirúrgicos e treinamento das ratas.

4.3 Grupos Experimentais

4.3.1 Grupos sedentários

Os animais dos grupos sedentários (Sham-Sed e Ovx-Sed) foram mantidos em suas gaiolas durante todo o período experimental do estudo sem nenhum tipo de exercício físico sistemático.

4.3.2 Grupos treinamento resistido

Os animais dos grupos treinamento resistido (Sham-Tr e Ovx-Tr) foram submetidos a dez semanas de treinamento resistido progressivo em escada.

4.4 Procedimentos Cirúrgicos da Ovariectomia e Simulação

A ovariectomia (OVX) foi realizada quando os animais atingiram aproximadamente 250g de massa corporal de acordo com a técnica descrita por Kalu (1991).

Inicialmente as ratas foram anestesiadas com uma mistura de Ketamina-Xilazina (61,5-7,6 mg/kg, intraperitoneal). Durante todos os procedimentos da OVX as ratas foram mantidas sobre o efeito anestésico proporcionado pela Ketamina-Xilazina.

Primeiramente, foi realizada uma pequena incisão bilateral de 1,0-1,5 cm através da pele e da camada muscular, entre a última costela e a coxa, em paralelo com a linha corporal do animal. A cavidade peritoneal foi aberta e feita uma ligadura abaixo da fimbria. Os ovários foram removidos e a incisão feita na pele e músculos suturados. Pelas próximas 72 horas após a OVX as ratas foram mantidas em caixas individuais, posteriormente a este período as ratas foram novamente agrupadas nas caixas coletivas referentes aos seus grupos, onde permaneceram até o fim do experimento. Foi respeitado um período de 21 dias de recuperação pós-cirurgia para dar início aos procedimentos do protocolo de treinamento resistido no grupo Ovx-Tr.

A Simulação nas ratas Sham foi realizada através dos mesmos procedimentos da OVX, exceto que não foi realizada a ligadura abaixo da fimbria e nem os ovários foram removidos, e sim apenas expostos e devolvidos ao local de origem. Vale ressaltar que todos os animais sham operados e ovariectomizados tiveram o mesmo tempo de exposição aos procedimentos cirúrgicos (92 dias) até a data do sacrifício.

4.5 Treinamento resistido

Foi utilizada uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degraus de 2 cm, inclinação de 80°) com uma gaiola de dimensões 20 x 20 x 20 cm. Foi utilizado tubo falcon com chumbada de pesca atado à porção proximal a cauda das ratas como carga de carregamento, como mostra a figura 5.

4.5.1 Familiarização ao Treinamento.

A familiarização ao treinamento foi realizada por 2 dias consecutivos como segue. Com o aparato fixado a cauda, as ratas eram colocadas na parte inferior da escada e familiarizadas com a escalada. Caso necessário, um estímulo com dedos em movimento de pinçar foi aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento de escalada. As dimensões da escada obrigavam os animais a realizarem 8-12 movimentos por escalada. Atingindo a gaiola no topo da escada as ratas descansavam durante 2 minutos. Este procedimento repetia-se até que os animais escalassem voluntariamente a escada por três vezes consecutivas, sem a necessidade de estímulo.



Figura 5- Escada para treinamento resistido.

4.5.2 Determinação da Carga de Carregamento.

Três dias após a familiarização, foi realizada a determinação da carga máxima de carregamento onde a primeira escalada consistiu em carregar uma carga de 75% da massa corporal do animal. Após 2 minutos de recuperação, a segunda escalada foi realizada com a adição de um peso de 30g. Este acréscimo de 30 g na carga foi repetido em cada escalada até uma carga com a qual a rata não conseguiu escalar toda a escada mesmo após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga efetivamente carregada por toda a escada foi considerada a capacidade máxima de carregamento da rata.

4.5.3 Sessões de Treinamento.

As sessões de treino foram realizadas três vezes por semana, todas as segundas, quartas e sextas-feiras. O início das sessões de treino sempre ocorreu às 15 horas.. Cada sessão de treino consistiu em um mínimo de quatro e um máximo de nove escaladas. As quatro escaladas iniciais consistiam respectivamente a 65%, 85%, 95% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal, determinada na sessão anterior. Após a quarta escalada foram realizadas um máximo de cinco escaladas adicionando-se 30g de carga até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada, como

demonstrado na figura 6. Este protocolo de treinamento resistido foi adaptado de Hornberger e Farrar (2004)

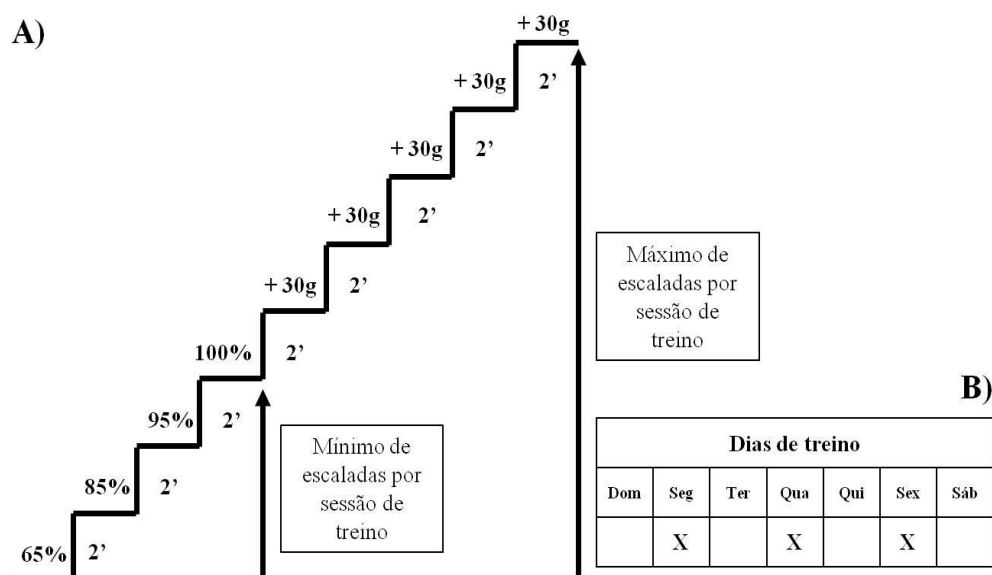


Figura 6- A) organização da carga de carregamento por sessão de treino. B) dias de treino.

4.6 Controle da ingestão alimentar e da massa corporal

A ingestão alimentar (gramas de ração consumida por gaiola) foi monitorado diariamente sempre no mesmo horário do dia, entre 17h00min e 17h30min e a massa corporal verificada três vezes na semana, todas as segundas, quartas e sextas-feiras sempre no mesmo horário entre 16h00min e 17h00min. Ambos os procedimentos foram realizados durante todo o período experimental.

4.7 Armazenamento e preparo do tecido

Os animais foram sacrificados por decapitação 48h após a última sessão de treinamento. O fígado foi imediatamente removido e três alíquotas do lobo mediano foram guardadas em tubos de criogenia, imediatamente congelados no nitrogênio líquido e armazenados no freezer a -80°C até o momento das análises.

4.8 Quantificação da expressão gênica do GLUT2, PGC1- α e GAPDH

A quantificação da expressão gênica do GLUT2, PGC1- α e do GAPDH foi realizada pela quantificação do seu RNAm por Reação em Cadeia da Polimerase – Tempo Real (PCR-RT). Esta análise foi realizada no laboratório de Fisiologia do Exercício do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos.

