



## Estudo preliminar da ligação hormônio-receptor da insulina à membranas de músculo e da tolerância à glicose em fêmeas caninas durante o ciclo estral

Hormone-receptor binding preliminary evaluation from insulin to muscles membranes and glucose tolerance in female dogs during oestrus cycle

Álan Gomes Pöppl<sup>1</sup>, Tatiane da Silva Mottin<sup>2</sup>, Cinthia Brum Dias<sup>2</sup>, Irene Breitsmater<sup>3</sup>, Carlos Afonso de Castro Beck<sup>4</sup>, Camila Lasta<sup>5</sup>, Félix Hilário Díaz González<sup>6</sup>, Luiz Carlos Kucharski<sup>7</sup> & Roselis Silveira Martins da Silva<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada-ICBS/UFRGS. <sup>2</sup>Graduação, FAVET/UFRGS. <sup>3</sup>Médica Veterinária, Técnica Contratada, HCV/UFRGS. <sup>4</sup>Setor de Medicina Animal, FAVET/UFRGS. <sup>5</sup>Residente (R2) em Patologia Clínica, Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, HCV/UFRGS. <sup>6</sup>Setor de Patologia Animal, FAVET/UFRGS. <sup>7</sup>Biólogo(a), Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS (Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada).

### ABSTRACT

The major predisposition to diabetes mellitus development by diestral bitches is being associated to progesterone induced mamary production of GH. This work evaluate binding profile between insulina and insulin receptor em bitches during oestrus cycle.

**Key words:** bitches, oestrus cycle, glucose tolerance, insulin receptor.

### INTRODUÇÃO

A cadela é uma espécie poliéstrica anual, apresentando tipicamente um ciclo estral a cada 7 meses, com intervalos inter-estrais de 4 a 13 meses em decorrência de variações individuais, sazonais e raciais. A concentração de progesterona (P4) de cadelas em anestro é basal (< 0,5 ng/ml), permanecendo com valores menores que 1 ng/ml durante o pró-estro. No início do estro a concentração sérica da P4 começa a elevar-se, tipicamente mantendo-se maior que 2 ng/ml. A concentração de P4 continua aumentando durante o estro e as primeiras semanas do diestro, seguido de um platô que normalmente é superior a 40ng/ml (15 – 90 ng/ml). O fim desta fase é marcado pelo retorno da concentração sérica de P4 a valores basais e repouso do eixo hipotálamo-hipófise-ovário [2]. Evidências apontaram um efeito antagonico direto à insulina pela P4, reduzindo a ligação de insulina e transporte de glicose nos tecidos alvos [7]. A liberação de GH pela gândula mamária induzida pela P4 é um fenômeno bem documentado em cadelas [3,10]. Clinicamente observa-se uma maior prevalência de desenvolvimento de diabetes mellitus (DM) em cadelas em diestro [2,5]. O objetivo deste trabalho foi avaliar os perfis de ligação entra a insulina e seus receptores em amostras de músculo de cadelas durante o ciclo estral, bem como a tolerância à glicose.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Trinta e duas pacientes encaminhadas para ovário-salpingo-histerectomia (OSH) eletiva pelo Projeto de Controle Reprodutivo de Cães e Gatos do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS participaram do estudo. Com base no histórico reprodutivo e citologia vaginal as pacientes foram divididas em 3 grupos: anestro (n = 11, idade média 1,51 anos ± 1,02), estro (n = 7, idade média 2,48 anos ± 2,01) e diestro (n = 14, idade média 5,13 anos ± 3,68). Critérios de inclusão como ausência de leucocitose, adequada condição corporal, não uso de progestágenos e ausência de doenças intercorrentes foram adotados. De cada paciente avaliou-se hemograma; plaquetometria; fibrinogênio plasmático; colesterol total e triglicerídeos séricos (kits diagnósticos<sup>1</sup>); citologia vaginal e ultra-sonografia abdominal.

No pré-operatório, foi realizado um teste intra-venoso de tolerância à glicose (IVGTT) com determinação de glicemia nos tempos 0, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 minutos de IVGTT [4]. Para determinação da glicemia foi utilizado um glucômetro portátil<sup>2</sup>. O protocolo anestésico foi padronizado para ambos grupos com ampicilina sódica (22 mg/kg, IV), meperidina (3 mg/kg, IM), propofol (5 mg/kg, IV) e manutenção com isoflurano em oxigênio à 100%. Após OSH coletou-se 2 gramas de músculo retro-abdominal de cada paciente; imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até análise posterior.

