KATHERINE MARIA DE ARAÚJO VERAS

**CASTRACÃO, DIETA HIPERLIPÍDICA E DHEA: EFEITOS SOBRE
A SENSIBILIDADE À INSULINA E SECREÇÃO EM ILHOTAS
ISOLADAS DE RATAS**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

KATHERINE MARIA DE ARAÚJO VERAS

**CASTRAÇÃO, DIETA HIPERLIPÍDICA E DHEA: EFEITOS SOBRE
A SENSIBILIDADE À INSULINA E SECREÇÃO EM ILHOTAS
ISOLADAS DE RATAS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Versão corrigida. A versão original se encontra arquivada no Serviço de Comunicação do ICB.

São Paulo
2011

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

reprodução não autorizada pelo autor

Veras, Katherine Maria de Araújo.

Castração, dieta hiperlipídica e DHEA: efeitos sobre a sensibilidade à insulina e secreção em ilhotas isoladas de ratas / Katherine Maria de Araújo Veras. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Mecanismos moleculares de sinalização de insulina.

Versão do título para o inglês: Oophorectomy, high-fat diet, and DHEA: effects on insulin sensitivity and insulin secretion on isolated islets rats.

Descritores: 1. Castração 2. DHEA 3. Sensibilidade à insulina 4. Secreção de insulina 5. Tolerância à glicose I. Carvalho, Carla Roberta de Oliveira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB088/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Katherine Maria de Araújo Veras.

Título da Dissertação: Castração, dieta hiperlipídica e DHEA: efeitos sobre a sensibilidade à insulina e secreção em ilhotas isoladas de ratas.

Orientador(a): Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../.....,

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p align="center"> 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 </p> <p align="right">COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p>
---	---

Decl. CEEA.015.09

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 2708/CEEA datado de 24.03.08, por solicitação da Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Katherine Maria de Araújo Veras** ao projeto de pesquisa *"Menopausa e deidroepiandrosterona (DHEA): Efeitos sobre a resistência periférica à insulina e função vascular"*, uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 31 de março de 2009.

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

Dedico esse trabalho ao meu querido primo-irmão, Felipe Veras (*in memoriam*), “pedaço de mim, metade afastada de mim”.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sobre todas as coisas.

Em primeiro lugar, sem dúvidas, agradeço a minha instituição de origem, a Universidade Federal de Alagoas, UFAL, mais precisamente às minhas queridas: professora Terezinha Ataíde e Suzana Lima, da FANUT, exemplos de competência, que me proporcionaram a oportunidade de vivenciar o início de tudo: a iniciação científica.

À minha orientadora, professora Carla Roberta, que, inicialmente, sem mesmo me conhecer, abriu as portas dessa instituição de ensino, permitindo dar continuidade aos meus objetivos. Obrigada pela tolerância e pelo exemplo de competência.

Sem dúvidas, à família, nosso suporte emocional: Meu “painho” e “mainha”, Rodrigo, meus tios e primos, em especial aos meus padrinhos: tio Florentino e tia Marluce. Obrigada pelo apoio em todas as decisões que venho a tomar na minha vida. É um grande prazer e incentivo sentir em vocês a torcida pelo meu crescimento pessoal e profissional.

À Teca, que me ajudou bastante, não apenas com seus ensinamentos técnicos, mas também com a adaptação a nova vida em São Paulo, obrigada.

Aos amigos do nosso grupo de estudos: Anderson, Mário, Guga, Marilú, Gabi, Karina, João Paulo, Cris, Nelo e Vitor.

As amigadas conquistadas em Maceió, vocês são meu tesouro, meu suporte emocional. Obrigada pelas visitas a São Paulo, pela atenção aos meus pais, pelas ligações de onde quer que vocês estejam a fim de me incentivar e, pela dedicação com que sempre se fizeram presentes em minha vida: sem dúvidas somos privilegiados por esse sentimento. Amo vocês! Dona Ilza, Neto e sua família, pelos cuidados e dedicação e pelo incentivo à minha vinda a São Paulo.

Aos amigos da república onde moro principalmente Hadassa e Lívia, haja paciência!

Aos amigos Ana Cláudia Poletto, Aline David, Sandra Campos, Laureane Masi, professora Maria Tereza Nunes e Luciana Caperuto, professor Cipolla e Rafael Prévide.

Ao Renato Nachbar, pela boa vontade e dedicação. Como você mesmo disse: “valeu a pena cada feriado e cada fim de semana” na tentativa de me ajudar com as dificuldades encontradas ao longo dos experimentos.

Aos amigos ilhoteiros - irmãos, Daniel e Felipe “zoiudo”, cujo constante apoio foi fundamental ao meu amadurecimento pessoal e profissional.

A todos os professores do instituto e seus respectivos técnicos, pela disposição e boa vontade em nos ajudar. Em especial ao grupo do professor Angelo Carpinelli: Marlene, Fernanda, Gabi, Elo, Camila e Maíra; professora Silavana Bordin, professor Fernando Abdulkader, professor Britto e Adilson, Laila, Eduardo e Juan.

Aos nossos grandes facilitadores, Itamar, Bob, Víilson, Maria Alice, Jaqueline, Cláudio, Miguel, aos amigos da biblioteca e à Rosana, da estatística: Obrigada pela disposição e paciência.

Ao secretário de pós-graduação, José Maria Rodrigues Júnior, mais um grande exemplo de competência. Obrigada pela compreensão e disposição em ajudar com as dúvidas e burocracias infinitas.

Ao querido Flávio, pelo incentivo e dicas acadêmicas, mas principalmente pelos grandes momentos de alegria, em paralelo às minhas ansiedades.

À CAPES e a FAPESP, pelo apoio financeiro.

“A mente que se abre a uma
nova idéia jamais voltará ao
seu tamanho original.”

Einstein

RESUMO

VERAS, K. M. A. **Castração, Dieta Hiperlipídica e DHEA: Efeitos Sobre a Sensibilidade à Insulina e Secreção em Ilhotas Isoladas de Ratas**. 2011. 65 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Deidroepiandrosterona (DHEA), esteróide mais abundante em humanos, produzido principalmente pelo córtex das adrenais, é convertido a androstenediol e androstenediona, e a andrógenos e estrogênios nos tecidos periféricos. Em mulheres na pós-menopausa a síntese dos estrogênios e androgênios é feita localmente nos tecidos periféricos por enzimas esteroidogênicas tecido-específicas através de processo intrácrico, tendo como precursores os esteroides adrenais DHEA, DHEA-S e androstenediona. A privação dos hormônios sexuais, natural ou induzida contribui para o aparecimento de diversas desordens metabólicas e endócrinas como a obesidade, distúrbios cardiovasculares, resistência à insulina, intolerância à glicose e diabetes. Esse estudo investigou se a suplementação com DHEA melhora a sensibilidade à insulina, bem como sua secreção e ou a tolerância à glicose em ratas castradas alimentadas com dieta hiperlipídica (OHL), por seis semanas. A castração (OVX) induziu a perda da proteção fisiológica das fêmeas contra o ganho de peso corpóreo. O tratamento com DHEA não promoveu nenhuma alteração nesse parâmetro, porém corrigiu a elevação na concentração de insulina plasmática e o índice HOMA IR. Além disso, DHEA melhorou a ação periférica da insulina, observada pela constante de decaimento de glicose, k_{it} . A tolerância à glicose foi avaliada através do cálculo da área sob a curva que mostrou diferença significativa no grupo OHL versus OVX. Todos os grupos de animais castrados apresentaram aumento da área da ilhota. Ratas tratadas com DHEA apresentaram aumento do grau de fosforilação da proteína Akt em suas ilhotas e melhora da capacidade secretória estática de insulina frente ao estímulo da glicose. O presente estudo nos permite sugerir que o uso do DHEA pode ser uma alternativa protetora sobre a sensibilidade à insulina em fêmeas desprovidas de ovários, expostas a fatores de risco à saúde.

Palavras-chave: Deidroepiandrosterona. Castração. Fêmeas. Sensibilidade à insulina. Tolerância à glicose. Secreção de insulina. p- Akt.

ABSTRACT

VERAS, K. M. A. **Oophorectomy high fat diet and DHEA: Effects on insulin sensitivity and insulin secretion on isolated islets rats.** 2011. 65 p. Masters thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is the most abundant steroid in humans. DHEA is principally produced by the adrenal cortex and plays an important role as precursor of estrogen and androgen. DHEA is converted to androstenediol and androstenedione in peripheral tissue. With the loss of ovarian follicular activity during the menopause, adrenal DHEA, DHEA-S, and androstenedione become the major precursors for the extragonadal production of estrogens and androgens in postmenopausal women (intracrine process). Natural and induced privation of sexual hormones contributes to develop several metabolic and endocrine disorders such as: obesity, insulin resistance, glucose intolerance, diabetes and cardiac diseases. The present study evaluated if DHEA supplementation would improve the insulin sensitivity and secretion as well as the glucose tolerance, in high fat diet fed ovariectomized rats (OHL). Ovariectomy (OVX) reduced the physiological female protection against the weight gain. Although no effect depot-specific action of DHEA has been found on this parameter, DHEA corrected the plasmatic insulin levels and HOMA IR. In addition, DHEA improved peripheral insulin action by the glucose disappearance rate, kitt. The glucose tolerance test was reduced in OHL versus OVX group. The islets area was increased in all ovariectomized groups. Furthermore, gonadal hormones privation induced reduction in serine phosphorylation status of Akt in OVX and OHL pancreatic islets. DHEA supplementation restored this Akt serine phosphorylation to a degree higher to the control and increased glucose-stimulated insulin secretion. The present results might let us suggest that DHEA could be alternatively used to promote protective effects by increasing the insulin sensitivity without body weight changes in female castrated rats exposed to health risk factors.

Key words: dehydroepiandrosteron. Ovariectomy. Females. Insulin sensitivity. Glucose tolerance. Insulin secretion. p Akt.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Revisão da literatura	14
1.2 Hipótese.....	21
1.3 Justificativa.....	21
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Animais	24
3.2 Materiais	29
3.3 Teste de tolerância à insulina curto (índice de decaimento da glicose KITT).....	29
3.4 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipgtt).....	30
3.5 Extração de ilhotas pancreáticas	30
3.6 Análise da secreção estática de insulina em ilhotas pancreáticas.....	31
3.7 Dosagem de insulina	31
3.8 Extração de proteínas totais de ilhotas pancreáticas isoladas	32
3.9 Análise protéica por immunoblotting	32
3.10 Dosagem plasmática de dheia	33
3.11 Análise histológica.....	33
3.12 Análise estatística	34
4 RESULTADOS	35

5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO A - Evolução do peso corporal das ratas.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão da literatura

O Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é um problema global de saúde pública. Em 2010 foi projetado que 171 milhões de indivíduos apresentariam a doença e a expectativa para 2030 é de 366 milhões em todo o mundo. Estima-se que, no Brasil, em 2030, essa doença atinja 11,4 milhões de indivíduos (WILD et al., 2004). Nos Estados Unidos 11,8% dos homens e 10,8% das mulheres acima de 20 anos de idade são portadores de diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

Essa doença é caracterizada por resistência periférica à insulina, hiperglicemia, secreção insuficiente de insulina pelas células beta (β) do pâncreas, e supressão inadequada da produção de glucagon. Como consequência, ocorre uma diminuição da captação e remoção da glicose sanguínea, acompanhada de elevada produção hepática de glicose resultando em hiperglicemia (EVANS et al., 2003; SPELLMAN, 2010).

A resistência à insulina ocorre quando os tecidos periféricos se tornam menos sensíveis às quantidades de insulina secretadas normalmente pelo pâncreas, com prejuízo na manutenção da glicemia. Como efeito compensador a esse estado de resistência as células β pancreáticas aumentam a secreção de insulina, resultando em hiperinsulinemia (LOIS et al., 2010).

Uma condição que apresenta redução na tolerância à glicose, com glicemia acima do normal, porém não suficiente para o diagnóstico de diabetes é a denominada pré-diabetes. Trata-se de um estágio intermediário entre a tolerância normal à glicose e o diabetes, observado geralmente em adultos, contribuindo também como fator de risco para o aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular (SPELLMAN, 2010).

A prevalência de diabetes é similar em homens e mulheres adultos, sendo levemente maior nos homens nessa faixa etária e em mulheres acima dos 65 anos (WILD et al., 2004). Há diferenças entre os sexos quanto à localização e ao estoque de

gordura, proporção em hormônios secretados pelo tecido adiposo, bem como na resposta do cérebro aos sinais que regulam a ingestão alimentar e ganho de peso. Essas diferenças foram observadas tanto em humanos quanto em modelos animais. (BROWN et al., 2010; MASTORAKOS et al., 2010; TEEDE; LOMBARD; DEEKS, 2010) .

O excesso de peso e a obesidade levam ao aumento da adiposidade central ocasionando alterações metabólicas como o aumento dos níveis de ácidos graxos livres e glicose circulantes, bem como de citocinas pró inflamatórias contribuindo para o prejuízo da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina, como também ao desencadeamento de doenças crônicas, como o DM2 (GADE et al., 2010). Portanto os altos níveis de glicose e lipídios plasmáticos tornam-se tóxicos, o resultado é o prejuízo na função das células β , sobrevivendo o DM tipo 2 (AHREN, 2005).