4.8.1 Procedimentos gerais

Para reduzir a presença de ácidos ribonucleases (RNAses), foram adotados os seguintes cuidados em todos os procedimentos: utilização de material esterilizado descartável; autoclavagem da vidraria, eppendorfs e ponteiras utilizadas; manipulação de amostras e materiais com luvas; utilização de água tratada com dietil-pirocarbonato (água DEPC, autoclavada).

4.8.2 Extração do RNA total

Para a análise da expressão gênica das proteínas GLUT2, PGC1- α e do GAPDH o RNA total do fígado foi extraído com o reagente Trizol[®] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia) de acordo com as especificações do fabricante. Foi extraído 40 – 45 mg de tecido homogeneizado (*homogenizador Power Gen – Fisher Scientific 1000*) em 1 mL de Trizol segundo os seguintes protocolos:

Após a homogeneização as amostras permaneciam por 5 minutos em temperatura ambiente. Adicionava-se 200 μ L de clorofórmio às amostras e agitava-se por 15 segundos no vórtex. As amostras permaneciam em temperatura ambiente por 15 minutos e posteriormente centrifugavam-as (*Eppendorf 5804R*) por mais 15 minutos, a 12000rpm, a 4° C. Após a centrifugação transferiu-se o sobrenadante (450 μ L) para um microtubo limpo. Adicionou-se 450 μ L de isopropanol e a amostra era agitada por inversão manual, permanecendo por 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir, centrifugou-se as amostras por 10 minutos a 12000rpm (4° C) para formação do pellet. O sobrenadante foi descartado com cuidado por inversão manual e ao pellet era acrescentado 1mL de etanol 75%. Após nova centrifugação, por 5 minutos a 7500rpm (4° C), novamente o sobrenadante foi descartado com cuidado por inversão manual. Esperava-se o secar por 5-10 minutos microtubo com o pellet em estufa a 37° C. Após esse tempo, acrescentou-se 30-60 μ L de água tratada com dietilpirocarbonato (água

DEPC) 0,1%. As amostras foram armazenadas no freezer a -80°C até o momento das análises subsequentes.

4.8.3 Quantificação do RNA total

Para avaliação da concentração e pureza do RNA total, realizou-se ensaios no espectrofotométricos sob comprimento de onda de 260 e 280 nm. Utilizou-se a seguinte fórmula para determinar a concentração de RNA total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$): concentração $\mu\text{g}/\mu\text{L} = (A_{260} \times 40 \times \text{diluição da amostra}) \times 1000^{-1}$. A razão $A_{260/280}$ é proporcional à concentração de RNA total na amostra.

O grau de pureza do RNA foi determinado pela razão $A_{260/280}$, considerando-se adequados os valores entre 1,8 e 2,0.

4.8.4 Determinação da integridade do RNA

Confirmou-se a integridade do RNA pela visualização em luz ultravioleta do padrão de eletroforese das bandas 28S e 18S do RNA ribossomal, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

4.8.5 Transcrição reversa

Para esta reação utilizou-se o kit Synthesis cDNA da Bio-Rad. Todos os passos para a confecção do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) seguiu as especificações do fabricante conforme a bula. O volume final produzido para cada amostra foi de 20 μl . As amostras foram armazenadas no freezer -80°C .

4.8.6 Reação em cadeia da polimerase - tempo real (PCR-RT)

As amostras processadas no PCR Real-Time CFX96TM e Termociclador *C1000TM* (Bradford J. Crutchfield) e os ciclos consistiram de 95°C por 10 minutos, seguidos de 42 ciclos de amplificação a 95°C por 15 segundos; temperatura de anelamento (T_m) $-65 - 40^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos e 72°C por 60 segundos. As T_m dos primers foram previamente padronizadas.

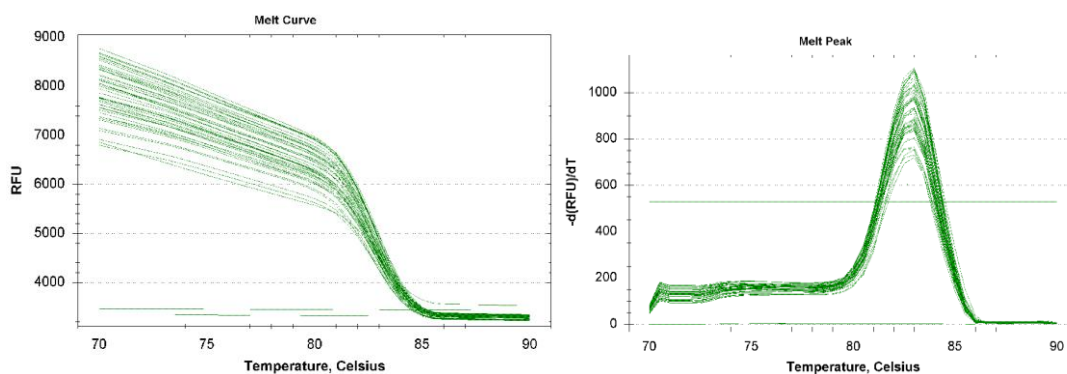
Os primers foram adquiridos da Biomex Biotechnologie. As sequencias são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos primers usados para PCR-RT

Genes	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')	N. de acesso
GLUT2	CTCGGGCCTTACGTGTTCTTCCTT	TGGTTCCTTCTGGTCTGTTC	NM_012879
PGC1- α	GGCCCGGTACAGTGAGTGTT	ATTGCTCCGGCCCTTTCTT	NM_031347.1
GAPDH	GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG	GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA	NM_017008.3

GLUT2 transportador de glicose 2; PGC1- α *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1*; GAPDH gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

Os produtos específicos foram determinados como picos únicos por meio das curvas de MELT. Os valores de thresholdcycle (Ct) e as curvas de MELT foram obtidos pelo *Software Plate Quick*. O Ct é o ponto onde o sinal de fluorescência é notado pela primeira vez com o menor número de ciclos durante a fase exponencial da amplificação do primer. A figura 7 apresenta os resultados qualitativos de GLUT2.

**Figura 7** -Temperatura de Melt e Ct das amostras.

Depois de calculado a média dos Ct de cada gene foi realizado o calculo do nível de expressão comparativa de cada condição pelo método delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) da seguinte forma;

- Delta Ct (ΔCt) = Ct GAPDH – Ct do gene alvo, seguindo;
- Cálculo da média S: Média do ΔCt , seguindo;
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \text{média S}$

Os $\Delta\Delta Ct$ dos grupos Sham-Sed, OVX-Sed, Sham-Tr e OVX-Tr foram calculados em relação ao Sham-Sed. O valor em unidades arbitrárias (UA) da expressão dos genes alvos calculados por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Com os valores em UA foram realizados os testes estatísticos.

4.9 Western Blotting

Inicialmente, realizou-se um homogeneizado em tampão de imunoprecipitação contendo inibidores de proteases (aprotinina, 0,01mg/mL; PMSF, 2mM) e inibidores de

fosfatase (ortovanadato de sódio, 100mM; pirofosfato de sódio, 10mM; Fluoreto de sódio, 10mM).

4.9.1 Quantificação das proteínas totais.

A análise para a quantificação das proteínas totais seguiu o protocolo de Bradford (Bradford, 1976) onde os valores obtidos por absorvância foram plotados em gráfico. A partir da concentração de uma proteína já conhecida, a albumina, quantificou-se as proteínas totais.

