

Humberto de Mello Brandão

Efeito da insulina sobre a superovulação de ovelhas e desenvolvimento de um sistema nanoestruturado para permeação de mucosa

São Paulo
2009

Humberto de Mello Brandão

Efeito da insulina sobre a superovulação de ovelhas e desenvolvimento de um sistema nanoestruturado para permeação de mucosa

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira

São Paulo
2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2216
FMVZ

Brandão, Humberto de Mello

Efeito da insulina sobre a superovulação de ovelhas e desenvolvimento de um sistema nanoestruturado para permeação de mucosa / Humberto de Mello Brandão. -- 2009.

124 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira.

1. Ovelha. 2. Insulina. 3. Superovulação. 4. Nanopartícula. 5. Diabetes.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da influência da insulina em ovelhas superovuladas e desenvolvimento de uma formulação nanoestruturada de longa ação contendo insulina", protocolado sob o nº1580/2009, utilizando 32 (trinta e dois) ovelhas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/05/09.

We certify that the Research "Evaluation of the effects of the insulin in superovulated ewe and development of long action nanostructured formulation with insulin load", utilizing 32 (thirty two) ovine, protocol number 1580/2009, under the Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/20/09.

São Paulo, 21 de maio de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP



Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BRANDÃO, Humberto de Mello

Título: Efeito da insulina sobre a superovulação de ovelhas e desenvolvimento de um sistema nanoestruturado para permeação de mucosa

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus dois orientadores Prof. Ed Hoffmann Madureira e Profa. Annelise de Souza Traldi pela paciência, amizade e ensino.

À Harumi Doi Shiraishi, secretária do departamento de reprodução animal – VRA, pela presença, disposta sempre a ajudar.

Às mãos amigas de Priscila do LDH pelo auxílio na dosagem da progesterona e José Nélio na estatística.

Aos estagiários da Unincor e da Embrapa Gado de Leite pela paciência e dedicação.

Ao corpo docente da Universidade de São Paulo pela possibilidade do conhecer e partilhar.

À minha esposa Tarita, ouvinte, companheira de todas as horas estando eu presente ou ausente.

Aos meus pais e irmãos por fazerem parte da torcida pelas minhas vitórias.

À todos que rezaram por mim, sogra, tios, tias, amigos e voltaram o olhar de Deus mais um pouquinho para esta minha conquista.

Especialmente à Deus por estar vivo e conseguir vencer mais esta etapa amparado por seu olhar de pai zeloso.

RESUMO

BRANDÃO, H. M. **Efeito da insulina sobre a superovulação de ovelhas e desenvolvimento de um sistema nanoestruturado para permeação de mucosa.**[Insulin Effect on Sheep Superovulation and the Development of a nanostructure system for mucosal permeability]. 2009. 124f. Tese (Doutorado em Ciência). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2009.

A nutrição é o principal fator que interfere com o desempenho reprodutivo de mamíferos e vários metabólitos e hormônios, envolvidos no metabolismo energético, funcionam como sinalizadores para o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. O fato de a insulina ser o principal regulador da homeostase de glicose e exercer controle em diversas etapas do metabolismo de gorduras e proteínas, fez desse hormônio, ao longo do processo evolutivo, um modulador da reprodução. Neste estudo, no experimento 1, foi comparado o efeito da hiper e da hipoinsulinemia, no desempenho reprodutivo relacionado ao processo de superovulação em ovelhas. Para tanto foram utilizadas 27 ovelhas, distribuídas em 3 grupos: a) controle; b) grupo diabético (induzido pela aplicação I.V. de 50mg/kg de Alloxano); e c) grupo hiperinsulinêmico (suplementado com 1 UI/kg ao dia, S.C.). Todos os animais receberam um pessário vaginal, contendo 60 mg de medroxiprogesterona no D0 e foram superovulados, com 250UI de FSH em 6 aplicações, iniciadas no D10. No D12 aplicaram-se 250UI de eCG e 125 µg de cloprostenol sódico. As ovelhas foram submetidas à monta natural e a colheita dos embriões foi realizada no sétimo dia após o início do estro. Em média, os teores de insulina medidos a partir da remoção dos pessários até a colheita dos embriões foram de $14,52 \pm 0,4$ vs $10,18 \pm 0,5$ vs $20,05 \pm 0,9$ µUI/mL ($P < 0,01$), respectivamente para os grupos controle, diabético e hiperinsulinêmico. Os valores para glicemia, medida no mesmo período, para os grupos controle, diabético e hiperinsulinêmico foram de $83,1 \pm 2,1$ mg/dL vs $241,2 \pm 9,2$ mg/dL vs $53,9 \pm 2,7$ mg/dL ($P < 0,01$), respectivamente. O grupo diabético apresentou menor produção de corpos lúteos que os animais controle e hiperinsulinêmicos ($5 \pm 1,1$ vs $10,3 \pm 1,9$ e $11,3 \pm 1,1$, $P < 0,01$); pior qualidade do CL (IQCL de $2,3 \pm 0,3$ vs $1,6 \pm 0,1$ e $1,3 \pm 0,1$, $P < 0,01$), menor número de embriões ($2,3 \pm 1,2$ vs $7,9 \pm 1,97$ e $7,4 \pm 1,2$, $P < 0,01$), que por sua vez também foram de pior qualidade (IQE de $2,9 \pm 0,2$ vs $2 \pm 0,1$ e $1,7 \pm 0,1$, $P < 0,01$). De um modo geral, os animais hiperinsulinêmicos apresentaram desempenho