A obesidade tem sido responsável por cerca 2% a 6% das despesas de saúde em países desenvolvidos (WHO, 2000). Além da predisposição genética, uma das principais causas para a obesidade e sobrepeso é o desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético, associado a mudanças no padrão alimentar, com o excessivo consumo de alimentos ricos em gorduras e açúcares, pobres em vitaminas, minerais e fibras, associados ao comportamento sedentário adotado como estilo de vida (COHEN, 2008; HILL, 2006; NGUYEN; EL-SERAG, 2010; ANDERSEN, 2000).

Sabe-se que o aumento da adiposidade abdominal está inversamente correlacionado com a secreção de insulina e à função da célula β . Alterações na composição e na quantidade de ácidos graxos na dieta levam a modificações no conteúdo de produtos metabólicos e secretórios do tecido adiposo, que podem contribuir para a disfunção das ilhotas pancreáticas (YAN et al., 2006; CNOP et al., 2005).

Há inúmeras evidências demonstrando que o excesso de gordura encontrado em dietas ricas em lipídeos, particularmente gordura saturada, está associado a modificações da expressão gênica e protéica de importantes moléculas intracelulares relacionadas ao mecanismo da secreção de insulina (CERF, 2006; RISEUS, 2008). Por exemplo, a redução na expressão do transportador de glicose GLUT 2 e da enzima glicoquinase nas células β , prejudica a secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas de ratos alimentados com dieta HL. Outro exemplo corresponde à relação entre o

aumento dos níveis de ácidos graxos livres e a indução de estresse oxidativo e apoptose, reduzindo a massa e função das células β (CERF, 2007).

Outro aspecto importante relacionado à modificação da adiposidade é o envelhecimento, que leva a uma diminuição da adiposidade subcutânea bem como o aumento da gordura visceral (STEVENS, 2010). A prevalência de Diabetes tipo 2 e o prejuízo da tolerância à glicose também aumentam drasticamente após a quarta década de vida. No diabetes, a morte das células produtoras de insulina por apoptose, leva a deficiência de insulina (CHRSTODOULAKOS et al., 2005; CHOI; JANG; PARK, 2005). A perda da produção endógena dos hormônios ovarianos, associada ao envelhecimento e ao estilo de vida inadequado, contribui para o aumento da reserva visceral adiposa em mulheres na pós-menopausa o que as torna mais vulneráveis a obesidade e suas complicações (MEYER et al., 2011, *In press*).

Desde a primeira metade do século XX há relatos demonstrando associação entre administração de estrogênios e funcionalidade do pâncreas endócrino. A administração de estrógenos induziu aumento do conteúdo de insulina em pâncreas de ratos (FRAENKEL-CONRAT et al., 1941). Em 1954, Bernardo Houssay e sua equipe demonstraram a regeneração e hipertrofia de ilhotas pancreáticas em modelo animal de pancreatectomia parcial tratado com estrógenos (HOUSSAY; FOGLIA; RODRIGUEZ, 1954). Ademais, a castração em ratas foi associada com a redução na liberação de insulina de ilhotas isoladas estimuladas com glicose e restaurada pela administração de estradiol (EL SEIFI; GREEN; PERRIN, 1981).

A redução da sensibilidade à insulina com a menopausa e melhora subsequente após a reposição com estrógeno, sugere um papel importante desse esteróide sobre a sensibilidade à insulina e possivelmente menor prevalência de diabetes em fêmeas (D'EON et al., 2005). A utilização do clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico confirma o aumento da prevalência de hiperinsulinemia e resistência a insulina no início da menopausa em mulheres obesas e não obesas relacionadas àquelas na pré-menopausa (GASPARD, 2009). Essa mesma técnica demonstrou redução da sensibilidade à insulina em músculo esquelético de ratas ovariectomizadas havendo melhora na captação de glicose, síntese de glicogênio e na sensibilidade à insulina quando esses

animais foram tratados com estrógeno (KUMAGAI; HOLMANG; BJORNTORP, 1993).

Os estrógenos cuja via biossintética inicia-se com o colesterol, tanto nas gônadas femininas como nas glândulas adrenais, participam do desenvolvimento e da manutenção dos tecidos reprodutivos além da regulação da homeostase glicêmica, metabolismo ósseo e funções cardiovasculares durante os anos reprodutivos (TURNER; RIGGS; SPELSBERG, 1994; KANAYA et al., 2005; FORD et al., 2005).

Mais recentemente através da utilização de técnicas *knockout* (silenciamento) da expressão de proteínas em mamíferos tem sido possível identificar os receptores de estrógeno como moléculas importantes para homeostase da glicose (ROPERO et al., 2008).

Evidências demonstram que os hormônios esteróides atuam sobre a função das ilhotas pancreáticas (MORIMOTO et al., 2010) e seus receptores estão surgindo como moléculas envolvidas no metabolismo da glicose e lipídios, inclusive na adaptação das células beta à resistência à insulina (NADAL et al., 2009; NADAL et al., 2011).

Os receptores de estrógenos (ER) são classificados em 2 famílias ER α e ER β , estando os dois presentes nas células β pancreáticas (ALONSO-MAGDALENA et al., 2008). Camundongos ER α (-/-) são obesos e resistentes à insulina. Humanos com mutações no ER α também apresentam resistência à insulina (HEINE et al., 2000; NADAL et al., 2009). Também foram identificados os receptores de estrógeno acoplados à proteína G, como o GPR30, GPR 39 e GPR119 que medeiam ações sobre a secreção de insulina e função da ilhota pancreática (HOLST et al., 2009).

Além disso, foi detectado que o estradiol possui ações antiapoptóticas em células e que esse efeito é mediado pelo ER α (LE MAY et al., 2006; BEHL, 2002). O estradiol, usado em concentrações farmacológicas, protege as ilhotas pancreáticas de apoptose induzida por citocinas pro-inflamatórias *in vitro*, (CLEARY; ZISK, 1996; CONTRERAS et al., 2002). Ademais, a exposição crônica a concentrações fisiológicas de 17 β -estradiol foi capaz de aumentar, seu mRNA, o conteúdo de insulina e sua liberação em células β cultivadas, sem interferir na massa dessas células (ALONSO-MAGDALENA et al., 2008).

O efeito protetor do estradiol é parcialmente perdido em células β e ilhotas de camundongos tratados com um antagonista de ER α e também em ilhotas de camundongos silenciados para o ER α (α ERKO) (LE MAY et al., 2006). Some-se a isto ao fato de que camundongos *Knockout* para a aromatase, enzima (ArKO) não somente desenvolvem intolerância à glicose e resistência à insulina após 12 semanas de idade, mas também apresentam aumento do peso corporal (TAKEDA et al., 2003), e maior sensibilidade aos efeitos danosos da estreptozotocina sobre a citoarquitetura e função das ilhotas pancreáticas (LE MAY et al., 2006).

Além das evidências que demonstram alguns efeitos protetores ou benéficos da reposição hormonal com estrogênios em condições de ovariectomia, como modelo de menopausa, sobre a função e a massa das células β (CHOI; JANG; PARK, 2005; LE MAY et al., 2006), também foi demonstrado efeito pró-apoptótico do estradiol em ilhotas pancreáticas de camundongos dependentes da faixa etária e do gênero (ACKERMANN et al., 2009).

Outro esteróide que tem efeitos anti-proliferativo, quimioprotetor, redutor de obesidade e anti-hiperglicemiante em roedores diabéticos (REGELSON; KALIMI, 1994; YEN et al., 1977; VOGIATZI et al., 1996; MUKASA et al., 1998) o deidroepiandrosterona (DHEA), hormônio esteróide sintetizado pelo córtex adrenal, é precursor de estrógenos e andrógenos (LABRIE, 1991). Alta proporção de andrógenos nos homens (cerca de 40%) e a maioria dos estrógenos nas mulheres (75% antes da menopausa e cerca de 100% após a menopausa) são sintetizados em tecidos-alvos periféricos através de precursores esteróides. Este evento é conhecido como intracrinologia (LABRIE, 1991).

O DHEA é capaz de modificar a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios, a acil-CoA sintetase (ACS) e a acil-CoA oxidase peroxissomal (ACO) (MOHAN et al., 1990; CLEARY; ZISK, 1986; YAMADA; SAKUMA; SUGA, 1992), e no número de peroxissomos em fígado e ilhotas pancreáticas de roedores (YAMADA; SAKUMA; SUGA, 1992; DILLON et al., 2000). Em camundongos diabéticos db/db, o DHEA induziu a preservação da estrutura e função das células β (COLEMAN; LEITER; SCHWIZER, 1982; GIROX et al., 1997).

Além disso, há dados demonstrando efeitos diretos da forma sulfatada do DHEA sobre a secreção de insulina em células β pancreáticas (DILLON et al., 2000). 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 (WAXMAN, 1996).

A insulina exerce efeitos pleiotrópicos de fundamental importância na regulação da homeostase energética, como a captação de glicose no músculo estriado e no tecido adiposo; lipogênese e síntese protéica; síntese de glicogênio hepático e muscular; crescimento e diferenciação celular; efeito anti-catabólico, inibindo a produção hepática de glicose, cetogênese, proteólise e lipólise (GOODMAN; GILMAN, 2006).

A ligação da insulina à subunidade extracelular do seu receptor de membrana estimula sua atividade enzimática, promovendo a fosforilação em vários resíduos de tirosina. Esta autofosforilação ativa o receptor, que leva a fosforilação de substratos intracelulares, denominados substratos do receptor de insulina (IRS). A fosforilação em resíduos de serina e treonina pode ser considerada um potente modulador dos efeitos da insulina (SAAD, 1994; ZIERATH; WALLBERG-HENRIKSON, 2002; VELOSO; ARAUJO; DE SOUZA, 2008; PAULI et al., 2008). Vários estudos demonstram o papel das dietas hiperlipídicas induzindo ativação de diversas serinas quinases em tecidos como o hipotálamo, inibindo a fosforilação do IRS-1 em resíduos de tirosina (DE SOUZA et al., 2005; VELOSO; ARAUJO; DE SOUZA, 2008).

Evidências trazidas por estudos com animais *knockout* demonstraram um papel importante dos receptores de insulina (IR) e do fator de crescimento semelhante à insulina IGF-1, e das proteínas a jusante a ativação desses receptores nas ilhotas pancreáticas. Camundongos que não expressam o IR nas células β 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 1ª fase (KULKARNI et al., 1999), o que pode ser devido a uma expressão alterada da glicocinase (LEIBIGER et al., 1998). Esses camundongos desenvolvem progressiva intolerância à glicose, apresentando redução do tamanho das ilhotas pancreáticas e da massa das células β (KULKARNI et al., 1999).

Das seis 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 sem expressão do IRS-1 apresentam redução da secreção de insulina estimulada por glicose e arginina, além de apresentarem redução do conteúdo total de insulina (KULKARNI et al., 1999; KUBOTA et al., 2000). 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 (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).

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) .

Após a fosforilação em diversos resíduos de tirosina, os IRSs atuam como proteínas acopladoras da subunidade regulatória da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K ou p85). A ligação da subunidade p85 da PI3K ao IRS1 estimula a atividade quinase da subunidade catalítica p110. A ativação da PI3K é essencial aos efeitos metabólicos da insulina (PRADA et al., 2005), que são abolidos quando a ativação da PI3K é abolida farmacologicamente ou através de animais geneticamente modificados. Essa proteína está envolvida em vários efeitos biológicos dentre eles a captação de glicose, translocação de vesículas contendo GLUT 4 para a membrana plasmática, síntese de DNA e glicogênio e ativação da lipólise (CARVALHEIRA et al., 2003; VELLOSO; ARAÚJO; DE SOUZA, 2008).

A partir da PI3K a ativação da PKB/Akt pode seguir diversos caminhos relacionados às diferentes ações da insulina. A ativação da via intracelular da PI3K/Akt está associada à sobrevivência celular (KULIK; KLIPPEL; WEBER, 1997). Em ilhotas pancreáticas isoladas de cachorros, a ativação da PI 3-K/Akt protegeu-as contra a morte celular mediada por citocinas (AIKIN; ROSENBERG; MAYSINGER, 2000). Também é reconhecido que a ativação da via IRS-2/PI 3-K/Akt é necessária para o controle da

massa das células β em relação à homeostase metabólica (LINGOHR; BUETTNER; RHODES, 2002).

O aumento da expressão de Akt-1 nas células β de camundongos alterou o tamanho e função destas células, ocorrendo aumento do tamanho das células β e da massa das ilhotas, melhorando a tolerância à glicose e tornando os camundongos resistentes ao diabetes experimental (TUTTLE et al., 2001). DHEA também foi identificado como protetor de precursores neurais inibindo a apoptose através da ativação da via da PI-3 K/Akt (ZHANG et al., 2002).

Ademais, ratos de um ano de idade, hiperinsulinêmicos, obesos e resistentes à insulina, tratados com dose única de DHEA, apresentaram aumento na expressão da proteína Akt acompanhado de melhora da secreção estática de insulina estimulada por glicose e aumento da área das ilhotas (MEDINA et al., 2006).

1.2 Hipótese

Portanto, a hipótese dessa investigação científica foi que a administração de DHEA a ratas castradas e alimentadas com dieta hiperlipídica ou dieta padrão para roedores poderia corrigir ou amenizar a redução da sensibilidade à insulina e sua secreção.