4.9.2 Gel de Acrilamida

Foi elaborado o gel de acrilamida 30%. As alíquotas do tecido lisado foram ressuspendida em tampão de amostra Laemmli (1:4)

Depois de conhecidas as concentrações das proteínas, realizou-se a correção do volume da amostra a ser aplicado no poço (15ug). Todos os poços continham a mesma quantidade de proteína que foram fracionadas pelo método SDS-PAGE.

4.9.3 Transferência das proteínas

Após a corrida o fracionamento das proteínas por eletroforese, o suporte do gel foi desmontado e retirado do tampão de corrida cuidadosamente. Colocado no sistema de transferência semi-seco.

A membrana de nitrocelulose foi embebida no tampão de transferência (Tris-HCl 24,8 mM, glicina 192 mM) e tensão de 100V. por 5 minutos antes, assim como os papéis de filtro do sistema “sanduíche”.

Para visualizar as bandas do padrão e das proteínas, as membranas foram coradas com Ponceau S ~ 2 minutos. Após retirar o excesso do corante com água milli-Q, foi possível visualizar as bandas de marcação de peso molecular e as proteínas como mostra a figura 7. Esta técnica nos permite avaliar a eficiência da transferência das proteínas para o gel e assim dar seguimento com os passos subsequentes.

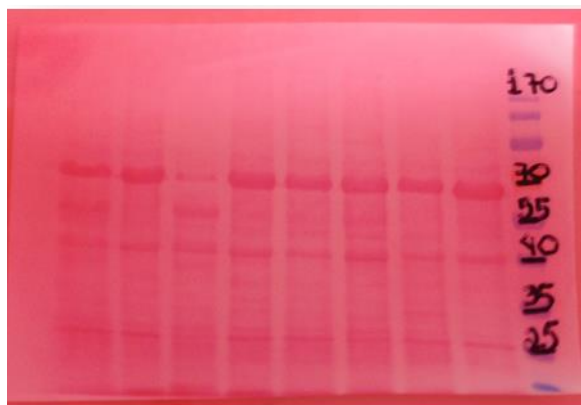


Figura 8 - Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau-S

4.9.4 Bloqueio

Cada membrana foi encubada em tampão TBS-T (TBS e Tween-20) e albumina 5%) por 60 minutos a temperatura ambiente. Foi realizadas 3 lavagens de 5 minutos antes de incubá-la com o anticorpo primário.

4.9.5 Anticorpo

Para incubar a membrana com anticorpo primário foram realizadas diluições adequadas dos mesmos $\sim 1:1000$. A membrana foi incubada overnight a 4°C (em geladeira) com os anticorpos primários GLUT2, Akt-p e o padrão β -actina (Sigma).

Em seguida a membrana foi lavada novamente com tampão TBS-T por 3 vezes de 5 minutos. Incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 2 hora. Repetiu-se o procedimento de lavagem.

A membrana foi revelada com kit quimioluminescência (kit ECL) no ChemiDoc XRS da BioRad.

5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi iniciada com o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal, sendo utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de dois fatores, levando em consideração duas variáveis: ovariectomia x exercício resistido. O pós-teste de Tukey foi aplicado no caso de alguma significância. Todas as informações foram processadas no pacote estatístico OringinPro 8® adotando-se um nível de significância de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

A ovariectomia promoveu maior ganho de massa corporal, ingestão alimentar diária e massa dos depósitos de gordura, urogenital, mesentérica e retroperitoneal ($p < 0,05$) quando comparado com as ratas sham-Sed (Tabela 2). Entretanto, a massa corporal, ingestão alimentar e depósitos de gordura mesentérica e retroperitoneal foi menor nas ratas Ovx-Tr comparado com as ratas Ovx-Sed ($p < 0,05$).

Tabela 2. Efeitos da ovariectomia e do treinamento resistido sobre parâmetros corporais.

	Sham-Sed	Ovx-Sed	Sham-Tr	Ovx-Tr
Massa corporal (g)	337,11 ± 8,13	401,93 ± 4,60*	308,94 ± 5,17*#	370,38 ± 5,89*#&
Ingestão alimentar (g/d)	20,58 ± 0,18	23,15 ± 0,18*	19,61 ± 0,14*#	21,44 ± 0,19*# &
Gordura urogenital (g)	8,52 ± 0,89	11,03 ± 1,84*	6,40 ± 0,75#	9,12 ± 0,18
Gordura mesentérica (g)	4,28 ± 0,34	6,72 ± 0,81*	4,00 ± 0,47#	5,18 ± 0,27#
Gordura retroperitoneal (g)	3,26 ± 0,30	4,84 ± 0,45*	2,67 ± 0,34#	3,45 ± 0,07#
Massa do útero (g)	0,68 ± 0,02	0,18 ± 0,01*	0,64 ± 0,04#	0,15 ± 0,00*&

Valores são médias ± erro padrão da média; n = 6 ratas por grupo. d = dia; MC = massa corporal

*, significativamente diferente de Sham-Sed: ($p < 0,05$) #, significativamente diferente de Ovx-Sed: ($p < 0,05$) &, significativamente diferente de Sham-Tr ($p < 0,05$)

Para a carga máxima de carregamento durante as 10 semanas de treinamento, não houve nenhuma interação entre grupo e tempo. As cargas aumentaram após a quinta e a décima semana quando comparado com a primeira e após a décima semana, quando comparadas com a quinta e semana de treinamento (Figura 8).

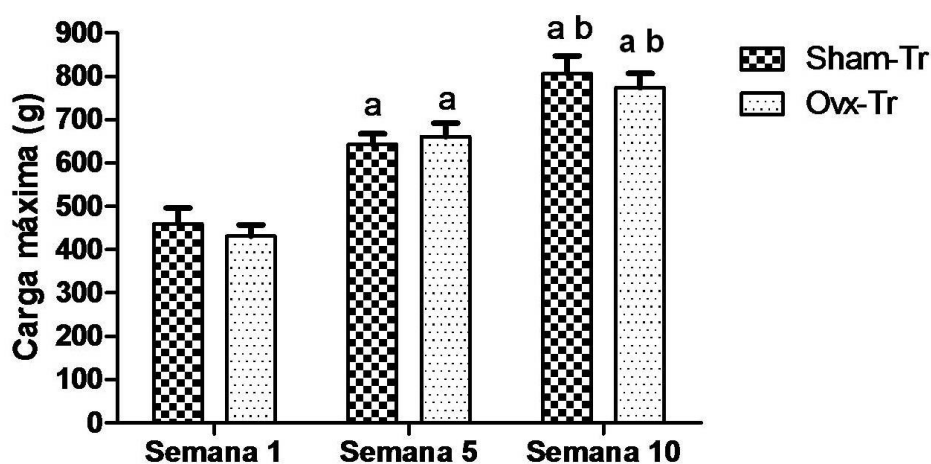


Figura 9 -Carga máxima (g) dos grupos Sham-Tr e Ovx-Tr nas semanas 1, 5 e 10. Os valores são médias ± erro padrão da média (n = 6 por grupo). a, significativamente diferente de semana 1; b, significativamente diferente de semana 5 ($p < 0,05$).

As análises de PCR-RT apresentaram maior expressão gênica de PGC1- α no grupo Sham-Tr ($p < 0,05$) em relação aos grupos Sham-Sed, Ovx-Sed e Ovx-Tr. Adicionalmente, a expressão gênica do PGC1- α foi maior ($p > 0,05$) no grupo Ovx-Sed ($p > 0,05$) quando comparada com os grupos Sham-Sed. Não houve alteração significativa entre os grupos Sham-Sed e Ovx-Tr. Também não houve diferença entre os grupos Ovx-Sed e Ovx-Tr (Figura 9).

