

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Fisiologia**

ESTUDO DA AÇÃO ESTIMULATÓRIA DE ANDRÓGENOS SOBRE O
TRANSPORTE DE CÁLCIO E A SECREÇÃO DE INSULINA EM
CÉLULA β DE PÂNCREAS DE RATO

MARCELO DE LACERDA GRILLO

ORIENTADOR

PROF^a DRA. ROSELIS SILVEIRA MARTINS DA SILVA

CO-ORIENTADOR

PROF. DR. GUILLERMO FEDERICO WASSERMANN

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor.

Porto Alegre, junho de 2011

“Embora ninguém possa voltar atrás
e fazer um novo começo,
Qualquer Um pode começar agora
e fazer um novo fim.”

Emmanuel

À Ana Paula Jacobus,
presente desde o princípio.

À Maria Lúcia Scrofernecker
e Medianeira Aparecida Pereira Goulart,
que muito lutaram para que este momento se concretizasse.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Guillermo Federico Wassermann, no mínimo pela paciência.

A Prof^ª. Dra. Roselis Silveira da Silva, pela grandeza em aceitar esta orientação, atitude esta que não me surpreendeu.

A Prof^ª. Dra. Maria Marques, por sua grandeza e exemplo.

A Prof^ª Dra. Eloísa Loss, por sua participação eficiente e engajada durante desenrolar dos experimentos.

Aos anjos que Deus colocou na minha vida: Chris Krebs Danilevicz, Débora Olmedo Rodrigues, Fernanda do Amaral, Luciane Cerioli, e Rebeca Zannini, exatamente por isto - por serem anjos.

Às amigas Prof^ª Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro e Prof^ª Dra Adriane Belló Klein, pela torcida sempre positiva para que este momento chegasse.

A Prof^ª Dra. Helena Barros, da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, pela gentileza em nos propiciar os animais para a experimentação e ao Mário Gomes, sempre atento, responsável pela manutenção do biotério dessa instituição.

Ao Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, nas pessoas do Dr. José Romildo de Jesus e Dra. Joisa Lins Camargo, pela gentileza em disponibilizar as dosagens de radioimunoensaio.

A Rosana Scalco, outro anjo, que executou as exaustivas dosagens de radioimunoensaio sempre com serenidade e excelente disposição.

A Prof^ª Dra. Célia Carlini, Departamento de Biofísica da UFRGS, e ao Dr. German Wassermann, por disponibilizarem as dependências e equipamentos do Laboratório de Proteínas Tóxicas para sonicação das amostras.

Ao Alexandre Brandelli , da BIOENSAIOS – Análises e Consultoria Ambiental Ltda, amigo de sempre, por nos possibilitar a dosagem de amostras radioativas em sua instituição.

Às bibliotecárias da Biblioteca do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Antonieta Romano de Souza e Dirce Maria Santin, pela pronta e eficiente e disposição na orientação bibliográfica.

À Comissão do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia, e em especial, a Prof^a Ilma Simone Brum da Silva, por ter feito sempre o possível para a concretização deste Doutorado.

A Uiraçara Vilarinho da Silva, pela colaboração e eficiência constante.

A nossa Elsa Silva Pires, pólo de harmonia no Laboratório.

A Alice Ferreira Machado e a Rita Alves Pereira, pelo carinho.

Às seguintes instituições pelo apoio financeiro: CNPq, CAPES, FAPERGS e PROPESQ-UFRGS.

Aos meus pais Jeronymo Filippozzi Grillo (*in memoriam*) e Amazília Maria de Lacerda Grillo, por tudo.

Aos meus irmãos Paulo, Jacqueline e Jeanine, na torcida até o fim.

Ao Arthur e ao Henrique, motivo de vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	12
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	19
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	23
1.1. CONTROLE HOMEOSTÁTICO DA GLICEMIA.....	23
1.2. PÂNCREAS ENDÓCRINO.....	25
1.3. MECANISMO DE SÍNTESE E LIBERAÇÃO DA INSULINA	27
1.3.1. Síntese e Liberação de Insulina.....	27
1.4. CANAL DE K ⁺ DEPENDENTE DE ATP E A SECREÇÃO DE INSULINA.....	32
1.5. CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM (CCDV).....	38
1.5.1. Canais de Cálcio dependentes de voltagem Ca _{v1} (Tipo L).....	39
1.5.2. Canais de cálcio e a célula β.....	40
1.6. REGULAÇÃO FISIOLÓGICA DA SECREÇÃO DE INSULINA.....	41
1.6.1. Nutrientes.....	41
1.6.2. Efeito incretina e hormônios.....	44
1.6.3. Sistema nervoso autônomo.....	45
1.6.4. Ação parácrina das células da ilhota pancreática.....	46
1.7. TESTOSTERONA E AÇÃO NÃO CLÁSSICA.....	48
1.7.1. Efeitos da testosterona sobre a membrana de diferentes células.....	53
1.8. ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS E NANDROLONA.....	58
2. <u>HIPÓTESE DE TRABALHO</u>	61
3. <u>OBJETIVOS</u>	62
3.1. OBJETIVO GERAL.....	62
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	62
4. <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	63
4.1. ANIMAIS.....	63
4.2. SOLUÇÃO- TAMPÃO KREBS-RINGER BICARBONATO (KRB).....	63
4.3. ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	64
4.4. EXPERIMENTOS DE SECREÇÃO DE INSULINA.....	67
4.4.1. Em presença de concentrações crescentes de glicose.....	67

4.4.2. Em presença de testosterona, testosterona ligada à albumina sérica bovina (T-BSA), nandrolona, estradiol ou progesterona.....	68
4.4.3. Em presença de aminoácidos	69
4.4.3.1. <i>Em presença de alanina</i>	69
4.4.3.2. <i>Em presença de mistura de aminoácidos</i>	70
4.5. EXPERIMENTOS DE TRANSPORTES.....	70
4.5.1. Captação de aminoácidos.....	70
4.5.2. Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	71
4.5.2.1. <i>Em presença de concentrações crescentes de glicose</i>	73
4.5.2.2. <i>Em presença de nifedipina, diazoxida, glibenclamida ou tolbutamida</i>	73
4.5.2.3. <i>Em presença do inibidor da fosfolipase C U73122</i>	74
4.6. QUANTIFICAÇÃO DE INSULINA.....	75
4.7. DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	75
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
5. <u>RESULTADOS</u>	77
5.1. EFEITO DA TESTOSTERONA SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA EM ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	77
5.1.1. Influência da glicose na ação da testosterona sobre a secreção de insulina.....	77
5.1.2. Curva dose-resposta de testosterona sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas.....	78
5.1.3. Ação da testosterona, da testosterona ligada à albumina (T-BSA), do 17β -estradiol e da progesterona sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas.....	80
5.2. EFEITO DE AMINOÁCIDOS NA AÇÃO ESTIMULATÓRIA DA TESTOSTERONA E DA NANDROLONA SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA.....	81
5.2.1. Efeito da alanina na ação da testosterona e da nandrolona sobre a secreção de insulina.....	81
5.2.2. Efeito da mistura de aminoácidos (MIX) na ação da testosterona sobre a secreção de insulina.....	83

5.3. EFEITO DA TESTOSTERONA SOBRE O TRANSPORTE DE AMINOÁCIDO NÃO METABOLIZÁVEL EM ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	84
5.3.1. Ação da testosterona sobre o transporte de aminoácido não metabolizável em ilhotas pancreáticas.....	84
5.4. EFEITO DA TESTOSTERONA SOBRE A CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ EM ILHOTAS PANCREÁTICAS, PAPEL DOS CANAIS DE Ca^{2+} TIPO L.....	85
5.4.1. Influência da glicose na ação da testosterona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	85
5.4.2. Efeito do bloqueador de canais de Ca^{2+} tipo L, nifedipina, sobre a ação estimulatória da testosterona na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	86
5.5. PAPEL DOS CANAIS K_{ATP} NA AÇÃO DA TESTOSTERONA E DA NANDROLONA SOBRE A CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ EM ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	87
5.5.1. Efeito do estimulador da abertura de canais K_{ATP} , diazoxida, na ação da testosterona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas.....	87
5.5.2. Ação de andrógenos e de sulfoniluréias sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas.....	88
5.6. PAPEL DA FOSFOLIPASE C NA AÇÃO DA TESTOSTERONA SOBRE A CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ EM ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	89
5.6.1. Efeito do inibidor da fosfolipase C, U73122, na ação da testosterona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	89
6. <u>DISCUSSÃO DE RESULTADOS</u>	90
7. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	102
8. <u>APÊNDICE</u> : Artigo submetido	132

LISTA DE ABREVIATURAS

α : alfa
 β : beta
 γ : gama
 δ : delta
 Am: atomolar
 $^{45}\text{Ca}^{2+}$: íon cálcio marcado radiotivamente
 ADP: adenosina difosfato
 AGL: ácido graxo livre
 AMPc: adenosina monofosfato cíclica
 AR: receptor de androgênio
 ATP: adenosina trifosfato
 ATP/ADP: relação ou proporção entre ATP e ADP
 $^{\circ}\text{C}$: grau centígrado
 ^{14}C : radioisótopo carbono 14
 ^{14}C]MeAIB: [1- ^{14}C] ácido α -metil aminoisobutírico
 Ca^{2+} : íon cálcio
 $^{45}\text{Ca}^{2+}$: radioisótopo cálcio 45
 $[\text{Ca}^{2+}]_i$: concentração de íon cálcio intracelular
 Ca_v : a letra v indica a subunidade α do canal de cálcio dependente de voltagem
 CCDV: Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem
 CCK: colecistocinina
 ^{60}Co : radioisótopo cobalto 60
 CPT1: carnitina palmitoiltransferase I
 CREB: proteína ligadora do elemento de resposta do AMPc (*cAMP response element binding protein*)
 DAG: diacilglicerol
 DMSO: dimetilsulfóxido
 DNA: ácido desoxirribonucleico
 ERK: quinase regulada por sinal extracelular (*extracellular signal-regulated kinase*)
 Fig: figura
 FITC: isotiocianato de fluoresceína
 FSH: hormônio estimulante do folículo
 g: grama
 G: gravidade
 G_{α} : subunidade α da proteína G
 $G_{\beta\gamma}$: subunidades β e γ da proteína G
 G_q : proteína G ativadora de fosfolipase C
 g/L: grama por litro
 GABA: ácido gama-aminobutírico
 GDH: glutamato desidrogenase
 GIP: peptídeo insulínico dependente de insulina ou peptídeo inibidor gástrico
 GLP-1: peptídeo semelhante ao glucagon do tipo 1
 GLUT: transportador de glicose
 GPCR: receptor acoplado à proteína G
 GRP: peptídeo liberador de gastrina
 H^+ : íon hidrogênio
 iAR: receptor intracelular clássico de andrógenos

