FELIPE NATALI ALMEIDA

DESIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) E ENVELHECIMENTO:

MECANISMOS CELULARES DO EFEITO POTENCIALIZADOR SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo
2012

FELIPE NATALI ALMEIDA

DESIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) E ENVELHECIMENTO:

MECANISMOS CELULARES DO EFEITO POTENCIALIZADOR SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiologia Humana.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Almeida, Felipe Natali.
Desidroepiandrosterona (DHEA) e envelhecimento: mecanismos celulares do efeito potencializador sobre a secreção de insulina / Felipe Natali Almeida. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Mecanismos intracelulares de ação insulínica e interação com outros hormônios.

Versão do título para o inglês: Dehydroepiandrosterone (DHEA) and aging: cellular mechanisms of the potentiating effect on insulin secretion.

1. Desidroepoandrosterona 2. Envelhecimento 3. Ilhotas pancreáticas 4. Secreção de insulina I. Carvalho, Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0160/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Felipe Natali Almeida.

Título da Tese: Desidroepiandrosterona (DHEA) e envelhecimento: mecanismos celulares do efeito potencializador sobre a secreção de insulina.

Orientador(a): Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-7438
e-mail cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.032.08

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 051/05/CEEA, datado de 02.06.05 e por solicitação da Profa. Dra. CARLA ROBERTA DE OLIVEIRA CARVALHO, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno, **Felipe Natali Almeida** ao projeto de pesquisa "*Desidroepiandrosterona e ação insulínica: regulação da secreção de insulina, das etapas iniciais da ação insulínica, do fator de transcricional PDX-1 e da expressão do GLUT2, em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos*" uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 07 de julho de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEEA- ICB/USP

EXPEDIÇÃO
DATA 08/07/08
REL. N.º 2813

Ao meu pai, minha mãe e minha irmã, que de certa forma, participaram de todos os momentos felizes e de dificuldade ao longo de meu doutorado, me apressando para eu não perder o ônibus nas constantes viagens, abrindo mão de minha presença em muitos momentos, tentando frear minha correria, enfim, por tudo que passamos, amo muito vocês.

À minha tia, Maria Aparecida Natali, minha segunda mãe, por ajudar a equilibrar nossa família (mesmo que desequilibrando para o lado extremo, mas na média...) e por estar presente em todas as fases de minha vida. Você é muito importante em minha vida e de todos em nossa casa. Amo você.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre guiando meus passos.

À minha orientadora, Profª. Drª. Carla Roberta de Oliveira Carvalho, primeiro, por me aceitar no laboratório, depois por não me mandar embora mesmo com a bagunça... (não que eu seja bagunceiro sempre), e pelas conversas, orientações, direcionamentos e por estimular minha criatividade.

Aos amigos do laboratório, Anderson, Teca, João Paulo, Katherine, Mário, Karina, Gabriela, Cris (BriBri), Vitor, por tornar a jornada desse doutorado muito mais divertida, alegre, leve, engraçada. Demos muitas risadas...

A todos do laboratório do Prof. Angelo, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho, assim como a todos os professores do departamento de Fisiologia e Biofísica, que de certa forma participaram e contribuíram na minha formação acadêmica.

A minha namorada, Maynara Lucca Andrade, que tem me dado incentivo, amor, carinho e atenção nesta etapa importante de minha vida.

A galera dos demais laboratórios, pelas risadas, pizzas, risadas de novo, e risadas novamente, enfim, por se tornarem grandes amigos ou por fortalecer mais ainda amizades antigas... em especial Leonardo Torres, Patricia Chimin, Talita Farias, Andressa Bolsoni, Ariclécio Oliveira, Arnaldo, Renato Nachbar...

Também a todos os funcionários técnicos-administrativos do departamento de Fisiologia e Biofísica (biotério, secretarias, audiovisual, biblioteca, segurança e limpeza).

A CAPES pelo apoio financeiro.

“Se o problema tem solução, não se preocupe, ele tem solução. Se o problema não tem solução, não se preocupe, ele não tem solução”

Autor desconhecido

“Tudo posso Naquele que me fortalece”

Filipenses 4:13

RESUMO

Almeida FN. Desidroepiandrosterona (DHEA) e envelhecimento: mecanismos celulares do efeito potencializador sobre a secreção de insulina. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

A muito está estabelecido em humanos e em modelos experimentais que com o envelhecimento ocorre um prejuízo na capacidade secretora de insulina. Esta modificação está associada com o aumento na adiposidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (DM2). Em contrapartida, existem evidências associando o tratamento com um esteróide adrenal, a desidroepiandrosterona (DHEA), levando a melhorias na sensibilidade à insulina, secreção de insulina estimulada por glicose, e em alguns modelos animais, redução do peso e adiposidade. No presente trabalho, objetivamos identificar os efeitos celulares pelo qual o DHEA melhora a função das ilhotas pancreáticas. Para tanto, ratos wistar com 12-14 meses de idade receberam uma única injeção subcutânea de DHEA ($10mg.kg^{-1}$) ou veículo em igual volume. Após uma semana, ilhotas pancreáticas destes animais foram isoladas para realização dos seguintes testes: secreção de insulina estimulada por diferentes secretagogos (glicose em diferentes concentrações, arginina 20mM, leucina 10mM, alfa-cetoisocaproato 10mM, carbacol 100µM, *forskolin* 10µM, IBMX 1mM e tolbutamida 100µM), respiração mitocondrial, oxidação de glicose, atividade da citrato sintase, fragmentação de DNA, expressão gênica e dosagem plasmáticas de hormônios esteróides sexuais. Apesar da ausência de efeitos sobre peso corporal, adiposidade e homeostase da glicose, o grupo tratado com DHEA apresentou melhoria significativa na secreção de insulina estimulada por glicose, arginina, leucina, carbacol, tolbutamida e *forskolin.* Em adição, observamos aumento na oxidação da glicose, respiração mitocondrial, atividade da citrato sintase, expressão do PCNA mRNA, seguido de reduzida apoptose. Adicionalmente, ao realizarmos o ensaio de secreção de insulina estimulado por glicose na presença de inibidores de receptores de andrógeno (flutamide) e estrógeno (ICI 182,780), ocorreu uma perda no efeito potencializador da secreção pelo DHEA. Desta forma, podemos concluir que o DHEA é capaz de melhorar a funcionalidade metabólica e reduzir o índice de apoptose da ilhota pancreática, melhorando a capacidade secretora frente a diferentes secretagogos, sendo este papel modulado, provavelmente, pela ligação do DHEA aos receptores de andrógenos e estrógenos. Estes resultados também reforçam o papel da reduzida função metabólica nas ilhotas pancreáticas ocorrido com o envelhecimento como um agente causador do aumento da prevalência de DM2.

Palavras-chave: Desidroepiandrosterona. Envelhecimento. Ilhotas pancreáticas. Secreção de insulina.

ABSTRACT

Almeida FN. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and aging: cellular mechanisms of the potentiating effect on insulin secretion. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

It has long been known that with aging, there is a decrease in insulin secretion capacity in both, humans and experimental animal models. This change is associated with increased adiposity, insulin resistance and diabetes type 2 (DM2). On the other hand, there are some evidences associating the treatment with an adrenal steroid, dehydroepiandrosterone (DHEA), with improvements in insulin resistance, glucose-stimulated insulin secretion, and in some animal models, the reduction of body weight and adiposity. In the present study, we sought to identify the cellular effects by which DHEA improves pancreatic islets function. For this purpose, male Wistar rats, 12-14 month-old, receive one subcutaneous injection of DHEA ($10mg.kg^{-1}$) or vehicle (in a same volume). After a week, pancreatic islets from these animals were isolated and submitted to the following tests: insulin secretion stimulated by several secretagogues (different concentrations of glucose, arginin 20mM, leucine 10mM, alfa-ketoisocaproate 10mM, carbachol 100 µM, *forskolin* 10µM, IBMX 1mM, tolbutamide 100µM and arginine 20mM), mitochondrial respiration, glucose oxidation, citrate synthase activity, DNA fragmentation, gene expression and the dosage of plasmatic steroid hormones. Despite the absence of effects on body weight, adiposity and glucose homeostasis, the animals treated with DHEA presented significant improvement in glucose-, arginine-, leucine-, carbachol-, tolbutamine-, arginine-, and *forskolin*-stimulated insulin secretion. In addition, we observed na increase in glucose oxidation, mitochondrial respiration, citrate synthase activity, PCNA mRNA expression, followed by reduced apoptosis. Additionally, when performing the test for glucose-stimulated insulin secretion in the presence of androgen (flutamide) and estrogen (ICI 182,780) receptor inhibitors, there was suppression on the potentiating effect of secretion of DHEA. Thus, we can conclude that DHEA is capable of improving metabolic functionality and reduces apoptosis index in pancreatic islets, improving the secretory capacity stimulated by different secretagogues, with this being probably modulated by the binding of DHEA to androgen and estrogen receptors. These results also reinforce the role of reduced metabolic function of pancreatic islets, with aging as a causative agent in the increasing prevalence of DM2.

Keywords: Dehydroepiandrosterone. Aging. Pancreatic islets. Insulin secretion.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL: Ácidos graxos livres

AKT: *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*

AR: Receptor de andrógenos

cAMP: Adenosina monofosfato cíclico

CON: Controle

DHEA: Dehidroepiandrosterona

DHEA-S: Dehidroepiandrosterona sulfatado

DM2: Diabetes Mellitus do tipo 2

EPM: Erro padrão da média

ER: Receptor para estrogênios

FCCP: p-[trifluoromethoxy]-phenyl-hydrazone

FSH: Hormônio folículo estimulante

GLUT-2: Isoforma 2 do transportador para glicose

GPx: Glutationa peroxidase

GTT: Teste de tolerância à glicose

IBMX: Isometilbutilxantina

IL-1β: Interleucina 1 beta

IMC: Índice de Massa Corporal

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

IRS: Substrato do receptor de insulina

ITT: Teste de tolerância à insulina

KIC: Alfacetoisocaproato

LEU: Leucina

LH: Hormônio luteinizante

NRF-1: *Nuclear receptor factor* -1

NRF-2: *Nuclear receptor factor* -2

PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*

PGC-1α: *Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1α*

PGC-1β: *Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1β*

PI3-K: Fosfatidilinositol 3 cinase

PPARγ: *Peroxisome proliferator-activated receptor γ*

ROS: Espécies reativas de oxigênio

Tfam: Fator de transcrição mitocondrial

UCP-2: Proteína desacopladora mitocondrial do tipo 2

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Glicemia média (mmol/L) estimada da população brasileira no ano de 2008. 17

Figura 2 - Incidência (%) na população brasileira de pessoas acima de 25 anos com glicemia de jejum superior a 7 mmol/L ou que faz uso de medicação contra DM2. 18

Figura 3 - Esquema representativo de uma célula-B pancreática ilustrando os mecanismos relacionados à secreção de insulina. 24

Figura 4 - Secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas dos grupos controle (CON) e tratados com DHEA (DHEA). 32

Figura 5 - Secreção de insulina estimulada por agentes despolarizantes, tolbutamida e arginina, em ilhotas dos grupos controle (CON- barras abertas) e tratados com DHEA (DHEA-barras pretas). 33

Figura 6 - Secreção de insulina estimulada por agente mimético colinérgico, carbacol, em ilhotas dos grupos controle (CON – barras abertas) e tratados com DHEA (DHEA – barras pretas). 34

Figura 7 - Secreção de insulina induzida por estimuladores dos níveis de cAMP intracelular em células B pancreáticas, *forskolin* e IBMX, em ilhotas dos grupos controle (CON – barras abertas) e tratados com DHEA (DHEA – barras pretas). 35

Figura 8 - Secreção de insulina estimulada por alfacetoisocaproato (KIC) e leucina (LEU), em ilhotas dos grupos controle (CON-barras abertas) e tratados com DHEA (DHEA-barras pretas). 35

Figura 9 - Secreção de insulina estimulada por alfacetoisocaproato (KIC) e leucina (LEU) na presença de glutamina (mimetizando condição de ativação de glutaminólise), em ilhotas dos grupos controle (CON-barras abertas) e tratados com DHEA (DHEA-barras pretas). 36

Figura 10 - Respiração mitocondrial de ilhotas (750 ilhotas) incubadas com glucose 5,6 mM, glicose 5,6 mM com oligomicina (inibidor da ATPase), e glucose 5,6 mM com p-[trifluoromethoxy]-phenyl-hydrazone (FCCP, desacoplador químico mitocondrial) dos grupos controle (CON) e tratados com DHEA (DHEA). 37

Figura 11 - Oxidação da glicose em ilhotas (100 ilhotas) estimulada por glicose 5,6 mM e 16,7 mM dos grupos controle (CON) e tratados com DHEA (DHEA). 38

Figura 12 - Atividade da citrato sintase (400 ilhotas) dos grupos controle (CON) e tratados com DHEA (DHEA). 38

Figura 13 - Efeitos da aplicação de DHEA na expressão gênica (A) da UCP-2, (B) do GLUT-2 e, (C) da glicoquinase em relação ao gene *housekeeping* HPRT. 39

Figura 14 - Efeitos da aplicação de DHEA na expressão gênica (A) PGC-1α, (B) PGC-1β, (C) NRF-1, (D) NRF-2 e, (E) TFam em relação ao gene *housekeeping* HPRT. 40

Figura 15 - Efeitos da aplicação de DHEA na expressão gênica (A) catalase, (B) GPx, (C) $gp91^{phox}$, (D) $p22^{phox}$, (E) $p47^{phox}$, (F) $p40^{phox}$, (G) $p67^{phox}$ e, (H) iNOS em relação ao gene *housekeeping* HPRT. 41

Figura 16 - Secreção de insulina estimulada por (A) glicose, (B) alfacetoisocaproato e leucina com glutamina, (C) ativadores de cAMP IBMX e *forskolin*, (D) mimético colinérgico carbacol e, (E) agente despolarizante tolbutamida nos grupos controle (CON) e tratado com DHEA (DHEA). 42

Figura 17 - (A) Fragmentação de DNA de ilhotas pancreáticas marcado com iodeto de propidio via citômetro de fluxo, e expressão gênica de proteínas envolvidas na via de morte celular (B) Bax, (C) Bad e (D) Bcl-2 e de um marcador de proliferação celular (E) PCNA nos grupos controle (CON) e tratado com DHEA (DHEA). 43

Figura 18 - Secreção de insulina estimulada por glicose 5,6 mM e 16,7 mM em animais que receberam aplicação de DHEA, na presença de inibidores de receptor de andrógeno (flutamide) e receptor de estrógeno (ICI 182,780). 45

Figura 19 - Secreção de insulina estimulada por glicose 5,6 mM e 16,7 mM nos grupos controle (CON) e tratado com DHEA (DHEA). 46

Figura 21 - Secreção de insulina estimulada por glicose 2,8 mM e 16,7 mM em linhagem de células B-pancreáticas INS-1e incubadas com diferentes concentrações de DHEA..... 48

Figura 22 - Proposta de resposta das células B pancreáticas a suplementação com DHEA a ratos envelhecidos e obesos. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações plasmáticas do hormônio luteinizante (LH, ng/mL), hormônio folículo estimulante (FSH, ng/mL), progesterona (ng/mL), β-estradiol (pg/mL), testosterona (pg/mL) and androstenediona (ng/mL) dos grupos controle (CON) e tratados com DHEA (DHEA). 44

Tabela 2 - Glicemia (mg/dL) e insulinemia (ng/dL) no estado alimentado e em jejum, indíce HOMA-IR e HOMA-β dos grupos controle (CON) e tratados com DHEA (DHEA). 47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

1.1 Diabetes Mellitus do tipo 2 (DM2) 17

1.2 Secreção de insulina e função da célula B 19

1.3 Desidroepiandrosterona, ação insulínica e secreção de insulina 24

1.4 Considerações finais e objetivo 26

2 MATERIAIS E MÉTODOS 27

2.1 Animais e procedimento experimental 27

2.2 Extração das ilhotas pancreáticas 27

2.3 Secreção de insulina 28

2.4 Atividade enzimática da citrato sintase em ilhotas isoladas 28

2.5 Oxidação da glicose 29

2.6 Consumo de oxigênio 29

2.7 RT-PCR 29

2.8 Dosagem dos hormônios esteróides sexuais 30

2.9 Avaliação da Fragmentação de DNA por Citometria de Fluxo 30

2.10 Caracterização zoométrica e perfil glicêmico 30

2.11 Análise estatística 31

3.1 Secreção de insulina estimulada por glicose 32

3.2 Secreção de insulina estimulada por outros agentes 33

3.3 Capacidade oxidativa mitocondrial 36

3.4 Expressão gênica de marcadores de biogênese mitocondrial 39

3.5 Agentes relacionados à presença de ROS 40

3.6 Melhora na capacidade secretora pode ser modulada por maior sobrevivência celular 41

3.7 DHEA atua via receptores de andrógenos e receptores de estrógeno 44

3.8 Ação do DHEA sobre a capacidade secretora de insulina é tempo-dependente 45

3.9 Melhorias na capacidade secretora de insulina frente à glicose não repercutiram em benefícios na homeostase glicêmica 46

3.10 DHEA melhora capacidade secretora de insulina em linhagem de células B pancreáticas INS-1e 47

4 DISCUSSÃO 49

4.1 DHEA potencializa a capacidade secretora de insulina 49

4.2 Quais os mecanismos relacionados a esta maior capacidade secretora de insulina induzida pela glicose? 52

4.3 Como o DHEA promove suas ações? 56

5 CONCLUSÃO 57

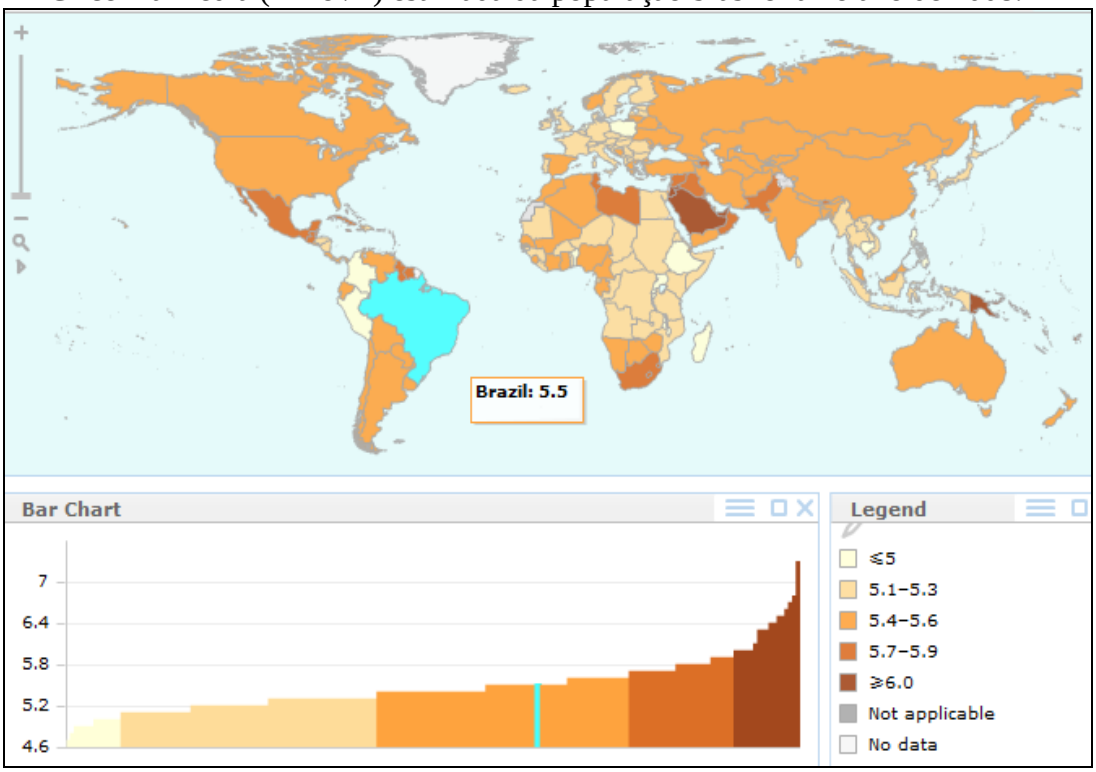
REFERÊNCIAS* 58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus do tipo 2 (DM2)