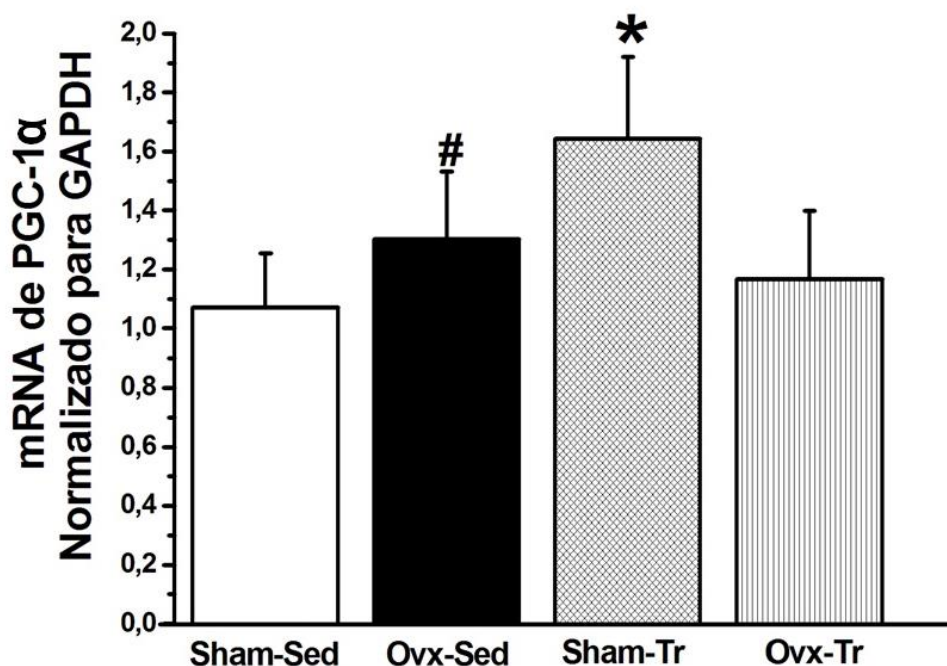


Figura 10- Expressão genica de PGC1- α nos grupos sham operado sedentário (Sham-Sed), ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed), sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). Valores são médias \pm erro padrão da média ($n = 6$ por grupo). *, significativamente diferente de Sham-Sed, Ovx-Sed e Ovx-Tr; #, significativamente diferente de Sham-Sed ($p < 0,05$).

O GLUT2 resultou em maior ($p < 0,05$) expressão gênica nas ratas Ovx-Sed em relação aos grupos Sham-Sed, Sham-Tr e Ovx-Tr. A expressão gênica do GLUT2 nas ratas Sham-Tr foi menor ($p < 0,05$) do que a expressão gênica das ratas no grupo Sham-Sed. Entre os grupos dois grupos treinados Ovx-Tr e Sham-Tr não apresentaram alteração significativa ($p < 0,05$).

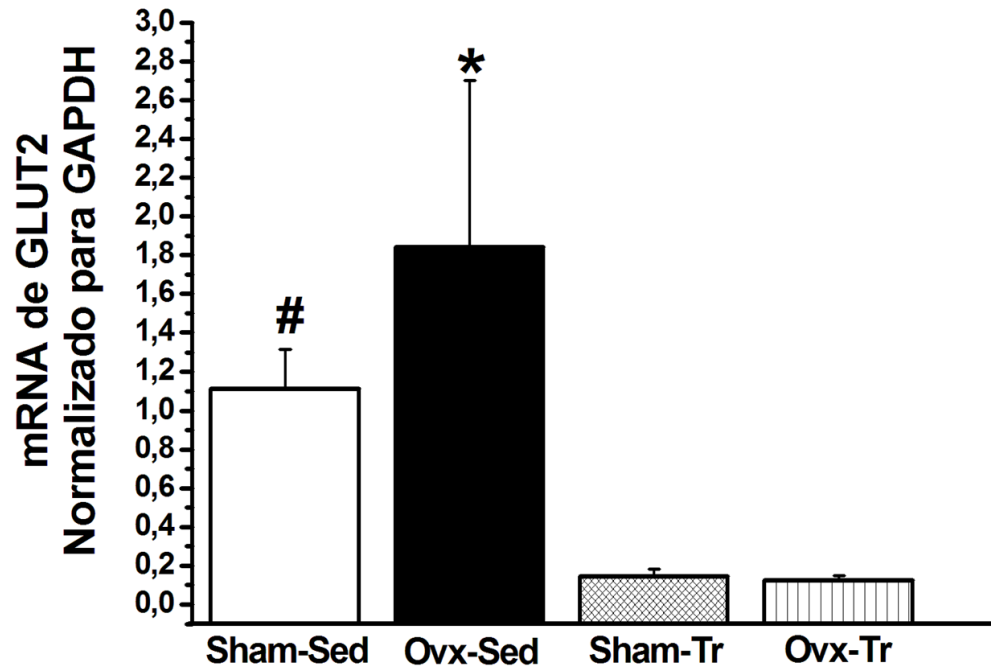


Figura 11 - Expressão genica do GLUT2 nos grupos sham operado sedentário (Sham-Sed), ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed), sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). Valores são médias \pm erro padrão da média (n = 6 por grupo). *,significativamente diferente de Sham-Sed, Sham-Tr, Ovx-Tr; #, significativamente diferente de Sham-Tr e OvxTr ($p < 0,05$).

Para a análise de expressão proteica pela técnica de Western Blotting apresentaram os seguintes resultados. A expressão proteica de Akt-p Ser473 apresentou-se maior ($p < 0,05$) nos grupos Sham-Tr e OvxTr quando comparados com os grupos Sham-Sed, e Ovx-Sed. Também houve diferença significativa entre os grupos Sham-Tr e Ovx-Tr, onde o grupo Sham-Tr apresenta maior quantificação de p-Akt. A expressão proteica de Akt-p foi menor ($p < 0,05$) no grupo Ovx-Sed em relação ao Sham-Sed.