1.3 Justificativa

A perda da função ovariana, fisiológica ou induzida, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, aumenta o risco para o desenvolvimento de distúrbios sexuais, endócrinos e metabólicos, devido em parte, pela perda do efeito protetor dos estrogênios. Dietas desbalanceadas podem levar ao excesso de peso e a obesidade ocasionando alterações metabólicas como o aumento dos níveis de ácidos graxos livres e glicose circulantes. A suplementação com DHEA em estudos animais ou em humanos está relacionada à redução da obesidade, da resistência à insulina e do risco de doenças cardiovasculares.

Além das conhecidas e controversas terapias de reposição hormonal (TRH) (LEBLANC et al., 2009; SARAC et al., 2009; YANG; RECKELHOF, 2010; SACCO; WARD, 2010), que têm sido estudadas relacionadas à saúde da mulher, ainda são necessários novos estudos que visem a compreensão dos divergentes resultados publicados. Portanto novas estratégias terapêuticas deverão ser elaboradas para a melhoria da qualidade de vida dessa população.

2 OBJETIVOS

Investigar o efeito da administração de DHEA em ratas ovariectomizadas e/ou alimentadas com dieta hiperlipídica sobre a (1) sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, (2) morfologia das ilhotas pancreáticas, (3) secreção estática de insulina frente ao estímulo da glicose e (4) expressão e grau de fosforilação de proteínas envolvidas no crescimento e apoptose celular, p Akt, Akt, ERK e Caspase 3 clivada em ilhotas pancreáticas isoladas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

A figura 1 esquematiza os protocolos experimentais. Foram usadas ratas Wistar, Rattus norvegicus, não prenhes, submetidas a ovariectomia aos 60 dias de vida. Os animais foram anestesiados com tiopental (60 mg/kg de peso de animal), após incisão abdominal, os ovários foram clampeados e removidos. Em seguida, a pele foi suturada, os animais receberam injeção intramuscular de tramadol (2 mg/kg peso corporal) e foram acomodados nas suas gaiolas plásticas, com aquecimento para permitir que acordem. O grupo SHAM sofreu o mesmo procedimento, porém, os ovários não foram retirados. No primeiro protocolo experimental (figura 1A), os animais foram alimentados exclusivamente com dieta padrão Nuvilab® (Nuvital, Colombo, Paraná, Brasil) (quadro 1). No segundo protocolo experimental (figura 1B) as ratas ovariectomizadas e respectivos controles SHAM foram alimentados com dieta hiperlipídica (quadro 2) por seis semanas consecutivas até a realização dos experimentos. Em ambos os protocolos experimentais houve ratas que receberam um implante subcutâneo de pellet de DHEA de liberação lenta (50 mg provenientes da *Innovative Research of America- FL, USA*) 3 semanas anteriores aos experimentos funcionais (ITT curto e GTT) e remoção dos tecidos (pâncreas).

No primeiro protocolo experimental as ratas Wistar foram divididas em quatro grupos (figura 1A) e avaliadas após 8 semanas da remoção cirúrgica dos ovários e com 3 semanas de DHEA:

- 1) grupo 1 – controle (SHAM)
- 2) grupo 2 – controle + DHEA (SHAM+DHEA)
- 3) grupo 3 – ovariectomizada (OVX)
- 4) grupo 4 – ovariectomizada + DHEA (OVX+D)

No segundo protocolo houve 5 grupos e as ratas foram avaliadas após 6 semanas de ovariectomia mais dieta e com 3 semanas de DHEA. Os grupos foram identificados como:

- 1) Grupo 1 – controle (SHAM)
- 2) Grupo 2 – controle + Dieta hiperlipídica (SHL)
- 3) Grupo 3 – ovariectomizado (OVX)
- 4) Grupo 4 – ovariectomizado + Dieta hiperlipídica (OHL)
- 5) Grupo 5- ovariectomizado + Dieta hiperlipídica + DHEA (OHLD)

Os animais tiveram a evolução ponderal avaliada ao longo do período experimental e após um dia da realização dos testes funcionais, ITT e GTT foram eutanasiadas por decapitação precedida de narcose com mistura de gás carbônico e oxigênio na proporção de 70% e 30%, respectivamente (AVMA Guidelines on Euthanasia, 2007, www.icb.usp.br/etica/euthanasia.pdf) para subsequente retirada do pâncreas, isolamento e análise das ilhotas pancreáticas. Esse procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), sob o número de protocolo 027 nas fls. 55 do livro 02, para uso de animais em experimentação.

A

B

Figura 1. Esquema ilustrativo do protocolo experimental. A. ao final de 11 semanas. B: ao final de 6 semanas.

As dietas utilizadas têm sua composição descrita nos quadros 1 e 2 apresentados a seguir.

Quadro 1 – Composição da dieta comercial Nuvilab®

Umidade (Máx)	125 g
Proteína Bruta (min)	220 g
Extrato Etéreo (min)	45 g
Matéria Mineral (máx)	100 g
Matéria Fibrosa (máx)	80 g
Cálcio (máx)	14 g
Fósforo (min)	8 g
Lisina	100,00 mg
Metionina	300,00 mg
Antioxidante	100,00 mg
Total	1000 g

FONTE: Nuvital, 2010.

Quadro 2 – Composição da Dieta Hiperlipídica ®

Amido de Milho	127,5 g
Caseína	200 g
Amido Dextrinizado	132 g
Sacarose	100 g
Óleo de Soja	40 g
Fibra	50 g
L-cistina	3 g
Colina	2,5 g
BHT	0,028 g
Mix Mineral	35 g
Mix Vitamínico	10 g
Banha	300 g
TOTAL	1000 g

FONTE: Pragsoluções Biociências (Jaú, São Paulo, Brasil, 2010).

3.2 Materiais e métodos

Os reagentes e os aparelhos para eletroforese em gel poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram da *Bio-Rad* (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina, ditioneitol (DTT), DHEA, albumina, colagenase tipo V e poli-lisina foram fornecidos pela *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO) e insulina regular pela Lilly. A insulina marcada (^{125}I), a membrana de nitrocelulose ECL e os kits para detecção por quimioluminescência foram fornecidos pela *Amersham (UK)*. D-glicose anidra e PEG (polietileno glicol + tampão borato) foram fornecidos pelo *Labsynth*. Os anticorpos utilizados foram fornecidos por: *Santa Cruz Biotechnology* (Santa Cruz, CA) e *BioLabs* (USA). Anticorpo anti-insulina (AC_1) obtido a partir de imunização com insulina murina e padrões de insulina murina purificada, cedidos gentilmente pelo Dr. Leclercq da Université Libre de Bruxelles, Bélgica. O anticorpo policlonal anti-insulina (de porco da Índia, A0564, lote 018), para a marcação das células B e o cromógeno 3,3'-Diamino-Benzidina (K1390) foram fornecidos pela *Dako* (CA, USA).

3.3 Teste de tolerância à insulina curto (índice de decaimento da glicose kitt)

Para avaliar a sensibilidade à insulina os animais, após o jejum de 12 horas, foram anestesiados com tiopental (60 mg/Kg de peso de animal). Ao se confirmar o efeito do anestésico através da observação da não retirada da cauda a estímulo de pressão, foi injetada solução de insulina (0,75 U por Kg de peso de animal) intraperitoneal. Amostras de sangue da cauda foram coletadas nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção do hormônio. A constante de decaimento da glicose foi calculada pela fórmula $0,693/t^{1/2}$, onde $t^{1/2}$ é o tempo de meia vida da glicose plasmática calculada pela inclinação da curva obtida durante a fase linear de decaimento da glicose plasmática (BONORA et al., 2000).

Também foi possível obter alíquotas de plasma para mensuração da insulina (determinada pelo método de radioimunoensaio), e subsequente mensuração da ação

insulínica pelo índice HOMA (“Homeostasis model Assessment”). Esse índice é calculado a partir da multiplicação da glicemia em mMol/L pela insulinemia em uU/mL e o produto resultante é dividido por uma constante, 22,5. O índice HOMA prediz a sensibilidade à insulina a partir das concentrações de glicose e insulina plasmáticas no jejum, ou tempo “0” (GELONEZE; TAMBASCIA, 2006).

3.4 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipgtt)

Para a determinação da curva glicêmica após a sobrecarga de glicose, os animais foram deixados em jejum por 12 horas. Em seguida, injetou-se uma dose de glicose (1 mg/g de peso corporal) administrada intraperitonealmente. A extremidade final da cauda do animal recebeu uma leve picada com auxílio de uma agulha para a obtenção de sangue, e a glicemia foi determinada utilizando o glicosímetro (*Accu-chek Active - Roche*). Os tempos de retirada de sangue foram 0 (basal), 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos.

3.5 Extração de ilhotas pancreáticas

Os animais foram sacrificados por decapitação após narcose induzida por mistura de gás contendo 30% de O₂ mais 70% de CO₂. Após a laparotomia e exposição do ducto biliar comum, o mesmo 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 collagenase tipo IV (50 ml de Hanks/34 mg de collagenase). 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 no mesmo banho-maria por mais 1 minuto, 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 (LACY; KOSTIANOVSKY,

1967). A solução final foi depositada em placa de Petri para coleta das ilhotas com o emprego de micropipeta e lupa. De 150 a 300 ilhotas isoladas foram coletadas e lavadas com solução de Hanks.

Amostras de sangue também foram coletadas, separadas as frações plasmáticas, acondicionadas em tubos tipo *ependorf* e armazenados em freezer -70 °C, para posterior dosagem hormonal pelo método do radioimunoensaio (RIE).

3.6 Análise da secreção estática de insulina em ilhotas pancreáticas

Para avaliação da secreção estática de insulina, foram utilizados grupos de cinco ilhotas em triplicata para cada condição experimental. As amostras foram pré-incubadas por trinta minutos em 500 µl de solução Krebs-Henseleit com 5,6 mM glicose suplementada com albumina bovina (0,2%), e incubadas em 2,8 e 16,7 mM, permanecendo em banho a 37 °C por 60 minutos. Após o período de incubação, 450 µl do sobrenadante foram removidos e estocados a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio.

3.7 Dosagem de insulina

A determinação da quantidade de insulina secretada, inclusive a plasmática, foi determinada por radioimunoensaio. Para tanto, a solução reagente inclui uma quantidade conhecida de anticorpo, uma quantidade conhecida do hormônio marcado radioativamente (insulina marcada com iodo – ^{125}I , Amershan Biosciences, Inglaterra) e uma quantidade desconhecida de hormônio não-radioativo (amostra). Como as duas formas de hormônio, radioativo e não-radioativo, competem por um mesmo número de locais de ligação ao anticorpo, quanto mais hormônio não-radioativo estiver presente, menos o hormônio radioativo irá se ligar. O complexo insulina-anticorpo marcado formado foi precipitado com polietilenoglicol (PM 6000) e dosado em contador tipo gama (PerkinElmer, Turku, Finlândia). Uma curva padrão foi preparada, na qual a

relação ligado/livre para o hormônio radioativo é plotada com função da concentração do hormônio não – radioativo: A relação ligado/livre do hormônio radioativo é maior quanto menor número de não – radioativo estiver presente. A curva padrão foi utilizada para determinar a concentração do hormônio em cada amostra.

3.8 Extração de proteínas totais de ilhotas pancreáticas isoladas

Cerca de 150 a 300 ilhotas foram coletadas e transferidas para eppendorfs. Para a obtenção das proteínas, as mesmas foram homogeneizadas em 150µl de tampão de extração gelado constituído de Triton-X 100 1%, Tris (pH 7,4) 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml. Os extratos foram centrifugados a 12.000 rpm a 4 °C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação os sobrenadantes das amostras tiveram seu conteúdo protéico quantificado utilizando o reagente de Bradford (BioRad), foram tratados com tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970), acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 5:1 (V:V).

3.9 Análise protéica por immunoblotting

Alíquotas de cada amostra, contendo 30 µg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8% e 6,5%). Em cada gel foi aplicado padrão pré-corado de marcador de peso molecular com valores estabelecidos. A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da *Bio-Rad* por 2 horas à 120 V, como descrito por Towbin et al. (1979). Porém no tampão foi acrescido SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) à 4 °C durante a noite. As membranas foram incubadas com anticorpos específicos Anti-pAkt^{ser473}, anti-Akt, e α-tubulina,

fornecidos pela Santa Cruz, anti-ERK1/2 fornecido pela *Millipore* e anti-caspase 3 Clivada, da *Cell signaling technology* em solução bloqueadora (com 3% de BSA ao invés de leite) por 4 horas a temperatura ambiente e em seguida lavada com esta mesma solução sem leite ou BSA, por 30 minutos. Em seguida, estas membranas foram então incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente e solução para detecção por quimioluminescência como descrito no protocolo do kit. A intensidade das bandas nas auto-radiografias reveladas foi determinada através da leitura por densitometria óptica das imagens escaneadas utilizando um *scanner* (HP 3400) e o programa *ImageJ*.

3.10 Dosagem plasmática de dhea

As concentrações plasmáticas de DHEA foram determinadas seguindo o protocolo do Kit comercial para detecção quantitativa deste hormônio com anticorpo humano específico anti- DHEA. Fornecido pela *DSLabs* (TX,USA). Os demais hormônios do eixo hipófise gonadal foram mensurados por RIE no laboratório do Prof. Dr. Celso Franci, Departamento de Fisiologia da FMUSP de Ribeirão Preto, SP.