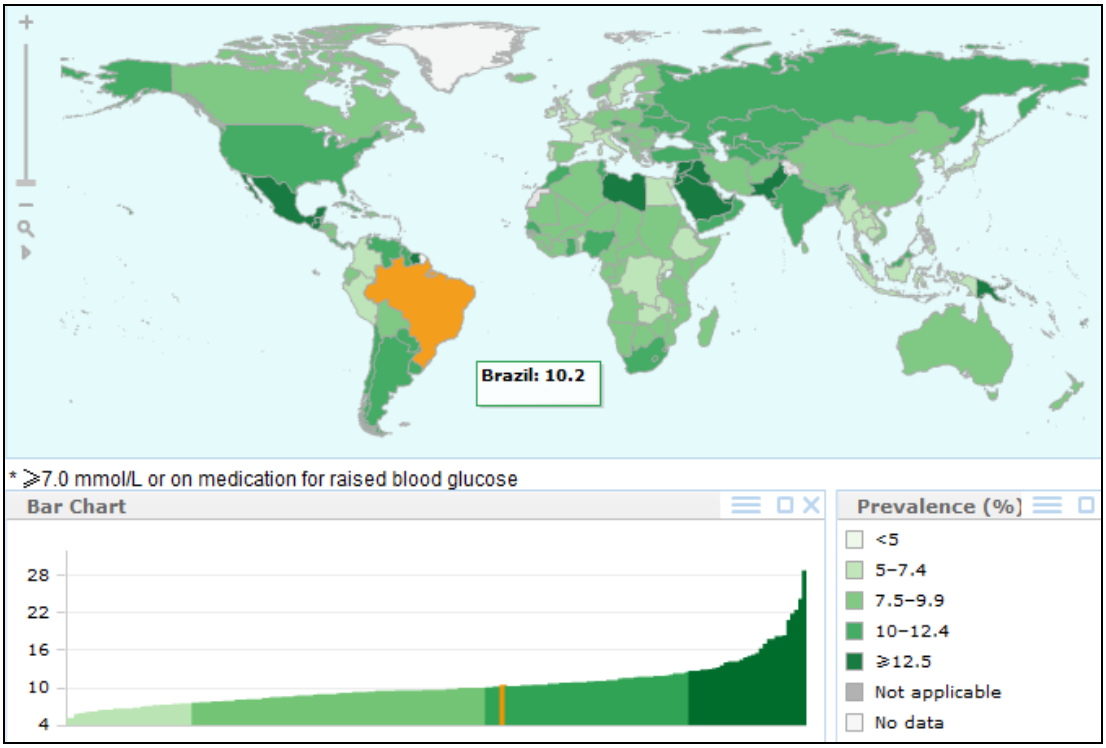
Nas últimas duas décadas tem sido observado um explosivo aumento no número de pessoas com DM2 diagnosticadas em todo mundo, atingindo aproximadamente 250 milhões de humanos. Adicionalmente, estima-se que no ano de 2025 cerca de 380 milhões de pessoas apresentarão esta doença (Hegarty et al., 2009). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (2011), cerca de 9% da população mundial em 2008 apresentavam DM2 e, ao olharmos a população brasileira, temos que nesse mesmo ano, a média da glicemia de jejum da população acima de 25 anos estava em torno de 5,5 mmol/L (Figura 1), enquanto 10,2% apresentava glicemia de jejum acima de 7 mmol/L ou tomava medicação para DM2 (Figura 2).

Figura 1 - Glicemia média (mmol/L) estimada da população brasileira no ano de 2008.



Fonte: WHO (2012).

Figura 2 - Incidência (%) na população brasileira de pessoas acima de 25 anos com glicemia de jejum superior a 7 mmol/L ou que faz uso de medicação contra DM2.



Fonte: WHO (2012).

Há vários mecanismos propostos para a gênese do DM2, sendo alguns de consenso para o desenvolvimento desta doença, como a obesidade e o envelhecimento. Evidências demonstram que valores para o índice de massa corporal (IMC) de 31 estão relacionados a aumento de 40 vezes para o risco de desenvolver DM2 e, quando esse índice está acima de 35 o risco sobe 90 vezes, comparados com o IMC de 22 (Colditz et al., 1995). Além disso, cerca de 80% dos indivíduos com DM2 apresentam sobrepeso ou obesidade (Choussein et al., 2009). Sendo assim, a obesidade pode ser considerada um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento de DM2. Por outro lado, o envelhecimento encontra-se associado com um aumento na incidência do DM2 e com prejuízo na tolerância à glicose que parece iniciar a partir de meados da terceira década de vida e continua a declinar gradualmente com a progressão da idade (DeFronzo, 1981). De fato, a influencia da idade na prevalência de diabetes mellitus e tolerância reduzida à glicose foi bem evidenciada em um estudo multicêntrico no qual foi observada prevalência de 2,7% na faixa etária que

compreendeu 30-59 anos e um aumento dessa prevalência de 6,4 vezes para indivíduos na faixa etária de 60-69 anos (Malerbi, Franco, 1992).

Tanto um aumento na resistência periférica à insulina quanto um decréscimo na secreção desse hormônio podem ser responsáveis pela ocorrência da hiperglicemia relacionada ao envelhecimento, porém devido à ampla quantidade de fatores externos que podem influenciar a ocorrência do quadro de DM2 advindos com a idade, tais como a obesidade e a inatividade física, os resultados podem ser conflitantes. Em ratos, foram demonstrados que a função da célula-β pancreática é negativamente influenciada pela idade, independente de outros fatores de risco (Basu et al., 2003; Draznin et al, 1985; Gu et al., 2011; Keymeulen et al., 1997; Reaven et al., 1979; Reaven et al., 1987; Reaven; Reaven, 1981; Selawry et al., 1978). Em ilhotas pancreáticas isoladas de humanos foi observado que há perda da capacidade secretora de insulina estimulada por glicose em função da idade e independente do índice de massa corporal, sexo ou causa da morte (Ihm et al., 2006).

A importância da realização de diversos estudos envolvendo a gênese, prevenção e tratamento do DM2 pode ser facilmente justificada quando observamos a evolução da mortalidade associada a mesma. Em 1999, 3,4% das causas de morte estavam relacionadas ao DM2. Em 2005, estes valores aumentaram para 5%, enquanto as previsões para 2015 são de um aumento de 82% na mortalidade relacionada ao DM2.

1.2 Secreção de insulina e função da célula B

Até 1869, o pâncreas era tido como um tecido formado apenas por células acinares, que tinha como função chave a produção de suco pancreático. Nesta data, Paul Langerhans identificou e descreveu pela primeira vez, um conjunto de células aglomeradas dispersas entre os ácinos, que passaram a ser identificadas como ilhotas de Langerhans ou ilhotas pancreáticas. Mais adiante, observou-se que este aglomerado celular era constituído por diferentes tipos de células, no qual as células A ou α são responsáveis pela produção e secreção de glucagon, as células B ou β pela produção e secreção de insulina, as células D ou δ pela produção e secreção de somatostatina e as células F ou PP pela produção e secreção de polipeptídeo pancreático, compreendendo, portanto, a porção endócrina do pâncreas (Carpinelli, 2009).

A função da célula B está diretamente relacionada com o seu metabolismo, já que a secreção de insulina é estimulada por sinais intracelulares provenientes da metabolização de diversos nutrientes, sendo o mais importante deles a glicose. Estes mesmos nutrientes sinalizadores da secreção da insulina também estão relacionados a sinais reguladores da expressão gênica, síntese protéica e proliferação celular (Deeney et al., 2000). Porém, os efeitos dos nutrientes sobre as células B são diferentes, dependendo se a exposição a estes nutrientes é aguda ou crônica. Concentração elevada de glicose e ácidos graxos livres (AGL) estimula a secreção de insulina agudamente, enquanto a exposição crônica, como no caso de DM2, pode levar a efeitos deletérios descritos como glicotoxidade e lipotoxidade (Eizirik, Cnop, 2010; Gremlich et al., 1997; Harmon et al., 1999; Poitout, Robertson, 2002).

A glicose é o principal secretagogo fisiológico de insulina pela célula B e entra nessas células através de transportadores de glicose (GLUT). A isoforma 2, GLUT-2, é o mais abundante transportador de glicose presente nas células B pancreáticas e apresenta Km igual a 17mmol/l (Guillam et al., 2000). Um decréscimo na expressão deste transportador com simultânea redução na secreção de insulina estimulada por glicose ocorre em diversos modelos de DM2. Guillam et al. (2000) demonstraram que a deleção do GLUT-2 diminui a secreção de insulina estimulada por glicose, sem alterar as concentrações dos demais transportadores de glicose presente na membrana das células B-pancreáticas e da glicoquinase. Além disso, restaurando as concentrações de GLUT-2, há normalização da secreção de insulina estimulada por glicose. Apesar destes dados demonstrarem a importância do transporte de glicose para a secreção de insulina, esta etapa não é o passo limitante da secreção de insulina estimulada por glicose, mas sim a fosforilação da glicose pela glicoquinase/hexoquinase IV (Heimberg et al., 1993).

Pela ação desta enzima, a glicose será fosforilada, convertendo-se à glicose 6 fosfato e metabolizada. A glicoquinase é a enzima limitante para o uso da glicose pelas células B-pancreáticas (Matshinksy, 1996), governa tão eficientemente a taxa de glicose que alterações no seu conteúdo nestas células têm efeito diretamente proporcional na via glicolítica e, consequentemente, no equilíbrio glicêmico (Matshinksy, Collins, 1997). Isto pode ser observado pelo quadro de hiperinsulinemia e hipoglicemia apresentado por indivíduos com uma mutação genética que leva ao aumento da afinidade da glicoquinase pela glicose (Gansler et al., 1998). Adicionalmente, mutações suprimindo a atividade desta enzima levam a quadro de hiperglicemia e hipoinsulinemia (Byrne et al., 1994). A inativação específica do

gene da glicoquinase promove diminuição da sensibilidade da célula B-pancreática à glicose e desequilibra a secreção de insulina *in vivo* (Aizawa et al., 1996; Efrat et al., 1994).

O produto final da metabolização da glicose, o piruvato, é direcionado a mitocôndria para metabolização aeróbia, ocasionando um aumento nas concentrações de ATP e consequente aumento da razão ATP/ADP. Isto leva ao fechamento dos canais de potássio ATP-dependente (K_{ATP}), retenção de K^+ no interior das células e despolarização da membrana. A regulação da secreção de insulina estimulada pela glicose depende tanto da metabolização da glicose quanto da atividade elétrica da célula B-pancreática, que é controlada por diversos canais iônicos. Dentre estes canais, os canais de potássio ATP-dependente são críticos, pois ligam o metabolismo da glicose com a atividade elétrica destas células. Isto é possível, pois mudanças metabólicas nestas células levam a alterações nas concentrações de ATP e ADP, e consequentemente, ativando ou inibindo estes canais. Desta forma, os canais de potássio ATP-dependentes podem ser considerados como sensores na regulação da atividade destas células (Seino et al., 2000). Os canais de potássio ATP-dependentes presentes na membrana plasmática das células são formados por duas estruturas distintas. Sua subunidade alfa é denominada de Kir6.2 e a subunidade beta, formada por receptores de sulfoniluréias, nas variantes SUR1 ou SUR2.

A despolarização da membrana leva ativação de canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem, que se abrem permitindo a entrada deste íon que direciona a exocitose/secreção dos grânulos de insulina (Deeney et al., 2000). O processo de secreção pode ser visualizado na figura 3.

Em decorrência de seu importante papel nos processos de formação de ATP em diversos tipos celulares, incluindo as células B-pancreáticas, a mitocôndria possui relevância significativa no processo secretor de insulina, visto que o produto final da glicólise, o piruvato, é eficientemente transportado para esta organela e metabolizado. Isto leva a uma maior rentabilidade no processo de formação do ATP ao compará-lo com a via glicolítica lática de metabolização da glicose. Mais de 90% dos carbonos derivados da glicose são convertidos a CO_2, devido à síntese aeróbica de ATP, que chega a ser três vezes maior do que em qualquer outra célula (Wiederkehr, Wollheim, 2006).

Assim, proteínas que regulam o funcionamento e gênese da mitocôndria estão relacionadas à secreção de insulina. Uma dessas proteínas pode ser o PGC-1, que foi originalmente identificado como um coativador do receptor nuclear PPARγ (Puigserver et al.,1998). O padrão de expressão do PGC-1 e o seu aumento pela exposição ao frio têm

sugerido um papel na regulação do metabolismo e adaptações termogênicas (Knutti, Kralli, 2001; Puigserver et al., 1998). Foi demonstrado que o aumento da expressão do PGC-1 em mioblastos induz a biogênese mitocondrial (Wu et al., 1999). No entanto, um aumento da expressão protéica induzido pelo frio do PGC-1 em ilhotas pancreáticas, leva a redução da secreção de insulina estimulada por glicose. Isso se dá em virtude do simultâneo aumento da expressão da proteína desacopladora mitocondrial 2 (UCP-2), que reduz a produção de ATP e aumenta a produção de calor (De Souza et al., 2003).

Outro fator adicional que pode levar a redução da secreção de insulina e tem como alvo a mitocôndria é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Wiederkehr, Wollheim, 2006). Em altas concentrações de glicose, observou-se um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por diversos mecanismos, tais como fosforilação oxidativa, auto-oxidação via enolização e reação de Schiff durante a glicação, sendo que a fosforilação oxidativa mitocondrial surge como a principal fonte de ROS nas ilhotas pancreáticas (Morgan et al., 2009). No entanto, a presença da ROS é fundamental para secreção de insulina (Rebelato et al., 2011).

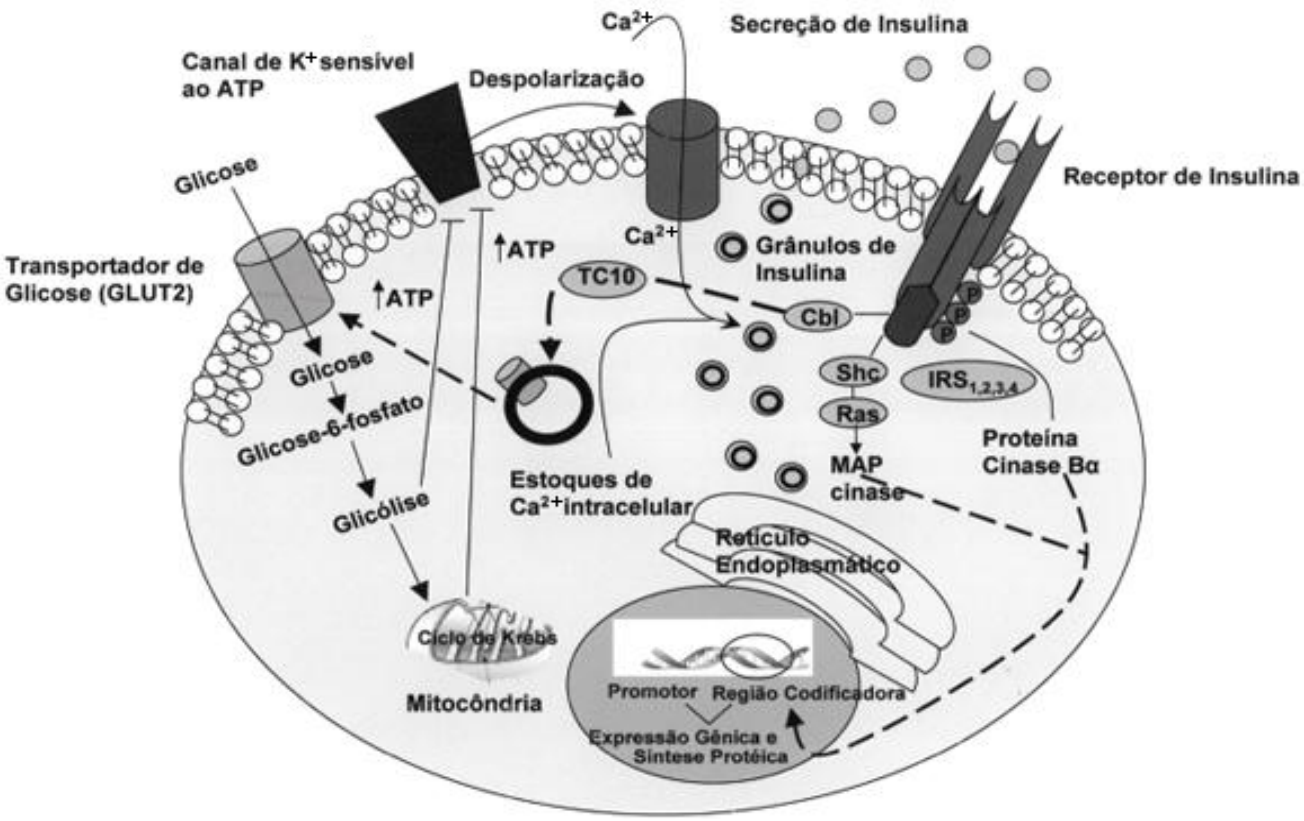
Adicionalmente, também determinou-se a presença da NADPH oxidase, uma enzima produtora de superóxido, nas células-B pancreáticas (Oliveira et al., 2003). Sabe-se que exposições crônicas a sobrecarga de glicose (Oliveira et al., 2003), de palmitato e mesmo de IL-1B (Morgan et al., 2007), aumentam a produção de superóxido mediante ativação da NADPH oxidase neste tipo celular. Em adição, descobriu-se também que a inibição desta enzima leva a um reduzido influxo de Ca^{2+} nas células B-pancreáticas frente ao estímulo da glicose, com conseqüente redução da secreção de insulina estimulada por glicose, reduzida oxidação da glicose e reduzida expressão do RNAm do GLUT-2 e da glicocinase, levantando a questão de um papel importante deste componente na função da célula B e no metabolismo celular, que pode se encontrar danificado ao longo do processo de envelhecimento.

A célula B também possui receptores e proteínas envolvidas na via da sinalização intracelular da insulina (Harbeck et al., 1996). O papel da insulina em regular sua própria secreção, de forma parácrina ou autócrina, tem sido tópico de debates. Enquanto alguns estudos mostram que a insulina exerce um feedback negativo em sua própria secreção (Elahi et al., 1982; Iversen, Miles, 1971; Loreti et al., 1974), outros estudos falham em suportar essa hipótese (Malaisse et al., 1967; Marincola et al., 1983; Stagner et al., 1986). Camundongos que não expressam o receptor de insulina nas células B nascem com a glicemia e a

insulinemia normais. No entanto, com cerca de 8 semanas de idade, esses camundongos apresentam redução seletiva da secreção de insulina estimulada por glicose na 1º fase (Kulkarni et al., 1999), o que pode ser devido a uma expressão alterada da glicoquinase (Leibiger et al., 2001). Conseqüentemente, esses camundongos desenvolvem progressiva intolerância a glicose, apresentando redução do tamanho das ilhotas pancreáticas e da massa das células B (Kulkarni et al., 1999), fenótipo característico de humanos com DM2 comparados com indivíduos não diabéticos com o mesmo peso corporal (DeFronzo et al., 1997). Das 6 proteínas que pertencem à família dos IRSs, as 4 primeiras descritas (IRS-1/2/3/4) são expressas nas ilhotas pancreáticas (Kulkarni, 2002). Ilhotas provenientes de camundongos *knockout* para o IRS-1 apresentam redução da secreção de insulina estimulada por glicose e arginina, além de apresentarem redução do conteúdo total de insulina (Kubota et al., 2000; Kulkarni et al., 1999). Além disso, ilhotas isoladas de humanos que possuem polimorfismo no gene do IRS-1, apresentam redução da secreção de insulina e aumento da apoptose celular (Federeci et al., 2001; Porzio et al., 1999). No entanto, o bloqueio do IRS-1 em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos aumenta a secreção de insulina estimulada por glicose (Araújo et al., 2002). Os camundongos com deleção do IRS-2 apresentam redução da secreção de insulina, falha no crescimento adequado das ilhotas e desenvolvem um fenótipo de DM2 (Withers et al., 1998). O IRS-2 também é necessário para a hiperplasia compensatória das células B pancreáticas, em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e que desenvolvem resistência à insulina (Terauchi et al., 2007). O papel dos IRS-3 e IRS-4 no pâncreas endócrino ainda não foi totalmente investigado (Kulkarni, 2002).