reprodutivo semelhante aos do grupo controle; entretanto, embora o número de embriões colhidos não tenha sido estatisticamente diferente, os dados são sugestivos de que o estado de hiperinsulinemia pode favorecer o crescimento embrionário, acelerando seu desenvolvimento. Histologicamente, os CL do grupo diabético se apresentaram com hipotrofia das LLC, aumento no número de células apoptóticas por campo, quando comparados aos dos tratamentos controle e hiperinsulinêmico. Adicionalmente, no experimento 2, foram testadas formulações de nanopartículas de quitosana, para liberação sustentada de insulina, bem como permeação da mucosa gastrintestinal. A formulação de insulina nanoestruturada, sem proteção lipídica, administrada pela via SC, liberou $92,1 \pm 3,01\%$ da quantidade inicial de insulina, *in vitro*, porém o padrão desejado de liberação sustentada não foi atingido. No teste *in vivo*, a redução da glicemia foi apenas parcial (em média $60,8 \pm 3,2\%$ em relação à linha de base). O sistema composto por nanopartículas incorporadas à matriz lipídica, no teste *in vitro*, liberou apenas $15,6 \pm 4,9\%$ da quantidade inicial. Entretanto, quando administrada pela via oral, no teste *in vivo*, reduziu, embora parcialmente, a glicemia de ovinos diabéticos alloxano induzidos (em média $79,88 \pm 4,3\%$ em relação à linha de base). Concluiu-se, com base no experimento 1 que, na dose empregada, a insulina não foi capaz de produzir benefícios reprodutivos que justifiquem seu uso em protocolos de superovulação de ovelhas. As concentrações subfisiológicas de insulina, observadas nos animais diabéticos podem ser responsáveis por uma série de alterações metabólicas, que, em conjunto, comprometeram os índices de desempenho reprodutivo, relacionados ao processo de superovulação e induziram um quadro inicial de regressão de CL. Com isso, observou-se que o uso de ovelhas, como modelo animal, para estudo dos efeitos reprodutivos da insulina, foi satisfatório. Pela análise do experimento 2, concluiu-se que o sistema de nanopartículas revestidas por lipídios foi capaz de carrear a insulina, ao longo do trato digestivo de um ruminante, no teste *in vivo*, e compatibilizar sua permeação através da mucosa intestinal, mantendo a atividade biológica do hormônio, o que consiste em um fato inédito.

Palavras-chave: Ovelha; insulina; Superovulação; Nanopartícula; Diabetes

ABSTRACT

BRANDÃO, H. M. **Insulin Effect on Sheep Superovulation and the Development of a nanostructure system for mucosal permeability.** [Efeito da insulina sobre a superovulação de ovelhas e desenvolvimento de um sistema nanoestruturado para permeação de mucosa] 2009. 124f. Tese (Doutorado em Ciência). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2009.