3.11 Análise histológica

Os animais foram anestesiados com quetamina® (20 mg/100g de peso corporal, ip) e xilazina® (2 mg/100g de peso corporal, ip). O tórax foi aberto e aplicada heparina sódica por via intracardíaca para diminuir a formação de trombos. Os animais foram perfundidos transcardiacamente com solução salina tamponada. Solução de tampão fosfato (0,1 mol/l, pH 7.4) com 0,9% de PBS e 4% de paraformaldeído foi perfundida através do coração dos animais. Logo após o pâncreas foi removido e fixado em paraformaldeído 4% por 4-6 horas e transferido para uma solução de sacarose a 20% em PBS para crioproteção. Fragmentos de pâncreas foram incluídos em blocos de gelatina a

baixas temperaturas e cortados posteriormente (12 µm) em criostato. Os cortes histológicos de pâncreas foram corados com hematoxilina/eosina para análise morfológica.

3.12 Análise estatística

Foi utilizado teste de uma via (One way – ANOVA) e de duas vias (Two way – ANOVA), utilizando para ambos o pós-teste de Bonferroni e Tukey, respectivamente. O teste estatístico e o valor de significância (*p*) são indicados em cada gráfico e tabela de resultados.

4 RESULTADOS

Não houve diferença estatística quanto ao peso inicial dos animais (tabelas 1 e 2). A partir da terceira semana após a ovariectomia as ratas OVX e OVX +DHEA apresentaram aumento de peso significativo em relação ao grupo SHAM ($p < 0,05$). Por outro lado, o grupo ovariectomizado alimentado com dieta HL apresentou aumento de peso mais precoce, na segunda semana após a cirurgia ($p < 0,01$). No entanto, o peso corporal final foi maior nas OHL em relação à SHL ($p < 0,05$). O grupo OHLD apresentou aumento de peso significativo em relação ao grupo SHAM ($p < 0,01$) apenas a partir da 5ª semana após a cirurgia. O tratamento com DHEA não reverteu o ganho de peso na 6ª e nem 11ª semana após a castração (ver anexo A1 e A2).. Na 6ª semana de experimento as ratas controle alimentadas com dieta hiperlipídica (SHL) não apresentaram diferença quanto ao ganho de peso (tabela 2), comparadas com aquelas alimentadas com dieta padrão Nuvilab®.

O peso uterino das ratas castradas, OVX, OHL e OHLD foi significativamente menor que nas ratas controle SHAM e SHL ($0,5 \pm 0,03$ g; $0,5 \pm 0,09$ g; $0,55 \pm 0,05$ g *versus* $2,0 \pm 0,3$ g, $1,71 \pm 0,24$ g, respectivamente) (tabela 2). DHEA, portanto não levou a alterações sobre este parâmetro. Na tabela 3 observam-se as concentrações hormonais dos animais. As concentrações de estrogênios foram significativamente menores no grupo OVX comparado ao grupo SHAM ($28,4 \pm 3,7$ pg/ml *versus* $52,8 \pm 4,1$ pg/ml. No entanto, essas concentrações apresentaram aumento significativo no grupo OVX + DHEA, quando comparado ao grupo OVX ($57,5 \pm 6,9$ pg/ml *versus* $28,4 \pm 3,7$ pg/ml). As concentrações de progesterona e testosterona foram reduzidas nos grupos OVX: $9,5 \pm 1,6$ ng.ml⁻¹ e $29,3 \pm 3,4$ pg.ml⁻¹; OVX +DHEA: $9,7 \pm 2,4$ ng.ml⁻¹ e $27,6 \pm 4,5$ pg.ml⁻¹, respectivamente. Já as concentrações de LH e FSH foram significativamente maiores nos grupos ovariectomizados, OVX: $63,2 \pm 8,0$ ng.ml⁻¹ e $31,0 \pm 3,7$ ng.ml⁻¹; OVX +DHEA: $54,5 \pm 5,7$ ng.ml⁻¹ e $27,1 \pm 2,8$ ng.ml⁻¹, respectivamente. As concentrações de DHEA foram aumentadas significativamente após os 21 dias de tratamento tanto no grupo experimental de 11 semanas (tabelas 3 e 4, respectivamente),

como no de 6 semanas (tabela 4), revertendo apenas as concentrações reduzidas de estradiol.

Tabela 1- Peso corporal inicial e final, glicemia basal e Kitt das ratas SHAM, SHAM+DHEA, OVX e OVX + DHEA após 11 semanas de cirurgia.

	SHAM	SHAM +DHEA	OVX	OVX +DHEA
Peso Inicial (g)	212,0± 4,0	216,0 ± 5,0	218,0 ± 4,5	216,0 ± 5,0
Peso Final (g)	283,0 ± 3,2 ^a	276,0 ± 6,5 ^a	311,0± 7,2 ^b	327,0 ± 4,0 ^b
Glic Basal (ng/ml)	127,0 ± 5,4	128,0 ± 5,6	130,0 ± 5,7	132,0 ± 2,5
Kitt (% min⁻¹)	2,6 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,4

Glic é glicemia; Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM e SHAM +DHEA. Os resultados estão expressos como média ± EPM (n= 15, para peso inicial e final e n= 5, para glicemia e Kitt). One Way, ANOVA, com pós-teste de Tukey.

Tabela 2- Peso uterino, peso corporal inicial, peso corporal final e ganho de peso corporal das ratas SHAM, SHL, OVX, OHL e OHL, após 6 semanas de cirurgia.

	SHAM	SHL	OVX	OHL	OHL
Peso uterino (g)	2,0± 0,3 ^a	1,7± 0,24 ^a	0,5± 0,03 ^b	0,5± 0,09 ^b	0,55± 0,05 ^b
Peso corporal inicial (g)	201± 8	205± 9	204± 5	218± 9	199 ± 8
Peso corporal final (g)	250± 3 ^a	271± 7 ^a	300± 6 ^b	305± 6 ^b	303± 13 ^b
Ganho de peso (g)	48± 8 ^a	67± 7 ^a	94± 4 ^b	102± 7 ^b	100± 7 ^b

Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Os resultados estão expressos como média ± EPM (n= 8, para peso uterino e peso corporal inicial; n= 7, para peso corporal final e ganho de peso). One Way, ANOVA, com pós-teste de Tukey.

Tabela 3- Concentrações séricas de estradiol, progesterona, LH, FSH e testosterona das ratas controle, OVX e ratadas com DHEA, após 12 semanas da cirurgia.

Grupo	Estradiol (pg.ml ⁻¹)	Progesterona (ng.ml ⁻¹)	LH(ng.ml ⁻¹)	FSH (ng.ml- 1)	Testosterona (pg.ml ⁻¹)	DHEA (pg.ml ⁻¹)
SHAM	52,8 ± 4,1 ^a	26,0 ± 5,8 ^a	9,6 ± 0,5 ^a	4,8 ± 0,2 ^a	94,8 ± 16,6 ^a	31,7 ± 2,1 ^a
SHAM+ DHEA	60,0 ± 5,6 ^a	25,0 ± 4,8 ^a	9,5 ± 0,9 ^a	5,0 ± 0,5 ^a	104,0 ± 11,0 ^a	46,7 ± 1,9 ^b
OVX	28,4 ± 3,7 ^b	9,5 ± 1,6 ^b	63,2 ± 8,0 ^b	31,0 ± 3,7 ^b	29,3 ± 3,4 ^b	26,3 ± 3,8 ^a
OVX+ DHEA	57,5 ± 6,9 ^a	9,7 ± 2,4 ^b	54,5 ± 5,7 ^b	27,1 ± 2,8 ^b	27,6 ± 4,51 ^b	51,5 ± 3,2 ^b

Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05). Os resultados estão expressos como média ± EPM (n= 8-10). One Way, ANOVA, com pós-teste de Tukey.

Independente da dieta ou do tratamento com DHEA, tanto na 6^a como na 11^a semana após a cirurgia, os animais não apresentaram diferença estatística na glicemia basal (tabela 1 e 2). Ao final da sexta semana o grupo OVX manteve a mesma insulinemia que os animais SHAM e SHL (tabela 2). Por outro lado, a dieta HL aumentou a concentração sérica desse hormônio em aproximadamente 2 vezes no grupo OHL em comparação ao seu controle, OVX (1 ± 0,1 ng/ml; vs 0,3 ± 0,1 ng/ml; p<0,01). O tratamento com DHEA corrigiu a elevação na concentração de insulina plasmática nas ratas OHL (OHL: 0,4 ± 0,04 ng/ml vs OHL: 1 ± 0,1 ng/ml; P<0,001). A partir da glicemia e insulinemia basais, foi calculado o índice HOMA IR (tabela 4), que esteve significativamente aumentado nas ratas SHL e OHL em relação à SHAM e ao grupo OVX (6,0 ± 0,1; 7,5 ± 0,8 vs 2,7 ± 0,8; 2,0 ± 0,3; p<0,01, respectivamente), e a suplementação com DHEA também reverteu esse comportamento nas ratas OHL (3,0 ± 0,6).

Tabela 4- Glicemia e insulinemia basais, concentração sérica de DHEA, índice HOMA-IR e Kitt das ratas SHAM, SHL, OVX, OHL e OHLD após 6 semanas de cirurgia.

	SHAM	SHL	OVX	OHL	OHLD
Glicemia Basal (ng/ml)	105 ± 3	110 ± 4	101 ± 4	118 ± 4	117 ± 5
Insulinemia Basal (ng/ml)	0,4 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,1 ^{ac}	0,3 ± 0,1 ^a	1 ± 0,1 ^{bc}	0,4 ± 0,04 ^a
DHEA (pg.ml⁻¹)	22,7 ± 3,5 ^a	31,9 ± 3,1 ^a	24,0 ± 4,0 ^a	35,0 ± 2,56 ^a	60,0 ± 1,31 ^b
Índice HOMA-IR(UA)	2,7 ± 0,4 ^a	6,0 ± 1,0 ^b	2,0 ± 0,3 ^a	7,5 ± 0,8 ^b	3,0 ± 0,6 ^a
Kitt (%min⁻¹)	2,5 ± 0,2 ^a	2,3 ± 0,1 ^a	2,5 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,1 ^b	2,3 ± 0,1 ^a

Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05). Os resultados estão expressos como média ± EPM. One Way, ANOVA, com pós-teste de Tukey. (n= 15, para glicemia basal; n=4, para insulinemia basal e HOMA IR; n=12, para o Kitt.).

O decaimento da glicose, expresso pelo Kitt, não esteve alterado nos grupos SHAM, SHAM +DHEA, OVX e OVX+DHEA na 11^a semana após a castração (tabela 1). No entanto, foi menor no grupo ovariectomizado tratado com dieta HL na 6^a semana após a cirurgia (tabela 4): OHL (1,5 ± 0,1%min⁻¹; p< 0,01) em relação aos demais grupos (SHAM: 2,5 ± 0,2%min⁻¹; SHL: 2,3 ± 0,1%min⁻¹; OVX: 2,5 ± 0,1%min⁻¹ e OHLD: 2,3 ± 0,1%min⁻¹) indicando redução da sensibilidade periférica à insulina. O tratamento com DHEA impediu a instalação da resistência periférica à insulina, mensurada ao final do protocolo experimental.

O teste de tolerância à glicose intraperitoneal também não identificou alteração da glicemia nos grupos SHAM, SHAM +DHEA, OVX e OVX+DHEA na 11^a semana (figura 2A). Por outro lado, a glicemia plasmática esteve significativamente aumentada

nos grupos SHL, OHL e OHL D no tempo 15 minutos, comparados ao grupo controle ($p<0,05$) (Ver figura 2B). Aos 45 minutos a glicemia do grupo OHL foi significativamente maior que a do grupo OVX ($p<0,05$) e após uma hora da administração de glicose houve diferença significativa apenas entre os grupos OHL em relação aos grupos SHL e OVX ($p<0,05$). O cálculo da área sob a curva indicou diferença significativa no grupo OHL em relação ao grupo OVX (23124 ± 517 vs 19950 ± 853 ; $p<0,05$). O DHEA não preveniu tal alteração nas ratas OHL D.

A

B

Figura 2. Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) (1g/kg de peso corporal). A. Ao final de 11 semanas: SHAM, SHAM +DHEA, OVX e OVX +DHEA (n= 8-10) B. Ao final de 6 semanas: Animais do grupo controle SHAM (n=10), SHL(n=5), OVX (n=10), OHL(n=9) e OHL D (n=8), submetidos ao ipGTT. Utilizou-se o teste de duas vias (Two way, ANOVA) com pós-teste de Tukey.* $p<0,05$, SHL, OHL e OHL D em relação à SHAM; # $p<0,05$, OHL em relação à OVX; & $p<0,05$; & $p<0,05$, OHL em relação à SHL e \$ $p<0,05$ OHL em relação à OVX. No canto superior direito de cada figura evidenciamos a área sobre a curva

glicêmica (* $p < 0.05$ OHL em relação à OVX), cujos valores foram expressos em mg/dL e em $\text{mg}/(\text{dL} \cdot \text{min})^{-1}$.

Seguindo o protocolo descrito em Materiais e Métodos as ilhotas foram visualizadas (Figura 3) com aumento de 10X. A área total foi medida e os resultados empregados para análise estatística. A área das ilhotas pancreáticas dos animais do grupo SHAM foi menor em relação aos animais castrados (SHAM: $1046 \pm 825 \mu\text{m}^2$; SHL: $13278 \pm 1006 \mu\text{m}^2$; OVX: $15265 \pm 1225 \mu\text{m}^2$; OHL: $15980 \pm 1626 \mu\text{m}^2$ e OHL: $17632 \pm 1154 \mu\text{m}^2$, figuras 3 A, B, C, D e E, respectivamente). O tratamento com DHEA não surtiu qualquer efeito sobre esse parâmetro.