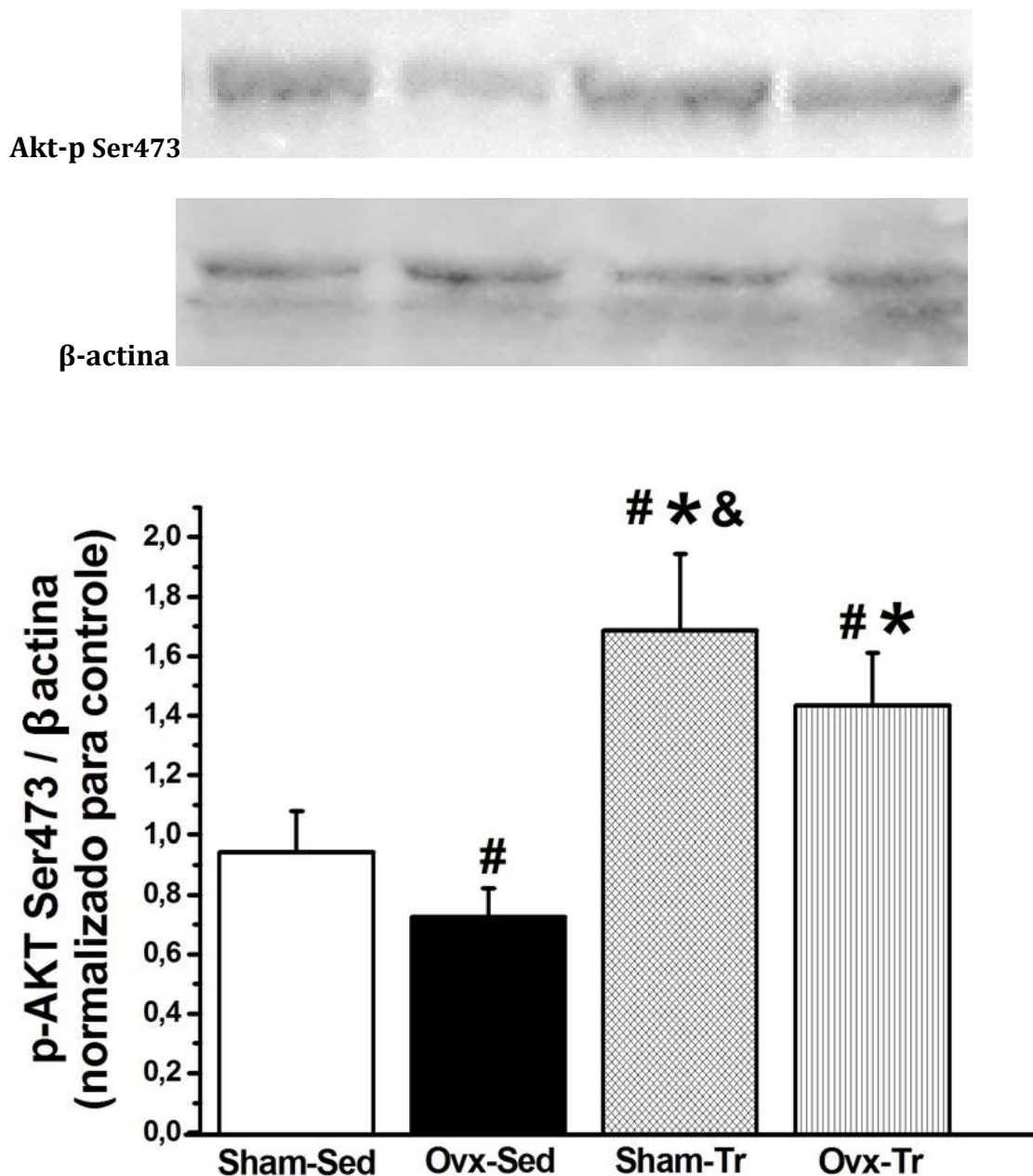


Figura 12– Expressão Proteica de p-Akt Ser473, nos grupos sham operado sedentário (Sham-Sed), ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed), sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). Valores são médias \pm erro padrão da média ($n = 4$ por grupo). #, significativamente diferente de Sham-Sed; * significativamente diferente de Ovx-Sed e & significativamente diferente de Ovx-Tr ($p < 0,05$).

A quantificação proteica de GLUT2 no grupo Sham-Sed foi menor ($p < 0,05$) quando comparada com o grupo Ovx-Sed e maior se comparada com os grupos Sham-Tr e Ovx-Tr. O grupo Ovx-Sed foi significativamente diferente dos grupos Sham-Tr e Ovx-Tr. Entretanto não foi encontrada diferença entre os grupos Sham-Tr e Ovx-Tr (Figura 12).

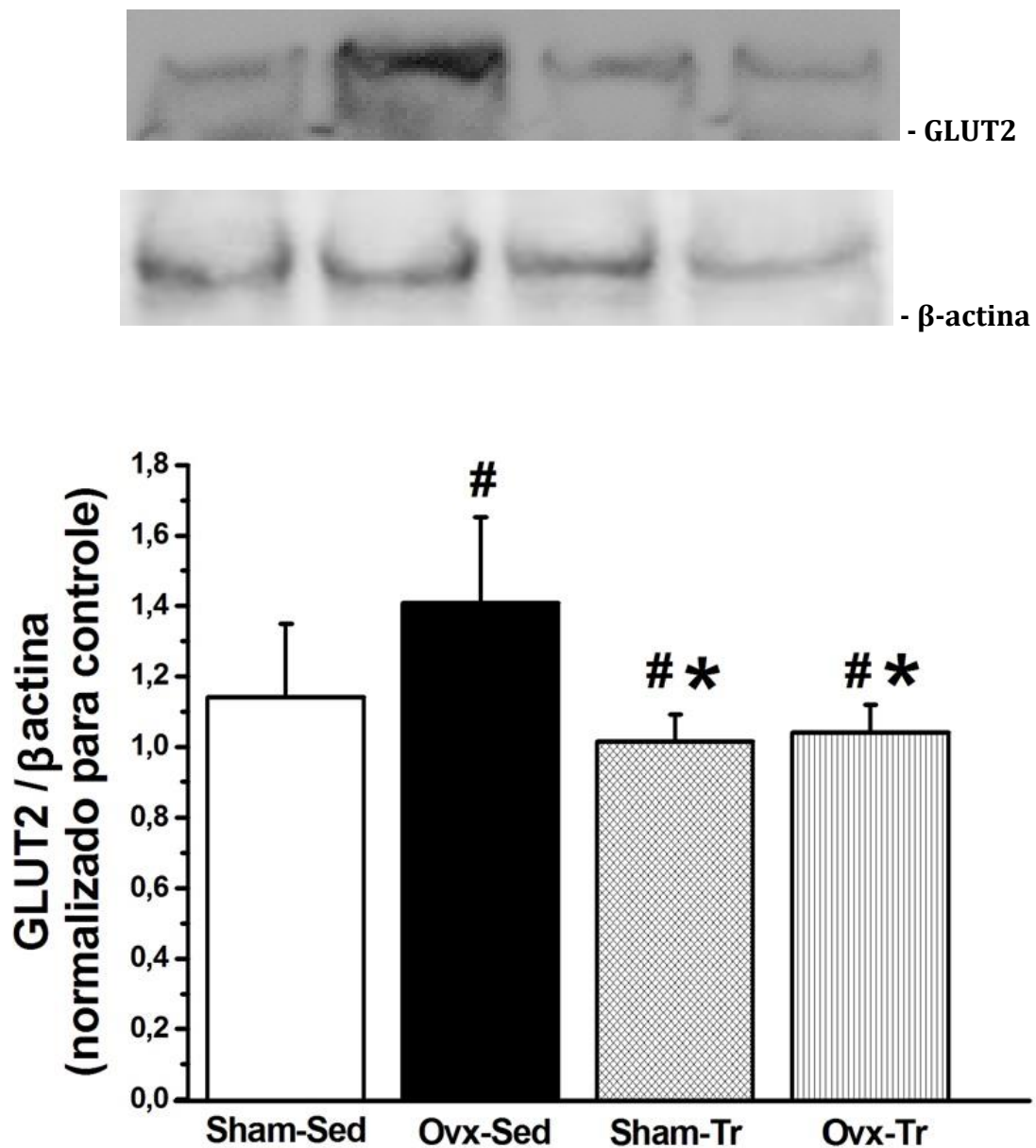


Figura 13 - Expressão proteica de GLUT2 nos grupos sham operado sedentário (Sham-Sed), ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed), sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). Valores são médias \pm erro padrão da média (n = 4 por grupo). #, significativamente diferente de Sham-Sed. *, significativamente diferente de Ovx-Sed (p < 0,05).