Nutrition is the main factor that interferes with the reproductive development of all mammals and many of the metabolites and hormones involved in the energetic metabolism work as signaling factors for the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. The fact of insulin being the main regulator of glucose homeostasis and having control in various steps of fat and protein metabolism, has made this hormone, along the evolution process, a reproductive modulator. In the first experiment of this study, the effect of hyper and hypoinsulinemia were compared as to how it affects the reproductive performance related to superovulation in sheep. For this, 27 sheep were used, distributed in 3 groups a) control, b) diabetic group (induced by IV injection of 50mg/kg of Alloxan); and c) hyperinsulinemic group (supplemented with 1 UI/kg per day, SC). All animals received a vaginal pessary, containing 60 mg of medroxyprogesterone on D0 and were superovulated, with 250UI of FSH in 6 applications, starting on D10. On D12 250UI of eCG and 125 µg of sodium cloprostenol were administered. The sheep were submitted to natural breeding and embryo collection was performed on the seventh day after the beginning of estrus. In average, the insulin levels recorded starting on the day of pessary removal until the day of embryo collection were $14,52 \pm 0,4$ vs $10,18 \pm 0,5$ vs $20,05 \pm 0,9$ µUI/mL ($P < 0,01$), respectively for the control, diabetic and hyperinsulinemic groups. The values for glycemia, measured during the same period, for the control, diabetic and hyperinsulinemic groups were $83,1 \pm 2,1$ mg/dL vs $241,2 \pm 9,2$ mg/dL vs $53,9 \pm 2,7$ mg/dL ($P < 0,01$), respectively. The diabetic group showed less corpus lutea production than the control and hyperinsulinemic groups ($5 \pm 1,1$ vs $10,3 \pm 1,9$ and $11,3 \pm 1$, $P < 0,01$); worse CL quality (IQCL de $2,3 \pm 0,3$ vs $1,6 \pm 0,1$ and $1,3 \pm 0,1$, $P < 0,01$), less number of embryos ($2,3 \pm 1,2$ vs $7,9 \pm 1,97$ and $7,4 \pm 1,2$, $P < 0,01$), which by its turn were also of worse quality (IQE de $2,9 \pm 0,2$ vs $2 \pm 0,1$ and $1,7 \pm 0,1$, $P < 0,01$). Overall, hyperinsulinemic animals presented a reproductive performance similar to the control group; however, although the number of embryos recovered were not

statistically different, the data suggest that the state of hyperinsulinemia can favor embryo growth, accelerating its development. Histologically, the CLs from the diabetic group showed hypotrophy of LLC and an increase in the number of apoptotic cells per field when compared to the control and hyperinsulinemic treatments. In addition, the second experiment, chitosan nanoparticles formulations were tested, for sustained release of insulin as well as gastrointestinal mucosal permeability. The nanostructured insulin formulation without lipid protection, administered SC, released $92,1 \pm 3,01\%$ of the initial insulin amount, *in vitro*, however, the desired standard for sustained release was not reached. In the *in vivo* test, the reduction in glycemia was only partial (on average $60,8 \pm 3,2\%$ in relation to base line). In the *in vitro* test, the system made up of nanoparticles incorporated to the lipid matrix, released only $15,6 \pm 4,9\%$ of the initial amount. However, when administered orally, in the *in vivo* test, it reduced, although only partially, the glycemia of the alloxan induced diabetic ovines (on average $79,88 \pm 4,3\%$ in relation to base line). In conclusion, based on the first experiment, the applied insulin dose was not able to produce any reproductive benefits that may justify its use in sheep superovulation protocols. The sub-physiologic insulin concentrations observed in the diabetic animals may be responsible for various metabolic alterations, that together compromised the reproductive performance levels related to the superovulation process and induced an initial state of CL regression. With that, it was noticed that the use of sheep as an animal model for the study of the effects of insulin on reproduction was satisfactory. By analyzing the second experiment, it was concluded that the nanoparticles system coated with lipids was able to carry insulin along the ruminant digestive during the *in vivo* test, show permeability through the intestinal mucosa, maintaining the hormone biologic activity, which is a new and unpublished fact.

Key words : Ewe; insulin; Superovulation; Nanoparticles; Diabetes

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