IP₃: inositol-3,4,5-trifosfato
 K⁺: íon potássio
 K_{ATP}: canal de potássio dependente de ATP
 Kir: subunidade do canal K_{ATP} formadora do poro
 Km: constante de Michaelis-Menten
 KRb: solução-tampão de Krebs-Ringer bicarbonato
 LH: hormônio luteinizante
 M: molar
 MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno (*mitogen activate protein kinase*)
 Mg²⁺: íon magnésio
 MgADP: magnésio ligado à adenosina difosfato
 M: molar
 mCi.mg⁻¹: milicurie por miligrama
 mg: miligrama
 min: minuto
 MIX: mistura dos aminoácidos glutamina, lisina, alanina e leucina
 MIX2: duas vezes a concentração de MIX.
 MIX4: quatro vezes a concentração de MIX.
 mL: Mililitros
 mm: milímetro
 mM: Milimolar
 mM.L⁻¹: milimolar por litro
 N: normal
 NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
 NBF: sítio de ligação a nucleotídeo (*nucleotide-binding fold*)
 ng: nanograma
 ng.mg⁻¹: nanograma por miligrama
 nm: nanômetro
 nM: nanomolar
 PACAP: peptídeo pituitário ativador da adenilato ciclase
 pH: potencial de hidrogênios
 PIP2: fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato
 PKA: proteína cinase A
 PKC: proteína cinase C
 PLC: fosfolipase C
 pmol: picomolar
 pmol.mg⁻¹: picomolar por miligrama
 RE: retículo endoplasmático
 REr: retículo endoplasmático rugoso
 RIA: radioimunoensaio
 RNAm: ácido ribonucléico mensageiro
 RPP: grupo prontamente disponível (*readily releasable pool*)
 SNARES: *SNAP Receptors*, onde SNAP: *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein*
 SUR: receptor de sulfoniluréia
 T-BSA: testosterona ligada à albumina sérica bovina
 TM: região transmembrana
 U73122: inibidor da fosfolipase C
 VIP: peptídeo intestinal vasoativo

v/v: volume por volume

WA: sequência (motivo) Walker A

WB: sequência (motivo) Walker B

Zn²⁺: íon zinco

μCi: microCurie

μL: microlitro

μm: micrômetro

μM: micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Modelo esquemático da síntese e transporte subcelular da pró-insulina e secreção de insulina, peptídeo C e pró-insulina pelas vias secretória e “constitutiva” (STEINER et al., 2001).

Figura 1.2: Dissociação entre fusão do grânulo e evacuação do seu interior.

Figura 1.3: Envolvimento do canal K_{ATP} no estímulo da glicose sobre a secreção de insulina e sua estrutura.

Figura 1.4: Representações do Ca_{v1} e suas subunidades.

Figura 1.5: Modelo para a regulação da secreção de insulina na célula β estimulada por glicose e aminoácidos.

Figura 1.6: Interações entre os produtos de secreção dos principais tipos de células da ilhota.

Figura 1.7: Via biossintética de andrógenos.

Figura 1.8: Vias de sinalização não-clássicas da testosterona na célula de Sertoli.

Figura 1.9: Estrutura e metabolismo da nandrolona.

Figura 4.A. Exposição do abdome.

Figura 4.B. Dissecção do ducto biliar.

Figura 4.C. Ducto biliar dissecado.

Figura 4.D. Ligadura do ducto biliar próximo ao duodeno.

Figura 4.E. Canulação do ducto biliar.

Figura 4.F. Pâncreas distendido.

Figura 4.G. Pâncreas removido para uma placa de Petri.

Figura 5.1.1: Efeito da testosterona sobre a secreção de insulina em presença de diferentes concentrações de glicose.

Figura 5.1.2.A: Curva dose-resposta de testosterona sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas.

Figura 5.1.2.B: Percentagem da curva dose-resposta de testosterona sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas.

Figura 5.1.3: Ação da testosterona, da testosterona ligada à albumina (T-BSA), do 17β -estradiol e da progesterona sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas.

Figura 5.2.1.A: Comparação dos efeitos estimulatórios de testosterona e alanina sobre a secreção de insulina.

Figura 5.2.1.B: : Comparação dos efeitos estimulatórios de nandrolona e alanina sobre a secreção de insulina.

Figura 5.2.2: Efeito da testosterona sobre a secreção de insulina quando associado com diferentes concentrações de mistura de aminoácidos (MIX).

Figura 5.3.1: Ação da testosterona sobre o transporte de aminoácido não metabolizável em ilhotas pancreáticas.

Figura 5.4.1: Efeito da testosterona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em presença de diferentes concentrações de glicose.

Figura 5.4.2: Efeito antagonista do bloqueador de canais de Ca^{2+} tipo L, nifedipina, sobre a ação estimulatória da testosterona na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

Figura 5.5.1: Efeito antagonista da diazoxida sobre a ação estimulatória da testosterona na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas.

Figura 5.5.2: Ação de andrógenos e de sulfoniluréias sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas.

Figura 5.6.1: Efeito antagonista do inibidor da fosfolipase C, U73122, sobre a ação estimulatória da testosterona na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

Figura 6: Mecanismo proposto para a estimulação da secreção de insulina e da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por testosterona e nandrolona na célula β .

Tabela 4.1: Composição salina e concentrações presentes nas soluções estoque de KRb e na solução final.

RESUMO

Em homens, os níveis de testosterona e de testosterona biodisponível (livre e a ligada à albumina) declinam com a idade, apresentando elevado risco de desenvolver resistência à insulina e diabetes tipo II. Já foi demonstrada a ação clássica (efeito genômico) da testosterona sobre a síntese e a liberação de insulina em pâncreas de rato. Os objetivos do presente trabalho são determinar: 1) a ação não clássica específica da testosterona, da nandrolona e de outros esteróides sexuais sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos machos adultos; 2) a influência de aminoácidos sobre esta ação; 3) a ação da testosterona sobre o transporte de aminoácidos; 4) a participação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L e dos canais K_{ATP} na ação da testosterona e da nandrolona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$; 5) a participação da via da fosfolipase C na ação da testosterona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. As ilhotas foram isoladas de pâncreas de 3 ratos Wistar machos (pesando 180-220g) por experimento pela técnica de Lacy e Kostianovsky (**Diabetes**, 16:35-39, 1967). Nos experimentos de secreção de insulina, amostras de 10 μL de ilhotas isoladas foram pré-incubadas por 30 minutos e incubadas por 3 minutos em presença ou não de testosterona (1 μM), T-BSA (1 μM), nandrolona (1 μM), 17 β -estradiol (10 nM) ou progesterona (1 μM) em um incubador metabólico Dubnoff em tampão KRb-HEPES com glicose 3 mM a 37°C, pH 7,4 e gaseificação constante com carbogênio ($\text{O}_2:\text{CO}_2$; 95:5; v/v). Nos experimentos com glutamina, lisina, alanina e leucina, as ilhotas eram incubadas por mais 3 minutos com estes aminoácidos. A incubação foi interrompida em banho de gelo. Os tubos com as ilhotas eram centrifugados por 2 minutos a 45 x G, o sobrenadante coletado e a insulina

quantificada por radioimunoensaio. No experimento de captação de aminoácido, as ilhotas isoladas (10 μ L) foram pré-incubadas por 30 minutos e incubadas por 15, 30 ou 60 minutos com 0,2 μ Ci de [1-¹⁴C] ácido α -metil aminoisobutírico mais testosterona (1 μ M). Após o final da incubação os tubos eram centrifugados por 2 minutos a 45 x G. O sobrenadante (meio externo) era preservado. As ilhotas eram transferidas para tubos Eppendorff contendo 1 mL de água destilada (meio interno). Os tubos com as ilhotas eram congelados por 24 horas e após sonificados por 30 segundos. Eram retiradas amostras de 100 μ L de cada frasco e do respectivo meio externo para contagem da radioatividade. Os resultados foram expressos pela relação entre a radioatividade contida no tecido (meio interno) e no meio de incubação (meio externo). Nos experimentos de captação de ⁴⁵Ca²⁺, as ilhotas isoladas (50 μ L) eram pré-incubadas por 45 ou 50 minutos com 0,2 μ Ci ⁴⁵Ca²⁺, novamente pré-incubadas por 10 minutos com nifedipina (1 μ M), diazoxidina (100 μ M), glibenclamida (25 μ M), ou tolbutamida (10 μ M) e incubadas com ou sem testosterona (0,1 μ M) ou nandrolona (0,1 μ M) por 1 minuto. No experimento com U73122 (2 μ M), as ilhotas eram pré-incubadas por mais 15 minutos com este fármaco e incubadas com ou sem testosterona (1 μ M) por 1 minuto. Para a interrupção da incubação, utilizou-se 1 mL de tampão frio com cloreto de lantânio (10 mM) Após, os tubos eram centrifugados por 2 minutos a 45 x G, o sobrenadante desprezado e as ilhotas lavadas duas vezes com a solução de cloreto de lantânio. As ilhotas eram transferidas para tubos tipo Eppendorff contendo 1 mL de água destilada. Os tubos eram congelados por 24 horas e após sonificados por 30 segundos. Eram retiradas amostras de 50 μ L de cada frasco para contagem da radioatividade. A testosterona e a nandrolona estimularam a secreção de insulina após incubação de 3 minutos, através do fechamento de