A via da PI 3-K/Akt também pode ser ativada pela insulina, principalmente pela associação das proteínas IRS com a subunidade regulatória p85 da PI 3-K (Saltiel, Kahn, 2001). A ativação dessa via está associada à sobrevivência celular (Kulik et al., 1997). Em ilhotas pancreáticas isoladas de cachorros, a ativação da PI 3-K/Akt protegeu-as contra a morte celular mediada por citocinas (Aikin et al., 2000). Também é reconhecido que a ativação da via IRS-2/PI 3-K/Akt é necessária para o controle da massa das células B em relação a homeostase metabólica (Lingohr et al., 2002). O aumento da expressão de Akt-1 nas células B de camundongos alterou o tamanho e função destas células, ocorrendo aumento do tamanho das células B e massa das ilhotas, melhorando a tolerância à glicose e tornando os camundongos resistentes ao diabetes experimental (Tuttle et al., 2001).

Figura 3 - Esquema representativo de uma célula-B pancreática ilustrando os mecanismos relacionados à secreção de insulina.



Fonte: Cardoso et al. (2007).

1.3 Desidroepiandrosterona, ação insulínica e secreção de insulina

O córtex adrenal humano produz aldosterona, cortisol e andrógenos como a desidroepiandrosterona (DHEA) e sua forma sulfatada (DHEA-S). Os processos reguladores da síntese do cortisol e aldosterona estão bem definidos, porém os mecanismos reguladores da produção de DHEA(S) não estão completamente esclarecidos. DHEA(S) origina-se de um precursor universal na síntese de todos os hormônios esteróides, o colesterol. A produção de DHEA e sua forma sulfatada estão elevadas durante o desenvolvimento neonatal pelo feto, decrescendo rapidamente após o nascimento para permanecer em níveis muito baixos nos primeiros cinco anos de vida pós-natal. Próximo à segunda década da vida os níveis deste hormônio aumentam e chegam a seus valores máximos apresentando diferenças entre os

sexos, com concentrações sanguíneas maiores no homem (Williams et al., 2002). A partir da quarta década da vida os níveis de DHEA(S) começam a declinar novamente, e aos 70 anos de idade há níveis mínimos. Os mecanismos causadores da drástica variação nos níveis de DHEA durante o desenvolvimento humano são ainda desconhecidos. Os progressos em definir o(s) mecanismo(s) que regula(m) a produção deste hormônio tornam-se difíceis, pois a secreção adrenal de DHEA(S) é pouca ou quase nula em todos os mamíferos exceto nos primatas (Cutler et al., 1978).

De maneira distinta de outros esteróides, um receptor intracelular para DHEA não foi isolado. Porém há dados descrevendo sua interação *in vitro* com receptor de andrógenos (RA) e com receptores de estrógenos (RE) *in vivo* em leveduras (Nephew et al, 1998). Algumas das atividades biológicas do DHEA necessitam da presença do PPAR alfa, no entanto, nenhuma das isoformas do PPAR parece funcionar como um receptor para este hormônio (Peters et al., 1996; Waxman, 1996).

Além do fato de ser precursor de andrógenos e estrógenos (Labrie, 1991), outro papel fisiológico do DHEA e de sua forma sulfatada DHEA-S é desconhecido. Porém, o declínio do DHEA e DHEA-S plasmático relatado para a idade tem sido relacionado com o desenvolvimento de diversas doenças crônicas associadas ao envelhecimento, como a resistência à insulina (Schriock et al., 1988), obesidade (Macewen, Kurzman, 1991; Nestler et al., 1988), doenças cardiovasculares (Barret-Connor et al., 1986), câncer (Schwartz et al.,1986), redução da defesa imunológica (Casson et al., 1993), depressão e redução da sensação de bem estar (Morales et al., 1994). Logo, inúmeros estudos têm focado nos efeitos do DHEA sobre a resistência à insulina, obesidade e doenças cardiovasculares.

Em relação aos estudos referentes à associação do DHEA com quadros de resistência à insulina e DM2, observou-se que o DHEA reduz as concentrações de glicose sanguínea em ratos obesos e camundongos, independente de seus efeitos na redução de peso (Coleman et al., 1982). Adicionalmente, o DHEA não alterou a resposta à insulina nos tecidos adiposo e muscular *in vitro* (Cleary et al., 1988). Entretanto a alimentação suplementada com DHEA-S induziu uma preservação da estrutura e função das células B em camundongos diabéticos (Coleman et al., 1982; Giroix et al., 1997).

Em fígado e ilhotas pancreáticas de roedores, DHEA-S induz um aumento na atividade e expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de lípideos e no número de peroxissomos (Dillon et al., 2000). DHEA-S modula a secreção de insulina por um efeito direto sobre a

célula B pancreática, no entanto este feito não parece ser devido a sua ação sobre o processo secretório, mas sim secundário a mudanças no meio intracelular metabólico e/ou na síntese de proteínas que podem participar da modulação da secreção de insulina (Dillon et al., 2000).

DHEA também foi identificado como protetor de precursores neurais inibindo a apoptose através da ativação da via da PI-3 cinase/AKT (Zhang et al., 2001). Os resultados do nosso laboratório em ratos de um ano de idade, hiperinsulinêmicos, obesos e resistentes à insulina, tratados com dose única de DHEA mostraram, em ilhotas pancreáticas, diminuição do nível protéico do receptor de insulina 61±9% ($P<0,05$) e de seus substratos IRS-1 e IRS-2 para 74±3% ($p<0,05$) e 53±25% ($p<0,05$) respectivamente. A secreção estática de insulina estimulada por glicose apresentou-se aumentada e a análise morfométrica revelou um aumento da área das ilhotas nos animais tratados com DHEA. Se estas alterações são resultantes de um efeito direto do DHEA sobre a ilhota pancreático ou uma resposta de adaptação frente à alteração da sensibilidade à insulina deste modelo animal requer mais investigação (Medina et al., 2006).

1.4 Considerações finais e objetivo

A adequada função das ilhotas pancreáticas é uma das questões centrais no controle da homeostase energética, particularmente relacionada a diferentes condições que cursam com resistência à insulina. Condições estas freqüentes na população humana e epidemiologicamente crescentes como a obesidade, síndrome metabólica, DM2, envelhecimento, entre outros. A compreensão de mecanismos celulares relacionados tanto às alterações adaptativas funcionais quanto morfológicas das ilhotas pancreáticas poderá ampliar e fornecer evidências para a contínua busca de alternativas terapêuticas. Assim, o objetivo do presente projeto é investigar os mecanismos pelos quais o tratamento com DHEA induz aumento da secreção de insulina e da área das ilhotas pancreáticas isoladas de ratos com 12 meses de idade.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e procedimento experimental

Foram utilizados ratos Wistar machos com 12-14 meses de idade fornecidos pelo Biotério Central do ICB-USP. Os animais foram mantidos com ração comercial (Nuvilab CR-1, da Nuvital) e água *ad libitum* até o dia do experimento.

Os animais foram divididos em dois grupos principais: a) Controle (CON), que recebeu injeção subcutânea de óleo de canola (veículo) e; b) Tratado (DHEA), que recebeu uma injeção subcutânea de DHEA (10 mg/kg) diluído em óleo de canola. Sete dias após as aplicações os animais foram submetidos aos experimentos.

Em alguns experimentos, animais de ambos os grupos receberam injeções de inibidores de receptor de andrógenos (AR) (flutamide-50 mg/Kg/48horas) e de estrógenos (ER) (ICI 182,780- 0,005 g/Kg/48horas), sendo a primeira aplicação dos inibidores realizada previamente a aplicação do DHEA.

Outros experimentos foram realizados para avaliar o tempo de ação do DHEA após 4 dias ou 17 dias da aplicação com o esteróide.

Todos os procedimentos adotados estavam de acordo com as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB-USP (32/2008 - adendo 051/2005).

2.2 Extração das ilhotas pancreáticas

Após 7 dias da aplicação do DHEA, os animais foram submetidos a narcose com mistura de gás contendo 70% de O_2 e 30% de CO_2, mortos por decapitação, seguida de laparotomia e exposição do ducto biliar comum. Este foi clampeado na sua extremidade distal, junto ao duodeno, e dissecado próximo ao pedículo hepático, por onde foi introduzida uma cânula de polietileno e injetada retrogradamente cerca de 20 ml de solução de Hanks contendo colagenase (50 ml de Hanks/34 mg de colagenase). Após divulsão do tecido acinar, o pâncreas foi retirado e colocado em uma placa de Petri para dissecação de gânglios linfáticos, gorduras e vasos sanguíneos. O tecido foi colocado em tubo cônico tipo falcon em banho maria a 37 °C durante 25 minutos, seguido de agitação manual, para a digestão da parte exócrina do pâncreas. Posteriormente foram feitas sucessivas lavagens do conteúdo do tubo,

para ressuspensão do material isolado com solução de Hanks. A solução final foi depositada em placa de Petri para coleta das ilhotas com o emprego lupa.

2.3 Secreção de insulina

Conjunto de 5 ilhotas dos grupos controle e tratado com DHEA, foram utilizadas neste ensaio. As ilhotas foram incubadas com diferentes concentrações de glicose (5,6; 8,3; 11,1; 16,7 mM e 20 mM), arginina 20 mM, leucina 20 mM e alfa-cetoisocaproato 10 mM (na presença e ausência de glutamina 1 mM), carbacol 100 µM e KCl 30 mM, tolbutamida 100 µM, IBMX 1 mM e *forskolin* 100 µM. Cada amostra foi colocada em eppendorfs contendo 500 uL de solução de pré-incubação (glicose 5.6mM), mantidos por 30 minutos, seguida por uma incubação de 1 hora com o estímulo principal. Terminada a incubação, o sobrenadante foi coletado e as ilhotas foram lisadas por uma solução de álcool:água:HCl, para identificação do conteúdo de insulina restante nas ilhotas pancreáticas. Os valores de insulina no sobrenadante da incubação (secretado) e do conteúdo de insulina restante nas ilhotas foram dosados por radioimunoensaio. Também realizamos ensaio de secreção de insulina estimulado por glicose em células da linhagem INS-1e.

2.4 Atividade enzimática da citrato sintase em ilhotas isoladas

Para determinação da atividade enzimática da citrato sintase, aproximadamente 350 ilhotas isoladas foram homogeneizadas em 100 µL de Krebs/Ringer fosfato (pH 7,0) e sonicados em 10 pulsos de baixa freqüência. Posteriormente, foram incubados por 2 minutos a 30 ºC com 100 µL de Tris/HCl 0,75M (pH 8,0) misturado com 100 µL de Triton X-100 1%, 100 µL de 5,5´-dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico), 50 µL de acetil-CoA (7mg.ml^{-1}) e 10 µL do tecido homogenado, completado com 950 µL de água destilada. A_{412} foi mensurada no último minuto em um espectofotometro Beckman DU-68. Em seguida, o oxaloacetato foi adicionado para iniciar a reação bioquímica e as absorbâncias foram observados por 2 a 3 minutos. Para calcular a atividade enzimática, subtraiu-se a A_{412} (absorbância) de depois da adição do oxaloacetato da A_{412} anterior a adição do oxaloacetato (Liu et al., 1998).

2.5 Oxidação da glicose

Grupos de ilhotas foram incubadas em 1,2 mL de tampão KH, contendo albumina (0,1%) a 37 ^{o}C por 60 min. O tampão de incubação para mensuração da glicose oxidada continha 0,2uCi/mL [U-^{14}C] glicose para 5,6 mM ou 0,6uCi/mL para 16,7 mM. A reação foi interrompida pela adição de 400 uL de HCl (10M). O papel filtro embebido em feniletilamina/metanol (1:1) foi transferido para um tubo plástico com 1,8 mL de líquido de cintilação, e o $^{14}CO_2$ adsorvido foi mensurado em um contador Beckman-LS5000 TD (Beckman Instruments, Fullerton, CA).

2.6 Consumo de oxigênio

Grupo de 750 ilhotas foram incubadas em uma câmara contendo solução de glicose 5,6 mM, para mensuração do consumo de oxigênio, usando um eletrodo do tipo Clark (Hansatech Instruents limited, Norfolk, UK). Este experimento foi realizado com o auxílio do Laboratório de Bioenergética, coordenado pelo professor Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

2.7 RT-PCR

O RNA total foi extraído de ilhotas pancreáticas utilizando-se trizol, conforme indicado pelo fabricante. O RNA total foi reversamente transcrito à cDNA. A expressão genética da UCP-2, glicoquinase, GLUT-2, subunidades da NADPH oxidase (gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}), *nuclear receptor factor* -1 (NRF-1), *nuclear receptor factor* -2 (NRF-2), *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1α* (PGC-1α), *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1β* (PGC-1β), *proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ), pró-insulina, fator de transcrição mitocondrial (Tfam), catalase, glutationa peroxidase (GPx), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), Bax, Bad, Bcl-2 e PCNA foram quantificados por real-time PCR usando o equipamento Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) e o Sybergreen como fluoróforo. A expressão gênica foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando a hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase transferase (HRPT) como controle interno.

2.8 Dosagem dos hormônios esteróides sexuais

As dosagens das gonadotrofinas hipofisárias, luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) e dos esteróides sexuais, androstenediona, testosterona, β-estradiol e progesterona, foram realizadas a partir do soro dos animais dos grupos controle e tratados com DHEA, e executados com o auxílio do laboratório do professor Dr. Celso Rodrigues Franci, do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

2.9 Avaliação da Fragmentação de DNA por Citometria de Fluxo

Grupos de 30 ilhotas foram colocados em uma solução com Triton-X-100 0.1% para permeabilizar as células. A sonda usada foi iodeto de propídeo, que se intercala entre o DNA. Antes da incubação, as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a 4 ^{o}C. O *pellet* foi então ressuspendido em 200 µL de solução hipotônica, com 20 µg/mL de iodeto de propídio, 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de triton-X-100. Os tubos foram cobertos por papel alumínio e incubados a temperatura ambiente por 2 h. A fluorescência foi medida em um citômetro de fluxo FACScalibur (*Becton Dickinson*, San Juan, CA, USA), com o canal FL2 (fluorescência laranja-vermelhada - 585/42 nm). Os histogramas foram analisados utilizando-se o programa *Cell Quest*.

2.10 Caracterização zoométrica e perfil glicêmico

O peso corporal total e o peso dos tecidos adiposos retroperitonial e periepididimal foram quantificados. Além disso, amostras do plasma foram coletadas dos animais acordados em estado alimentado e em jejum noturno (12 horas) para quantificação da glicemia através do uso de tiras reativas e aparato de leitura Accu-check Active® (Roche, Mannhein, Alemanha) e da insulinemia por radioimunoensaio. Adicionalmente, os animais em jejum (12 horas) receberam uma das 2 seguintes soluções: (1) solução de insulina diluída em salina contendo 1 U/ml e aplicado 1 mL/Kg de peso corporal, para realização do teste de tolerância à insulina intraperitonial, ou (2) solução de glicose diluída em salina contendo 1 g/mL e

aplicado 1mL/Kg de peso corporal, para realização do teste de tolerância à glicose intraperitonial.

Para o teste de tolerância à insulina, a glicemia foi mensurada nos tempos 0 (basal) e 4, 8, 12 e 16 minutos, após administração da solução. Foi calculado a constante de decaimento da glicose (kitt) pela fórmula $0{,}693/t^{1/2}$, um indicador da efetividade da captação de glicose estimulada pela insulina. Para o teste de tolerância a glicose, a glicemia foi mensurada nos tempos 0 (basal) e 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após administração da solução.

2.11 Análise estatística

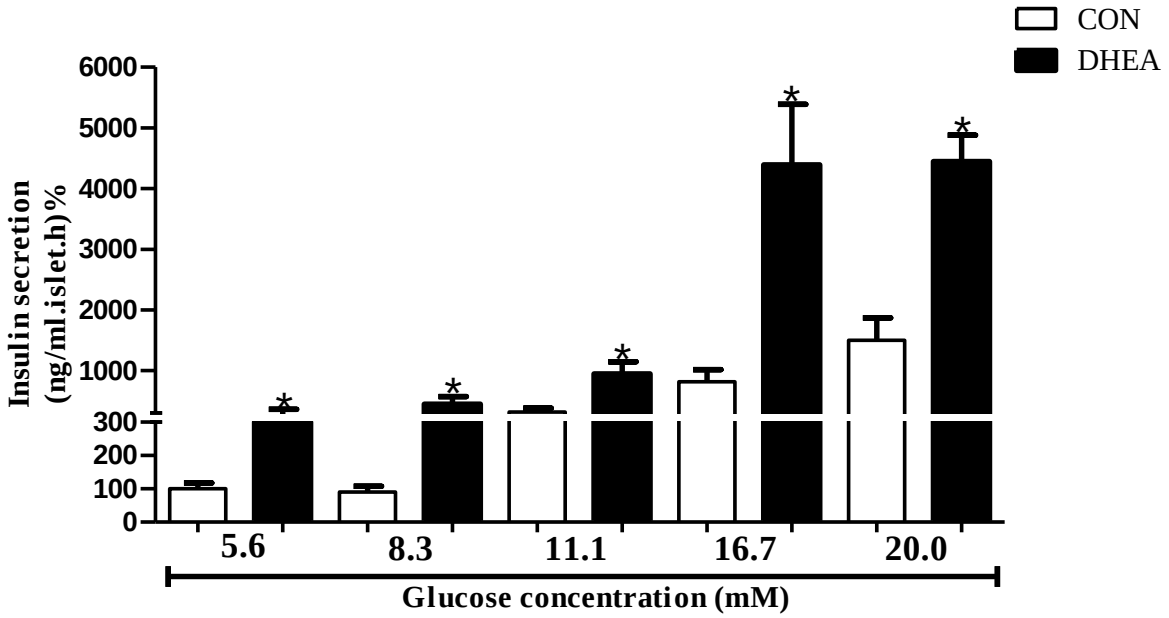
Os resultados estão expressos como média±epm. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se SPSS 13.0 e Graph Pad Prism 5.1. Realizamos a análise da normalidade dos dados, seguido do teste de comparação entre os grupos. O nível de significância mínima aceitável foi $p \leq 0{,}05$.

3 RESULTADOS

3.1 Secreção de insulina estimulada por glicose

Este trabalho surgiu de dados preliminares encontrados por nosso grupo nos quais ilhotas pancreáticas de ratos com 12 meses de idade apresentaram aumento na secreção de insulina estimulada por glicose. Para ratificar estes dados, realizamos o ensaio de secreção de insulina estimulado por glicose com concentrações adicionais de glicose e novamente encontramos aumento significativo na capacidade secretora em todos os pontos avaliados (Figura 4).

Figura 4 - Secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas dos grupos controle (CON) e tratados com DHEA (DHEA).