Figura 3. Imagem representativa de corte histológico de pâncreas das ratas SHAM (A), SHL (B), OVX (C), OHL (D) e OHL (E) ao final de 6 semanas de tratamento, corados com H/E. As regiões circundadas pelas setas indicam as ilhotas pancreáticas com aumento de 10X. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM.. One Way, ANOVA, com pós-teste de Tukey. (Para cada condição 25 ilhotas de 5 ratas diferentes).

Houve aumento da secreção de insulina estimulada por glicose em relação ao basal em todas as condições experimentais (basal: 2,8mM, estimulada: 16.7 mM), exceto nas ilhotas do grupo OHL. O grupo tratado com DHEA restabeleceu essa resposta ($p < 0,05$) (figura 4A). A figura 4B aponta diferença estatística da secreção de

insulina das ilhotas estimuladas por 2.8mM de glicose do grupo OHL em relação aos demais grupos. O tratamento com DHEA reverteu tal alteração (OHL: $3,2 \pm 0,46$ ng/ilhota; SHAM: $1,41 \pm 0,16$ ng/ilhota; SHL: $1,45 \pm 0,3$ ng/ilhota; OVX: $1,67 \pm 0,15$ ng/ilhota e OHL: $0,95 \pm 0,1$ ng/ilhota). Não foi observada diferença estatística entre as ilhotas dos diferentes grupos quando estimuladas com 16.7mM de glicose (figura 4C).

Figura 4. A. Secreção estática de insulina em 2.8 e 16.7 Mm de glicose em ilhotas pancreáticas isoladas das ratas, SHAM, SHL, OVX, OHL e OHL ao final de 6 semanas de tratamento. As ilhotas foram pré-incubadas durante 30 minutos em meio Krebs-bicarbonato contendo 5.6mM de glicose e posteriormente incubadas em 2.8 ou 16.7 mM de glicose, durante 1 hora. Utilizou-se o teste two way, ANOVA (n=5-6), com pós-teste de Bonferroni. B e C. Secreção estática de insulina em 2.8 e 16.7 mM de glicose, por ilhota, respectivamente. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p<0,01$). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. One Way, ANOVA, com pós-teste de Tukey. (n= 5-6).

O grau de fosforilação no resíduo serina (na posição 473) da proteína Akt em ilhotas pancreáticas (figura 5A) foi diminuído nos grupos SHL, OVX e OHL ($56,8 \pm 7$; $53,45 \pm 8,6$ e $57,2 \pm 6$ respectivamente). O tratamento com DHEA aumentou a

ativação dessa proteína nas ratas OHLD ($140 \pm 1,63$). Não foi observada diferença significativa na expressão protéica da ERK_{1/2} bem como da Caspase 3 clivada nas ilhotas pancreáticas (figura 5B e 5C).

Figura 5. Expressão protéica de pAkt^{ser473}/ Akt (A), ERK1/2 (B) e Caspase 3 Clivada (C) em ilhotas pancreáticas isoladas de animais controle (SHAM), controle + Dieta Hiperlipídica (SHL), ovariectomizado (OVX), ovariectomizado + Dieta Hiperlipídica (OHL) e ovariectomizado + Dieta Hiperlipídica + DHEA. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). One Way, ANOVA, com pós-teste de Tukey ($n = 3-8$).

5 DISCUSSÃO

A retirada dos ovários em roedores é uma estratégia para abordar a menopausa humana e estudar os efeitos da perda da função ovariana (VON DIEMEN; TRINDADE, 2006; BROWN et al., 2010). Conforme esperado e corroborando os dados da literatura, tanto em modelo animal como em mulheres, verificou-se que a ovariectomia (nos grupos OVX, OHL e OHL D) resultou num aumento significativo do peso corporal comparado aos grupos controle (SHAM e SHL), demonstrando o importante papel dos hormônios sexuais para o controle do peso corporal, em fêmeas.

Foi demonstrado ganho de peso significativo em relação ao controle em ratas ovariectomizadas, alimentadas com dieta padrão, sendo que quando esses animais foram tratados por 3 meses com estrógeno (30µg/kg por dia) o ganho de peso foi atenuado (LIU et al., 2004). Ratas e camundongos fêmeas ovariectomizadas, também alimentadas com dieta padrão, apresentaram ganho de peso e aumento do acúmulo de gordura visceral (RACHON; TEED, 2010; TSAI et al., 2010), mesmo quando tratadas com extrato de soja e 17 beta estradiol (GALLO et al., 2005).

As ratas OHL apresentaram sensibilidade precoce aos efeitos da dieta hiperlipídica já na segunda semana após a cirurgia. Já o grupo OVX, apresentou a mesma diferença, posteriormente, na terceira semana após a cirurgia. Tal comportamento deve-se ao fato de que a ingestão da dieta padrão não foi suficiente para aumentar o peso dos animais nesse mesmo período. Os dois grupos tratados com dieta HL, SHL e OHL, apresentaram diferença significativa do peso corporal final ao término do protocolo experimental, demonstrando por sua vez o papel dos hormônios sexuais para a regulação do peso corporal. Nesse mesmo período não foi verificada diferença de peso corporal final entre os grupos castrados, independente do tipo de dieta ingerida. O DHEA não foi capaz de reverter o ganho de peso observado no grupo OHL D, porém tal tratamento manteve o peso corporal semelhante ao controle: animais com ovários, SHAM, até a quarta semana de experimento.

Homens apresentam mais massa magra, gordura visceral e hepática em relação às mulheres, que possuem maior deposição de gordura periférica e subcutânea (GEER; SHEN, 2009). O papel dos estrogênios na composição corporal também foi demonstrado por Lovejoy et al. (2008) em mulheres de 43 anos, acompanhadas por 4 anos, onde foi observado aumento do peso corporal e peso da gordura visceral apenas naquelas que entraram na menopausa.

Embora existam algumas divergências, o emprego do DHEA como agente anti-obesidade em roedores tem sido bem aceito. Foi demonstrada a eficácia do tratamento agudo com DHEA sobre a redução do peso e gordura corporal em ratas alimentadas com dieta HL (De Heredia et al., 2007). No entanto, não foram verificadas mudanças significativas sobre a composição corporal e glicemia basal em mulheres, quando tratadas com 50 mg de DHEA por dia durante 6 meses (BOXER et al., 2010).

Hong et al. (2009) demonstraram que camundongos machos alimentados com dieta hiperlipídica (30%) por 20 semanas apresentaram maior susceptibilidade à obesidade que camundongos fêmeas, também alimentadas pelo mesmo período, e que a ovariectomia elimina a proteção das fêmeas de se tornarem obesas quando expostas a mesma dieta. Rogers et al. (2009) demonstraram que a ovariectomia induz uma redução no gasto energético associado ao aumento de peso corporal.

As concentrações séricas de estradiol, além da progesterona e testosterona estiveram diminuídas em nosso grupo de ratas jovens após 11 semanas de castração. Dos 2 grupos tratados, SHAM +DHEA e OVX +DHEA, apenas o grupo OVX + DHEA apresentou aumento das concentrações de estradiol, comparado ao seu controle, OVX, demonstrando, nessas circunstâncias, a eficácia da conversão desse esteróide, sob a ação de enzimas específicas, a estradiol. A suplementação com DHEA não alterou os níveis de progesterona e testosterona, diminuídos em função da castração.

Com a privação dos hormônios sexuais femininos, observada no grupo OVX, o mecanismo de regulação por retroalimentação negativa do eixo gônadas-hipotálamo-hipófise desencadeou o aumento na secreção dos hormônios luteinizante (LH) e foliculoestimulante (FSH), pela hipófise, como ocorre em mulheres, na menopausa. Apesar da recuperação das concentrações de estradiol no grupo castrado

tratado com DHEA, a alça de retroalimentação sobre os níveis de LH e FSH nessas ratas não foi corrigida. Algumas ações locais específicas dos estrogênios, particularmente sobre a trofia do endométrio e miométrio também se mantiveram perdidas no grupo OVX +DHEA e OHL, demonstrando, portanto um dado curioso e ainda não identificado sobre a possibilidade de uma ação direta do DHEA ou do resultado da sua conversão a estrógeno.

Maninger et al. (2009), em revisão, relataram que diferente dos humanos, cujas concentrações de DHEA(S) são as mais abundantes na circulação, ratos e camundongos apresentam baixas concentrações desse hormônio, decorrentes do complexo enzimático específico presente nas gônadas e adrenais. Apesar dessa informação o conteúdo de DHEA, determinado através de um kit comercial no grupo OVX, não diferiu em relação ao do grupo controle. No entanto uma possibilidade que deverá ser testada é se o kit utilizado para dosagem desse hormônio em sua forma não sulfatada tem sensibilidade ou especificidades inadequadas. A suplementação com 50 mg de DHEA, liberados ao longo de 21 dias aumentou as concentrações séricas desse hormônio nos grupos SHAM +DHEA e OVX+ DHEA.

A relação entre a obesidade e a resistência a insulina é um conceito bem estabelecido. É sabido que a obesidade induzida por dieta de cafeteria ou rica em lipídios também induz resistência à insulina em modelos experimentais (HIROSUMI et al., 2002; BROWN et al., 2010; BELGARDT; MAUER; BRUNING, 2010). Cefalu et al. (1995) correlacionaram negativamente a gordura intra-abdominal com a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose entre homens e mulheres com idade entre 23 e 83 anos.

O alto consumo de alimentos puramente energéticos como carboidratos refinados e alimentos fontes de gordura saturada, como a carne vermelha e a banha de porco, associado a uma dieta pobre em fibras e micronutrientes como vitaminas e minerais, refletem o perfil alimentar dos países ocidentais e em desenvolvimento, cuja incidência de doenças crônicas e suas complicações esta aumentando bruscamente.

Randle et al. (1994) demonstraram que o aumento em ácidos graxos livres circulantes inibe a captação e oxidação da glicose em músculo esquelético e tecido

adiposo. Além do ácido graxo esteárico, o palmítico é o ácido graxo mais encontrado nos alimentos como leite e derivados e na carne bovina. Altas concentrações de palmitato levaram a diminuição da expressão do gene do receptor de insulina e prejuízos sobre as vias de ação desse hormônio em cultura de células musculares (DEY et al., 2005).

A ovariectomia *per se* não levou a uma redução na sensibilidade à insulina nem ao prejuízo a tolerância à glicose nas ratas dos grupos OVX ao final de 6 e 11, semanas, ambas alimentadas com dieta padrão. Esse efeito foi diferente do verificado por Choi et al. (2005), onde ratas ovariectomizadas alimentadas com a mesma dieta apresentaram redução na captação da glicose. No entanto, a perda dos hormônios sexuais parece tornar as ratas mais sensíveis aos efeitos deletérios da dieta HL em apenas 6 semanas de tratamento.

A insulinemia esteve aumentada nos animais controle e desprovidos dos ovários alimentados com dieta rica em lipídio, SHL e OHL. O índice HOMA-IR, calculado a partir da glicemia e insulinemia de jejum, que faz correlação com técnicas consideradas padrão-ouro (clamp hiperinsulinêmico) para estimar o diagnóstico de resistência a insulina, esteve aumentado nos grupos, SHL e OHL, evidenciando o papel da dieta HL sobre o desencadeamento do quadro de hiperinsulinemia.

Por outro lado, o índice de decaimento da glicose, Kitt, que reflete a capacidade dos tecidos periféricos em responder a ação da insulina, foi reduzido apenas nos animais do grupo OHL. Isso demonstra que a perda dos hormônios sexuais femininos, associada ao consumo de dieta HL, rica em ácidos graxos saturados, já desencadeia o quadro de resistência à insulina nesse período, com redução da captação da glicose, pelo tecido muscular.

Riant et al. (2009) também observaram resistência à insulina em camundongos fêmeas castradas e alimentadas com dieta HL, enquanto o grupo controle alimentado com a mesma dieta e o grupo ovariectomizado, apenas alimentado com dieta padrão, não apresentaram essa alteração. Carnevale et al. (2006) observaram aumento da insulinemia basal, alteração no HOMA IR e da relação cintura quadril em mulheres menopausadas com média de 50 anos.

Situações como obesidade, processos inflamatórios que desencadeiam a produção de citocinas, como o fator de necrose tumoral, TNF α , hiperlipidemia, hiperinsulinemia e até disfunção mitocondrial, podem aumentar o grau de fosforilação em resíduos de Serina 302, Ser 307, Ser 612 e Ser 312, do IRS-1, em músculo esquelético de roedores, representando assim um modelo de resistência à insulina com prejuízos sobre a transdução do sinal desse hormônio em suas vias à jusante, IR/IRS/PI3K/AKT (KIM et al., 2004; MOESCHEL et al., 2004).

A proteína Akt está envolvida em vários processos biológicos nos diferentes tecidos, como crescimento, sobrevivência celular e proliferação, exercendo um papel essencial no metabolismo, cuja ativação está envolvida com a translocação do transportador de glicose, GLUT-4 para a membrana, promovendo a captação de glicose para as células (CHOI; KIM, 2010). A atividade e o estado de fosforilação da Akt estiveram diminuídos em células musculares cardíacas na presença de palmitato, com conseqüente diminuição da oxidação da glicose e sua captação nesse tecido (SOLTYS et al., 2002).