canais K^+_{ATP} tendo, como conseqüência, o aumento da captação de Ca^{2+} e a exocitose do hormônio. A testosterona ligada à albumina, que não entra na célula e interage com receptor de membrana, também estimulou a secreção de insulina em 3 minutos, sugerindo um efeito de membrana dos andrógenos. Em nossas condições experimentais, o 17- β -estradiol e a progesterona não mostraram efeito sobre a secreção de insulina. A ação androgênica sobre a secreção de insulina ocorreu somente na ausência de glicose ou em concentrações sublimiares (3mM). A testosterona não estimulou a captação do aminoácido metilaminoisobutírico [^{14}C]. A L-alanina estimulou a secreção de insulina. Porém, quando associadas testosterona e alanina somente, houve redução na secreção. Também foi observado que uma mistura de aminoácidos (MIX- glutamina, lisina, leucina e alanina,) em diferentes concentrações proporcionais foi efetiva na secreção de insulina. Houve aumento significativo na secreção de insulina quando associados testosterona e a concentração 2x maior dos aminoácidos. Também, os andrógenos aumentaram a captação de Ca^{2+} em 60 segundos. A ação da testosterona sobre a captação de Ca^{2+} ocorreu em concentrações limiares de glicose (5 e 8 mM), porém não em concentrações elevadas (11 mM). Quando a testosterona foi incubada na presença de nifedipina (bloqueador de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L), seu efeito estimulatório sobre a captação de $^{45}Ca^{2+}$ foi anulado. Ocorreu inibição da ação androgênica quando a testosterona foi incubada em presença de diazoxida, a qual aumenta a probabilidade de abertura do canal K^+_{ATP} . O efeito da testosterona e da nandrolona sobre a captação de $^{45}Ca^{2+}$ é análogo à ação das sulfoniluréias (glibenclamida e tolbutamida), as quais inibem o canal K^+_{ATP} . Ambos os efeitos indicam que a ação da testosterona envolve o fechamento do canal K^+_{ATP} e

conseqüente despolarização da membrana da célula β . O inibidor da fosfolipase C, o U73122, bloqueou a ação estimulatória de testosterona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

Nossa conclusão para estes achados seria que a testosterona e a nandrolona, na presença de baixas concentrações de substratos energéticos como a glicose e aminoácidos, estimulariam a liberação da insulina para modular os efeitos catabólicos dos contra-reguladores e, assim, manter a homeostase. O mecanismo de secreção da insulina pelos andrógenos envolve a ativação de PLC via ligação ao receptor de membrana acoplado à proteína G_q , o fechamento de K^+_{ATP} e a entrada de Ca^{2+} através de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L.

ABSTRACT

In men, testosterone and bioavailable testosterone levels (free and albumin-bound) decline with age, with high risk of developing insulin resistance and type 2 diabetes. It has been already shown the classic action of testosterone (genomic effect) on the insulin synthesis and release in rat pancreas. The objective of this survey is to determine: 1) the specific non-classical action of testosterone, nandrolone and other sex steroids on insulin secretion in isolated pancreatic islets from adult male rats; 2) aminoacids influence on this action; 3) testosterone action on amino acid transport; 4) the participation of L-type voltage-gated Ca^{2+} channels and K_{ATP} channels in the testosterone and nandrolone action on the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake; 5) the participation of phospholipase C via in the testosterone action on the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake. The islets were isolated from the pancreas of 3 male Wistar rats (weighing between 180 and 200g) per experiment by the technique of Lacy and Kostianovsky (**Diabetes**, 16:35-39, 1967). In the experiments of insulin secretion, samples of 10 μL of isolated islets were pre-incubated for 30 minutes and incubated for 3 minutes in the presence or absence of testosterone (1 μM), T-BSA (1 μM), nandrolone (1 μM), 17 β -estradiol (10 nM) or progesterone (1 μM) in a Dubnoff metabolic incubator in KRb-HEPES buffer with 3 mM glucose at 37°C, pH 7,4 and constant gasification constante with carbogen ($\text{O}_2:\text{CO}_2$; 95:5; v/v). In experiments with glutamine, lysine, alanine and leucine, the islets were incubated for another 3 minutes with these amino acids. The incubation was stopped in an ice bath. The tubes containing the islets were centrifuged for 2 minutes at 45xG, the supernatant collected and insulin measured by radioimmunoassay. In the experiment of amino acid uptake, isolated islets (10 μL)

were pre-incubated for 30 minutes and incubated for 15, 30 or 60 minutes with 0,2 μCi of [$1\text{-}^{14}\text{C}$] α -methyl aminoisobutyric plus testosterone ($1\mu\text{M}$). After the end of incubation, tubes were centrifuged for 2 minutes at $45 \times \text{G}$. The supernatant (environment) was preserved. The islets were transferred to Eppendorff tubes containing 1mL of distilled water (internal environment). The tubes with islets were frozen for 24 hours and after this sonicated for 30 seconds. Samples of $100 \mu\text{L}$ were removed from each bottle and respective environment for radioactivity counting. Results were expressed by the relation between the radioactivity contained in the tissue (internal environment) and the incubation environment (external environment). In the experiments of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake, the isolated islets ($50\mu\text{L}$), were pre-incubated for 45 or 50 minutes with $0,2 \mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}^{2+}$, pre-incubated again for 10 minutes with nifedipine ($1\mu\text{M}$), diazoxide ($100\mu\text{M}$), glibenclamide ($25\mu\text{M}$), or tolbutamide ($10\mu\text{M}$) and incubated with or without testosterone ($1\mu\text{M}$) for 1 minute. In this experiment with U73122 ($2\mu\text{M}$), the islets were pre-incubated for more 15 minutes with this drug and incubated with or without testosterone ($1\mu\text{M}$) for 1 minute. For the interruption of incubation, it was used a cold 1mL buffer with lanthanum chloride (10mM). After, tubes were centrifuged for 2 minutes at $45 \times \text{G}$, the supernatant discarded and the islets washed twice with lanthanum chloride solution. The islets were transferred to Eppendorf tubes containing 1ml of distilled water. The tubes were frozen for 24 hours and after it, sonicated for 30 seconds. Samples of $50 \mu\text{L}$ were taken from each bottle for radioactivity counting. In isolated pancreatic islets of rats, testosterone and nandrolone have stimulated insulin secretion, after a 3-minute incubation period, closing the K^+_{ATP} channels, having as consequence the increase of Ca^{2+} inflow and the hormone exocytosis. Testosterone conjugated to bovine

serum albumin, which is not membrane permeable and interacts with the receptor of membrane, also stimulated insulin secretion in 3 minutes, suggesting an androgen membrane effect. In our experimental conditions, 17- β -estradiol and progesterone have not demonstrated effects in insulin secretion. Testosterone has not stimulated the uptake of methylaminoisobutyric acid [$1\text{-}^{14}\text{C}$]. L-alanine has stimulated insulin secretion. However, when testosterone was associated only with alanine, insulin secretion has decreased. It has also been noted that an amino-acid mixture (MIX-alanine, glutamine, lysine and leucine) in different proportional concentrations has been effective in insulin secretion. When associated, testosterone and MIX, there has been an increase in insulin secretion when the concentration of amino acids has been 2 times higher. Also, the androgens have increased the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in 60 seconds. However, the androgenic action has occurred only in absence of glucose or at sub stimulatory concentrations (3 mM). The action of testosterone on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake has occurred at stimulatory glucose concentrations (5 and 8 mM), but not in high concentrations (11 mM). When testosterone has been incubated in the presence of nifedipine (Ca^{2+} type L channel blocker), its stimulatory effect on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake has been nullified. When it was used diazoxide to produce the opening of $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$ channels, it has occurred the inhibition of androgenic action. The testosterone and nandrolone effect is analogous to the action of sulphonilureias (glibenclamida and tolbutamida), which inhibit the $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$ channel. Both effects show that testosterone action involves the $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$ channel closing and consequent membrane depolarization of β cell. The presence of U73122, which inhibits the activation of PLC, has inhibited the testosterone action on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake.

Our conclusion for these results would be that testosterone and nandrolone, in the presence of low concentrations of energetics substrates as glucose and amino acids would stimulate the insulin liberation for modulating the catabolic effects of counter-regulators and, then, sustaining homeostasis. It can also be observed that the associated mechanism involves a G_q protein-coupled membrane receptor-binding, the PLC activation, the K^+_{ATP} closing and Ca^{2+} entry through the voltage-dependent L-type calcium channels.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONTROLE HOMEOSTÁTICO DA GLICEMIA

Em mamíferos, a concentração da glicose sanguínea é controlada através de mecanismos homeostáticos eficientes. Esse controle homeostático restrito é necessário devido à ingestão esporádica de alimentos, intercalada com períodos variáveis de jejum. A demanda energética de tecidos e de órgãos, especialmente, do sistema nervoso central, que depende, principalmente, da glicose como substrato energético, é outro fator importante na manutenção da homeostase da glicose (HEDESKOV, 1980).

A homeostase da glicose é dependente de respostas hormonais. O balanço homeostático é mantido por ação da insulina, hormônio hipoglicêmico, e seus contra-reguladores: o glucagon, a adrenalina, os corticosteróides e o hormônio do crescimento, que são hormônios hiperglicêmicos (POLONSKY e O'MEARA, 2001).

O mecanismo da secreção de insulina pela célula β deve, necessariamente, responder com rapidez e com alta sensibilidade às modificações na concentração extracelular de glicose (HEDESKOV, 1980). Tem sido enfatizado que mesmo alterações pequenas na secreção e/ou perdas na sensibilidade deste controle de retroalimentação podem refletir na homeostase glicêmica do organismo.