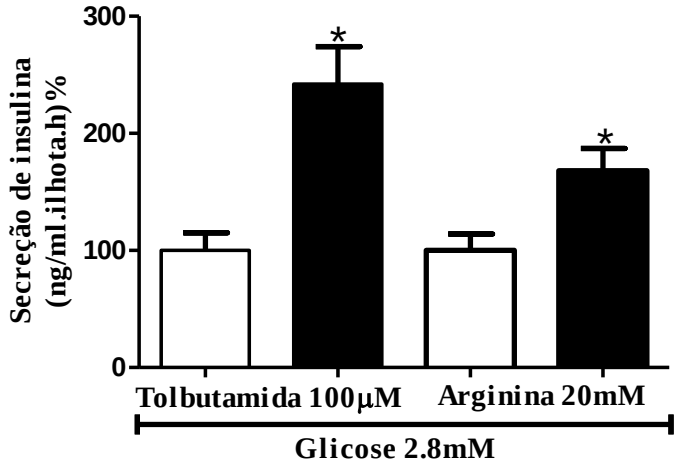


Grupos de 5 ilhotas, após pré-incubação, foram incubadas durante 1 hora com diferentes concentrações de glicose, conforme indicado. Dados estão expressos como média±EPM.*p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle.
Fonte: Almeida (2012).

3.2 Secreção de insulina estimulada por outros agentes

Em adição à estimulação modulada por diferentes concentrações de glicose, realizamos ensaios com outros agentes secretores. Inicialmente, realizamos ensaios de secreção de insulina modulados por agentes despolarizantes (Bonfleur et al., 2011). A figura 5 mostra que a injeção com DHEA resultou em um aumento na secreção de insulina estimulado por tolbutamida (CON-100±15% vs. DHEA-242±32, p<0,05) e por arginina (CON-100±14% vs. DHEA-168±19%, p<0,05).

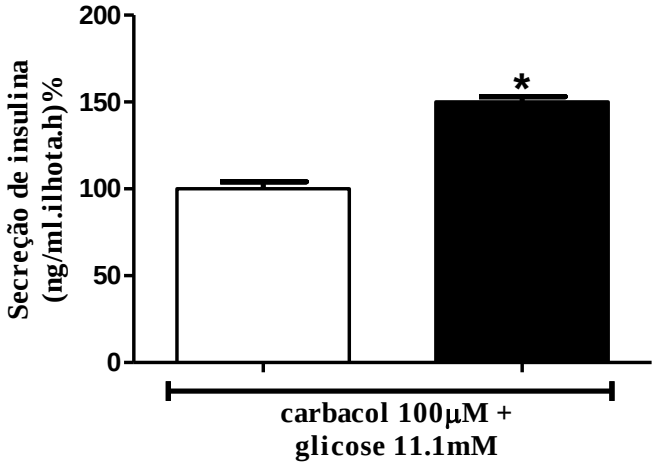
Figura 5 - Secreção de insulina estimulada por agentes despolarizantes, tolbutamida e arginina, em ilhotas dos grupos controle (CON- barras abertas) e tratados com DHEA (DHEA-barras pretas).



Grupos de 5 ilhotas, após pré-incubação, foram incubadas durante 1 hora com tolbutamida ou arginina, conforme indicado. Dados estão expressos como média±EPM.*p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle.
Fonte: Almeida (2012).

Outro secretagogo fisiológico da insulina é a acetilcolina, que através da ligação e subseqüente ativação de seu receptor nas células B pancreáticas, induz aumento intracelular dos segundos mensageiros DAG, IP_3 e íons cálcio (Bonfleur et al., 2011). A figura 6 ilustra os efeitos do mimético de acetilcolina, carbacol, sobre a secreção estática de insulina induzida por glicose das ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controles e dos que foram tratados com DHEA. A adição de carbacol induziu aumento maior nas ilhotas dos ratos que receberam previamente DHEA (CON- 100±4% vs. DHEA- 150±3%, p<0,05).

Figura 6 - Secreção de insulina estimulada por agente mimético colinérgico, carbacol, em ilhotas dos grupos controle (CON – barras abertas) e tratados com DHEA (DHEA – barras pretas).

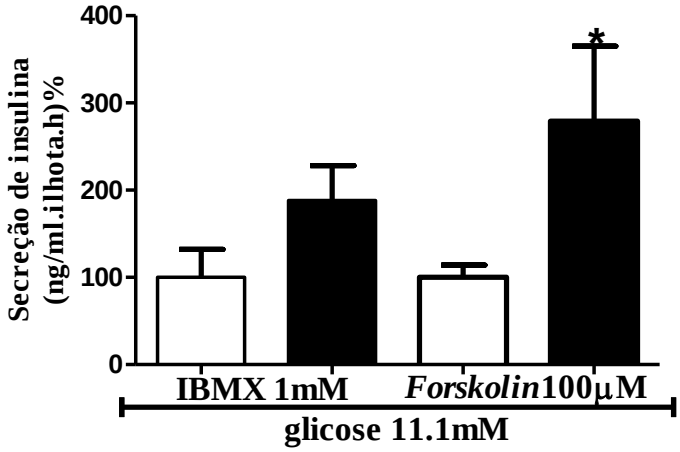


Grupos de 5 ilhotas, após pré-incubação, foram incubadas durante 1 hora com carbacol, conforme indicado. Dados estão expressos como média±EPM.*p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle.
Fonte: Almeida (2012).

Nós também buscamos verificar se agentes moduladores da secreção de insulina via aumento da concentração intracelular de cAMP seriam influenciados pela aplicação de DHEA. Desta maneira, realizamos ensaio de secreção de insulina estimulado por *forskolin*, que eleva os níveis de cAMP por ativação da enzima adenilato ciclase e pelo IBMX, que eleva os níveis de cAMP por inibir a fosfodiesterase (Bonfleur et al., 2011). Conforme observado na figura 7, somente o uso do *forskolin* induziu aumento na secreção de insulina (CON-100±14% vs. DHEA-279±86, p<0,05).

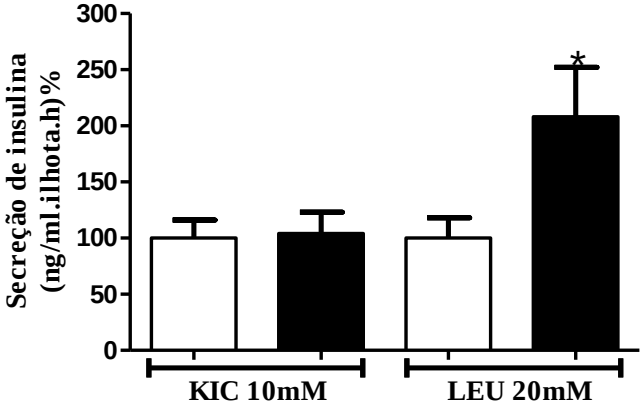
Leucina e alfacetoisocaproato (KIC) são outros dois agentes estimuladores da secreção de insulina. Esses últimos modulam um processo denominado glutaminólise por duas possíveis vias: metabolização ou por ativação da enzima glutamato desidrogenase (Zhou et al., 2010). A figura 8 ilustra os dados obtidos utilizando-se esses dois agentes na ausência de glicose. Observamos aumento na secreção de insulina estimulada apenas quando as ilhotas dos ratos tratados com DHEA foram incubadas com leucina. Ademais, somente as ilhotas isoladas dos ratos que receberam DHEA tiveram aumento estatisticamente significativo da secreção de insulina frente à incubação simultânea com leucina, KIC e glutamina (figura 9).

Figura 7 - Secreção de insulina induzida por estimuladores dos níveis de cAMP intracelular em células B pancreáticas, *forskolin* e IBMX, em ilhotas dos grupos controle (CON – barras abertas) e tratados com DHEA (DHEA – barras pretas).



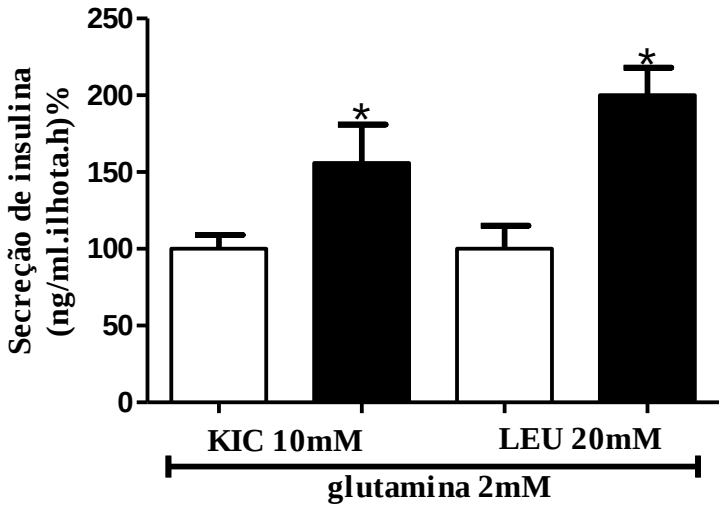
Grupos de 5 ilhotas, após pré-incubação, foram incubadas durante 1 hora com *forskolin* e IBMX, conforme indicado. Dados estão expressos como média±EPM.*p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle.
Fonte: Almeida (2012).

Figura 8 - Secreção de insulina estimulada por alfacetoisocaproato (KIC) e leucina (LEU), em ilhotas dos grupos controle (CON-barras abertas) e tratados com DHEA (DHEA-barras pretas).



Grupos de 5 ilhotas, após pré-incubação, foram incubadas durante 1 hora com KIC e LEU, conforme indicado. Dados estão expressos como média±EPM.*p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle.
Fonte: Almeida (2012).

Figura 9 - Secreção de insulina estimulada por alfacetoisocaproato (KIC) e leucina (LEU) na presença de glutamina (mimetizando condição de ativação de glutaminólise), em ilhotas dos grupos controle (CON-barras abertas) e tratados com DHEA (DHEA-barras pretas).

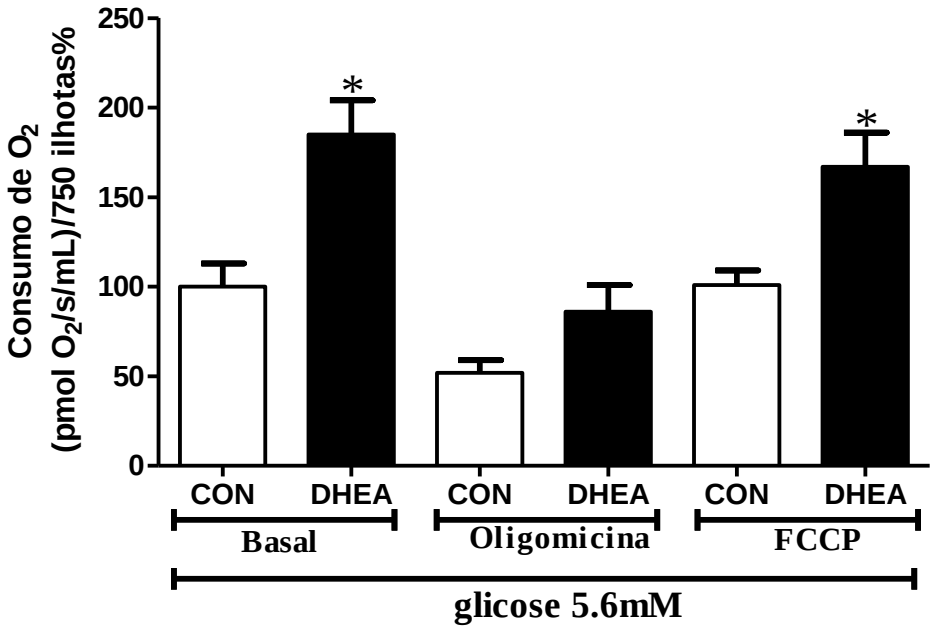


Grupos de 5 ilhotas, após pré-incubação, foram incubadas durante 1 hora com KIC, LEU e glutamina, conforme indicado. Dados estão expressos como média±EPM.*p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle.
Fonte: Almeida (2012)

3.3 Capacidade oxidativa mitocondrial

Um passo central na secreção de insulina estimulada pela glicose é a oxidação dessa hexose pelas células B pancreáticas. Este poderia ser um dos caminhos pelo qual o DHEA estaria levando a um aumento na capacidade secretora. Foi identificada maior capacidade oxidativa mitocondrial mensurada pelo consumo de oxigênio em ilhotas pancreáticas isoladas dos ratos tratados com DHEA em relação às ilhotas dos ratos controles (figura 10).

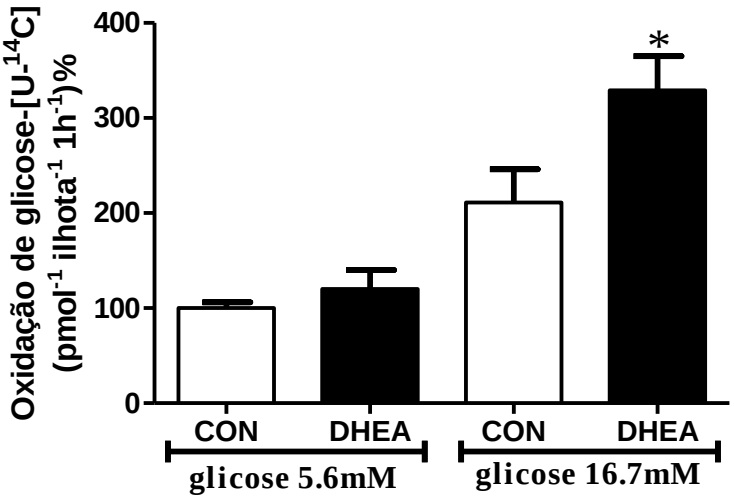
Figura 10 - Respiração mitocondrial de ilhotas (750 ilhotas) incubadas com glucose 5,6 mM, glicose 5,6 mM com oligomicina (inibidor da ATPase), e glucose 5,6 mM com p-[trifluoromethoxy]-phenyl-hydrazone (FCCP, desacoplador químico mitocondrial) dos grupos controle (CON) e tratados com DHEA (DHEA).



Dados estão apresentados como média±EPM. *p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle.
Fonte: Almeida (2012).

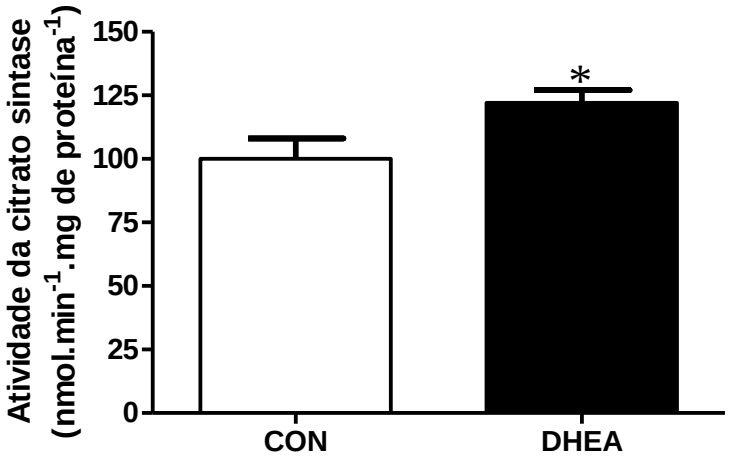
A taxa de oxidação da glicose em baixa concentração (5,6mM) dessa hexose foi semelhante entre as ilhotas dos ratos controles (100±6%) e tratados com DHEA (120±20%). No entanto, em alta concentração (16,7mM) houve maior oxidação da glicose nas ilhotas dos ratos tratados com DHEA em relação aos controles (CON-211±35% vs. DHEA-329±36%, p<0,05) (figura 11). Ademais, as ilhotas do grupo DHEA apresentaram aumento na atividade da enzima citrato sintase, primeira enzima do ciclo do ácido cítrico (CON- 100±8% vs. 122±5%, p<0,05) (figura 12).

Figura 11 - Oxidação da glicose em ilhotas (100 ilhotas) estimulada por glicose 5,6 mM e 16,7 mM dos grupos controle (CON) e tratados com DHEA (DHEA).



Dados estão apresentados como média±EPM. *p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle.
Fonte: Almeida (2012).

Figura 12 - Atividade da citrato sintase (400 ilhotas) dos grupos controle (CON) e tratados com DHEA (DHEA).

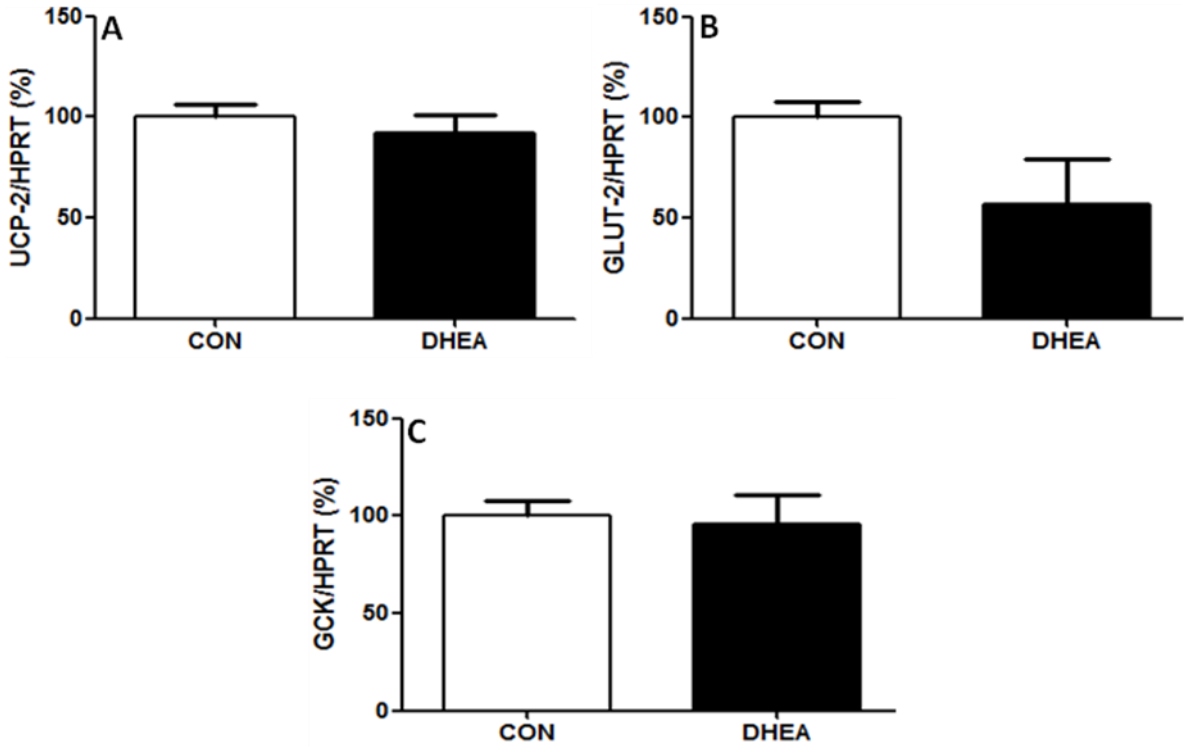


Dados estão apresentados como média±EPM. *p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle.
Fonte: Almeida (2012).

O aumento na capacidade oxidativa detectado nas ilhotas pancreáticas dos ratos tratados com DHEA não foi acompanhado de mudança na expressão gênica da UCP-2 (figura

13A), do transportador de glicose GLUT-2 (figura 13B) e da enzima glicoquinase (figura 13C).

Figura 13 - Efeitos da aplicação de DHEA na expressão gênica (A) da UCP-2, (B) do GLUT-2 e, (C) da glicoquinase em relação ao gene *housekeeping* HPRT.