Hirabara et al. (2010), aponta o papel dos ácidos graxos saturados, palmítico e esteárico, no prejuízo da função mitocondrial em células musculares causando resistência à insulina. Camundongos com deleção no gene da Akt 2 manifestaram resistência a insulina, demonstrando a importância dessa proteína para a homeostase glicêmica (CHO et al., 2001).

Apesar do nosso estudo não ter demonstrado alteração na glicemia basal entre os diferentes grupos experimentais, por outro lado, quando realizado o cálculo da área sob a curva, através do teste de tolerância a glicose intraperitoneal, foi evidenciado que o grupo OHL também apresentou intolerância à glicose, sugerindo novamente a presença dos hormônios sexuais como fator protetor para as fêmeas.

Embora a *American Diabetes Association (ADA)* tenha preconizado a verificação da glicemia de jejum para o diagnóstico de diabetes tipo 2, o teste de tolerância a glicose ainda é uma ferramenta bastante utilizada para identificar, de forma precoce, diabetes e intolerância a glicose. Tanto o teste de tolerância oral a glicose, como o intravenoso ou intraperitoneal (não comum na prática clínica) representam

apenas medidas estimativas de avaliação da função da célula beta. Atualmente o *clamp* hiperinsulinêmico-euglicêmico é a única técnica experimental que mantém experimentalmente o maior controle da secreção e sensibilidade à insulina (BARTOLI; FRA; CARNEVALE SCHIANCA, 2011)

Os estrogênios possuem efeitos já reconhecidos sobre o metabolismo da glicose e lipídios que parecem ser mediados pela isoforma ER α , já que camundongos fêmeas nocauteadas para ER α castradas e alimentadas com dieta hiperlipídica não responderam ao tratamento com 17 β -estradiol, permanecendo resistentes à insulina (RIANT et al., 2009). Heine et al. (2000) observaram intolerância à glicose em camundongos de ambos os sexos nocauteados para ER α . Por outro lado, ER β tem sido correlacionado negativamente com a sinalização de insulina e o metabolismo da glicose devido à diminuição da captação de glicose pelo tecido adiposo e da diminuição na expressão do transportador de glicose, GLUT-4, em músculo esquelético (BARROS et al., 2009; FORYST-LUDWIG; KINTSCHER, 2010).

Embora os resultados com humanos sejam menos concordantes e alguns estudos não demonstrem melhora na ação da insulina nem qualquer efeito sobre a obesidade, alguns estudos indicam que o tratamento com DHEA, tanto em humanos como em modelos experimentais, pode exercer propriedades anti-obesidade e anti-diabetogênicas. Também foi comprovado o efeito do DHEA sobre a diminuição do peso corporal e da adiposidade visceral, com alterações na proliferação e diferenciação de pré-adipócitos (CLEARY; ZISK, 1986; DE HEREDIA et al., 2007) com conseqüente melhora da sensibilidade à insulina e restauração dos seus níveis circulantes (COLEMAN; LEITER; SCHWIZER, 1982).

No presente trabalho não houve correlação do tratamento com DHEA sobre a redução dos parâmetros de composição corporal, no entanto, o DHEA preveniu a resistência à insulina e a hiperinsulinemia nas ratas OHLD, além de normalizar a secreção de insulina estimulada por glicose. Choi et al. (2009) observaram aumento da glicemia e insulinemia séricas em ratas alimentadas com dieta HL, efeitos que foram revertidos quando esses animais receberam o isoflavonóide genisteína. Ao tratar ratas velhas por 13 semanas com dieta HL suplementada com DHEA (5 g/kg dieta) observou-se diminuição da concentração sérica de insulina, sem alteração na glicemia basal,

comparado com o grupo controle tratado apenas com dieta HL (SANCHEZ et al., 2008).

No início do desenvolvimento da resistência a insulina a glicemia é mantida em concentrações adequadas em função do mecanismo compensatório que é desenvolvido pelas células β envolvendo a expansão da massa dessas células com aumento da secreção de insulina (WANG; JIN, 2009). A massa da célula β é regulada pelo balanço entre fatores de crescimento (GLP-1, IGF-1, insulina, GIP, entre outros) e eventos de morte celular, como apoptose e necrose (WANG; JIN, 2009; BAGGIO; DRUCKER, 2006).

O fracasso do mecanismo compensatório ocorre com a incapacidade/falha na expansão de massa da célula β por fatores adquiridos, genéticos e na maioria das vezes, morte por apoptose, desencadeando o quadro de hiperglicemia (BONNER-WEIR, 2000). Foi demonstrada uma redução em 40-60% da massa de célula β em pacientes com diabetes tipo 2 (BUTLER et al., 2003).

A exposição crônica a elevadas concentrações de glicose e ácidos graxos saturados, pode causar disfunção da célula β e até induzir a apoptose. Esse mecanismo pode culminar na ativação de citocinas capazes de induzir respostas protetoras ou deletérias à sobrevivência da célula β (CNOP et al., 2005). Graciano et al. (2009) não observou alteração na atividade da caspase 3 em ilhotas pancreáticas tratadas em curto tempo com palmitato. Também não verificamos alteração na expressão dessa proteína mediadora inicial de eventos apoptóticos em nossos animais.

Portanto, dos 3 grupos de ratas castradas, aquelas do grupo OHL foram as únicas a apresentar diminuição na sensibilidade à insulina, comprovada através da realização do kitt, da hiperinsulinemia e pelo cálculo do índice HOMA. Apesar do aumento na área das ilhotas ter ocorrido nos 3 grupos, OVX, OHL e OHLD, e mesmo não podendo afirmar que isso seja decorrente do aumento do número e/ou do tamanho de suas células beta, provavelmente o grupo OHL é o único a apresentar falha no mecanismo compensatório que supostamente está ocorrendo para a preservação da tolerância a glicose. A perda da capacidade de resposta secretória de insulina frente ao estímulo da glicose em 16,7 mM e o aumento de sua secreção no estado basal em já confirmam o comprometimento da tolerância a glicose. As ilhotas da ratas tratadas com DHEA

apresentaram correção na secreção de insulina, porém ainda não identificamos os mecanismos envolvidos. Medina et al. (2006) sugeriram que o aumento da secreção de insulina, verificado em ilhotas de ratos velhos tratados com DHEA, poderia ser decorrente da eficiência da cinética dos canais de cálcio envolvidos na exocitose dos grânulos de secreção de insulina.

Nosso estudo demonstrou que a fosforilação da Akt esteve diminuída nas ilhotas pancreáticas das ratas OHL. Essa proteína atua como um importante mediador no mecanismo de expansão de massa da célula beta durante o desenvolvimento da resistência a insulina, e está, portanto diretamente associada ao o crescimento e a sobrevivência de ilhotas pancreáticas. Mizuno et al. (1999) relacionaram o aumento da massa da célula β e o baixo conteúdo de insulina ao reduzido grau de fosforilação da Akt em ilhotas de ratos diabéticos tipo 2. Jetton et al. (2005) também identificaram hiperplasia nas ilhotas pancreáticas e em sua células beta no mesmo modelo animal.

Também verificamos que as ilhotas pancreáticas do grupo de animais tratados com DHEA apresentaram aumento do grau de fosforilação da Akt. Sugerindo, portanto, o papel do DHEA sobre essas vias, particularmente na regulação da homeostase da glicose. DHEA também corrigiu a secreção de insulina estimulada por glicose verificada nas ratas OHL. Bernal- Mizrachi et al. (2004) observaram prejuízo da secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas de animais cuja atividade da Akt foi diminuída, com conseqüente prejuízo na tolerância a glicose.

A expressão da ERK 1/ 2 não esteve alterada nos cinco grupos experimentais estudados. Embora sua atividade não seja necessária ao processo de secreção de insulina, sabe-se que a quantidade e a atividade dessas proteínas são aumentadas no núcleo de células β , sob diferentes concentrações de glicose, o que sugere o envolvimento dessas proteínas na regulação da transcrição gênica (LAWRENCE et al., 2008).

Sendo assim, ratas jovens, privadas dos hormônios gonadais por ovariectomia bilateral, por 11 semanas, não apresentaram quaisquer prejuízos sobre a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, apesar do reduzido grau de fosforilação no resíduo serina 473 da proteína Akt, em ilhotas. Por outro lado, quando esses animais foram expostos à

dieta HL, outro fator de risco a saúde, por apenas 6 semanas, houve a mesma redução no grau de fosforilação da Akt em ilhotas, mas acompanhado de prejuízo da sensibilidade periférica à insulina, hiperinsulinemia e perda da capacidade secretória desse hormônio frente ao estímulo da glicose, seguido de intolerância a mesma. As ratas suplementadas com DHEA apresentaram melhora da sensibilidade à insulina, correção da insulinemia e recuperação da resposta secretória das ilhotas.

6 CONCLUSÃO

Nossos dados permitem concluir que o tratamento com DHEA tem um efeito protetor sobre a sensibilidade à insulina e sua secreção estimulada pela glicose, sem alterar a evolução ponderal de ganho de peso, em ratas jovens, privadas dos hormônios gonadais e alimentadas com dieta hiperlipídica

REFERÊNCIAS¹

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diabetes Basics. Disponível em: <<http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diabetes-statistics/>> Acesso em: 22 nov. 2010.

ACKERMANN, S.; HILLER, S.; OSSWALD, H.; LOSLE, M.; GRENZ, A.; HAMBROCK, A. 17beta-Estradiol modulates apoptosis in pancreatic beta-cells by specific involvement of the sulfonylurea receptor (SUR) isoform SUR1. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 8, p. 4905-4913, 2009.

AHREN, B. Type 2 diabetes, insulin secretion and beta-cell mass. **Curr. Mol. Med.**, v. 5, n. 3, p. 275-286, 2005.

AIKIN, R.; ROSENBERG, L.; MAYSINGER, D. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling to Akt mediates survival in isolated canine islets of Langerhans. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 277, n. 2, p. 455-461, 2000.

ALONSO-MAGDALENA, P.; ROPERO, A. B.; CARRERA, M. P.; CEDERROTH, C. R.; BAQUIE, M.; GAUTHIER, B. R.; NEF, S.; STEFANI, E.; NADAL, A. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. **PLoS One**, v. 3, n. 4, p. e2069, 2008.

ANDERSEN, R. E. The spread of the childhood obesity epidemic. **CMAJ**, v. 163, n. 11, p. 1461-1462, 2000.

ARAUJO, E. P.; AMARAL, M. E.; SOUZA, C. T.; BORDIN, S.; FERREIRA, F.; SAAD, M. J.; BOSCHERO, A. C.; MAGALHAES, E. C.; VELLOSO, L. A. Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. **FEBS Lett.**, v. 531, n. 3, p. 437-442, 2002.

BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Therapeutic approaches to preserve islet mass in type 2 diabetes. **Annu. Rev. Med.**, v. 57, p. 265-281, 2006.

BARROS, R. P.; GABBI, C.; MORANI, A.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. Participation of ERalpha and ERbeta in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 297, n. 1, p. E124-133, 2009.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARTOLI, E.; FRA, G. P.; CARNEVALE SCHIANCA, G. P. The oral glucose tolerance test (OGTT) revisited. **Eur. J. Intern. Med.**, v. 22, n. 1, p. 8-12, 2010.

BELGARDT, B. F.; MAUER, J.; BRUNING, J. C. Novel roles for JNK1 in metabolism. **Aging (Albany NY)**, v. 2, n. 9, p. 621-626, 2010.

BEHL C. Oestrogen as a neuroprotective hormone. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 6, n.3, p.433-442, 2002.

BERNAL-MIZRACHI, E.; FATRAI, S.; JOHNSON, J. D.; OHSUGI, M.; OTANI, K.; HAN, Z.; POLONSKY, K. S.; PERMUTT, M. A. Defective insulin secretion and increased susceptibility to experimental diabetes are induced by reduced Akt activity in pancreatic islet beta cells. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n. 7, p. 928-936, 2004.

BONNER-WEIR, S. Life and death of the pancreatic beta cells. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 11, n. 9, p. 375-378, 2000.

BONORA, E.; TARGHER, G.; ALBERICHE, M.; BONADONNA, R. C.; SAGGIANI, F.; ZENERE, M. B.; MONAUNI, T.; MUGGEO, M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v. 23, n. 1, p. 57-63, 2000.

BOXER, R. S.; KLEPPINGER, A.; BRINDISI, J.; FEINN, R.; BURLESON, J. A.; KENNY, A. M. Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on cardiovascular risk factors in older women with frailty characteristics. **Age Ageing**, v. 39, n. 4, p. 451-458, 2010.

BROWN, L. M.; GENT, L.; DAVIS, K.; CLEGG, D. J. Metabolic impact of sex hormones on obesity. **Brain Res.**, v. 1350, p. 77-85, 2006.

BUTLER, A. E.; JANSON, J.; BONNER-WEIR, S.; RITZEL, R.; RIZZA, R. A.; BUTLER, P. C. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 102-110, 2003.

CARNEVALE SCHIANCA, G.P.; SAINAGHI, P.P.; CASTELLO, L.; RAPETTI R.; LIMONCINI, A.M.; BARTOLI, E. Comparison between HOMA-IR and ISI-gly in detecting subjects with the metabolic syndrome. **Diabetes Metab. Res. Ver.**, v. 22, n. 2, p. 111-117, 2006.