Um declínio na ação da insulina está associado ao envelhecimento (JACKSON, 1990; PAOLISSO et al., 1995) e relaciona-se com a prevalência elevada de diabetes tipo 2 nesta fase (SHIMOKATA et al., 1991). Em uma grande amostra de pessoas saudáveis, "The European Group for Insulin Resistance", foi

observado que a disponibilidade da glicose plasmática para os tecidos, mediada pela insulina, diminui com o avanço da idade. Este fato pode ser, parcialmente, consequência da obesidade e de modificações na distribuição de gordura na porção central do corpo (FERRANNINI et al., 1996).

Por outro lado, tem sido sugerido que os hormônios sexuais podem exercer um papel causal no desenvolvimento de resistência à insulina e de diabetes tipo 2 (STELLATO et al., 2000; BASARIA et al., 2006; TRAISH et al., 2009). Na literatura, diversos trabalhos têm demonstrado o papel dos hormônios sexuais no desenvolvimento de diabetes e de doenças cardiovasculares em mulheres e homens (SELVIN et al., 2007). Homens com desordens endócrinas associadas a baixos níveis de testosterona (hipogonadismo), tais como as síndromes de Klinefelter e de Wolfram, possuem um elevado risco de desenvolver resistência à insulina e diabetes (SWERDLOW et al., 2005; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006). Em homens, os níveis de testosterona e de testosterona biodisponível (livre e a ligada à albumina) declinam com a idade (HARMAN et al., 2001). Em estudo realizado com ampla amostra de homens de diversas etnias, Selvin et al. (2007) observaram que as concentrações de testosterona e de testosterona biodisponível eram inferiores em homens com diabetes quando comparadas àquelas encontradas em homens sem diabetes. Estes autores concluíram que os dados obtidos eram consistentes com a hipótese de que os andrógenos podem influenciar diretamente o metabolismo da glicose e o desenvolvimento de resistência à insulina, independentemente dos efeitos da adiposidade (SELVIN et al., 2007). Ainda, foi descrito que os níveis de testosterona em homens estão inversamente associados a diversos fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2, tais como obesidade (BARRET-

CONNOR e KHAW, 1988), adiposidade central (CHANG et al., 1994), elevada concentração plasmática de insulina em jejum (HAFFNER et al., 1994; SEIDELL et al., 1990; HAFFNER, 1996; VERMEULEN et al., 1996) e glicemia elevada (BARRET-CONNOR e KHAW, 1988; SEIDELL et al., 1990; HAFFNER, 1996).

1.2. PÂNCREAS ENDÓCRINO

Em 1869, Langerhans observou grupamentos celulares distintos do tecido exócrino no pâncreas, denominando-os de ilhotas pancreáticas. Em 1907, Lane subdividiu as células das ilhotas em dois tipos baseado nas diferentes solubilidades de seus grânulos secretórios em álcool e designou-as como células α e células β . Em 1931, Bloom identificou a célula D presente em ilhotas humanas (LACY, 1970).

O componente endócrino do pâncreas é constituído pelas ilhotas pancreáticas ou ilhotas de Langerhans, como descrito acima, que estão disseminadas por todo o órgão em agrupamentos celulares de tamanho variado, com poucas centenas a milhares de células. As ilhotas pancreáticas constituem cerca de 1 a 2% do volume do pâncreas, sendo mais numerosas na cauda deste órgão. Suas células poligonais estão colocadas em cordões curtos, os quais são profusamente irrigados por uma cadeia de capilares fenestrados. As células endócrinas das ilhotas desenvolvem-se entre a 9^o e 12^o semanas de gestação em humanos (ROSS et al, 2003).

Três tipos celulares principais são identificados na ilhota pancreática. A célula A ou α secreta o hormônio glucagon; constitui cerca de 15 a 20% da população de células das ilhotas humanas e está geralmente localizada na periferia da ilhota. A célula B ou β secreta insulina e constitui cerca de 65 a 85%

das células da ilhota; está localizada na sua porção central. A célula D ou δ secreta o hormônio somatostatina; constitui cerca de 3 a 10% da população celular e está localizada na periferia da ilhota (ASHCROFT e RORSMAN, 1989; ROSS et al, 2003).

Além dessas principais células, é possível identificar outros três tipos celulares que constituem, na sua totalidade, cerca de 5% e são responsáveis pela produção e liberação de outros hormônios, por exemplo, a célula D-1 que produz o peptídeo intestinal vasoativo (VIP).

As células da ilhota podem influenciar células vizinhas por meio de efeitos parácrinos e/ou via conexões ultraestruturais (junções comunicantes), as quais existem entre células do mesmo tipo e entre células de tipo diverso (MEDA et al, 1986). As células β são acopladas eletricamente dentro de ilhotas intactas. Tal fato tem implicações diversas para o controle da atividade elétrica e, assim, da secreção de insulina. Este acoplamento explica como células β , em diferentes partes da ilhota, podem ter seus potenciais de ação sincronizados (MEISSNER, 1976; EDDLESTONE et al., 1984), apresentar as mesmas mudanças na concentração de Ca^{2+} citosólico (VALDEOLMILLOS et al, 1989) e secreção de insulina pulsátil similar em concentrações intermediárias de glicose (SCOTT et al, 1981).

As ilhotas apresentam um rico suprimento vascular que permite aos hormônios circulantes e aos nutrientes chegarem às células facilmente. No rato e no camundongo, o suprimento arterial é derivado das artérias celíaca e mesentérica superior, e o sangue é drenado pela veia porta (GREENE, 1935 apud BUNNAG et al, 1963).

As ilhotas são ricamente inervadas por terminações nervosas colinérgicas, adrenérgicas e peptidérgicas (PIPELLERS, 1987), no entanto, a abundância e a organização desta inervação é muito variável entre as espécies (KOBAYASHI e FUJITA, 1969).

1.3. MECANISMO DE SÍNTESE E DE LIBERAÇÃO DE INSULINA PELAS CÉLULAS β E LIBERAÇÃO DE INSULINA

1.3.1 Síntese e liberação de Insulina.

Pré-pró-insulina, uma vez sintetizada no retículo endoplasmático rugoso (REr), permanece por 30-60 segundos antes da porção pré ser removida por uma peptidase de sinalização (**Figura 1.1**). Então, a pró-insulina é liberada dentro do espaço intracisternal do RE, onde ela se dobra e são formadas pontes de dissulfeto da insulina. A partir daí a pró-insulina é transportada nas vesículas transportadoras, através da cadeia de microtúbulos, para a região *cis* do aparelho de Golgi (STEINER et al., 2001). É na região *trans* do aparelho de Golgi que a pró-insulina é convertida em insulina e peptídeo C por ação das endopeptidases conversoras PC2 e PC3 (também conhecida como PC1) e da carboxipeptidase H. Esta conversão ocorre em grânulos secretórios imaturos, recobertos por clatrina (ORCI et al., 1985), dando origem a grânulos maduros mais condensados. O núcleo denso deste grânulo consiste quase inteiramente de insulina, frequentemente em arranjo cristalino, enquanto a fase solúvel que circunda este núcleo é formada principalmente por peptídeo C e pequenas quantidades de pró-insulina (MICHAEL et al., 1987). A liberação de insulina envolve o trânsito desses grânulos, via microtúbulos, para a membrana plasmática, a fusão exocitótica

destes grânulos com a membrana plasmática e, finalmente, o recolhimento da membrana “secretada” por endocitose (RORSMAN e RENSTROM, 2003). Não existem evidências de rotas de secreção não granular de pró-insulina ou de insulina (STEINER et al., 2001).

A maioria das moléculas de insulina é empacotada dentro de vesículas e secretada em via regulada por glicose e outros fatores, enquanto somente 1% é secretada através da via constitutiva (basal) (RHODES e HALBAN, 1987). A via quantitativamente mais importante para a liberação de insulina no interstício da ilhota é regulada pelo íon Ca^{2+} (ORCI et al., 1973; WOLLHEIM e SHARP, 1981; AMMALA et al., 1993).

Em humanos e em cães há liberação de insulina e peptídeo C em proporções equimolares em condição basal ou estimulada (POLONSKY E RUBENSTEIN, 1986).

O citoesqueleto da célula β é um importante componente da secreção de insulina e a sua ruptura prejudica o processamento pós-transducional e a mobilização da insulina para a membrana plasmática (DOYLE E EGAN, 2003). Esta cadeia consiste de estruturas polimerizadas de filamentos de actina e microtúbulos, formando uma ponte importante entre o retículo endoplasmático, o aparelho de Golgi e a membrana plasmática. Os microtúbulos são formados por tubulina polimerizada e a aplicação de glicose na célula β aumenta a intensidade desta polimerização (MONTAGUE et al., 1976). A polimerização de tubulina e a mobilização de vesículas, através do citoesqueleto, são reguladas por proteínas que se ligam à tubulina, conhecidas como proteínas associadas ao microtúbulo, as quais são fosforiladas por proteína cinase A (EASOM, 2000). A fosforilação de microtubulinas e dos filamentos do citoesqueleto facilita a navegação das

vesículas em direção à membrana plasmática (**Figura 1.2**). A quantidade de actina polimerizada na célula β aumenta de 40% para 70% quando estimulada por glicose (SWANSTON –FLATT et al., 1980; HOWELL e TYHURST, 1986).