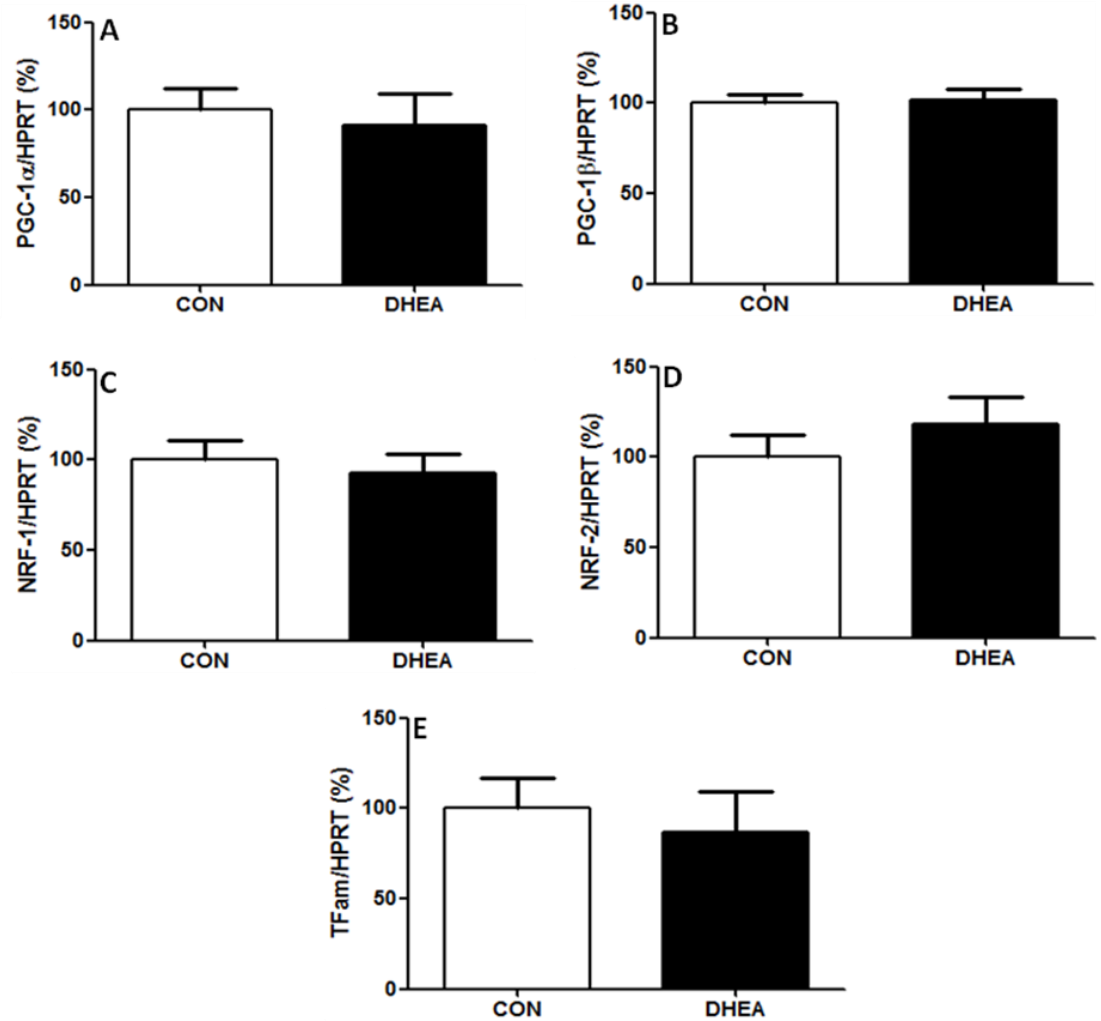


Foram utilizados grupos de 200 ilhotas. Dados estão expressos como média±EPM.
Fonte: Almeida (2012).

3.4 Expressão gênica de marcadores de biogênese mitocondrial

A fim de identificarmos se a maior atividade metabólica oxidativa das ilhotas do grupo DHEA foi devido a um aumento na quantidade de mitocôndrias nas células B pancreáticas realizamos a quantificação da expressão gênica de cinco indicadores de biogênese mitocondrial: PGC-1α (A), PGC-1β (B), NRF-1 (C), NRF-2 (D) e o Tfam (E). A figura 14 mostra que a expressão gênica de cada um desses cinco fatores foi semelhante entre os grupos controle e tratado com DHEA

Figura 14 - Efeitos da aplicação de DHEA na expressão gênica (A) PGC-1α, (B) PGC-1β, (C) NRF-1, (D) NRF-2 e, (E) TFam em relação ao gene *housekeeping* HPRT.



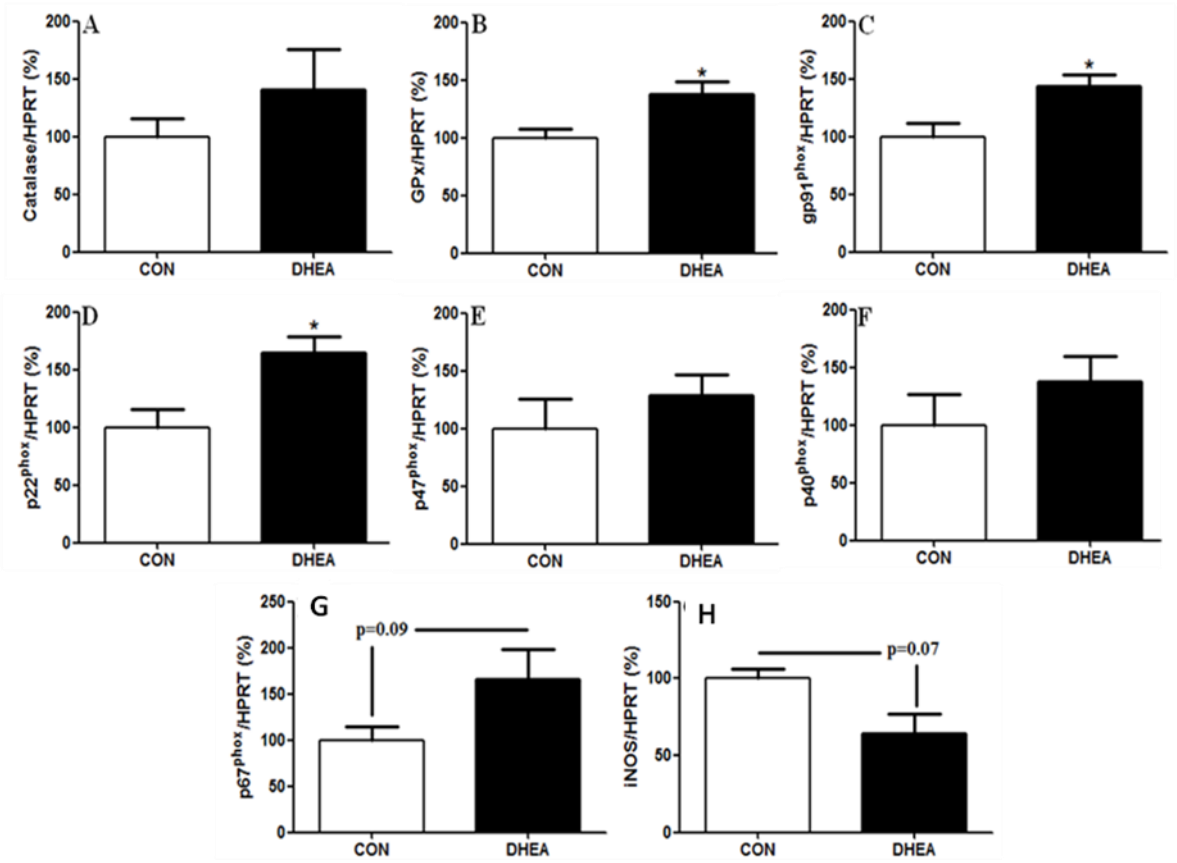
Dados estão expressos como média±EPM. Foram utilizados grupos de 200 ilhotas.
Fonte: Almeida (2012).

3.5 Agentes relacionados à presença de ROS

Um dos fatores celulares relacionados ao processo de envelhecimento envolve alteração nos mecanismos produtores de ROS. Adicionalmente, sabe-se do importante papel que as ROS apresentam modulando a capacidade secretora de insulina, visto que a falta e o excesso das mesmas são prejudiciais e refletem negativamente sobre a secreção de insulina. Além disso, há evidências experimentais demonstrando que DHEA teria efeito protetor contra alguns ROS em sistemas celulares (Camporez et al., 2011; Rebelato et al., 2011). Desta forma, foram avaliadas a expressão de alguns genes relacionados à produção de ROS (figura

15). O tratamento com DHEA aumentou a expressão gênica de GPx (CON-100±8% vs. DHEA-138±11%, p<0,05) (figura 15B), gp91^{phox} (CON-100±12% vs. DHEA-144±10%, p<0,05) (figura 15C) e p22^{phox} (CON-100±16% vs. DHEA-165±14%, p<0,05) (figura 15D). Importante ressaltar também a tendência a redução de iNOS no grupo DHEA (CON-100±6% vs. DHEA-64±13%, p=0,07) (figura 15H).

Figura 15 - Efeitos da aplicação de DHEA na expressão gênica (A) catalase, (B) GPx, (C) gp91^{phox}, (D) p22^{phox}, (E) p47^{phox}, (F) p40^{phox}, (G) p67^{phox} e, (H) iNOS em relação ao gene *housekeeping* HPRT.



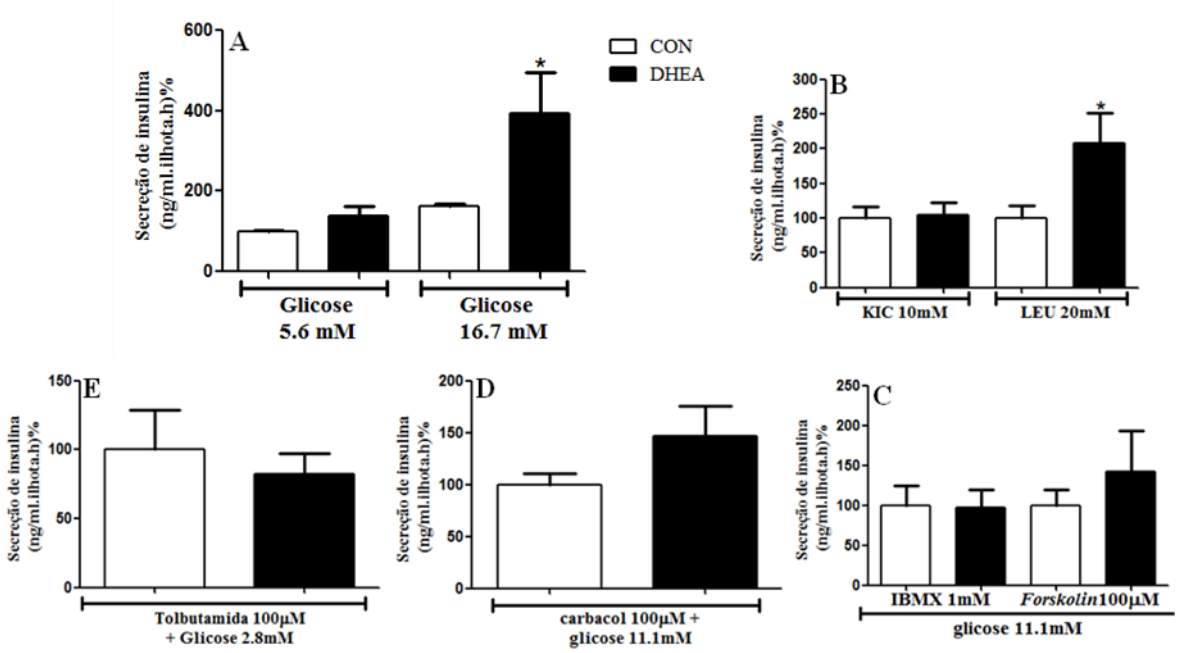
Dados estão expressos como média±EPM. Foram utilizados grupos de 200 ilhotas.
Fonte: Almeida (2012).

3.6 Melhora na capacidade secretora pode ser modulada por maior sobrevivência celular

Além da melhor capacidade secretora frente ao seu principal secretagogo, as ilhotas dos animais tratados com DHEA também apresentavam uma maior massa (Medina et al.,2006).

Desta forma, buscamos identificar se este não seria um dos agentes determinantes da maior capacidade secretora, além da maior capacidade metabólica. Assim, ao realizarmos os ensaios de secreção de insulina, porém corrigindo o valor da secreção de insulina pelo conteúdo total restante de insulina na ilhota pancreática, perdemos alguns dos efeitos potencializadores da secreção de insulina modulados pela aplicação de DHEA (figura 16). Conforme observado, o efeito potencializador da secreção de insulina foi mantido apenas com a estimulação por glicose em alta concentração (CON-162±7% vs. DHEA-392±103%, $p<0,05$) e com a associação entre leucina+glutamina (CON-100±18% vs. DHEA-208±44%, $p<0,05$).

Figura 16 - Secreção de insulina estimulada por (A) glicose, (B) alfacetoisocaproato e leucina com glutamina, (C) ativadores de cAMP IBMX e *forskolin*, (D) mimético colinérgico carbacol e, (E) agente despolarizante tolbutamida nos grupos controle (CON) e tratado com DHEA (DHEA).

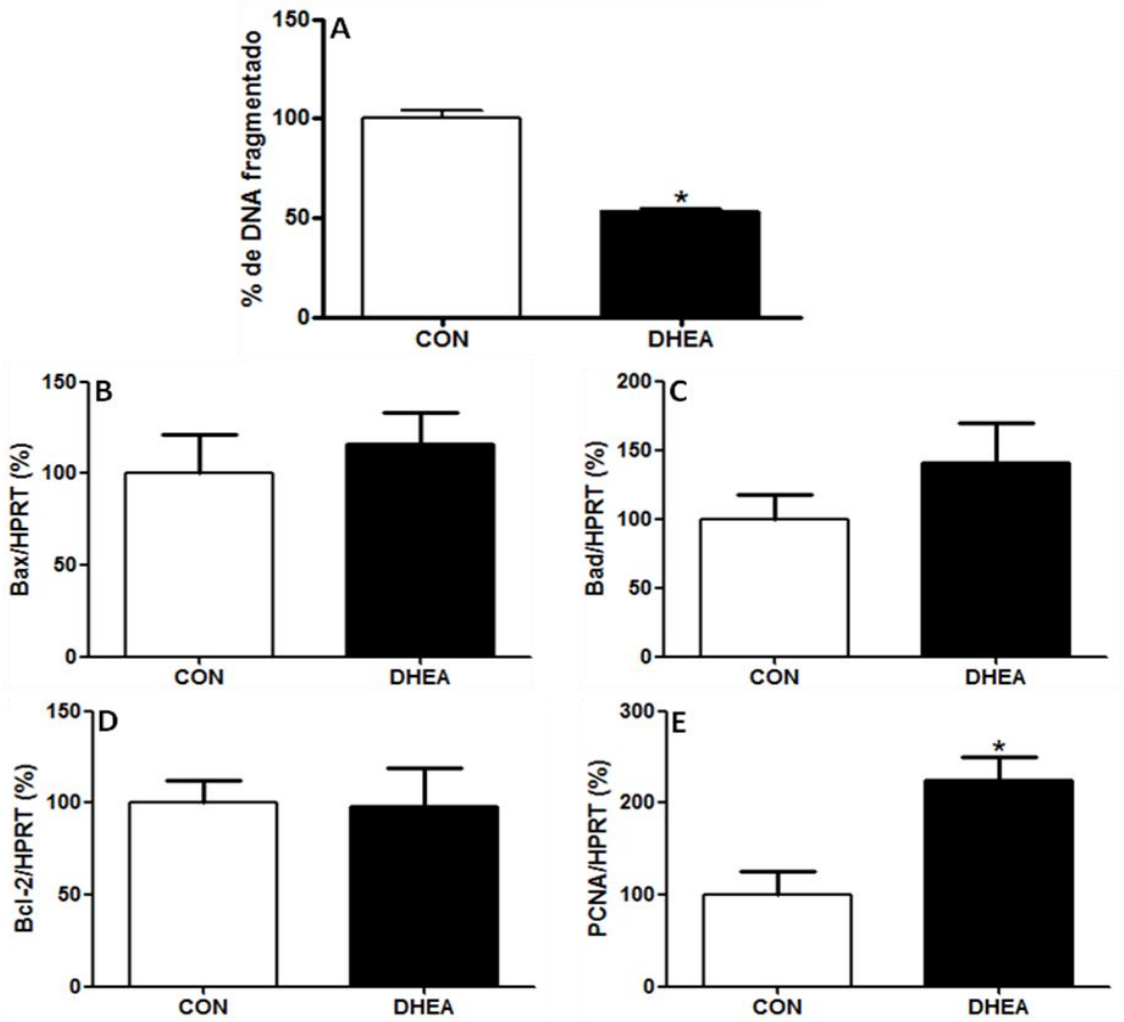


Todos os valores foram corrigidos pelo conteúdo total de insulina nas ilhotas pancreáticas. Dados estão expressos como média±EPM. Foram utilizados grupos de 5 ilhotas nas incubações.
Fonte: Almeida (2012).

Devido a este padrão secretor apresentado após a correção, buscamos verificar se a aplicação de DHEA não estaria repercutindo sobre índices de apoptose e proliferação das células B pancreáticas. Foram realizadas análises de taxa de fragmentação de DNA em ilhotas pancreáticas coradas com iodeto de propidio através de citômetro de fluxo (figura 17A).

As ilhotas pancreáticas do grupo DHEA apresentaram uma redução na fragmentação de DNA de aproximadamente 50% em relação às controles, $p<0,05$. No entanto, a expressão gênica dos marcadores de apoptose celular selecionados, Bax (figura 17B), Bad (figura 17C) e Bcl-2 (figura 17D), foi semelhante entre os grupos controle e tratado com DHEA. Por outro lado, foi detectado aumento na expressão do marcador de proliferação celular, PCNA, para 225±25%, no grupo DHEA em comparação ao controle (100±25%, $p<0,05$) (figura 17E).

Figura 17 - (A) Fragmentação de DNA de ilhotas pancreáticas marcado com iodeto de propidio via citômetro de fluxo, e expressão gênica de proteínas envolvidas na via de morte celular (B) Bax, (C) Bad e (D) Bcl-2 e de um marcador de proliferação celular (E) PCNA nos grupos controle (CON) e tratado com DHEA (DHEA).



Dados estão expressos como média±EPM. Para fragmentação de DNA, utilizamos grupos de 30-50 ilhotas. Expressão gênica, grupos de 200 ilhotas.
Fonte: Almeida (2012).

3.7 DHEA atua via receptores de andrógenos e receptores de estrógeno

O mecanismo de ação celular do DHEA não é completamente conhecido pois não há um receptor específico, além de ser considerado precursor de esteróides sexuais androgênicos e estrogênicos. Assim, avaliamos se a injeção de DHEA modificou os valores circulantes de outros esteróides sexuais (tabela 1). As concentrações séricas de LH, FSH, progesterona, androstenediona, testosterona e β-estradiol foram semelhantes entre os animais controles e tratados com DHEA. Em relação aos níveis de DHEA circulantes, foi previamente demonstrado por nosso grupo que este tratamento significativamente aumenta seus níveis (Medina et al., 2006).

Tabela 1 - Concentrações plasmáticas do hormônio luteinizante (LH, ng/mL), hormônio folículo estimulante (FSH, ng/mL), progesterona (ng/mL), β-estradiol (pg/mL), testosterona (pg/mL) and androstenediona (ng/mL) dos grupos controle (CON) e tratados com DHEA (DHEA).