7. DISCUSSÃO

O presente estudo observou os efeitos da ovariectomia e treinamento nas variações de percentuais de gordura, expressão gênica do GLUT2 e PGC1- α e expressão proteica de Akt-p (Ser473) e GLUT2. Os principais resultados demonstraram que a ovariectomia pode ter induzido o desenvolvimento de RI por reduzir o conteúdo proteico de Akt fosforilada e, em consequência, superexpressar o gene e a proteína GLUT2 no grupo Ovx-Sed, como observado nas figuras 9 e 12.

Conforme o esperado, outro importante resultado que confirma nossa hipótese é expressão gênica de PGC-1 α (figura 9), houve o aumento da expressão gênica de PGC-1 α no grupo Ovx-Sed, o que pode sinalizar também um aumento da gliconeogênese hepática (LI et al., 2007; PUIGSERVER et al., 2003; RHEE et al., 2003). A associação dessas respostas obtidas pelo desenho experimental confirma parcialmente a hipótese deste trabalho. Os resultados obtidos, referente ao grupo Ovx-Sed demonstraram menor expressão proteica de Akt fosforilada e o aumento da expressão gênica de GLUT2 e PGC-1 α . Estes são alguns dos fatores moleculares determinantes para a indução de RI no fígado.

O aumento da expressão gênica e proteica de GLUT2 está associado com a redução da expressão proteica da Akt fosforilada. Quando a Akt não fosforila passa a induzir o HNF-3 β ao aumento de sua fosforilação, em consequência, ocorre maior transcrição de GLUT2. Esta relação foi demonstrada no estudo de OKA et al. (1990) que analisou esses marcadores hepáticos de ratas ovariectomizadas, além de associa-los com o aumento do acúmulo de gordura no fígado. A superexpressão de GLUT2 no fígado das ratas Ovx-Sed encontrada no presente trabalho, pode refletir uma intolerância a glicose que leva o fígado a aumentar o processo de gliconeogênese, como demonstrado também por outros estudos. (CHAKRAVARTY et al., 2001; DEFRONZO; FERRANNINI, 1991; IM et al., 2005).

O estudo VIEIRA POTTER et al. (2012) demonstrou que a ovariectomia só é capaz de gerar RI após um período de 26 semanas. Em nosso estudo não ocorreram alterações relevantes quando analisados os valores de glicemia (resultados não publicados). Entretanto, de acordo com os resultados obtidos, frente aos sinalizadores moleculares hepáticos, sugere-se que o fígado pode apresentar sinais de RI antes deste período, devido ao seu papel central na regulação metabólica e níveis glicêmicos. Assim o fígado é

o primeiro órgão atingido pela RI. Os outros órgãos não seriam sensíveis a essas alterações glicêmicas tão precocemente.

Vários estudos mostram que a RI inicia-se na falha e/ou bloqueio de alguma proteína da cascata de sinalização da insulina, promovendo uma redução do conteúdo de Akt fosforilada, o que impede o aumento da capacidade e velocidade do GLUT2 de captar a glicose (CHOUKEM; GAUTIER, 2008; LETURQUE; BROT-LAROCHE; LE GALL, 2009). Por consequência a redução do conteúdo de Akt fosforilada significa o aumento do conteúdo de Akt total. Este aumento induz o aumento da atividade do PGC-1 α para promover a oxidação de lipídios para a obtenção de energia para o organismo (BARTHEL; SCHMOLL, 2003). O estudo de LI et al., (2007) demonstra a forte relação da Akt total, com a indução da atividade do PGC-1 α no fígado, além de associa-la com a indução de diabetes mellitus tipo 2.

O TR pode ter sido eficiente em promover a restauração da sinalização da insulina. Nos grupos treinados ocorreu a diminuição da expressão gênica e proteica de GLUT2 e aumento da expressão proteica de Akt fosforilada. No grupo Sham-Tr houve o aumento da expressão gênica de PGC-1 α . Neste caso o aumento da expressão gênica de PGC-1 α representa uma melhora da eficiência metabólica.

A diminuição da expressão gênica e proteica de GLUT2, tanto no grupo Ovx-Tr quanto no Sham-Tr, denota a importante influência do TR na melhora da sensibilidade do GLUT2, independente da ovariectomia. Essa *downregulation* de GLUT2 pode ser gerada devido à ação da AMPK em superexpressar o HNF-4 α , o qual pode promover um bloqueio da superexpressão de GLUT2 (MIQUEROL et al., 1994; SLADEK et al., 1990), além de que a própria AMPK promove aumento da sensibilidade dos IRS1 e 2 e fosforilação da Akt. Esta regulação molecular pode estar diretamente relacionada com a prevenção da RI em mamíferos. O estudo de Pádua (PÁDUA et al.) avaliou o papel da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), em camundongos diabéticos após o exercício físico. Os resultados demonstraram um aumento da atividade da AMPK, redução da expressão da enzima gliconeogênica fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) no fígado e aumento da translocação do GLUT4 no músculo esquelético. Isso denota o importante efeito do exercício físico na melhora do metabolismo glicolítico, por ativar a via AMPK.

A AMPK induzida pelo exercício modula a expressão gênica de PGC1- α (SCARPULLA, 2011), no presente trabalho foi verificado, em todos os grupos, aumento da expressão gênica deste sinalizador em relação ao controle. Por um lado, devido à

falha da sinalização da insulina, pois é bem evidente que o PGC-1 α é superexpresso no jejum (LIANG; WARD, 2006) e a RI gera uma resposta ineficiente à da sinalização deste hormônio, o que simula o jejum no hepatócito. Por outro lado, o TR promove aumento do consumo energético o que também estimula tanto a atividade da AMPK quanto a atividade do PGC-1 α , o que condiz com a maior necessidade de oxidar lipídios para a geração de adenosina trifosfato (ATP) (JAGER et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2004; PÁDUA et al., 2009; SCARPULLA, 2011). Além disso, nestas condições a maior estimulação da AMPK promove melhora da sensibilidade à insulina, o que melhora da eficiência da captação de glicose. Tais aspectos permitem ao hepatócito uma otimização para oxidação dos substratos energéticos (BACKER et al., 1992; BARTHEL; SCHMOLL, 2003; OLIVEIRA et al., 2004; RODGERS et al., 2010). O que evidencia esta eficiência da atividade da AMPK no presente trabalho é a redução do conteúdo proteico de GLUT2 nos grupos treinados.