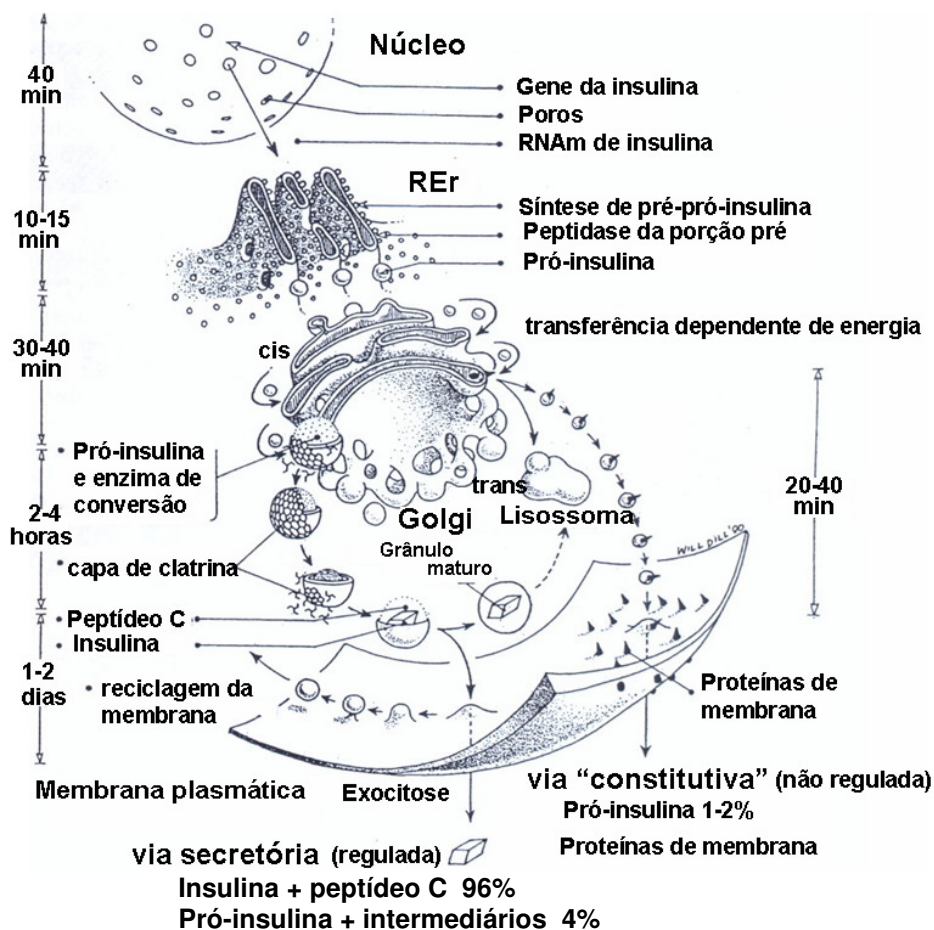


Figura 1.1: Modelo esquemático da síntese e do transporte celular da pró-insulina e da secreção de insulina, de peptídeo C e de pró-insulina pelas vias secretória e "constitutiva" (STEINER et al., 2001).

Estudos ultra-estruturais mostraram que uma única célula beta contém mais de 10.000 grânulos secretórios (DEAN, 1973; OLOFSSON et al., 2002). Análises de correntes amperométricas sugerem que um único grânulo secretório em célula beta humana contém 1,7 mM de insulina, o que equivale a uma

concentração de insulina intragranular de 118 mM.L^{-1} . Em grânulos de ratos, os valores correspondentes são $1,6 \text{ aM}$ e 74 mM.L^{-1} (HUANG et al., 1995).

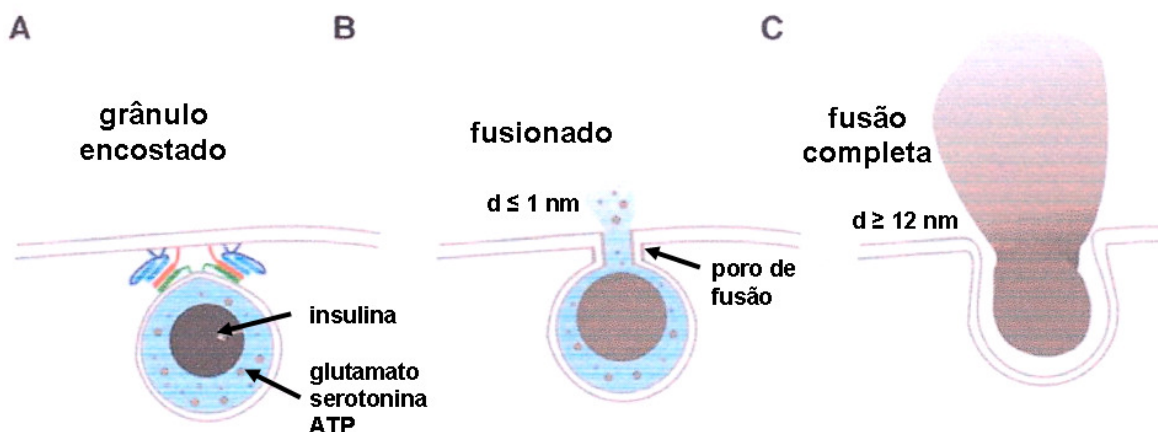


Figura 1.2: Dissociação entre fusão do grânulo e evacuação do seu interior. **A.** Grânulo da célula β encostado na membrana plasmática. Na região central há insulina hexamérica armazenada na forma cristalina. O halo do grânulo contém substâncias de baixo peso molecular como ATP, ADP, serotonina e glutamato. **B.** Durante a exocitose, é estabelecida transitória e reversivelmente uma conexão estreita ($\leq 1 \text{ nm}$, poro de fusão) entre o interior do grânulo e o espaço extracelular. Substâncias de baixo peso molecular, que não sejam a insulina, podem sair por este poro de fusão. **C.** Quando o poro de fusão está dilatado o suficiente ($\geq 12 \text{ nm}$ [TAKAHASHI et al., 2002], o grânulo colapsa na membrana plasmática e a insulina é liberada (RORSMAN e RENSTROM, 2003).

Experimentos têm demonstrado que as vesículas secretórias existem em diferentes grupos funcionais e a liberação sequencial permite uma separação cinética dos componentes da exocitose. Somente 1 a 5% dos grânulos pertencem ao grupo prontamente disponível para fusão com a membrana plasmática (“readily releasable pool” – RPP) (ELIASSON et al., 1997; NEHER, 1998).

Na célula β , este grupo RPP pode conter entre 20 e 100 grânulos secretórios, dependendo das condições experimentais (RENSTROM et al., 1997; GROMADA et al., 1999). A liberação de tais grânulos explicaria a 1ª fase da secreção de insulina (liberação rápida) e seu fim marcaria a depleção deste grupo.

Cerca de 95 a 99% dos grânulos pertencentes ao grupo não disponível devem sofrer uma série de reações dependentes de ATP, de Ca^{2+} e de temperatura (coletivamente referidas como mobilização) e assim obter a capacidade de liberação. Este último processo envolve a formação do complexo de proteínas SNARE (“SNAP Receptors”, onde SNAP: *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein*) (XU et al., 1999; RETTIG e NEHER, 2002) e reações adicionais de maturação, direcionando as vesículas para a membrana plasmática (EASOM, 2000).

As proteínas SNARE não somente exercem seu papel na fusão de grânulos com a membrana plasmática, elas também asseguram que a entrada de íons Ca^{2+} seja restrita às áreas da membrana plasmática em íntimo contato com os grânulos secretórios (BARG et al., 2002).

Como demonstrado pela primeira vez por Curry et al. (1968), a secreção de insulina em resposta a um aumento na concentração de glicose sanguínea segue um padrão bifásico característico: uma primeira fase rápida e transitória, seguida de uma segunda fase lenta e prolongada. Durante a segunda fase de secreção a concentração de insulina liberada é menor, mas sempre mais alta em relação ao controle pré-estimulatório. A primeira fase corresponde à liberação de vesículas do grupo prontamente disponível e ocorre em humanos dentro de 3 a 5 minutos após a ingestão de nutrientes, de glicose ou da administração intravenosa de glicose. A segunda fase da secreção de insulina é dependente do trânsito do grupo de vesículas secretórias de reserva e do processamento de insulina recém sintetizada. Esta fase é referida como fase de platô, com a glicemia retornando aos níveis de pós-estimulação após cerca de 120 minutos.

Somente uma fração do conteúdo de insulina da célula é liberada durante a estimulação. Em ilhotas de camundongos, as 1ª e 2ª fases de secreção liberam 0,14% por minuto e 0,05% por minuto, respectivamente (ANELLO et al., 1999). Dado que cada célula beta contém cerca de 10.000 grânulos, estes valores correspondem a aproximadamente 15 e 5 grânulos por minuto e por célula (BRATANOVA-TOCHKOVA et al., 2002). Estima-se que o número total de grânulos sofrendo exocitose durante a 1ª fase (que dura 5-10 min) é de 40 a 80 grânulos por célula beta.

A glicose inicia a 1ª fase da secreção de insulina. Esta ação é compartilhada com outros estímulos que resultam na despolarização da membrana plasmática (sulfoniluréias ou aumento no K^+ extracelular), contudo, somente os secretagogos combustíveis são capazes de iniciar a 2ª fase da secreção (HENQUIN, 2000).

É importante notar que a primeira fase da secreção de insulina é praticamente inexistente e a segunda fase é reduzida no estado diabético (NESHER e CERASI, 2002).

1.4. CANAL DE K^+ DEPENDENTE DE ATP E A SECREÇÃO DE INSULINA

Experimentos de *patch-clamp* estabeleceram que embora a célula β contenha entre 10 e 20 tipos de canais iônicos diferentes (ASHCROFT e RORSMAN, 1989), dois tipos de canais iônicos são particularmente importantes para o início da secreção de insulina: o canal de K^+ regulado por ATP (K_{ATP}) e o canal de Ca^{2+} dependente de voltagem (CCDV).

Os canais de K^+ dependentes de ATP (K_{ATP}) fecham em resposta à elevação de ATP citoplasmático. Esses canais foram descritos pela primeira vez em miócitos cardíacos por NOMA et al. em 1983. Outras isoformas desses canais foram identificadas em vários tipos celulares: célula β -pancreática, célula muscular esquelética, célula neuronal, célula muscular lisa e célula de Sertoli (KAKEI, 2003; WASSERMANN e LOSS, 2004).