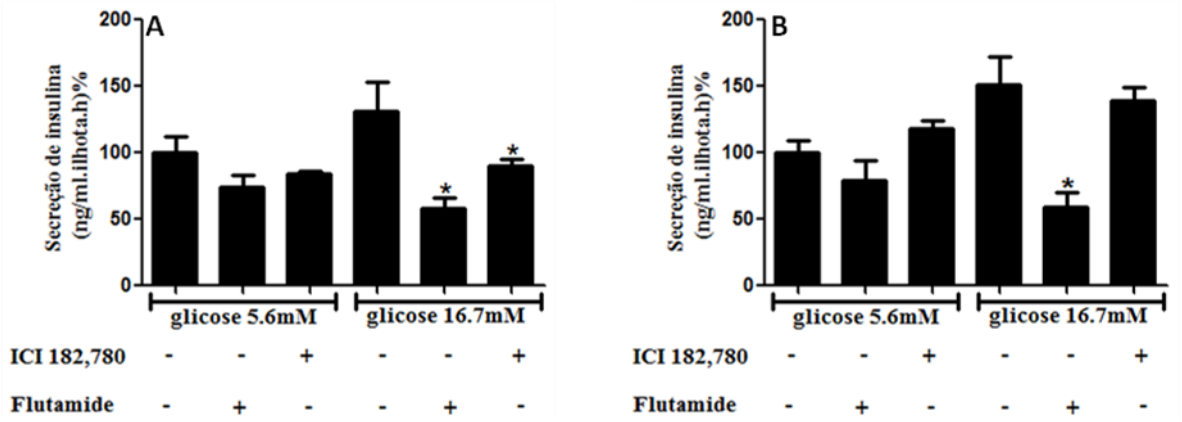
	LH	FSH	Progesterona	β-estradiol	Testosterona	Androstenediona
CON	6.11±0.6	7.53±1.6	2.04±0.8	1.87±0.4	516.75±88.6	52.78±7.8
DHEA	4.45±1.0	6.79±0.7	2.55±0.5	1.31±0.2	335.25±74.8	71.44±8.3

Dados estão apresentados como média±EPM. N=8.
Fonte: Almeida (2012).

Devido à ausência de conversão do DHEA a outros hormônios esteróides sexuais, verificamos se alguns dos efeitos observados nos animais tratados com DHEA seriam devido a ativação de receptores de andrógenos e de estrógenos. Foram realizados ensaios de secreção de insulina induzida por baixa (5,6 mM) e alta (16,7 mM) concentração de glicose em animais que além da aplicação de DHEA, receberam inibidor de receptor de andrógeno (flutamide) ou inibidor inespecífico de receptor de estrógeno (ICI 182,780) (figura 18).

A figura 18A ilustra o percentual da secreção de insulina absoluta e a figura 18B apresenta a secreção de insulina corrigida pelo conteúdo total de insulina. Ambos os inibidores induziram menor capacidade secretora absoluta de insulina em altas concentrações de glicose (figura 18A). Em contrapartida, ao corrigirmos estes valores pelo conteúdo total de insulina (figura 18B) apenas na presença do inibidor de andrógeno temos uma redução na capacidade secretora de insulina.

Figura 18 - Secreção de insulina estimulada por glicose 5,6 mM e 16,7 mM em animais que receberam aplicação de DHEA, na presença de inibidores de receptor de andrógeno (flutamide) e receptor de estrógeno (ICI 182,780).

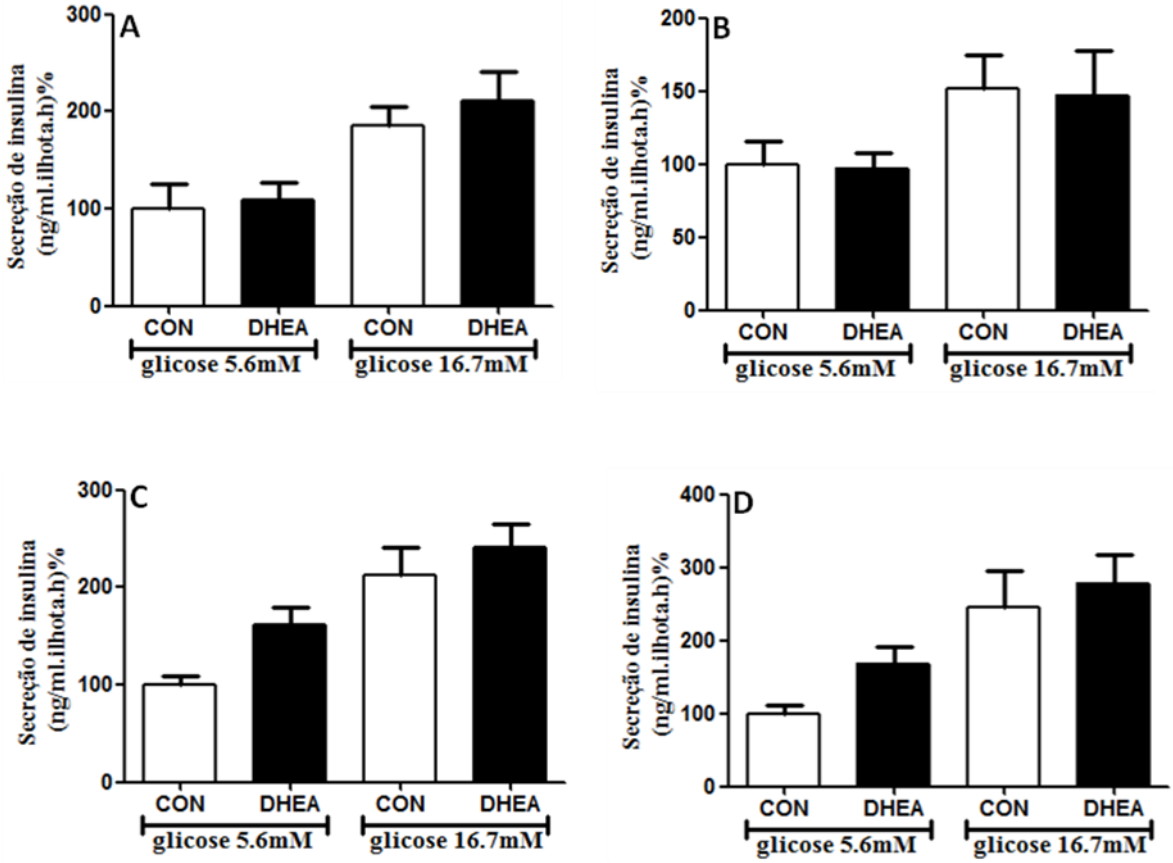


Em (A) secreção de insulina sem corrigir os valores pelo conteúdo total, (B) secreção de insulina com valores corrigidos pelo conteúdo total. Dados apresentados como média±EPM. *p<0,05 em relação a mesma concentração de glicose. Foram utilizados grupos de 5 ilhotas. Fonte: Almeida (2012).

3.8 Ação do DHEA sobre a capacidade secretora de insulina é tempo-dependente

Para verificar se o efeito potencializador da secreção de insulina induzida pela glicose pelo tratamento com DHEA poderia ocorrer em outro período de tempo distinto do sétimo dia após a injeção com o esteroide, foram realizados ensaios de secreção de insulina estimulada por glicose (5,6 mM e 16,7 mM) após quatro e 17 dias da aplicação de DHEA. A figura 19 demonstra que a antecipação ou o retardo do tempo de realização não induziu modificação da secreção de insulina estimulada pela glicose nas ilhotas dos ratos tratados com DHEA em relação aos controles.

Figura 19 - Secreção de insulina estimulada por glicose 5,6 mM e 16,7 mM nos grupos controle (CON) e tratado com DHEA (DHEA).



(A) Ensaio de secreção realizado após 4 dias da aplicação de DHEA, sem correção pelo conteúdo total, (B) Ensaio de secreção realizado após 4 dias da aplicação de DHEA, com correção pelo conteúdo total, (C) Ensaio de secreção realizado após17 dias da aplicação de DHEA, sem correção pelo conteúdo total e, (D) Ensaio de secreção realizado após 17 dias da aplicação de DHEA, com correção pelo conteúdo total. Dados apresentados como média±EPM. Foram utilizados grupos de 5 ilhotas.
Fonte: Almeida (2012).

3.9 Melhorias na capacidade secretora de insulina frente à glicose não repercutiram em benefícios na homeostase glicêmica

A fim de determinar se a melhora da secreção de insulina das ilhotas pancreáticas isoladas de ratos tratados com DHEA repercutiu na homeostase glicêmica desses ratos obesos e envelhecidos, foram analisadas glicemia e insulinemia em jejum e no estado alimentado e calculado os índices HOMA-IR e HOMA-B (tabela 2) e foram realizados os testes de

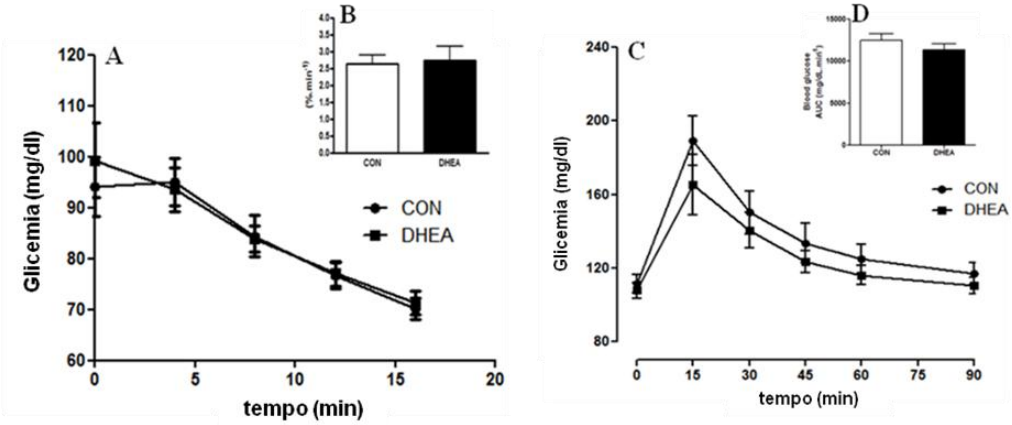
tolerância a glicose e a insulina (figura 20). O tratamento com DHEA não interferiu na glicemia, na insulinemia e consequentemente nos índices HOMA dos ratos envelhecidos. Adicionalmente, os testes de tolerância à glicose e de tolerância à insulina (figura 20) também foram semelhantes entre os grupos controle e DHEA.

Tabela 2 - Glicemia (mg/dL) e insulinemia (ng/dL) no estado alimentado e em jejum, indíce HOMA-IR e HOMA-β dos grupos controle (CON) e tratados com DHEA (DHEA).

	Jejum				Alimentado	
	Glicemia	Insulinemia	HOMA-IR	HOMA-β	Glicemia	Insulinemia
CON	111.40±4.93	1.36±0.11	9.37±0.91	107.45±9.40	97.83±2.41	1.08±0.26
DHEA	107.80±4.10	1.11±0.15	7.57±1.15	87.96±10.71	98.22±5.03	1.36±0.21

Dados estão expressos como média±EPM. N=8.
Fonte: Almeida (2012).

Figura 20 - (A) Teste de tolerância à insulina (ITT), (B) constante de decaimento da glicose (kitt), (C) Teste de tolerância à glucose (GTT), (D) area sobre a curva dos grupos controle (CON) e tratados com DHEA (DHEA).



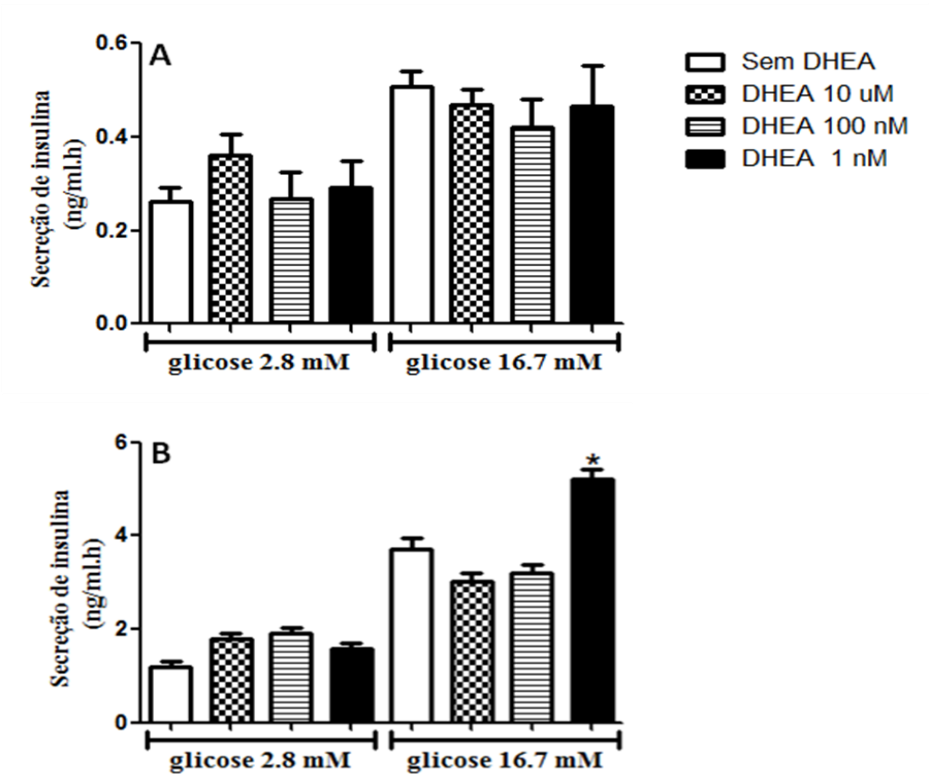
Dados estão expressos como média±EPM. N=8.
Fonte: Almeida (2012).

3.10 DHEA melhora capacidade secretora de insulina em linhagem de células B pancreáticas INS-1e

Adicionalmente aos seus efeitos nas ilhotas pancreáticas de ratos com 12-14 meses, verificamos que a incubação *in vitro* de DHEA (1 nM) com linhagem de células B-pancreáticas INS-1e após sete dias induz aumento da secreção de insulina em

aproximadamente 40% ($p<0,05$) em relação aos controles (figura 21B). Por outro lado, incubação por tempo menor, 24 h, não modifica a capacidade secretora de insulina nessas células in vivo (figura 21 A).

Figura 21 - Secreção de insulina estimulada por glicose 2,8 mM e 16,7 mM em linhagem de células B-pancreáticas INS-1e incubadas com diferentes concentrações de DHEA.



(A) Incubações de 24 horas com DHEA e (B) Incubações com DHEA por 7 dias.
Fonte: Almeida (2012).

4 DISCUSSÃO

4.1 DHEA potencializa a capacidade secretora de insulina

O DM2 é uma doença com incidência elevada globalmente com perspectiva de crescimento numérico para os próximos anos em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Por outro lado, o envelhecimento natural, é um importante fator de risco para o desenvolvimento de uma série de doenças metabólicas, incluindo obesidade, intolerância à glicose e o próprio DM2. Em particular, há aumento da incidência de DM2, independente da etnia, na faixa etária entre 60-74 anos (Chiu et al., 2005; Gunasekaran, Gannon, 2011).

Com o envelhecimento há uma redução nas concentrações plasmáticas do esteróide adrenal DHEA (Parker, 1999). Assim, é possível considerar que a concentração de DHEA plasmática e a incidência de DM2 apresentam uma relação inversa com o envelhecimento. Essa premissa levou vários pesquisadores à investigação de possível eficácia da suplementação com DHEA como uma medida terapêutica e/ou preventiva em relação ao desenvolvimento de DM2.

Ao focarmos na gênese do DM2 associado ao envelhecimento, identificamos dois componentes: a resistência a ação insulínica e a deficiência na capacidade secretora de insulina (Gong, Muzumdar, 2012).

Kawano et al. (2003) observaram mudanças significativas na glicemia de jejum em homens hipercolesterolêmicos tratados com 25 mg de DHEA ao dia durante 12 semanas. Villareal e Holloszy (2004) evidenciaram redução da insulinemia durante um teste de tolerância oral a glicose em indivíduos que receberam 50 mg diários de DHEA por seis meses a despeito de glicemia similares, indicando uma maior sensibilidade a insulina. Mas recentemente, Weiss et al. (2011), demonstraram em um estudo longitudinal seguido por até dois anos, aumento da tolerância a glicose e da razão entre glicose e insulina, outro indicador da sensibilidade a insulina.

Em paralelo aos estudos apresentados demonstrando efeitos benéficos da administração diária de DHEA, resultados contrários também foram descritos na literatura. Flynn et al. (1999) não identificaram melhora na glicemia de jejum de homens com idade entre 60 e 84 anos que fizeram uso diário de 100 mg de DHEA por um período de 3 meses. Adicionalmente, Nair et al. (2006), não observaram efeito do tratamento de DHEA em

homens e mulheres com idade avançada na glicemia de jejum e na sensibilidade a insulina. Posteriormente, Basu et al., 2007, não encontraram melhora na glicemia pós-prandial, na ação insulínica ou na secreção de insulina após o uso de 50 mg ou 75 mg de DHEA diariamente em homens e mulheres por cerca de dois anos consecutivos. Jankowski et al. (2011) realizaram intervenção por um período de 12 meses com dose de DHEA semelhante a utilizada por Weiss et al. (2011) e Villareal e Holloszy (2004), ou seja, 50 mg/dia. Porém, este grupo de pesquisadores não identificou melhora na sensibilidade à insulina nos homens e mulheres estudados.

Adicionalmente aos estudos com humanos, há evidencias experimentais demonstrando efeito da administração do DHEA e a ação da insulina em modelos animais e células isoladas. Dados de nosso laboratório (Campbell et al., 2004) apontaram uma melhora na resposta ao teste de tolerância à insulina em ratos adultos com 6 meses de idade tratados com DHEA e que este quadro estava associado a uma maior ativação da via IRS-1/PI3K e PKC atípica (aPKC). Associado a estes resultados, Sato et al. (2008) observaram em cultura primária de célula muscular um aumento no grau de fosforilação da AKT e da aPKC e na expressão protéica do GLUT-4, na translocação do mesmo até a membrana e na atividade das enzimas hexoquinase e da fosfofrutoquinase-1. Estes mesmos autores afirmaram que estas ações foram mediadas pela conversão do DHEA a diidrotestosterona (DHT), visto que o uso do inibidor da enzima 5α-redutase reverteu os efeitos identificados. Em 2009 foi demonstrada redução da glicemia em ratos com diabete induzido pela estreptozotocina acompanhado de efeito semelhante ao detectado nas células musculares isoladas no tecido muscular esquelético desses ratos, incluindo a inibição do efeito pelo bloqueio da 5α-redutase (Sato et al., 2009). Vale salientar que a ação do DHEA em ratos euglicêmicos não reproduziu os efeitos observados nos ratos diabéticos. Confirmando os resultados descritos acima, Jahn et al. (2010) detectaram melhora da glicemia de ratos diabéticos com simultâneo aumento na concentração de GLUT-4, na oxidação de glicose e na redução da concentração da tiorredoxina nos músculos estriados estudados.

Com base nos resultados desses estudos em humanos e em animais de experimentação, levanta-se a hipótese de um papel funcional para o DHEA como agente modulador da ação da insulina em presença de algum grau de resistência a esse hormônio.

Além dos estudos focados na resistência à insulina, dados do nosso laboratório (Medina et al., 2006) detectaram que a administração de DHEA a ratos envelhecidos aumentou a

capacidade secretória de insulina das ilhotas pancreáticas frente ao secretagogo fisiológico mais importante, a glicose, além de induzir aumento na área correspondente às células B pancreáticas. Com base nestes resultados demos continuidade à investigação dos mecanismos prováveis relacionados aos efeitos deste esteróide sobre as ilhotas pancreáticas.