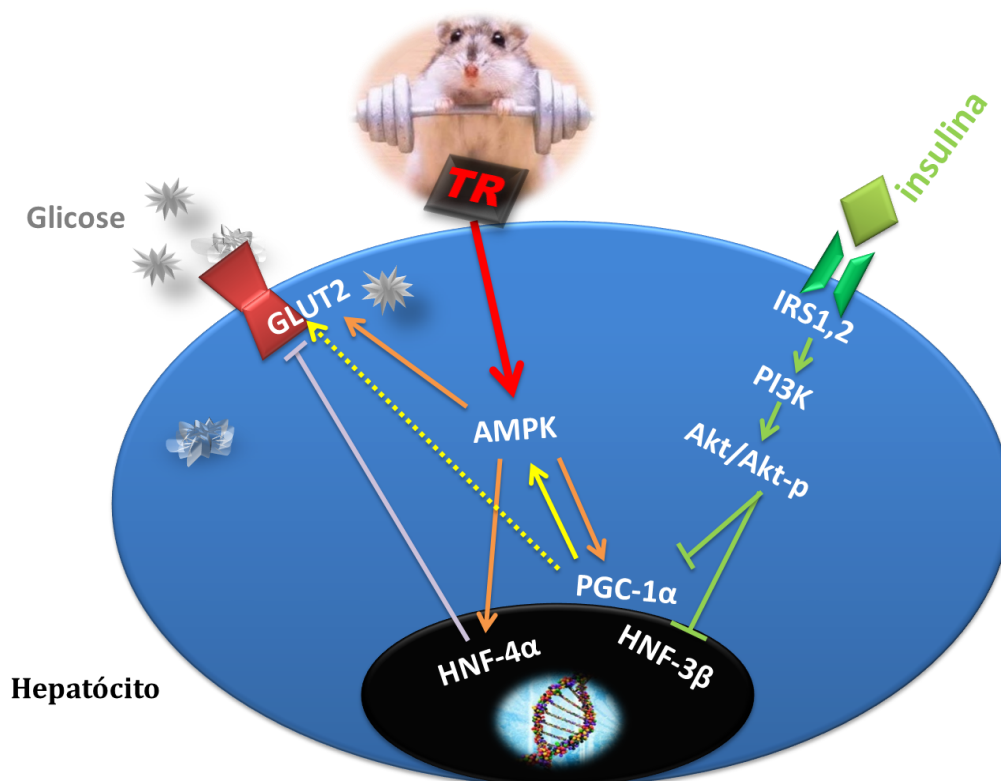


Figura 14 - Mecanismo de captação de glicose induzido pelo TR. IRS1,2; substrato 1 e 2 do receptor de insulina, PI3K; fosfatidilinositol 3 quinase, Akt; proteína quinase B, Akt-p; proteína quinase B fosforilada

em Ser473; GLUT2; transportador de glicose 2, HNF-3 β ; fator nuclear do hepatócito 3 beta; HNF-4 α ; fator nuclear do hepatócito 4 alfa e PGC-1 α .

Os resultados referentes ao peso corporal e ingestão alimentar foram maiores nas ratas Ovx quando comparadas com o grupo controle. A simples ausência dos hormônios femininos gerou, em pouco tempo, alterações significativas nesses parâmetros. Quando analisado a massa das gorduras mesentéricas e retroperitoneal, observou-se um aumento significativo no grupo Ovx-Sed. Esta ausência dos hormônios femininos culmina na necessidade de se obter um aumento nutricional e em conjunto há o aumento da composição corporal.

O TR também se mostrou eficiente em prevenir os efeitos da ovariectomia. Quando analisados o peso corporal, ingestão alimentar e a massa das gorduras mesentéricas e retroperitoneal, o grupo Ovx-Tr teve uma redução significativa quando comparados com o grupo Ovx-Sed. O peso das gorduras mesentéricas e retroperitoneal se aproximaram dos valores do grupo Sham-Sed. O treinamento previne o aumento de acúmulo de gordura, ponto de partida para o desencadeamento de varias doenças como hipertensão, diabetes, osteoporose dislipidemia, entre outros (CARVALHEIRA; SAAD, 2006). Os resultados obtidos quando comparados os grupos, Sham-Tr com Sham-Sed, demonstrou que o TR perse promove redução do consumo alimentar e peso corporal, o que condiz com uma melhora metabólica de todo o organismo.

A massa do útero, como esperado foi significativamente menor nos grupos Ovx. Este resultado se faz devido a eficiência do procedimento da ovariectomia. Sem a presença dos hormônios femininos o útero perde a função e atrofia. O TR não tem autonomia para induzir ou modular as funções uterinas, sendo assim o grupo Ovx-Sed e Ovx-Tr foram similares.

A carga de carregamento dos grupos treinados foi diferente entre a semana 1, 5 e 10. Não houve diferença entre os grupos Sham-Tr e Ovx-Tr, ambos aumentaram a capacidade máxima de carregamento de maneira similar durante todo o período de treinamento (Figura 08), este resultado demonstra que a ovariectomia não promove alterações da capacidade de gerar tensão e não reduz a adaptação muscular ao exercício.

Esta associação de TR e ovariectomia e representa uma possível ferramenta não farmacológica para a prevenção ou o tratamento da RI. Fica evidente que o TR promove melhora da eficiência da captação e oxidação da glicose a nível gênico e proteico. Em resumo o presente estudo demonstrou que o TR restaura as alterações moleculares hepáticas induzidas pela ovariectomia sobre o metabolismo glicolítico no fígado. Estes

resultados corroboram com os achados prévios do nosso grupo de pesquisa (DOMINGOS et al., 2011; LEITE et al., 2009; LEITE et al., 2010).

Apesar desses evidentes benefícios proporcionados pelo TR, este estudo apresenta limitações que poderiam definir com mais clareza as respostas hepáticas, tanto em nível celular quanto sistêmico. A análise de mais marcadores moleculares presentes neste mecanismo nos daria um suporte maior para entendermos como o hepatócito responde a ovariectomia e ao treinamento. Fica a necessidade de mais estudos para detalhar os caminhos utilizados pela célula hepática para garantir a normoglicemia.

O presente estudo pode contribuir para a comunidade científica, na obtenção de novas perspectivas para o tratamento da RI. A utilização do TR como forma não medicamentosa e de baixo custo para a prevenção. Além de sugerir a análise hepática para a determinação precoce do processo de RI.

8. CONCLUSÕES

Os resultados nos permitem concluir que:

- a deficiência de estrogênio devida a Ovx promove o aumento da massa corporal, ingesta alimentar e altera a expressão de genes que favorecem o desenvolvimento da RI no fígado.
- o TR foi efetivo em aumentar a expressão gênica de PGC-1 α minimizando a possibilidade do surgimento de IR.
- a fosforilação da Akt aumentada nas ratas Sham-TR e Ovx-TR propiciou a melhoria na sinalização da insulina, a qual otimizou a regulação gênica e proteica de GLUT2.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, J.; CLEARFIELD, M. Cardiovascular disease after menopause: a growing epidemic. **Minerva Ginecol**, v. 58, n. 1, p. 35-40, Feb 2006.

BACKER, J. M. et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **EMBO J**, v. 11, n. 9, p. 3469-79, Sep 1992.

BARROS, R. P.; MACHADO, U. F.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. **Trends Mol Med**, v. 12, n. 9, p. 425-31, Sep 2006.

BARTHEL, A.; SCHMOLL, D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 285, n. 4, p. E685-92, Oct 2003.

BURCELIN, R. et al. Liver hyperplasia and paradoxical regulation of glycogen metabolism and glucose-sensitive gene expression in GLUT2-null hepatocytes. Further evidence for the existence of a membrane-based glucose release pathway. **J Biol Chem**, v. 275, n. 15, p. 10930-6, Apr 14 2000.

CARR, M. C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 6, p. 2404-11, Jun 2003.

CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Doenças associadas à resistência à insulina/hiperinsulinemia, não incluídas na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 360-367, 2006.

CHAKRAVARTY, K. et al. Sterol regulatory element-binding protein-1c mimics the negative effect of insulin on phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription. **J Biol Chem**, v. 276, n. 37, p. 34816-23, Sep 14 2001.

CHAMBON, P. The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. **Mol Endocrinol**, v. 19, n. 6, p. 1418-28, Jun 2005.

CHEN, L. et al. Effects of insulin treatment on intracellular lipid metabolism in liver of diabetic rats. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v. 26, n. 3, p. 284-7, 2006.