CARVALHEIRA, J. B.; RIBEIRO, E. B.; ARAUJO, E. P.; GUIMARAES, R. B.; TELLES, M. M.; TORSONI, M.; GONTIJO, J. A.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. **Diabetologia**, v. 46, n. 12, p. 1629-1640, 2003.

CEFALU, W.T.; WANG, Z.Q.; WERBEL, S.; BELL-FARROW, A.; CROUSE, J.; 3rd, HINSON, W.H.; TERRY, J.G.; ANDERSON, R. Contribution of visceral fat mass to the insulin resistance of aging. **Metabolism**, v.;44, n. 7, p. 954-959, 1995.

CERF, M. E. Transcription factors regulating beta-cell function. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 155, n. 5, p. 671-679, 2006.

CERF, M. E. High fat diet modulation of glucose sensing in the beta-cell. **Med. Sci. Monit.**, v. 13, n. 1, p. RA12-17, 2007.

CHO, H.; MU, J.; KIM, J. K.; THORVALDSEN, J. L.; CHU, Q.; CRENSHAW, E. B., 3RD; KAESTNER, K. H.; BARTOLOMEI, M. S.; SHULMAN, G. I.; BIRNBAUM, M. J. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). **Science**, v. 292, n. 5522, p. 1728-1731, 2001.

CHOI, K.; KIM, Y. B. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. **Korean J. Intern. Med.**, v. 25, n. 2, p. 119-129, 2010.

CHOI, J.; SONG, J. Effect of genistein on insulin resistance, renal lipid metabolism, and antioxidative activities in ovariectomized rats. **Nutrition**, v. 25, n. 6, p. 676-685, 2009.

CHOI, S. B.; JANG, J. S.; PARK, S. Estrogen and exercise may enhance beta-cell function and mass via insulin receptor substrate 2 induction in ovariectomized diabetic rats. **Endocrinology**, v. 146, n. 11, p. 4786-4794, 2005.

CHRISTODOULAKOS, G.; LAMBRINOUDAKI, I.; PANOULIS, C.; SIOULAS, V.; RIZOS, D.; CARAMALIS, G.; BOTSIS, D.; CREATSAS, G. Serum androgen levels and insulin resistance in postmenopausal women: association with hormone therapy, tibolone and raloxifene. **Maturitas**, v. 50, n. 4, p. 321-330, 2005.

CLEARY, M. P.; ZISK, J. F. Anti-obesity effect of two different levels of dehydroepiandrosterone in lean and obese middle-aged female Zucker rats. **Int. J. Obes.**, v. 10, n. 3, p. 193-204, 1986.

CNOP, M.; WELSH, N.; JONAS, J. C.; JORNS, A.; LENZEN, S.; EIZIRIK, D. L. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes**, v. 54, p. S97-107, 2005. Suppl 2.

COHEN, D. A. Neurophysiological pathways to obesity: below awareness and beyond individual control. **Diabetes**, v. 57, n. 7, p. 1768-1773, 2008.

COLEMAN, D. L.; LEITER, E. H.; SCHWIZER, R. W. Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetic mice. **Diabetes**, v. 31, n. 9, p. 830-833, 1982.

CONTRERAS, J. L.; SMYTH, C. A.; BILBAO, G.; YOUNG, C. J.; THOMPSON, J. A.; ECKHOFF, D. E. 17beta-Estradiol protects isolated human pancreatic islets against proinflammatory cytokine-induced cell death: molecular mechanisms and islet functionality. **Transplantation**, v. 74, n. 9, p. 1252-1259, 2002.

D'EON, T. M.; SOUZA, S. C.; ARONOVITZ, M.; OBIN, M. S.; FRIED, S. K.; GREENBERG, A. S. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 43, p. 35983-35991, 2005.

DE HEREDIA, F. P.; CEREZO, D.; ZAMORA, S.; GARAULET, M. Effect of dehydroepiandrosterone on protein and fat digestibility, body protein and muscular composition in high-fat-diet-fed old rats. **Br. J. Nutr.**, v. 97, n. 3, p. 464-470, 2007.

DE SOUZA, C. T.; ARAUJO, E. P.; BORDIN, S.; ASHIMINE, R.; ZOLLNER, R. L.; BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4192-4199, 2005.

DEY, D.; MUKHERJEE, M.; BASU, D.; DATTA, M.; ROY, S. S.; BANDYOPADHYAY, A.; BHATTACHARYA, S. Inhibition of insulin receptor gene expression and insulin signaling by fatty acid: interplay of PKC isoforms therein. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 16, n. 4-6, p. 217-228, 2005.

DILLON, J. S.; YANEY, G. C.; ZHOU, Y.; VOILLEY, N.; BOWEN, S.; CHIPKIN, S.; BLISS, C. R.; SCHULTZ, V.; SCHUIT, F. C.; PRENTKI, M.; WAXMAN, D. J.; CORKEY, B. E. Dehydroepiandrosterone sulfate and beta-cell function: enhanced glucose-induced insulin secretion and altered gene expression in rodent pancreatic beta-cells. **Diabetes**, v. 49, n. 12, p. 2012-220, 2000.

EL SEIFI, S.; GREEN, I. C.; PERRIN, D. Insulin release and steroid-hormone binding in isolated islets of langerhans in the rat: effects of ovariectomy. **J. Endocrinol.**, v. 90, n. 1, p. 59-67, 1981.

EVANS, J. L.; GOLDFINE, I. D.; MADDUX, B. A.; GRODSKY, G. M. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2003.

FORD, K.; SOWERS, M.; CRUTCHFIELD, M.; WILSON, A.; JANNAUSCH, M. A longitudinal study of the predictors of prevalence and severity of symptoms commonly associated with menopause. **Menopause**, v. 12, n. 3, p. 308-317, 2005.

FORYST-LUDWIG, A.; KINTSCHER, U. Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 122, n. 1-3, p. 74-81, 2010.

FRAENKEL-CONRAT, H.L. et al. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. 48, p. 333-337, 1941.

GADE, W.; SCHMIT, J.; COLLINS, M.; GADE, J. Beyond obesity: the diagnosis and pathophysiology of metabolic syndrome. **Clin. Lab. Sci.**, v. 23, n. 1, p. 51-61; quiz 62-65, 2010.

GALLO, D.; ZANNONI, G.F.; , APOLLONIO, P.; MARTINELLI, E.; FERLINI, C.; PASSETTI, G.; RIVA, A.; MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E.; SCAMBIA, G.; Characterization of the pharmacologic profile of a standardized soy extract in the ovariectomized rat model of menopause: effects on bone, uterus, and lipid profile. **Menopause**, v. 12, n. 5, p.589-600, 2005.

GASPARD, U. Hyperinsulinaemia, a key factor of the metabolic syndrome in postmenopausal women. **Maturitas**, v. 62, n. 4, p. 362-365, 2009.

GEER, E. B.; SHEN, W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. **Gend. Med.**, v. 6, p. 60-75, 2009. Suppl 1.

GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M. A. Laboratorial evaluation and diagnosis of insulin resistance. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 50, n. 2, p. 208-215, 2006.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G. The pharmacological basis of therapeutics. 11. ed. Toronto: McGraw-hill, 2006.

GRACIANO, M. F.; NOGUEIRA, T. C.; CARVALHO, C. R.; CURI, R.; CARPINELLI, A. R. Palmitate activates insulin signaling pathway in pancreatic rat islets. **Pancreas**, v. 38, n. 5, p. 578-584, 2009.

HEINE, P. A.; TAYLOR, J. A.; IWAMOTO, G. A.; LUBAHN, D. B.; COOKE, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 97, n. 23, p. 12729-127234, 2000.

HILL, J. O. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. **Endocr. Rev.**, v. 27, n. 7, p. 750-761, 2006.

HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L.; GORGUN, C. Z.; UYSAL, K. T.; MAEDA, K.; KARIN, M.; HOTAMISLIGIL, G. S. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 333-336, 2002.

HONG, J. STUBBINS RE, Smith RR, Harvey AE, Núñez NP. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. **Nutr. J.**, v. 8, p. 11, 2009.

HOLST, B.; EGEROD, K. L.; JIN, C.; PETERSEN, P. S.; OSTERGAARD, M. V.; HALD, J.; SPRINKEL, A. M.; STORLING, J.; MANDRUP-POULSEN, T.; HOLST, J.

J.; THAMS, P.; ORSKOV, C.; WIERUP, N.; SUNDLER, F.; MADSEN, O. D.; SCHWARTZ, T. W. G protein-coupled receptor 39 deficiency is associated with pancreatic islet dysfunction. **Endocrinology**, v. 150, n. 6, p. 2577-2585, 2009.

HOUSSAY, B. A.; FOGLIA, V. G.; RODRIGUEZ, R. R. Production or prevention of some types of experimental diabetes by oestrogens or corticosteroids. **Acta Endocrinol. (Copenh.)**, v. 17, n. 1-4, p. 146-164, 1954.

JETTON, T. L.; LAUSIER, J.; LAROCK, K.; TROTMAN, W. E.; LARMIE, B.; HABIBOVIC, A.; PESHAVARIA, M.; LEAHY, J. L. Mechanisms of compensatory beta-cell growth in insulin-resistant rats: roles of Akt kinase. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2294-2304, 2005.

KANAYA, A. M.; HERRINGTON, D.; VITTINGHOFF, E.; LIN, F.; BITTNER, V.; CAULEY, J. A.; HULLEY, S.; BARRETT-CONNOR, E. Impaired fasting glucose and cardiovascular outcomes in postmenopausal women with coronary artery disease. **Ann. Intern. Med.**, v. 142, n. 10, p. 813-820, 2005.

KIM, J. K.; FILLMORE, J. J.; SUNSHINE, M. J.; ALBRECHT, B.; HIGASHIMORI, T.; KIM, D. W.; LIU, Z. X.; SOOS, T. J.; CLINE, G. W.; O'BRIEN, W. R.; LITTMAN, D. R.; SHULMAN, G. I. PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n. 6, p. 823-827, 2004.

KUBOTA N.; TOBE K.; TERAUCHI Y.; ETO K.; YAMAUCHI T.; SUZUKI R.; TSUBAMOTO Y.; KOMEDA K.; NAKANO R.; MIKI H.; SATOH S.; SEKIYAMA H.; SCACCHITANO S.; LESNIAK M.; AIZAWA S.; NAGAI R.; KIMURA S.; AKANUMA Y.; TAYLOR S.I.; KADOWAKI T. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. **Diabetes**, v. 49, n.11, p. 1880-1889, 2000.

KULIK, G.; KLIPPEL, A.; WEBER, M. J. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. **Mol. Cell. Biol.**, v. 17, n. 3, p. 1595-1606, 1997.

KULKARNI, R. N.; WINNAY, J. N.; DANIELS, M.; BRUNING, J. C.; FLIER, S. N.; HANAHAN, D.; KAHN, C. R. Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. **J. Clin. Invest.**, v. 104, n. 12, p. R69-75, 1999.

KULKARNI R.N. Receptors for insulin and insulin-like growth factor-1 and insulin receptor substrate-1 mediate pathways that regulate islet function. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 30, n. 2, p. 317-322, 2002.

KUMAGAI, S.; HOLMANG, A.; BJORNTORP, P. The effects of oestrogen and progesterone on insulin sensitivity in female rats. **Acta Physiol Scand.** v. 149, n. 1, p. 91-97, 1993.

- LABRIE, F. Intracrinology. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 78, n. 3, p. C113-118, 1991.
- LACY, P. E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, v. 16, n. 1, p. 35-39, 1967.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LAWRENCE, M.; SHAO, C.; DUAN, L.; MCGLYNN, K.; COBB, .H. The protein kinases ERK1/2 and their roles in pancreatic beta cells. **Acta. Physiol.**, v.192, n. 1, p. 11-17, 2008.
- LE MAY, C.; CHU, K.; HU, M.; ORTEGA, C. S.; SIMPSON, E. R.; KORACH, K. S.; TSAI, M. J.; MAUVAIS-JARVIS, F. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 103, n. 24, p. 9232-9237, 2006.
- LEBLANC, A. J.; REYES, R.; KANG, L. S.; DAILEY, R. A.; STALLONE, J. N.; MONINGKA, N. C.; MULLER-DELP, J. M. Estrogen replacement restores flow-induced vasodilation in coronary arterioles of aged and ovariectomized rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 297, n. 6, p. R1713-1723, 2009.
- LEIBIGER, I. B.; LEIBIGER, B.; MOEDE, T.; BERGGREN, P. O. Exocytosis of insulin promotes insulin gene transcription via the insulin receptor/PI-3 kinase/p70 s6 kinase and CaM kinase pathways. **Mol. Cell.**, v. 1, n. 6, p. 933-938, 1998.
- LINGOHR, M. K.; BUETTNER, R.; RHODES, C. J. Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? **Trends Mol. Med.**, v. 8, n. 8, p. 375-384, 2002.
- LIU, M. L.; XU, X.; RANG, W. Q.; LI, Y. J.; SONG, H. P. Influence of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function. **Int. J. Cardiol.**, v. 97, n. 3, p. 485-493, 2004.
- LOIS, K.; VALSAMAKIS, G.; MASTORAKOS, G.; KUMAR, S. The impact of insulin resistance on woman's health and potential treatment options. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1205, p. 156-165, 2010.
- LOVEJOY, J. C.; CHAMPAGNE, C. M.; DE JONGE, L.; XIE, H.; SMITH, S. R. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. **Int. J. Obes. (Lond)**, v. 32, n. 6, p. 949-958, 2008.
- MANINGER, N.; WOLKOWITZ, O. M.; REUS, V. I.; EPEL, E. S.; MELLON, S. H. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). **Front Neuroendocrinol.**, v. 30, n. 1, p. 65-91, 2009.