Além de ratificamos os dados apresentados anteriormente por Medina et al. (2006), foi possível avaliar que a secreção da insulina estimulada por outros agentes como arginina, tolbutamida, leucina, α-cetoisocaproato na presença de glutamina, carbacol e *forskolin* foi potencializada nas ilhotas dos ratos envelhecidos que receberam DHEA. Ampliamos assim o repertório de efeitos do DHEA sobre a secreção de insulina.

Primeiramente, pelo fato da secreção de insulina estimulada por arginina e tolbutamida serem potencializadas pela administração de DHEA, podemos levantar a hipótese de que algumas ações deste hormônio independem do aparato metabólico. Arginina e tolbutamida atuam como estimuladores da secreção de insulina através de modificações no potencial de repouso da membrana das células β-pancreáticas. O efeito envolve a retenção de cargas positivas no interior da célula resultando em despolarização.

A leucina é um ativador alostérico da glutamato desidrogenase (Fahien, MacDonald, 2011; Yang et al. 2010), enquanto o α-cetoisocaproato necessita ser convertido a leucina através da ação de transaminases, para estimular a secreção de insulina (Zhou et al., 2010). A glutamato desidrogenase é uma importante enzima influenciadora da capacidade secretora de insulina em ilhotas pancreáticas e sua ausência ou reduzida atividade está associado ao desequilíbrio na homeotase glicêmica e instalação do quadro diabético (Carobbio et al., 2009; Gohring, Mulder, 2012; Tanizawa et al., 2002). Em adição, devido a ação estimuladora de secreção de insulina mediada por leucina e α-cetoisocaproato associado com glutamina, podemos levantar a hipótese de um efeito positivo da deidroepiandrosterona sobre a atividade da glutamato desidrogenase. Uma questão a ser salientada envolve o fato de na ausência de glutamina, não observarmos auento na capacidade secretora de insulina com o α-cetoisocaproato.

Outro importante agente intracelular que potencializa a secreção de insulina induzida pela glicose é o cAMP (Idevall-Hagren et al., 2010; Malaisse et al., 1984). Esta molécula é formada pela atividade da enzima adenilato ciclase em resposta a alguns hormônios como as incretinas e também ao aumento na concentração citoplasmática de íons Ca^{2+} (Furman et al., 2010). Nossos resultados mostram um aumento na capacidade secretora de insulina

estimulada pelo indutor da atividade da adenilato ciclase, *forskolin*, nas ilhotas isoladas dos ratos que receberam dehidroepiandrosterona, mas não com a incubação com o inibidor da fosfodiesterase, IBMX.

Aumentos nos níveis de cAMP mediante influência da dehidroepiandrosterona foi demonstrado previamente em cultura primária de hepatócitos por Tang et al. (2009), porém em seu trabalho, a dehidroepiandrosterona reduziu a atividade da fosfodiesterase, sem influenciar na atividade da adenilato ciclase, justamente o inverso do mecanismo que parece atuar nas ilhotas pancreáticas. Desta forma, como este foi o primeiro trabalho a verificar a ação da dehidroepiandrosterona sobre a potencialização da secreção de insulina mediada pelo cAMP, novos estudos que aprofundem nesta via serão necessários para explicar melhor esta ação.

Por fim, o carbacol é um fármaco que mimetiza a acetilcolina e age através da ligação a receptores muscarínicos levando a um aumento na atividade da fosfolipase C nas células B pancreáticas, com conseqüente aumento em IP3 e DAG. A presença destes dois produtos induz aumento na concentração do íon Ca^{2+} citoplasmático com subseqüente secreção de insulina. Ações do DHEA moduladas por potencialização de vias muscarínicas já foi previamente relatado em literatura em células do sistema nervoso central (Steffensen et al., 2006).

4.2 Quais os mecanismos relacionados a esta maior capacidade secretora de insulina induzida pela glicose?

A entrada da glicose na célula B pancreática pelo transportador de glicose e outros monossacarídeos, o GLUT2, atua como um agente limitante na capacidade secretora. Há evidências demonstrando que a ausência ou a redução na expressão de GLUT-2 nessas células leva a quadro de hiperglicemia em humanos e DM2 em roedores (Guillam et al., 1997; Ohtsubo et al., 2005). Em adição sabe-se que ao longo do processo de envelhecimento ocorre uma redução na expressão de GLUT-2 na membrana das células B pancreáticas, observado em macacos (Kramer et al., 2009) e em roedores (Ihm et al., 2007; Novelli et al., 2000), o que poderia estar relacionado com um prejuízo na capacidade secretora com o avançar da idade. Porém, neste aspecto não observamos diferenças na expressão gênica do GLUT-2 com a aplicação de DHEA.

A segunda etapa central nesse processo celular que leva a secreção de insulina é a atividade da enzima glicoquinase, a primeira enzima da via glicolítica, a qual converte a glicose em glicose-6-fosfato (G-6-P) e essa continua o fluxo metabólico (Bell et al., 1996). Estudos com camundongos modificados geneticamente confirmaram a importância dessa enzima. Em camundongos *knockout* para a glicoquinase foi detectada hiperglicemia (Gorman et al., 2008) e, a ativação crônica dessa enzima induziu correção da glicemia associada a aumento da capacidade secretora de insulina em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica (Winzell et al., 2011). Por outro lado, tem sido descrito aumento da expressão gênica da glicoquinase em células B pancreáticas de roedores envelhecidos (Frese et al., 2007; Perfetti et al., 1996). O que tem sido sugerido ser um mecanismo compensatório a redução da capacidade secretora observado com o envelhecimento (Gong, Muzumdar, 2012). Em nosso experimento, o tratamento com DHEA a ratos envelhecidos não induziu mudança da expressão gênica da glicoquinase nas ilhotas pancreáticas isoladas. Importante ressaltar que por ser uma enzima, a medida da atividade enzimática seria um parâmetro importante a ser realizado, colocando a mesma como uma lacuna de nossa pesquisa.

Seguindo a via glicolítica a G-6-P é convertida a piruvato e o destino principal deste substrato envolve sua descarboxilação modulada pelo complexo piruvato desidrogenase com subseqüente formação de acetil-CoA e oxidação através da via do ciclo do ácido cítrico. Recentemente, em 2010, Srinivasan et al. demonstraram em camundongo *knockout* desta enzima, além de reduzida oxidação da glicose nas células isoladas das ilhotas pancreáticas, reduzida capacidade secretora de insulina, baixa insulinemia e hiperglicemia. Este trabalho confirmou a importância da oxidação da glicose pelas células B-pancreáticas para a capacidade secretora de insulina. Anteriormente, Reaven e Reaven (1980) haviam demonstrado que ao longo do processo de envelhecimento há redução da capacidade oxidativa em ilhotas pancreáticas de ratos.

Neste ponto, verificamos resultados significativos pela suplementação com DHEA. As ilhotas isoladas dos ratos que receberam DHEA apresentaram maior taxa de respiração mitocondrial, maior taxa de oxidação da glicose e maior atividade da enzima citrato sintase, a primeira enzima do ciclo do ácido cítrico. Todos indicadores de uma maior capacidade oxidativa mitocondrial, o que devem levar a uma maior produção de ATP e consequentemente, potencializarem a capacidade secretora de insulina.

Salienta-se que esta maior atividade mitocondrial ocorreu sem modificações na expressão gênica de UCP-2 entre os grupos controle e DHEA. Sabe-se que esta proteína tem papel no desacoplamento entre o gradiente de prótons mitocondrial e a biossíntese de ATP, produzindo energia térmica. Logo, uma expressão aumentada da mesma associa-se a menor biossíntese de ATP, o que, na célula B pancreática resulta em uma menor capacidade secretora de insulina (Polonsky e Semenkovich, 2001; Zhang et al., 2001).

Além disso, visto que não detectamos diferença na expressão gênica dos marcadores de biogênese mitocondrial, podemos considerar que a suplementação com DHEA resultou numa maior eficácia do aparato oxidativo, o que provavelmente refletiu numa maior produção de ATP, e subsequente maior capacidade secretora de insulina.

Devido ao DHEA apresentar efeito antioxidante em outros tecidos (Camporez et al., 2011; Huerta-Garcia et al., 2012) investigamos a expressão gênica de alguns componentes envolvidos na produção de ROS. Concordante com isso foi observado aumento na expressão gênica da enzima glutationa peroxidase, cuja atividade resulta em conversão de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Esse achado poderia indicar produção de menores concentrações de ROS nas ilhotas pancreáticas dos ratos envelhecidos suplementados com DHEA, resultando em maior capacidade mitocondrial para a produção de ATP. Há evidências demonstrando que quantidades elevadas de ROS são prejudiciais a capacidade secretora em células INS-1 por reduzirem o consumo de oxigênio a capacidade produtora de ATP (Li et al., 2009). Adicionalmente, aumento de ROS, reduzida capacidade oxidativa mitocondrial e conseqüente redução na capacidade secretora de insulina também foi observado em ratos Goto-Kakizaki (Kominato et al., 2008).

Verificamos simultaneamente ao aumento da expressão da glutadiona peroxidase, aumento na expressão gênica das subunidades $gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$ da NADPH oxidase. A NADPH oxidase apresenta um papel importante na produção de ROS que, agudamente, tende a elevar a capacidade secretora de insulina estimulada por glicose (Rebelato et al., 2011). Ademais, a inativação da NAPDH oxidase é prejudicial à capacidade secretora de insulina (Morgan et al., 2009); no entanto, o aumento da sua atividade pode ser extremamente nociva ao funcionamento das células B pancreáticas (Newsholme et al., 2009).

Assim, somente com a expressão gênica destes componentes fica difícil identificar o que está ocorrendo via produção de ROS nas células B-pancreáticas. Podemos hipotetizar que o aumento na NADPH oxidase está promovendo um aumento na produção de ROS

agudamente que está levando a uma maior capacidade secretora de insulina. Em contrapartida, o aumento na expressão gênica da glutationa peroxidase se faz necessário para melhorar a resposta antioxidante impedindo a manutenção de um ambiente intracelular no qual os níveis de ROS permaneçam cronicamente elevados. Porém, ensaios adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

A massa das células B pancreáticas é finamente regulada pelo equilíbrio entre apoptose, proliferação e neogênese. Temos que ao longo do desenvolvimento a massa das células B tende a aumentar gradativamente promovendo um aumento na capacidade secretora de insulina em decorrência da maior demanda, devido à maior estrutura corporal de adultos ao compararmos às crianças (Ackermann, Gannon, 2007). Também temos que ao longo do envelhecimento as células B pancreáticas são mais suscetíveis a apoptose e apresentam reduzida capacidade proliferativa com tendência a redução de sua massa (Gong, Muzumdar, 2012; Maedler et al., 2006). Gu et al. (2012) demonstraram ao comparar ratos de 4, 14 e 24 meses, um aumento gradativo no índice de apoptose associado a redução na taxa de apoptose com a evolução da idade. Dados publicados em 2006 de Maedler et al., demonstraram que ilhotas isoladas de ratos com 2 a 3 meses de idade apresentam um aumento na taxa de proliferação celular quando expostas a concentrações crescentes glicose, demonstrando uma capacidade adaptativa a sobrecarga de glicose. Em contrapartida, ilhotas de ratos com 7 a 8 meses de idade quando submetidas ao mesmo procedimento aumentam gradativamente seus índices de apoptose com redução na taxa de proliferação celular (Maedler et al., 2006).

A taxa de proliferação celular basal das células B pancreáticas decai com o avançar da idade (Montanya et al., 2000). Alem disso, mediante estímulos diferenciados, perde-se a capacidade proliferativa com o envelhecimento. Pancreatectomia parcial estimula a proliferação celular em camundongos jovens, porém há uma falha nesta compensação com o envelhecimento (Rankin, Kushner, 2009). Fenômeno semelhante acontece com a administração de estreptozotocina (Tschen et al., 2009).

Observamos que a suplementação com DHEA além de melhorar a capacidade metabólica das células, apresentou menor índice de apoptose medido por fragmentação de DNA e um aumento na taxa de proliferação celular. Esses dados poderiam ser um segundo mecanismo pelo qual a suplementação com DHEA leva a uma maior capacidade secretora de insulina nos ratos de 12-14 meses.

4.3 Como o DHEA promove suas ações?

De maneira distinta de outros esteróides, um receptor intracelular para DHEA não foi isolado. Porém há dados descrevendo sua interação *in vitro* com receptor de andrógenos (RA) e estrógenos (RE) e *in vivo* em leveduras (Nephew et al, 1998). Algumas das atividades biológicas do DHEA necessitam da presença do PPAR alfa, porém nenhuma das isoformas do PPAR parece funcionar como um receptor para este hormônio (Peters et al., 1996; Waxman, 1996).

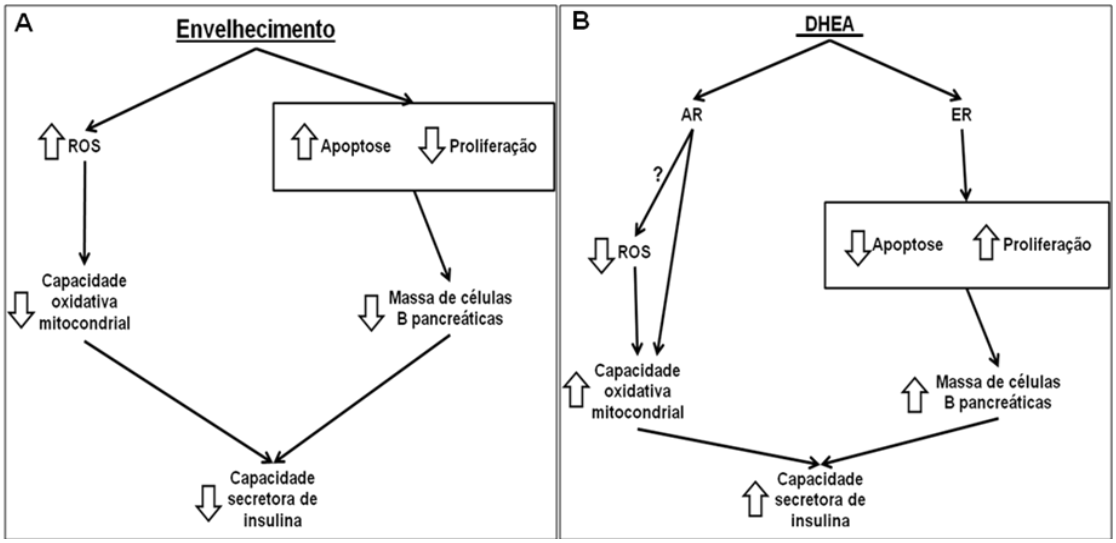
Desta forma, para tentar identificar se as ações do DHEA aqui detectadas foram por ligação a receptores de estrógeno (ER) e ou de andrógeno (AR), realizamos a inibição farmacológica e avaliamos a capacidade secretora. A análise desses dados nos permitiu concluir que os efeitos sobre a secreção de insulina do DHEA são principalmente modulados pela sua ligação a AR; o que é corroborado pelos dados de Grilo et al., 2006, que demonstraram aumento da secreção de insulina mediada pela testosterona. Por outro lado, uma ação promotora de sobrevivência das células B pancreáticas dos ER tem sido descrita nessa última década (Le May et al., 2006; Liu, Mauvais-Jarvis, 2010; Mauvais-Jarvis, 2011).

5 CONCLUSÃO

Em suma, concluímos que a suplementação com DHEA a ratos envelhecidos e obesos leva uma potencialização da capacidade secretora de insulina por diversos secretagogos. Esse efeito envolve uma modulação positiva na capacidade oxidativa mitocondrial com simultânea redução do índice de apoptose e aumento na taxa de proliferação celular. Em adição, demonstramos que, pelo menos em parte, a resposta de aumento da capacidade secretora de insulina está relacionada a ligação do DHEA a receptor de andrógeno.

Tomando esses dados em conjunto com outros da literatura, como o efeito do aumento da massa de células B pancreáticas (Medina et al., 2006) e os efeitos protetores dos ER, propomos o seguinte esquema de ação do DHEA:

Figura 22 - Proposta de resposta das células B pancreáticas a suplementação com DHEA a ratos envelhecidos e obesos.



No painel A, temos uma reduzida capacidade secretora de insulina com o envelhecimento em resposta a uma reduzida capacidade oxidativa mitocondrial e reduzida massa das células B pancreáticas; no painel B o DHEA, atuando atraveés do receptor de andrógenos (AR) promove um aumento na capacidade oxidativa mitocondrial e através dos receptores de estrógenos (ER) promove um aumento na massa de células B pancreáticas. Ambos os efeitos levariam ao aumento na capacidade secretora de insulina.
Fonte: Almeida (2012).

REFERÊNCIAS[1]

Aikin R, Rosenberg L, Maysinger D. Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling to Akt Mediates Survival in Isolated Canine Islets of Langerhans. Biochem Biophys Res Commun. 2000;277(2):455-61.

Aizawa T, Asanuma N, Terauchi Y, Suzuki N, Komatsu M, Itoh N, et al. Analysis of the pancreatic beta cell in the mouse with targeted disruption of the pancreatic beta cell-specific glucokinase gene. Biochem Biophycal Research Comm. 1996;229(2):460-5.

Araújo EP, Amaral MEC, Filiputti E, De Souza CT, Laurito TL, Augusto VD et al. Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. J Endocrinol. 2004;181(1):25-38.

Barrett-Connor E, Khaw KT, Yen S. A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate, mortality, and cardiovascular disease. N Engl J Med. 1986;315(24):1519-24.

Basu R, Man CD, Campioni M, Basu A, Nair KS, Jensen MD et al. Two years of treatment with dehydroepiandosterone does not improve insulin secretion, insulin action, or postprandial glucose turnover in elderly men or women. Diabetes. 2007;56(3):753-66.

Bell GI, Pilkis SJ, Weber IT, Polonsky KS. Glucokinase mutations, insulin secretion and diabetes mellitus. Annual Review of Physiology. 1996;58 :171-86.

Byrne MM, Sturis J, Clement K, Vionnet N, Pueyo ME, Stoffel M, Takeda J, Passa P, Cohen D, Bell GI, et al. Insulin secretory abnormalities in subjects with hyperglycemia due to glucokinase mutations. J Clin Invest. 1994;93(3):1120-30.

Bonfleur ML, Ribeiro RA, Balbo SL, Vanzela EC, Carneiro EM, de Oliveira HC, Boschero AC. Lower expression of PKAα impairs insulin secretion in islets isolated from low-density lipoprotein receptor (LDLR-/-) knockout mice. Metabolism. 2011;60(8):1158-64.

Campbell CS, Caperuto LC, Hirata AE, Araújo EP, Velloso LA, Saad MJ et al. The phosphatidylinositol/Akt/atypical PKC pathway is involved in the improved insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo. Life Sci. 2004;76(1):57-70.

Camporez JP, Akamine EH, Davel AP, Franci CR, Rossoni LV, Carvalho CR. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. J Physiol. 2011;589:2585-96.

[1]De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Avaliable from: http://www.icmje.org.

Carobbio S, Frigerio F, Rubi B, Vetterli L, Bloksgaard M, Gjinovci A, et al. Deletion of glutamate dehydrogenase in B-cell abolishes part of the insulin secretory response not required for glucose homeostasis. Journal of Biological Chemistry. 2009;284(2):921-9.

Carpinelli AR. Pâncreas Endócrino. In: Curi R, Procopio J. Fisiologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.

Casson PR, Andersen RN, Herrod HG, Stentz FB, Straughn AB, Abraham GE et al. Oral dehydroepiandrosterone in physiologic doses modulates immune function in postmenopausal women. Am J Obstet Gynecol. 1993;169(6):1536-9.

Cleary MP, Zabel T, Sartin JL. Effects of short-term dehydroepiandrosterone treatment on serum and pancreatic insulin in Zucker rats. J Nutr. 1988;118(3):382-7.

Colditz GA, Wilett WC, Rotnitzky A, Manson JE. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in woman. Ann Int Med. 1995;122(7):481-6.