As membranas de músculo foram preparadas homogeneizando o músculo em tampão TES (Tris 10mM, EDTA 1mM, Sacarose 250mM) pH 7,4 (1:5 P/V) e isoladas por centrifugação fracionada sob refrigeração. Os ensaios de ligação foram realizados oferecendo-se 400 µg de proteína por tubo em tampão Krebs-Ringer mamífero (KRM) pH 7,4 com albumina sérica bovina (BSA) a 1% na presença de concentrações crescentes de insulina regular humana<sup>3</sup> (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml e 500 µg/ml) mais 20000 cpm de insulina-<sup>125</sup>I humana<sup>4</sup> ou somente na presença de insulina marcada (ligação total). Após 2 horas de incubação a 25°C, o conteúdo dos tubos foi filtrado (filtro Whatman<sup>5</sup>). Cada filtro foi lavado 5 vezes com 1 ml de KRM 0,1% BSA. Depois de secos foi medida, em contador LKB, a formação do complexo insulina-<sup>125</sup>I

humana/receptor. O tratamento estatístico foi feito com ANOVA de uma via seguida de Teste de Tukey, considerou-se significativo valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

O peso médio do grupo anestro foi  $14,31 \text{ kg} \pm 6,5$  (condição corporal  $2,92 \pm 0,47$ ), enquanto o grupo estro apresentou peso médio  $16,75 \text{ kg} \pm 9,8$  (condição corporal  $3,09 \pm 0,33$ ) e o grupo diestro  $17,35 \text{ kg} \pm 9,87$  (condição corporal  $3,05 \pm 0,44$ ). Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos com relação a: leucometria, fibrinogênio plasmático, colesterol total, triglicerídeos séricos, glicemia basal e glicemia nos tempos de IVGTT estudados.

Não foi observada diferença significativa na ligação total entre os grupos anestro ( $1372,2 \text{ cpm} \pm 500,1$ ); estro ( $903,3 \text{ cpm} \pm 135$ ) e diestro ( $1469,8 \text{ cpm} \pm 500,2$ ). A redução percentual a partir da ligação total (100%) em presença de concentrações crescentes de insulina regular humana foi 70,1% no grupo anestro; 94,7% no grupo estro e 90,1% no grupo diestro na presença de  $0,1 \mu\text{g/ml}$  de insulina. Na presença de  $1 \mu\text{g/ml}$  de insulina regular, os valores foram: anestro 69,6%; estro 78,1% e diestro 83,3%. Em presença de  $10 \mu\text{g/ml}$  o percentual passou para 59,4% no grupo anestro; 66,3% no grupo estro e 78,5% no grupo diestro. Com  $100 \text{ } \mu\text{g/ml}$  de insulina os valores foram: anestro 55,9%; estro 68,5% e diestro 63,8%. Enquanto o grupo anestro apresentou valores de ligação 47,9% da ligação total, os grupos estro e diestro apresentaram respectivamente 64,9% e 61,3% com insulina regular na dose de  $250 \mu\text{g/ml}$  ao ensaio. Enfim, na presença de  $500 \mu\text{g/ml}$  o grupo anestro evidenciou uma ligação de 48,7% da ligação total e os grupos estro e diestro 64,3% e 52,4% respectivamente.

Os valores de ligação na presença de  $0,1 \mu\text{g/ml}$  de insulina regular foram diferentes entre os grupos estro e diestro ( $p < 0,001$ ) em comparação ao grupo anestro. Da mesma forma, observou-se diferença significativa na presença de  $250 \mu\text{g/ml}$  de insulina não marcada ( $p = 0,003$ ). Nas concentrações de  $1 \mu\text{g/ml}$ ,  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$  e  $500 \mu\text{g/ml}$  não observou-se diferenças significativas entre os grupos, apesar dos valores respectivos de  $p = 0,071$ ,  $p = 0,073$ ,  $p = 0,361$  e  $p = 0,069$ .

## DISCUSSÃO

Um estudo verificou prevalência de 79% de fêmeas com diagnóstico recente na fase do diestro [5]. Muitas vezes o início do estro pode ser um fator de risco a cetoacidose em pacientes diabéticas com pobre controle, persistindo a resistência insulínica ao longo do diestro [2,5,8]. Entretanto, não foi demonstrada evidência de diferenças significativas entre valores de glicemia, tolerância à glicose e concentrações de insulina em cadelas em anestro, estro ou diestro [8]. Porém em cadelas diabéticas não castradas, fica clara a supressão de secreção de insulina nas fases de estro; e principalmente no diestro em comparação as diabéticas em anestro [8]. Até o momento este estudo apresentou resultados similares com relação à tolerância à glicose. A avaliação futura da insulinemia nos tempos de IVGTT poderá vir de encontro a esta observação.