Na célula β , o canal K_{ATP} é um elemento chave na manutenção do potencial de repouso e na secreção de insulina estimulada por glicose (ASHCROFT et al., 1984; RORSMAN e TRUBE, 1985; ASHCROFT e RORSMAN, 1989). Os canais K_{ATP} estão abertos quando os níveis de glicose circulante estão baixos (3 mM). Esta concentração de glicose é subestimulatória ou sublimiar, isto é, incapaz de estimular a secreção de insulina pela célula β . O efluxo de íon K^+ através desses canais gera uma diminuição de cargas positivas dentro da célula e, portanto, o potencial de repouso da célula beta torna-se mais negativo (RORSMAN e RENSTROM, 2003).

Após o aumento da glicemia, a glicose é transportada para o interior da célula β pelo transportador de glicose GLUT2. Após entrar na célula β , a glicose é fosforilada em glicose-6-fosfato por duas enzimas: a hexocinase IV (glicocinase) de baixa afinidade (K_m entre 6 a 11 mM.L⁻¹) e a hexocinase I de alta afinidade ($K_m < 0,1$ mM.L⁻¹). Entretanto, a enzima de alta afinidade é fortemente inibida pela glicose-6-fosfato, o que denota um papel preponderante da glicocinase na fosforilação da glicose, caracterizando essa enzima como sensor de glicose nas células secretoras de insulina. Esse mecanismo permite a formação de glicose-6-fosfato a partir de concentrações fisiológicas e suprafisiológicas de glicose no sangue (HABER et al., 2001). O metabolismo da glicose pela via glicolítica gera

ATP e a relação da fração ATP/ADP aumenta no citoplasma (MATSCHINSKY, 1996). Essa relação ATP/ADP aumentada provoca o fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP e a despolarização da membrana celular, seguida da abertura de canais de cálcio do tipo L sensível à voltagem. Assim, canais K_{ATP} convertem informação metabólica em sinal elétrico na membrana plasmática (KAKEI, 2003). O aumento no influxo de Ca^{2+} incrementa a concentração intracelular de cálcio, desencadeando o processo excitatório na célula β (PRENTKI e CORKEY, 1996).

Assim, o fechamento dos canais K_{ATP} inicia a liberação de insulina, enquanto que a sua abertura inibe a secreção desse hormônio. Esse mecanismo também pode ser desencadeado por outras moléculas que desempenham papel modulador como os aminoácidos, a acetilcolina, a noradrenalina, os ácidos graxos e os hormônios androgênicos (HABER et al., 2001).

O bloqueio dos canais K_{ATP} com os hipoglicemiantes orais utilizados no tratamento de diabetes tipo 2 (sulfonilurías, como a tolbutamida e a glibenclamida) (STURGESS et al., 1985) estimula a secreção de insulina mesmo na ausência de glicose, enquanto fármacos que abrem esses canais (por exemplo, diazoxida) reduzem a secreção de insulina mesmo em presença de glicose (GRIBBLE E REIMANN, 2003a). Os efeitos desses fármacos no canal K_{ATP} são alterados em presença de ADP (ZUNKLER et al., 1988; GRIBBLE et al., 1997; MIYAMURA et al., 2000).

Mutações nos genes que codificam o canal K_{ATP} reduzem a atividade deste canal, produzindo uma persistente despolarização de membrana o que leva ao influxo de Ca^{2+} pela ativação do canal de Ca^{2+} dependente de voltagem. Como consequência, há uma contínua secreção de insulina, independente da glicemia

(hiperinsulinismo) (SEINO E MIKI, 2003; DUNNE et al., 2004; AITTONIEMI et al., 2009).

Em contraste, mutações com ganho de função previnem o fechamento do canal K_{ATP} em resposta aos nucleotídeos de adenina gerados metabolicamente. Nesta situação, a célula β permanece hiperpolarizada mesmo quando os níveis de glicose sanguínea aumentam, mantendo os canais de Ca^{2+} fechados, portanto sem influxo deste íon e sem secreção de insulina (diabetes neonatal permanente) (GLOYN et al., 2004; AITTONIEMI et al., 2009).

Muitos pesquisadores têm focado sua atenção na habilidade do canal K_{ATP} em modificar sua condutividade em resposta ao estado metabólico da célula. A regulação do canal por ATP apresenta uma discrepância entre a sua inibição por níveis micromolares de ATP e a concentração intracelular deste nucleotídeo na ordem de milimolar. Para resolver esta questão, outros fatores que poderiam regular este canal estão sendo investigados. Foi observado que diversos fatores influenciam a atividade do canal como, por exemplo, o ADP intracelular (KAKEI et al., 1986), os fosfolipídeos (HILGEMANN e BALL, 1996), o Mg^{2+} (FINDLAY, 1987; ASHCROFT e KAKEI, 1989), o Ca^{2+} (KAKEI e NOMA, 1984; FINDLAY, 1987), o H^+ (KOYANO et al., 1993), os ácidos graxos de cadeia longa (BRÄNSTRÖM et al., 1997; GRIBBLE et al., 1998), e os radicais livres (NAKAZAKI et al., 1995).

O canal K_{ATP} é um complexo hetero-octamérico com dois tipos diferentes de subunidades proteicas: uma subunidade formadora do poro do canal de K^+ , a Kir6.x, e uma subunidade regulatória, o receptor de sulfoniluréia, SUR1, em uma estequiometria de 1:1 (SUR1/Kir6.2)₄ (ASHCROFT e GRIBBLE 1999; AGUILAR-BRYAN e BRYAN, 1999). O receptor de sulfoniluréia (SUR1) foi clonado e classificado como um membro da superfamília “ATP-binding cassette”, contendo

duas dobras de ligação de nucleotídeo (“nucleotide-binding folds” – NBF-1 e NBF-2) (AGUILAR-BRYAN et al., 1995). Este canal estabiliza a membrana, próximo ao potencial de equilíbrio para o íon K^+ , portanto contrapondo-se à despolarização da membrana (MICHELS e HOPPE, 2008) (**Figura 1.3**). As sulfoniluréias, os estimuladores da abertura do canal K_{ATP} e o ADP ligam-se a SUR1, enquanto que o ATP liga-se a Kir6.2 para fechar o canal.

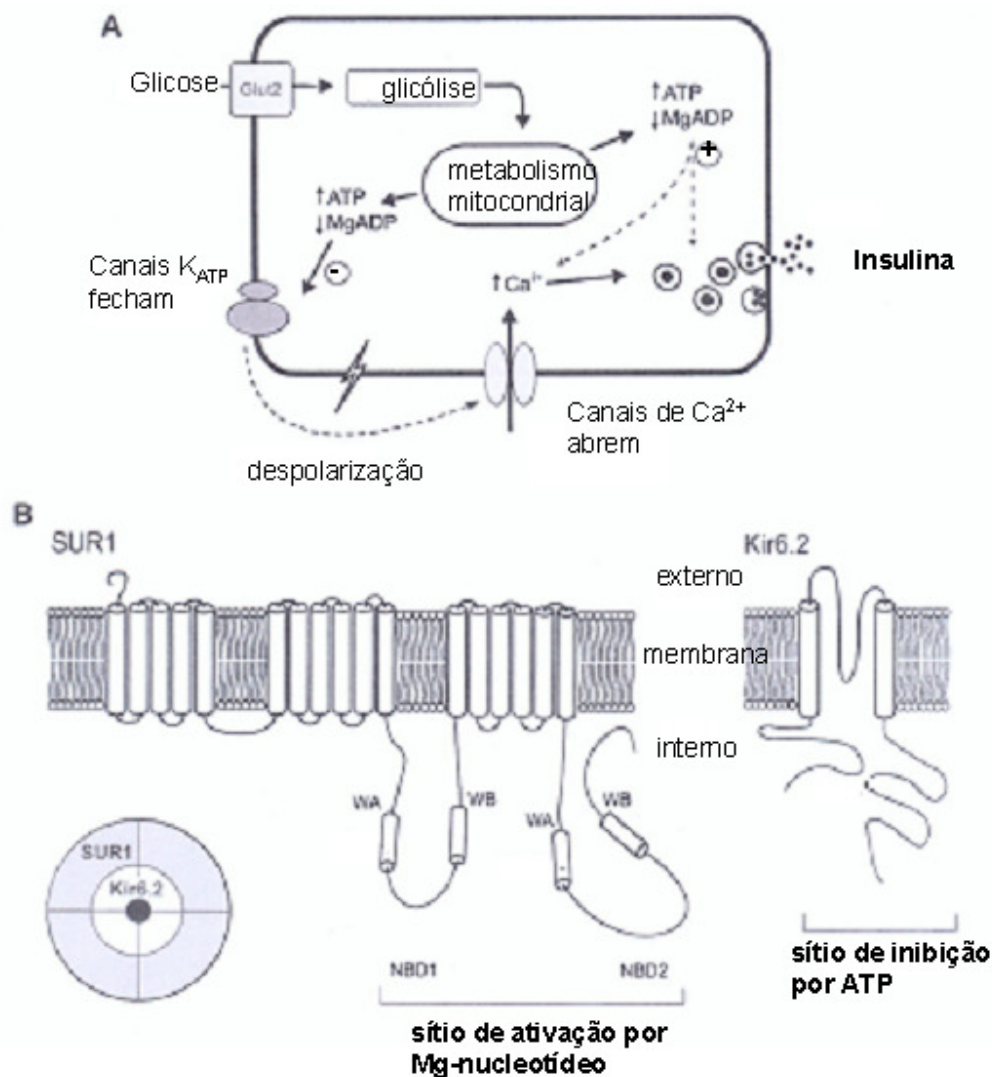


Figura 1.3: Envolvimento do canal K_{ATP} no estímulo da glicose sobre a secreção de insulina e sua estrutura. A) A glicose entra na célula β via transportador GLUT2. A seguir, a metabolização da glicose leva a um aumento da concentração de ATP e queda de MgADP. Isto resulta no fechamento do canal K_{ATP} , despolarização da membrana, abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, influxo de Ca^{2+} e exocitose dos grânulos de insulina. **B)** Topologia das subunidades SUR1 e Kir6.2, e sua estruturação no canal K_{ATP} . WA e WB, seqüências (motivos) Walker A e Walker B, respectivamente (TARASOV et al., 2004).