MASTORAKOS, G.; VALSAMAKIS, G.; PALTOGLOU, G.; CREATSAS, G. Management of obesity in menopause: diet, exercise, pharmacotherapy and bariatric surgery. **Maturitas.**, v. 65, n. 3, p. 219-224, 2010.

MEDINA, M. C.; SOUZA, L. C.; CAPERUTO, L. C.; ANHE, G. F.; AMANSO, A. M.; TEIXEIRA, V. P.; BORDIN, S.; CARPINELLI, A. R.; BRITTO, L. R.; BARBIERI, R. L.; BORELLA, M. I.; CARVALHO, C. R. Dehydroepiandrosterone increases beta-cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. **FEBS Lett.**, v. 580, n. 1, p. 285-290, 2006.

MEYER, M. R.; CLEGG, D. J.; PROSSNITZ, E. R.; BARTON, M. Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors. **Acta Physiol. (Oxf.)**, v. 202, 2011. In press.

MIZUNO, A.; NOMA, Y.; KUWAJIMA, M.; MURAKAMI, T.; ZHU, M.; SHIMA, K. Changes in islet capillary angioarchitecture coincide with impaired B-cell function but not with insulin resistance in male Otsuka-Long-Evans-Tokushima fatty rats: dimorphism of the diabetic phenotype at an advanced age. **Metabolism**, v. 48, n. 4, p. 477-483, 1999.

MOESCHEL, K.; BECK, A.; WEIGERT, C.; LAMMERS, R.; KALBACHER, H.; VOELTER, W.; SCHLEICHER, E. D.; HARING, H. U.; LEHMANN, R. Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 24, p. 25157-25163, 2004.

MOHAN, P. F.; IHNEN, J. S.; LEVIN, B. E.; CLEARY, M. P. Effects of dehydroepiandrosterone treatment in rats with diet-induced obesity. **J. Nutr.**, v. 120, n. 9, p. 1103-1114, 1990.

MORIMOTO, S.; MORALES, A.; ZAMBRANO, E.; FERNANDEZ-MEJIA, C. Sex steroids effects on the endocrine pancreas. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 122, n. 4, p. 107-113, 2010.

MUKASA, K.; KANESIRO, M.; AOKI, K.; OKAMURA, J.; SAITO, T.; SATOH, S.; SEKIHARA, H. Dehydroepiandrosterone (DHEA) ameliorates the insulin sensitivity in older rats. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** v. 67, n. 4, p. 355-358, 1998.

NADAL, A.; ALONSO-MAGDALENA, P.; SORIANO, S.; RIPOLL, C.; FUENTES, E.; QUESADA, I.; ROPERO, A. B. Role of estrogen receptors alpha, beta and GPER1/GPR30 in pancreatic beta-cells. **Front Biosci.**, v. 16, p. 251-260, 2011.

NADAL, A.; ALONSO-MAGDALENA, P.; SORIANO, S.; ROPERO, A. B.; QUESADA, I. The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. **J. Physiol.**, v. 587, pt. 21, p. 5031-5037, 2009.

NGUYEN, D. M.; EL-SERAG, H. B. The epidemiology of obesity. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 39, n. 1, p. 1-7, 2010.

PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; DE SOUZA, C. T.; DA SILVA, A. S.; MORAES, J. C.; PRADA, P. O.; DE ALMEIDA LEME, J. A.; LUCIANO, E.; VELLOSO, L. A.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J. Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. **Mech. Ageing Dev.**, v. 131, n. 5, p. 323-329, 2010.

PORZIO, O.; FEDERICI, M.; HRIBAL, M. L.; LAURO, D.; ACCILI, D.; LAURO, R.; BORBONI, P.; SESTI, G. The Gly972-->Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. **J. Clin. Invest.**, v. 104, n. 3, p. 357-364, 1999.

PRADA, P. O.; ZECCHIN, H. G.; GASPARETTI, A. L.; TORSONI, M. A.; UENO, M.; HIRATA, A. E.; COREZOLA DO AMARAL, M. E.; HOER, N. F.; BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. J. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1576-1587, 2005.

RACHON, D.; TEEDE, H. Ovarian function and obesity--interrelationship, impact on women's reproductive lifespan and treatment options. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 316, n. 2, p. 172-179, 2010.

RANDLE, P. J. Mechanism modifying glucose oxidation in diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 37, p. 155-161, 1994.

REGELSON, W.; KALIMI, M. Dehydroepiandrosterone (DHEA)--the multifunctional steroid. II. Effects on the CNS, cell proliferation, metabolic and vascular, clinical and other effects. Mechanism of action? **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 719, p. 564-575, 1994.

RIANT, E.; WAGET, A.; COGO, H.; ARNAL, J.; BURCELIN, R.; GOURDY, P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2109-2117, 2009.

RISERUS, U. Fatty acids and insulin sensitivity. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, v. 11, n. 2, p. 100-105, 2008.

ROGERS N.H.; PERFIELD J.W.; STRISSEL K.J.; OBIN M.S.; GREENBERG A.S.; **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2161-2168, 2009.

ROPERO, A. B.; ALONSO-MAGDALENA, P.; QUESADA, I.; NADAL, A. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. **Steroids**, v. 73, n. 9-10, p. 874-879, 2008.

SAAD, M. J. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 4, p. 941-957, 1994.

SACCO, S. M.; WARD, W. E. Revisiting estrogen: efficacy and safety for postmenopausal bone health. **J. Osteoporos.**, v. 2010, p. 708931, 2010.

SANCHEZ, J.; PEREZ-HEREDIA, F.; PRIEGO, T.; PORTILLO, M. P.; ZAMORA, S.; GARAULET, M.; PALOU, A. Dehydroepiandrosterone prevents age-associated alterations, increasing insulin sensitivity. **J. Nutr. Biochem.**, v. 19, n. 12, p. 809-818, 2008.

SARAC, F.; SAYDAM, G.; SAHIN, F.; OZTEKIN, K.; SAYGILI, F.; TUZUN, M.; YILMAZ, C. Effects of hormone replacement therapy on insulin resistance and platelet function tests. **Med. Princ. Pract.**, v. 18, n. 1, p. 43-47, 2009.

SOLTYS, C.L.; BUCHHOLZ, L.; GANDHI, M.; CLANACHAN, A.S.; WALSH, K.; DYCK, J.R. Phosphorylation of cardiac protein kinase B is regulated by palmitate. v. 283, n. 3, p. :H1056-H1064, 2002.

SPELLMAN, C. W. Pathophysiology of type 2 diabetes: targeting islet cell dysfunction. **J. Am. Osteopath Assoc.**, v. 110, n. 3, p. S2-7, 2010. Suppl 2.

STEVENS, J.; KATZ E.G.; HUXLEY R.R. Associations between gender, age and waist circumference. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.64, n.1, p. 6-15, 2010.

STUMVOLL, M.; FRITSCHKE, A.; HÄRING, H. The ogtt as test for beta cell function? **eur. J. clin. invest.**, V.31, n. 5, p. 380-381, 2001.

TAKEDA, K.; TODA, K.; SAIBARA, T.; NAKAGAWA, M.; SAIKA, K.; ONISHI, T.; SUGIURA, T.; SHIZUTA, Y. Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. **J. Endocrinol.**, v. 176, n. 2, p. 237-246, 2003.

TEEDE, H. J.; LOMBARD, C.; DEEKS, A. A. Obesity, metabolic complications and the menopause: an opportunity for prevention. **Climacteric**, v. 13, n. 3, p. 203-209, 2010.

TERAUCHI, Y.; TAKAMOTO, I.; KUBOTA, N.; MATSUI, J.; SUZUKI, R.; KOMEDA, K.; HARA, A.; TOYODA, Y.; MIWA, I.; AIZAWA, S.; TSUTSUMI, S.; TSUBAMOTO, Y.; HASHIMOTO, S.; ETO, K.; NAKAMURA, A.; NODA, M.; TOBE, K.; ABURATANI, H.; NAGAI, R.; KADOWAKI, T. Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 1, p. 246-257, 2007.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.76, n.9, p. 43050-43054, 1979.

TSAI, Y. C.; LEE, Y. M.; LAM, K. K.; WU, Y. C.; YEN, M. H.; CHENG, P. Y. The role of hypothalamic AMP-activated protein kinase in ovariectomy-induced obesity in rats. **Menopause**, v. 17, n. 6, p. 1194-1200, 2010.

TURNER, R. T.; RIGGS, B. L.; SPELSBERG, T. C. Skeletal effects of estrogen. **Endocr. Rev.**, v. 15, n. 3, p. 275-300, 1994.

TUTTLE, R. L.; GILL, N. S.; PUGH, W.; LEE, J. P.; KOEBERLEIN, B.; FURTH, E. E.; POLONSKY, K. S.; NAJI, A.; BIRNBAUM, M. J. Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. **Nat. Med.**, v. 7, n. 10, p. 1133-1137, 2001.

VELLOSO, L. A.; ARAUJO, E. P.; DE SOUZA, C. T. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 3, p. 189-193, 2008.

VOGIATZI, M. G.; BOECK, M. A.; VLACHOPAPADOPOULOU, E.; EL-RASHID, R.; NEW, M. I. Dehydroepiandrosterone in morbidly obese adolescents: effects on weight, body composition, lipids, and insulin resistance. **Metabolism**, v. 45, n. 8, p. 1011-1015, 1996.

VON DIEMEN, V.; TRINDADE, E. N.; TRINDADE, M. R. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 21, n. 6, p. 425-429, 2006.

WANG, Q.; JIN, T. The role of insulin signaling in the development of beta-cell dysfunction and diabetes. **Islets**, v. 1, n. 2, p. 95-101, 2009.

WANG, Q.; LI, L.; XU, E.; WONG, V.; RHODES, C.; BRUBAKER, P. L. Glucagon-like peptide-1 regulates proliferation and apoptosis via activation of protein kinase B in pancreatic INS-1 beta cells. **Diabetologia**, v. 47, n. 3, p. 478-487, 2004.

WAXMAN, D. J. Role of metabolism in the activation of dehydroepiandrosterone as a peroxisome proliferator. **J. Endocrinol.**, v. 150, p. S129-147, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. **World Health Organ. Tech. Rep. Ser.**, v. 894, p. i-xii, 1-253, 2000.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WITHERS, D. J.; GUTIERREZ, J. S.; TOWERY, H.; BURKS, D. J.; REN, J. M.; PREVIS, S.; ZHANG, Y.; BERNAL, D.; PONS, S.; SHULMAN, G. I.; BONNER-WEIR, S.; WHITE, M. F. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**, v. 391, n. 6670, p. 900-904, 1998.

YAMADA, J.; SAKUMA, M.; SUGA, T. Induction of peroxisomal beta-oxidation enzymes by dehydroepiandrosterone and its sulfate in primary cultures of rat hepatocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1137, n. 2, p. 231-236, 1992.

YAN, M. X.; LI, Y. Q.; MENG, M.; REN, H. B.; KOU, Y. Long-term high-fat diet induces pancreatic injuries via pancreatic microcirculatory disturbances and oxidative stress in rats with hyperlipidemia. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 347, n. 1, p. 192-199, 2006.

YANG, X. P.; RECKELHOFF, J. F. Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 20, n. 2, p. 133-138, 2010.

YEN, T. T.; ALLAN, J. A.; PEARSON, D. V.; ACTON, J. M.; GREENBERG, M. M. Prevention of obesity in Avy/a mice by dehydroepiandrosterone. **Lipids**, v. 12, n. 5, p. 409-413, 1977.

ZHANG, L.; LI, B.; MA, W.; BARKER, J. L.; CHANG, Y. H.; ZHAO, W.; RUBINOW, D. R. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated derivative (DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the Akt signaling pathway in opposing ways. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 98, n. 1-2, p. 58-66, 2002.

ZIERATH, J. R.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. From receptor to effector: insulin signal transduction in skeletal muscle from type II diabetic patients. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 967, p. 120-134, 2002.

ANEXO A - Evolução do peso corporal das ratas

Figura A.1 - Evolução do peso corporal dos animais controle (SHAM, n=10), controle + DHEA (SD, n=8), ovariectomizado (OVX, n=10) e ovariectomizado + DHEA (OVX+ DHEA, n=7) ao longo de 11 semanas. * OVX e OVX + DHEA versus SHAM e SHAM + DHEA. $p < 0,05$.

Figura A.2 - Evolução do peso corporal dos animais controle (SHAM, n=10), controle + dieta HL (SHL, n=8), ovariectomizado (OVX, n=10) + ovariectomizado + dieta HL (OHL, n=7) e ovariectomizado + dieta HL + DHEA (OHLD, n=7) ao longo de 6 semanas. *SHAM vs OHL, $p < 0,01$; # SHAM vs OVX, $p < 0,01$; \$ SHL vs OHL, $P < 0,05$; @ SHAM vs OHLD, $P < 0,01$.