São raros os estudos avaliando a relação primária da P4 com a sensibilidade à insulina [2,7]. Além de efeitos autócrinos e parácrinos na mama, o GH mamário pode apresentar um importante efeito endócrino; resultando em resistência insulínica e eventualmente sinais de acromegalia [2,3]. Observou-se maior secreção basal de GH e menor secreção em pulsos de GH durante platôs de P4 plasmática. Acredita-se que esta mudança possa ser decorrente da supressão parcial da liberação de GH pela hipófise em uma retroalimentação negativa do GH mamário [4]. O GH é um hormônio antagonista à insulina e um importante modulador da sensibilidade à insulina [1]. A hiperinsulinemia característica de quadros de excesso de GH resulta em redução da concentração de receptores de insulina e prejuízo de sua atividade tirosina-quinase [1]. Um estudo não demonstrou alterações significativas ao longo do ciclo estral em cadelas controle no colesterol total e triglicerídeos, ao contrário do observado em pacientes diabéticas não castradas [6]. O mesmo foi demonstrado até o momento neste estudo e em outros trabalhos do nosso grupo.

Os resultados dos ensaios de ligação hormônio-receptor evidenciam diferentes padrões de ligação insulina-receptor. A análise dos resultados com o programa de Scatchard permitirá a determinação da concentração dos receptores de insulina por  $\mu\text{g}$  de proteína de membrana bem como a determinação da constante de dissociação hormônio-receptor [9]. Amostras de membranas estão sendo armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  para avaliação da atividade tirosina-quinase do receptor de insulina em cada grupo. Também será determinada a concentração de glicogênio muscular.

## CONCLUSÃO

Estes resultados evidenciam um padrão diferente de interação da insulina com seus receptores de alta e baixa afinidade em cadelas em estro e diestro em comparação com cadelas em anestro. O estudo dos receptores de insulina em tecidos alvo pode ajudar a elucidar os mecanismos envolvidos na maior predisposição à diabetes em cadelas em diestro.

## NOTAS INFORMATIVAS

<sup>1</sup>Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil.

<sup>2</sup>Accu-Check Active, Roche Diagnóstica, Jacarepaguá, Brasil.

<sup>3</sup> $^3\text{I}$ -[<sup>125</sup>I] iodotyrosyl A <sup>141</sup> insulin, human recombinant, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido.

<sup>4</sup>Biohulin R, Biobrás, Montes Claros, Brasil.

<sup>5</sup>GF/B, Whatman, Maidstone, Inglaterra.

## REFERÊNCIAS

- 1 **Dominici F.P., Argentino D.P., Muñoz M.C., Miquet J.G., Sotelo A.I., Turyn D. 2005.** Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. *Growth Hormone & IGF Research*. 15: 324-336
- 2 **Feldman E.C. & Nelson R.W. 2004.** *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3.ed. Missouri: Saunders, 1089p.
- 3 **Kooistra H.S., den Hertog E., Okkens A.C., Mol J.A., Rijnberk A. 2000.** Pulsatile secretion pattern of growth hormone during the luteal phase and mid-anoestrus in beagle bitches. *Journal of Reproduction and Fertility*. 119: 217-222.
- 4 **Mattheeuws D., Rottiers M.D., Kaneko J.J. & Vermeulen M.D. 1984.** Diabetes mellitus in dogs: relationship of obesity to glucose tolerance and insulin response. *American Journal of Veterinary Research*. 45: 98-103.
- 5 **Pöpl A.G., González F.H.D. 2005.** Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais da diabetes mellitus em cães. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33: 33-40.
- 6 **Renauld A., Gomez N.V., Scaramal J.D., Garrido D., Wanke M.M. 1998.** Natural estrous cycle in normal and diabetic bitches. Basal serum total lipids and cholesterol. Serum tryglicerides profiles during glucose and insulin tests. *Acta Physiologica Pharmacologica et Therapeutica Latino Americana*. 48: 41-51.
- 7 **Ryan E.A., Enns L. 1988.** Role of gestacional hormones in the induction of insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 67: 341-348.
- 8 **Scaramal J.D., Renauld A., Gomez N.V., Garrido D., Wanke M.M., Marquez A.G. 1997.** Natural estrous cycle in normal and diabetic bitches in relation to glucose and insulin tests. *Medicina (Buenos Aires)*. 57:169-80.
- 9 **Scatchard G. 1949.**The attraction of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 51: 660-677.
- 10 **Selman P.J., Mol J.A., Rutteman G.R. & Rijnberk A. 1994.** Progestin treatment in the dog I. Effects on growth hormone, insuli-like growth factor-I and glucose homeostasis. *European Journal of Endocrinology*. 131: 413-421.