A razão ATP/ADP determina a probabilidade de abertura dos canais mais do que os níveis citoplasmáticos de ATP somente (DUNNE et al., 1988). Já a forma MgADP é necessária para abrir o canal (ASHCROFT e KAKEI, 1989; NICHOLS et al., 1996).

Os inibidores da atividade do canal K_{ATP} estão classificados em dois grupos: aqueles que interagem com Kir6.2 e aqueles que interagem com SUR. Os que bloqueiam o canal K_{ATP} por se ligarem à subunidade Kir6.2 são: imidazolininas (por exemplo, fentolamina, cibenzolina) e antimaláricos (por exemplo, quinina, mefloquina) (MUKAI et al., 1998; GRIBBLE et al., 2000). As drogas que fecham o canal por unirem-se à subunidade SUR (nos sítios de alta afinidade) são: sulfoniluréias (por exemplo, tolbutamida, glicazida, glimepirida) e derivados da benzamida (por exemplo, meglitinida). As sulfoniluréias também interagem com Kir6.2, mas com baixa afinidade. Todos os fármacos que bloqueiam o canal K_{ATP} estimulam a secreção de insulina, mas somente aquelas que interagem com a subunidade SUR são utilizadas terapeuticamente no tratamento de diabetes tipo 2.

Os inibidores do canal K_{ATP} exibem diferenças na reversibilidade de sua ação. A inibição de corrente de Kir6.2/SUR1 por tolbutamida é rapidamente reversível, enquanto que aquela produzida por glibenclamida é lentamente reversível. Esta lenta reversibilidade pode ser explicada pelo fato desta sulfoniluréia interagir com os dois sítios de alta afinidade de SUR1 (região transmembrana [TM] 15-16 e TM 5-6). Já a tolbutamida interage apenas com TM 15-16 (GRIBBLE e REIMANN, 2003b).

As sulfoniluréias induzem ao fechamento do canal K_{ATP} , mas esta inibição de alta afinidade não é completa visto que, mesmo em concentrações saturantes destes fármacos, o canal é capaz de manter-se parcialmente aberto (PROKS et al., 2002; GRIBBLE e REIMANN, 2003b).

1.5. CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM (CCDV)

Os canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) pertencem à superfamília de canais iônicos protéicos transmembrana, na qual estão incluídos os canais de potássio e os canais de sódio dependentes de voltagem (YU E CATERALL, 2004). Na década de 1980, a estrutura protéica dos CCDV foi determinada e as diversas subunidades que compõe o canal identificadas (BORSOTTO et al., 1985; FLOCKERZI et al., 1986; SIEBER et al., 1987; TAKAHASHI et al., 1987; VAGHY et al., 1987; LEUNG et al., 1988).

A principal subunidade dos CCDV é chamada de subunidade $\alpha 1$, e as subunidades auxiliares são conhecidas como β , $\alpha 2$, δ e γ . (HOFFMANN et al., 1999) (**Figura 1.4**).

A subunidade $\alpha 1$ é a maior delas. Nesta subunidade encontram-se os sensores de voltagem, o poro de condução iônica, o componente de portão do canal e os sítios de regulação do canal por drogas e por toxinas. As subunidades auxiliares modulam as propriedades do complexo do canal, gerando sua diversidade eletrofisiológica e farmacológica (HOFMANN *et al*, 1999).

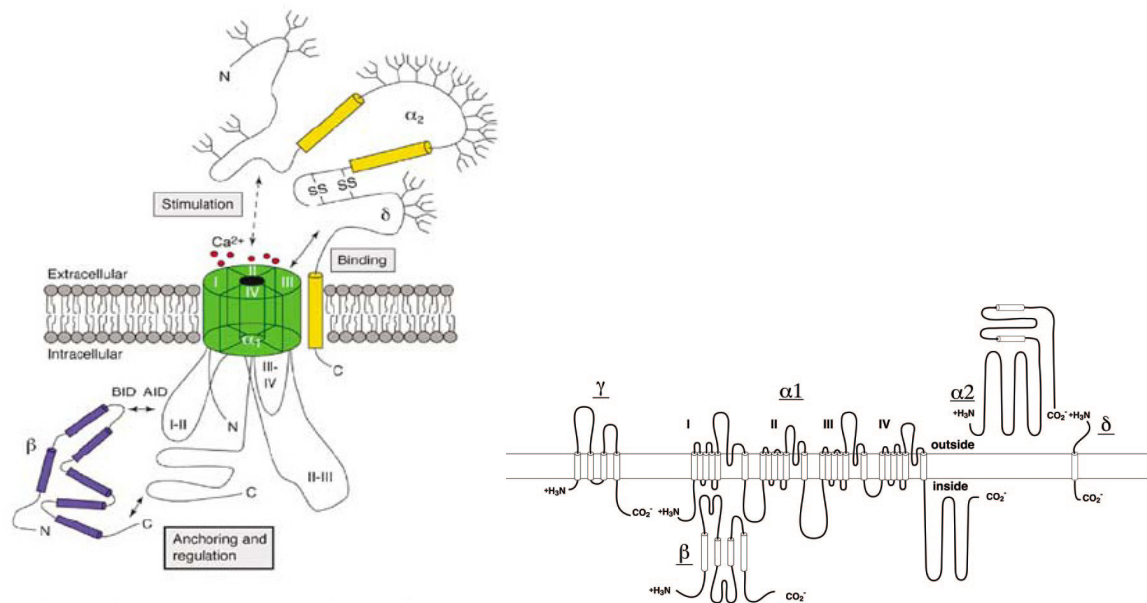


Figura 1.4: Representações do Ca_{v1} e suas subunidades (DOLPHIN, 2006; CATERALL et al., 2005).

1.5.1. Canais de Cálcio dependentes de voltagem Ca_{v1} (Tipo L)

São originalmente caracterizados por sua sensibilidade à diidropiridina e por apresentarem uma condutância prolongada (*long lasting*) após a abertura do canal (NOWYCKY et al., 1985). Esta classe apresenta quatro diferentes canais: $Ca_{v1.1}$ - $Ca_{v1.4}$ (ERTEL et al., 2000).

Os canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L ($Ca_{v1.n}$) têm uma estrutura homóloga aos demais CCDV, entretanto, o arranjo de suas subunidades varia de acordo com o tecido e, conseqüentemente, alterando sua função (LACINOVÁ, 2005).

Como outros CCDV, os canais Ca_{v1} têm uma subunidade α_1 que determina suas propriedades fisiológicas e farmacológicas (CATTERALL, 2000). Esta subunidade associa-se às subunidades auxiliares, as quais facilitam a localização do canal na membrana plasmática e influenciam na ativação e na inativação em

relação à dependência de voltagem (BIRNBAUMER et al., 1998; CATTERALL, 2000, RICHARDS et al., 2004).

Além da diversidade da composição das subunidades (SAFA et al., 2001; LIPSCOMBE et al., 2002; TANG et al., 2004, SHEN et al., 2006), outros fatores podem influenciar e modular a atividade do canal, como a presença de determinados fosfolípídeos e modificações pós-transducionais (KAMP E HELL, 2000; PITT, 2007). A atividade dos Ca_{v1} também pode ser modificada por hormônios, neurotransmissores e mediadores ligados ao receptor acoplado à proteína G (GPCR) (MACREZ et al., 1997; DE WAARD et al., 1997; VIARD et al., 1999). Há relatos de que ambas as subunidades da proteína Gs ($G\alpha$ e $G\beta\gamma$), podem exercer esta modulação sobre o Ca_{v1} através de diferentes mensageiros (CALLAGHAN, 2006).

1.5.2. Canais de cálcio e a célula β

As células beta pancreáticas contêm de 3 a 4 tipos distintos de canais de cálcio descritos (RORSMAN e RENSTROM, 2003), entretanto, somente o canal de cálcio tipo L parece estar relacionado com a exocitose dos grânulos contendo insulina (WISER et al, 1999; BARG et al, 2002; RORSMAN e RENSTROM, 2003). Eles estão localizados próximos à região excitoticamente ativa da membrana plasmática (BOKVIST et al, 1995). A atividade deste canal é potencializada por proteína cinase A (PKA) e proteína cinase C (PKC) (DOYLE E EGAN, 2003). Como já descrito anteriormente, a despolarização iniciada pelo fechamento dos canais K_{ATP} ativa a cinética de condução do canal tipo L, levando a um influxo de cálcio, o qual desencadeia o movimento das vesículas secretórias em direção à membrana plasmática e consequente liberação de insulina.

1.6. REGULAÇÃO FISIOLÓGICA DA SECREÇÃO DE INSULINA

A resposta secretória na célula β requer uma ação combinada de nutrientes, hormônios e neurotransmissores atuando em receptores acoplados à proteína G (LANG, 1999). Além disso, as células endócrinas na ilhota pancreática interagem umas com as outras (JO et al, 2009). Tem sido demonstrado que interações químicas, por meio de hormônios e de neurotransmissores, entre células adjacentes (interações parácrinas) afetam a regulação da glicose sanguínea. Assim, a principal dificuldade na compreensão dessas interações homeostáticas reside na complexidade do “sistema ilhota”, o que inclui muitas interações entre diferentes tipos celulares coexistentes trabalhando em diferentes condições (JO et al, 2009). Diversos fatores controlam estas interações celulares e, conseqüentemente, a secreção da célula β .