Coleman DL, Leiter EH, Schwizer RW. Therapeutic Effects of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in Diabetic Mice. Diabetes. 1982;31(9):830-3.

Chiu KC, Martinez DS, Chu A. Comparison of the relationship of age and beta cell function in three ethnic groups. Clin Endocrinol (Oxf). 2005;62(3):296-302.

Choussein S, Makri AA, Frangos CC, Petridou ET, Daskalopoulou SS. Effect of antiobesity medications in patients with type 2 diabetes mellitus. Diabetes Obes Metab. 2009;11(7):641-64.

Cutler GB, Glenn M, Bush M, Hodgen GD, Graham CE, Loriaux DL. Adrenarche: a survey of rodents, domestic animals, and primates. Endocrinology. 1978;103(6):2112-8.

Draznin B, Steinberg JP, Leitner JW, Sussman KE. The nature of insulin secretory defect in aging rats. Diabetes. 1985;34(11):1168-73.

Deeney JT, Prentki M, Corkey BE. Metabolic control of ß-cell function. Semin Cell Dev Biol. 2000;11(4):267-75.

DeFronzo RA, Barzilai N, Simonson DC. Mechanism of metformin action in obese and lean noninsulin-dependent diabetic subjects. J Clin Endocrinol Metab. 1991;73(6):1294-301.

De Souza CT, Gasparetti AL, Pereira-da-Silva M, Araújo EP, Carvalheira JB, Saad MJA et al. Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1-dependent uncoupling protein-2 expression in pancreatic islets of rats: a novel pathway for neural control of insulin secretion. Diabetologia. 2003;46(11):1522-31.

Dillon JS, Yaney GC, Zhou Y, Voilley N, Bowen S, Chipkin S et al. Dehydroepiandrosterone Sulfate and ß-Cell Function: Enhanced Glucose-Induced Insulin Secretion and Altered Gene Expression in Rodent Pancreatic ß-Cells. Diabetes. 2000;49(12):2012-20.

Efrat S, Tal M, Lodish HF. The pancreatic beta-cell glucose sensor. Trends Biochem Sci. 1994;19(12):535-8.

Elahi D, Nagulesparan M, Hershcopf RJ, Muller DC, Tobin JD, Blix PM et al. Feedback inhibition of insulin secretion by insulin: relation to the hyperinsulinemia of obesity. N Engl J Med. 1982;306(20):1196-202.

Eizirik DL, Cnop M. ER stress in pancreatic beta cells: the thin red line between adaptation and failure. Sci Signal. 2010;3(110).

Fahien LA, MacDonald MJ. The complex mechanism of glutamate dehydrogenase in insulin secretion. Diabetes. 2011;60:2450-4.

Federici M, Hribal ML, Ranalli M, Marselli L, Porzio O, Lauro D et al. The common Arg972 polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes apoptosis of human pancreatic islets. Faseb J. 2001;15(1):22-4.

Flynn MA, Weaver-Osterholtz D, Sharpe-Timms KL, Allen S, Krause G. Dehydroepiandrosterone replacement in aging humans. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1999;84(5):1527-33.

Frese T, Bazwinsky E, Muhlbauer E, Peschke E. Circadian and age-dependent expression patterns of GLUT-2 and glucokinase in the pancreatic beta-cell of diabetic and nondiabetic rats. Hormone and Metabolic Research. 2007;39:567-74.

Furman B, Ong WK, Pyne NJ. Cyclic AMP signaling in pancreatic islets. Adv Exp Med Biol. 2010;654:281-304.

Gansler TS, Muller S, Cleary MP. Chronic administration of dehydroepiandrosterone reduces pancreatic beta-cell hyperplasia and hyperinsulinemia in genetically obese Zucker rats. Proc Soc Exp Biol Med. 1985;180(1):155-62.

Giroix MH, Malaisse-Lagae F, Portha B, Sener A, Malaisse WJ. Effects of dehydroepiandrosterone in rats injected with streptozotocin during the neonatal period. Biochem Mol Med. 1997;61(1):72-81.

Gohring I, Mulder H. Glutamate dehydrogenase, insulin secretion, and type 2 diabetes: a new means to protect the pancreatic beta cell? Journal of Endocrinology. 2012;212: 239-42.

Gorman T, Hope DC, Brownlie R, Yu A, Gill D, Lofvenmark J, et al. Effect of high-fat diet on glucose homeostasis and gene expression in glucokinase knockout mice. Diabetes Obes Metab. 2008;10(10):885-97.

Gong Z, Muzumdar RH. Pancreatic function, type 2 diabetes, and metabolism in aging. International Journal of Endocrinology. 2012:1-13.

Gremlich S, Bonny C, Waeber G, Thorens B. Fatty acids decrease PDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce glut2, glucokinase, insulin and somatostatin levels. J Biol Chem. 1997;272(48):30261-9.

Gu Z, Du Y, Liu Y, Ma L, Li L, Gong Y, Tian H, Li C. Effect of aging on islet beta cell function mechanisms in wistar rats. Age. 2011.

Guillam MT, Hummler E, Schaerer E, Yeh JI, Birnbaum MJ, Schmidt A, et al. Nat Genet. 1997;17(3):327-30.

Gunasekaran U, Gannon M. Type 2 diabetes and the aging pancreatic beta-cell. Aging. 2011;3:565-75.

Harbeck MC, Louie DC, Howland J, Wolf BA, Rothenberg PL. Expression of insulin receptor mRNA and insulin receptor substrate 1 in pancreatic islet beta-cells. Diabetes. 1996;45(6):711-7.

Harmon JS, Gleason CE, Tanaka Y, Oseid EA, Hunter-Berger KK, Robertson PR. In vivo prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression. Diabetes. 1999;48(10):1995-2000.

Hegarty BD, Turner N, Cooney GJ, Kraegen EW. Insulin resistance and fuel homeostasis : the role of AMP-activated protein kinase. Acta Physiologica. 2009;196(1):129-45.

Heimberg H, De Vos A, Vandercammen A, Van Schaftingen E, Pipeleers D, Schuit F, Heterogeneity in glucose sensitivity among pancreatic beta-cells is correlated to differences in glucose phosphorylation rather than glucose transport. EMBO J. 1993;12(7):2873-9.

Idevall-Hagren O, Barg S, Gylfe E, Tengholm A. cAMP mediators of pulsatile insulin secretion from glucose-stimulated single beta-cells. Journal of Biological Chemistry. 2010;285(30): 23007-18.

Ihm SH, Moon HJ, Kang JG, Park CY, Oh KW, Jeong IK, et al. Effect of aging on insulin secretory function and expression of beta cell function-related genes of islets. Diabetes Research and Clinical Practice. 2007;77(3):S150-S4.

Iversen J, Miles DW. Evidence for a feedback inhibition of insulin on insulin secretion in the isolated, perfused canine pancreas. Diabetes. 1971;20(1):1-9.

Jahn MP, Jacob MHVM, Gomes LF, Duarte R, Araújo ASR, Belló-Klein A, et al. The effect of long-term DHEA treatment on glucose metabolism, hydrogen peroxide and thioredoxin levels in the skeletal muscle of diabetic rats. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2010 ;120:38-44.

Jankowski CM, Gozansky WS, Van Pelt RE, Wolfe P, Schwartz RS, Kohrt WM. Oral dehydroepiandrosterone replacement in older adults : effects on central adiposity, glucose metabolism and blood lipids. Clin. Endocrinol (Oxf). 2011;75(4):456-63.

Kawano H, Yasue H, Kitagawa A, Hirai N, Yoshida T, Soejima H et al. Dehydroepiandrosterone supplementation improves endothelial function and insulin sensitivity in men. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(7):3190-5.

Keymeulen B, Anselmo J, Pipeleers D. Length of metabolic normalization after rat islet cell transplantation depends on endocrine cell composition of graftand on donor age. Diabetologia. 1997;40(10):1152-8.

Knutti D, Kralli A. PGC-1, a versatile coactivator. Trends Endocrinol Metab. 2001;12(8):360-5.

Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R et al. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. Diabetes. 2000;49(11):1880-9.

Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signaling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. Mol Cell Biol. 1997;17(3):1595-606.

Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. Cell. 1999a;96(3):329-39.

Kulkarni RN, Winnay JN, Daniels M, Bruning JC, Flier SN, Hanahan D et al. Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. J Clin Invest. 1999b;104(12):R69-R75.

Kulkarni RN. Receptors for insulin and insulin-like growth factor-1 and insulin receptor substrate-1 mediate pathways that regulate islet function. Biochem Soc Trans. 2002;30(2): 317-22.

Kramer J, Moeller EL, Hachey A, Mansfiel KG, Wachtman LM. Differential expression of GLUT-2 in pancreatic islets and kidneys of new and old world nonhuman primates. American Journal Physiology. 2009;296(3):R786-R93.

Labrie F, Luu-The V, Bélanger A, Lin SX, Simard J, Pelletier G, Labrie C. Is dehydroepiandrosterone a hormone? Journal of Endocrinology. 2005;187(1):169-96.

Leibiger B, Leibiger IB, Moede T, Kemper S, Kulkarni RN, Kahn CR et al. Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. Mol Cell. 2001;7(3):559-70.

Lingohr MK, Buettner R, Rhodes CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival - a role in obesity-linked type 2 diabetes? Trends Mol Med. 2002;8(8):375-84.

Liu YQ, Tornheim K, Leahy JL. Shared biochemical properties of glucotoxicity and lipotoxicity in islets decrease citrate synthase activity and increase phosphofructokinase activity. Diabetes. 1998;47(12):1889-93.

Loreti L, Dunbar JC, Chen S, Foà PP. The autoregulation of insulin secretion in the isolated pancreatic islets of lean (obOb) and obese-hyperglycemic (obob) mice. Diabetologia. 1974;10(4):309-15.

Macewen EG, Kurzman ID. Obesity in the dog: role of the adrenal steroid dehydroepiandrosterone (DHEA). J Nutr. 1991;121(11 Suppl):S51-S5.

Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Lacy PE, Wright PH. Insulin secretion by isolated islets in presence of glucose, insulin and anti-insulin serum. Proc Soc Exp Biol Med. 1967; 124(2):497-500.

Malaisse WJ, Garcia-Morales P, Dufrane SP, Sener A, Valverde I. Forskolin-induced activation of adenylate cyclase, cyclic adenosine monophosphate production and insulin release in rat pancreatic islets. Endocrinology. 1984;115(5):2015-20.

Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. Diabetes Care. 1992;15(11):1509-16.

Marincola F, Frank W, Clark W, Douglas M, Merrell R. The independence of insulin release and ambient insulin in vitro. Diabetes. 1983;32(12):1162-7.

Matschinsky FM. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. Diabetes. 1996;45(2):223-41.

Matschinsky FM, Collins HW. Essential biochemical design features of the fuel-sensing system in pancreatic beta-cells. Chem Biol. 1997;4(4):249-57.

Medina MC, Souza LC, Caperuto LC, Anhê GF, Amanso AM, Teixeira VP et al. Dehydroepiandrosterone increases beta-cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. FEBS letters. 2006;580(1):285-90.

Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D, Hirata AE, Santos da Rocha M, Bordin S, Curi R, Newsholme P, Carpinelli AR. Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulates production and activity of a phagocyte like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. Diabetologia. 2007;50(2):359-69.

Morgan D, Rebelato E, Abdulkader F, Graciano MF, Oliveira-Emilio HR, Hirata AE, Rocha MS, Bordin S, Curi R, Carpinelli AR. Association of NAD(P)H oxidase with glucose induced inslin secretion by pancreatic beta-cell. Endocrinology. 2009;150(5):2197-201.

Nair KS, Rizza RA, O'Brien P, Dhatariya K, Short KR, Nehra A et al. DHEA in elderly women and DHEA or testosterone in elderly men. N Engl J Med. 2006;355(16):1647-59.

Nestler JE, Barlascini CO, Clore JN, Blackard WG. Dehydroepiandrosterone reduces serum low density lipoprotein levels and body fat but does not alter insulin sensitivity in normal men. J Clin Endocrinol Metabol. 1988;66(1):57-61.

Nephew KP, Sheleer CQ, Dudley MD, Gordon S, Nayfiel SG, Khan SA. Studies of dehydroepiandrosterone (DHEA) with the human estrogen receptor in yeast. Mol Cell Endocrinol. 1998;143(1-2):133-42.

Novelli M, De Tata V, Bombara M, Bergamini E, Masiello P. Age-dependent reduction in GLUT-2 levels in correlated with the impairment of the insulin secretory response in isolated islets of Sprague-dawley rats. Exp Gerontol. 2000;35(5):641-51.

Ohtsubo K, Takamatsu S, Minowa MT, Yoshida A, Takeuchi M, Marth JD. Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. Cell. 2005;123(7):1307-21.

Oliveira HR, Verlengia R, Carvalho CR, Britto LR, Curi R, Carpinelli AR. Pancreatic beta-cells express phagocyte like NAD(P)H oxidase. Diabetes. 2003;52(6):1457-63.

Parker Jr CR. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate production in the human adrenal during development and aging. Steroids. 1999;64:640-7.

Perfetti R, Wang Y, Shuldiner AR, Egan JM. Molecular investigation of age-related changes in mouse endocrine pancreas. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1996;51(5):B331-B6.

Peters JM, Zhou YC, Ram PA, Lee SS, Gonzalez FJ, Waxman DJ. Peroxisome proliferator-activated receptor alpharequired for gene induction by dehydroepiandrosterone-3 beta sulphate. Mol Pharmacol. 1996;50(1):67-74.

Polonsky KS, Semenkovich CF. The pancreatic beta-cell heats up: UCP2 and insulin secretion in diabetes. Cell. 2001;105(6):705-7.

Poitout V, Robertson RP. Secondary beta cell failure in type 2 diabetes- a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. Endocrinology. 2002;143(2):339-42.

Porzio O, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Accili D, Lauro R et al. The Gly972-->Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. J Clin Inves. 1999;104(3):357-64.

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. Cell. 1998;92(6):829-39.

Rebelato E, Abdulkader F, Curi R, Carpinelli AR. Control of intracellular redox state by glucose participates in the insulin secretion mechanisms. PLOS One. 2011;6(8):3614-21.

Reaven EP, Curry DL, Reaven GM. Effect of age and sex on rat endocrine pancreas. Diabetes. 1987;36(12):1397-400.

Reaven EP, Gold G, Reaven GM. Effect of age on glucose stimulated insulin release by the beta-cell of the rat. J Clin Invest. 1979;64(2):591-9.

Reaven GM, Reaven PD. Effect of aging on glucose oxidation by isolated rat islets. Diabetologia. 1980;18(1):69-71.

Reaven EP, Reaven GM. Structure and function changes in the endocrine pancreas of aging rats with reference to the modulating effects of exercise and caloric restriction. J Clin Invest. 1981;68(1):75-84.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. 2001;414(6865):799-806.

Sato K, Iemitsu M, Aizawa K, Ajisaka R. Testosterone and DHEA activate the glucose metabolism-related signaling pathway in skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008;294(5):E961-E8.

Sato K, Iemitsu M, Aizawa K, Ajisaka R. DHEA improves impaired activation of Akt and PKC zeta/lambda-GLUT-4 pathway in skeletal muscle and improves hyperglycaemia in streptozotocin-induced diabetes rats. Acta Physiol (Oxf). 2009;197(3):217-25.

Schriock ED, Buffington CK, Hubert GD, Kurtz BR, Kitabachi AE, Buster JE et al. Divergent correlations of circulating dehydroepiandrosterone sulfate and testosterone with insulin levels and insulin receptor binding. J Clin Endocrinol Metabol. 1988;66(6):1329-31.

Schwartz AG, Pashko L, Whitcomb JM. Inhibition of tumor development by dehydroepiandrosterone and related steroids. Toxicol Pathol. 1986;14(3):357-62.

Seino S, Iwanaga T, Nagashima K, Miki T. Diverse roles of K(ATP) channels learned from kir6.2 genetically engineered mice. Diabetes. 2000;49(3):311-8.

Selawry H, Harrison J, Patipa M, Mintz DH. Pancreatic islet isotransplantation. Effect of age and organ culture of donor islets on reversal of diabetes in rats. Diabetes. 1978;27(6):625-31.

Stagner J, Samols E, Polonsky K, Pugh W. Lack of direct inhibition of insulin secretion by exogenous insulin in the canine pancreas. J Clin Invest. 1986;78(5):1193-8.

Srinivasan M, Choi CS, Ghoshal P, Pliss L, Pandya JD, Hill D, et al. Beta-cell-specific pyruvate dehydrogenase deficiency impairs glucose-stimulated insulin secretion. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010;299(6):E910-E

Tanizawa Y, Nakai K, Sasaki T, Anno T, Ohta Y, Inoue H, et al. Upregulated elevation of glutamate dehydrogenase activity induces glutamine-stimulated insulin secretion: identification and characterization of a GLUD1 gene mutation and insulin secretion studies with MIN6 cells and overexpressing the mutant glutamate dehydrogenase. Diabetes. 2002;51:712-7.

Tang X, Ma H, Shen Z, Zhou S, Xu X, Lin C. Dehydroepiandrosterone activates cyclic adenosine 3`5`-monophosphate/protein kinase A signaling and suppresses sterol regulatory element binding protein -1 expression in cultured primary chicken hepatocytes. Br J Nutr. 2009;102(5):680-6.

Terauchi Y, Takamoto I, Kubota N, Matsui J, Suzuki R, Komeda K et al. Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory ß cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. J Clin Invest. 2007;117(1):246-57.

Tuttle RL, Gill NS, Pugh W, Lee JP, Koeberlein B, Furth EE et al. Regulation of pancreatic ß-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBa. Nat Med. 2001; 7(10):1133-7.

Villareal DT, Holloszy JO. Effect of DHEA on abdominal fat and insulin action in elderly women and men: a randomized controlled trial. JAMA. 2004;292(18):2243-8.

Waxman DJ. Role of metabolism in the activation of dehydroepiandrosterone as a peroxisome proliferator. J Endocrinol. 1996;150:S129-S47.

Weiss EP, Villareal DT, Fontana L, Han DH, Holloszy JO. Dehydroepiandrosterone (DHEA) replacement decreases insulin resistance and lowers inflammatory cytokines in aging humans. Aging. 2011;3(5):533-42.

Williams MR, Ling S, Dawood T, Hashimura K, Dai A, Li H, Liu JP, Funder JW, Sudhir K, Komesaroff PA. Dehydroepiandrosterone inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation independent of ARs and ERs. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(1):176-81.

Winzell MS, Coghlan M, Leighton B, Frangioudakis G, Smith DM, Storlien LH, et al. Chronic glucokinase activation reduces glycaemia and improves glucose tolerance in high fat diet fed mice. Eur J Pharmacol. 2011;663(1-3):80-6.

Wiederkehr A, Wollheim CB. Implication of mitochondria in insulin secretion and action. Endocrinology. 2006;147(6):2643-9.

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. Nature. 1998;391(6670):900-4.

World Health Organization. Prevalence of raised fasting glucose, 2008. Available from: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_glucose/en/index.html. [2012 Jul 25].

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and function through the thermogenic coactivator PGC-1. Cell. 1999;98(1):115-24.

Yang J, Chi Y, Burkhardt BR, Guan Y, Wolf BA. Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. Nutr Rev. 2010;68(5):270-9.

Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic , et al. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. Cell. 2001;105(6):745-55.

Zhang L, Li BS, Ma W, Barker JL, Chang YH, Zhao W, Rubinow DR. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulphated derivative (DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the Akt signaling pathway in opposing ways. Brain Res Mol Brain Res. 2002;98(1-2):58-66.

Zhou Y, Jetton TL Goshorn S, Lynch CJ, She P. Transamination is required for alpha-ketoisocaproate but not leucine to stimulate insulin secretion. J Biol Chem. 2010;285(44):33718-26.