CHOUKEM, S. P.; GAUTIER, J. F. How to measure hepatic insulin resistance? **Diabetes Metab**, v. 34, n. 6 Pt 2, p. 664-73, Dec 2008.

COFFER, P. J.; JIN, J.; WOODGETT, J. R. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. **Biochem J**, v. 335 (Pt 1), p. 1-13, Oct 1 1998.

DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care**, v. 14, n. 3, p. 173-94, Mar 1991.

DOMINGOS, M. M. et al. Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. **Eur J Appl Physiol**, Aug 10 2011.

ERIKSSON, J. et al. Aerobic endurance exercise or circuit-type resistance training for individuals with impaired glucose tolerance? **Horm Metab Res**, v. 30, n. 1, p. 37-41, Jan 1998.

GELONEZE, B. Síndrome metabólica: mito ou realidade? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 409-411, 2006.

HAYASHI, T.; WOJTASZEWSKI, J. F.; GOODYEAR, L. J. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 273, n. 6 Pt 1, p. E1039-51, Dec 1997.

HELLWIG, B.; JOOST, H. G. Differentiation of erythrocyte-(GLUT1), liver-(GLUT2), and adipocyte-type (GLUT4) glucose transporters by binding of the inhibitory ligands cytochalasin B, forskolin, dipyridamole, and isobutylmethylxanthine. **Mol Pharmacol**, v. 40, n. 3, p. 383-9, Sep 1991.

HUANG, W. et al. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. **Diabetes**, v. 59, n. 2, p. 347-57, Feb 2010.

IM, S. S. et al. Glucose-stimulated upregulation of GLUT2 gene is mediated by sterol response element-binding protein-1c in the hepatocytes. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1684-91, Jun 2005.

JAGER, S. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 29, p. 12017-22, Jul 17 2007.

JENSEN, E. V. On the mechanism of estrogen action. **Perspect Biol Med**, v. 6, p. 47-59, 1962.

KAAJA, R. J. Metabolic syndrome and the menopause. **Menopause Int**, v. 14, n. 1, p. 21-5, Mar 2008.

KUIPER, G. G. et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 863-70, Mar 1997.

LEITE, R. D. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, n. 6, p. 1079-86, Dec 2009.

LEITE, R. D. et al. Menopause: highlighting the effects of resistance training. **Int J Sports Med**, v. 31, n. 11, p. 761-7, Nov 2010.

LETURQUE, A.; BROT-LAROCHE, E.; LE GALL, M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 5, p. E985-92, May 2009.

LEVIN, E. R. Estrogen receptor-beta and the cardiovascular system. **Trends Endocrinol Metab**, v. 13, n. 5, p. 184-5, Jul 2002.

LI, X. et al. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 1012-6, Jun 21 2007.

LIANG, H.; WARD, W. F. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. **Adv Physiol Educ**, v. 30, n. 4, p. 145-51, Dec 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LU, Y. et al. Pancreatic-specific inactivation of IGF-I gene causes enlarged pancreatic islets and significant resistance to diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 12, p. 3131-41, Dec 2004.

LUCIANO, E. et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **Eur J Endocrinol**, v. 147, n. 1, p. 149-57, Jul 2002.

MATSUBARA, A. et al. Sequence variations of the pancreatic islet/liver glucose transporter (GLUT2) gene in Japanese subjects with noninsulin dependent diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 80, n. 11, p. 3131-5, Nov 1995.

MIQUEROL, L. et al. Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. **J Biol Chem**, v. 269, n. 12, p. 8944-51, Mar 25 1994.

MOOTHA, V. K. et al. Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 17, p. 6570-5, Apr 27 2004.

MOOTHA, V. K. et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. **Nat Genet**, v. 34, n. 3, p. 267-73, Jul 2003.

MUTHUSAMY, T.; MURUGESAN, P.; BALASUBRAMANIAN, K. Sex steroids deficiency impairs glucose transporter 4 expression and its translocation through defective Akt phosphorylation in target tissues of adult male rat. **Metabolism**, v. 58, n. 11, p. 1581-92, Nov 2009.

NEDROW, A. et al. Complementary and alternative therapies for the management of menopause-related symptoms: a systematic evidence review. **Arch Intern Med**, v. 166, n. 14, p. 1453-65, Jul 24 2006.

NELSON, B. D. Thyroid hormone regulation of mitochondrial function. Comments on the mechanism of signal transduction. **Biochim Biophys Acta**, v. 1018, n. 2-3, p. 275-7, Jul 25 1990.

NIKI, E.; NAKANO, M. Estrogens as antioxidants. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 330-3, 1990.

NILSSON, S. et al. Mechanisms of estrogen action. **Physiol Rev**, v. 81, n. 4, p. 1535-65, Oct 2001.

OKA, Y. et al. Increased liver glucose-transporter protein and mRNA in streptozocin-induced diabetic rats. **Diabetes**, v. 39, n. 4, p. 441-6, Apr 1990.

OLIVEIRA, R. L. et al. Cold-induced PGC-1alpha expression modulates muscle glucose uptake through an insulin receptor/Akt-independent, AMPK-dependent pathway. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 287, n. 4, p. E686-95, Oct 2004.

PÁDUA, M. F. D. et al. Exercício físico reduz a hiperglicemia de jejum em camundongos diabéticos através da ativação da AMPK. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, p. 179-184, 2009.

PATTI, M. E. et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8466-71, Jul 8 2003.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 9, n. 2-4, p. 89-109, 1998.

PEREIRA, G. B. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in rat calcaneal tendon. **Connect Tissue Res**, v. 51, n. 6, p. 459-66, Dec 2010.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 106, n. 2, p. 165-9, Jul 2000.

PRESTES, J. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, n. 4, p. 700-6, Aug 2009.

PUIGSERVER, P. et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. **Nature**, v. 423, n. 6939, p. 550-5, May 29 2003.

RHEE, J. et al. Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 7, p. 4012-7, Apr 1 2003.

RICHARDSON, D. K. et al. Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle. **J Biol Chem**, v. 280, n. 11, p. 10290-7, Mar 18 2005.

SAFE, S.; KIM, K. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. **J Mol Endocrinol**, v. 41, n. 5, p. 263-75, Nov 2008.

SCARPULLA, R. C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 7, p. 1269-78, Jul 2011.

SHIGUEMOTO, G. E. et al. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. **Scand J Med Sci Sports**, v. 22, n. 5, p. 607-17, Oct 2012.

SLADEK, F. M. et al. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. **Genes Dev**, v. 4, n. 12B, p. 2353-65, Dec 1990.

THORENS, B. Facilitated glucose transporters in epithelial cells. **Annu Rev Physiol**, v. 55, p. 591-608, 1993.

TOMIE FURUYA, D. et al. Low ethanol consumption induces enhancement of insulin sensitivity in liver of normal rats. **Life Sci**, v. 77, n. 15, p. 1813-24, Aug 26 2005.

VANHAESEBROECK, B.; ALESSI, D. R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. **Biochem J**, v. 346 Pt 3, p. 561-76, Mar 15 2000.

VERAS, R. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. **Rev Saúde Pública**, v. 43, n. 3, p. 548-54, 2009.

VIEIRA POTTER, V. J. et al. Adipose tissue inflammation and reduced insulin sensitivity in ovariectomized mice occurs in the absence of increased adiposity. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4266-77, Sep 2012.

ZHU, B. T.; CONNEY, A. H. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 1, p. 1-27, Jan 1998.