1.6.1. Nutrientes

Glicose é a substância fisiológica mais importante na regulação da liberação de insulina. A concentração mínima de glicose capaz de estimular a secreção de insulina pela célula β é chamada concentração limiar, cujo valor é de 5 mM. Além da glicose, outros monossacarídeos e metabólitos de carboidratos: D-manose, D-gliceraldeído, diidroxiacetona, D-glicosamina, N-acetilglicosamina, frutose e galactose são estimuladores ou potencializadores da secreção de insulina, *in vitro* (ASHCROFT e RORSMAN, 1989; POLONSKY e O'MEARA, 2001). A célula β apresenta metabolismo distinto quando comparada aos demais tipos celulares de mamíferos: 1) ela utiliza glicose em um nível fisiologicamente relevante (2-20 mM.L⁻¹) e expressa uma combinação de GLUT2 (transportador de

glicose de alto Km) e glicocinase; 2) apresenta baixa atividade da lactato desidrogenase e do transportador de membrana piruvato monocarboxilato/lactato e, correspondentemente, alta atividade do trocador mitocondrial malato-aspartato, assegurando oxidação mitocondrial de NADH; 3) possui alta atividade das enzimas piruvato desidrogenase e piruvato carboxilase, favorecendo que ambas as vias anaplerótica e metabolismo oxidativo da glicose/piruvato possam coexistir. Todas estas adaptações metabólicas específicas são ajustadas para reforçar a atividade mitocondrial do ciclo do ácido tricarboxílico, fosforilação oxidativa e produção eficiente de ATP (NEWSHOLME et al., 2007) (**Figura 1.5**).

A L-glutamina e a L-alanina são os aminoácidos mais abundantes no sangue e nos fluidos extracelulares de mamíferos, seguidos por aminoácidos de cadeias ramificadas. Entretanto, os aminoácidos individualmente não estimulam a secreção de insulina, *in vitro*, quando adicionados em concentrações fisiológicas. Combinações de aminoácidos ou dose mais elevadas que as fisiológicas são mais efetivas nesta ação. Somente poucos aminoácidos aumentam sinergicamente a secreção de insulina pelas células beta, embora seus mecanismos sejam diversos (FAJANS et al., 1967; MCCLENAGHAN et al., 1996). Aminoácidos catiônicos, como L-arginina, agem diretamente despolarizando a membrana da célula β em pH fisiológico e em presença de glicose, entretanto, este aminoácido é encontrado em concentrações baixas ($0,07\text{mM.L}^{-1}$) no sangue. Outros aminoácidos co-transportados com Na^+ também podem despolarizar a membrana e induzir a secreção de insulina através da ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem. O metabolismo resultante da oxidação parcial de L-alanina leva ao aumento intracelular de ATP, determinando o fechamento de

canais K_{ATP} e, conseqüentemente, à exocitose das vesículas contendo insulina (MAECHLER, 2002) (**Figura 1.5**).

Em contraste com os aminoácidos, vários lipídeos e seus metabólitos têm um efeito menor sobre a liberação de insulina (POLONSKY e O'MEARA, 2001). A exposição aguda à glicose e aos ácidos graxos livres (AGL) promove a secreção de insulina. No entanto, exposição crônica a altas concentrações de AGL ou de glicose pode levar à inibição da secreção de insulina via ciclo de Randle (RANDLE, 1994). O ciclo de Randle, descrito por Randle e colegas em 1963, é um processo metabólico que envolve a competição da glicose e dos ácidos graxos como substratos (BEVILACQUA et al., 1990). Este ciclo pode estar presente na diabetes tipo 2 e na resistência à insulina (SHULDINER e MCLENITHAN, 2004; DELARUE e MAGNAN, 2007). O mecanismo envolve malonil-CoA e sua inibição da carnitina palmitoiltransferase I (CPT1). A oxidação da glicose produz citrato, o qual pode ser convertido à malonil-CoA pela acetil-CoA carboxilase. A malonil-CoA pode, então, ligar-se a e inibir uma das diversas isoformas de CPT1 específicas dos tecidos. A CPT1 é um transportador de ácidos graxos de cadeia longa na membrana externa mitocondrial que regula o ritmo da oxidação dos ácidos graxos. Assim, a oxidação aumentada de glicose inibe a oxidação de ácidos graxos via malonil-CoA, a qual pode, então, ser utilizada como substrato para a síntese de ácidos graxos (SHULDINER e MCLENITHAN, 2004; DELARUE e MAGNAN, 2007).

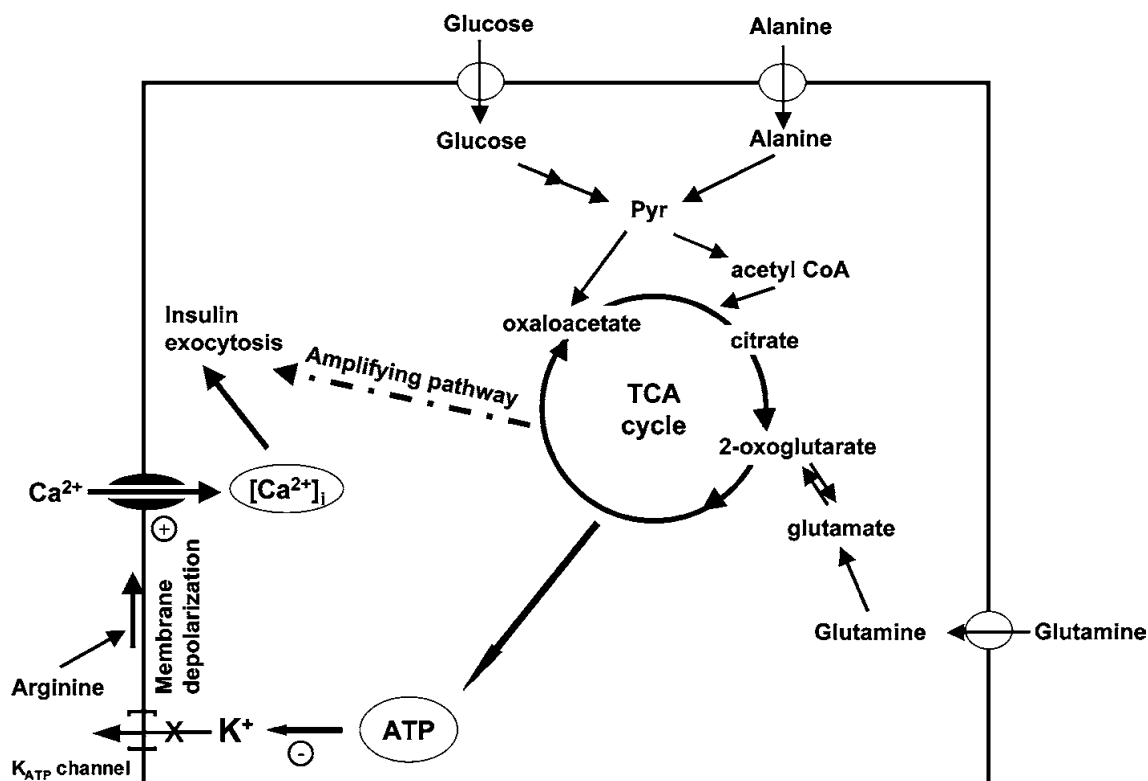


Figura 1.5: Modelo de regulação da secreção de insulina na célula β estimulada por glicose e por aminoácidos. A glicose é transportada através da membrana plasmática (GLUT 2) e é metabolizada via glicólise, fornecendo piruvato (Pyr), o qual é então metabolizado pelo ciclo do ácido tricarboxílico. O metabolismo mitocondrial é também ativado por aminoácidos tais como alanina, glutamina ou glutamato. O ciclo do ácido tricarboxílico gera equivalentes redutores os quais são transferidos para a cadeia transportadora de elétrons, determinando a geração de ATP. O aumento nos níveis de ATP leva ao fechamento dos canais K_{ATP} e despolarização da membrana celular. Esta despolarização abre os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, aumentando $[Ca^{2+}]_i$, o que dispara a exocitose de insulina. Sinais metabólicos adicionais podem ser gerados de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, os quais “amplificam” a estimulação inicial dependente de Ca^{2+} para a exocitose de insulina. (NEWSHOLME et al., 2007)

Também os metabólitos de aminoácidos: fenilpiruvato, α -cetocaproato, α -cetoisocaproato e α -ceto- β -metilvaleriato são potentes estimuladores da secreção de insulina (ASHCROFT e RORSMAN, 1989, POLONSKY e O’MEARA, 2001).

1.6.2. Efeito incretina e hormônios

A secreção de insulina é maior quando a glicose é administrada oralmente do que pela via intravenosa (TILLIL et al., 1988). Este maior aumento é devido ao “efeito incretina” (CREUTZFELDT e EBERT, 1985): a maior resposta na liberação

de insulina é estimulada por hormônios gastrointestinais, incluindo polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP, também conhecido como peptídeo inibidor gástrico), colecistocinina (CCK) e peptídeo semelhante ao glucagon-1 (“glucagon-like peptide-1”, GLP-1) (DUPRE et al., 1973; SCHMIDT et al., 1985; ZAWALICH e DIAZ, 1987). Estes hormônios são liberados de células endócrinas intestinais após a ingestão de alimento e via corrente sanguínea estimulam a secreção das células β . VIP, secretina e gastrina também atuam de maneira similar, aumentando a secreção de insulina induzida por glicose, porém seu exato papel fisiológico nesta regulação precisa ser melhor elucidado (POLONSKY e O'MEARA, 2001). O efeito incretina explica a significativa resposta secretória da célula β ao aumento modesto na glicemia após a refeição em sujeitos não diabéticos. A ação incretina foi demonstrada por estudos *in vitro* nos quais concentrações de glicose similares às encontradas após uma refeição determinam uma resposta de magnitude menor na ausência de hormônios gastrointestinais (RASMUSSEN et al., 1990).

Outros hormônios exercem um papel estimulatório na secreção de insulina, como por exemplo, o glucagon, o hormônio do crescimento (FELIG et al., 1971), fator liberador de corticotrofina (KANNO et al., 1999), glicocorticóides (KALHAN e ADAM, 1975), prolactina (LANDGRAF et al., 1977) e lactogênio placentário (BECK e DAUGHADAY, 1967).

1.6.3. Sistema nervoso autônomo

O sistema nervoso parassimpático e o simpático inervam ricamente as ilhotas pancreáticas. Os respectivos neurotransmissores e neuropeptídeos liberados dessas terminações nervosas exercem importantes efeitos regulatórios

sobre a liberação de insulina (GILON e HENQUIN, 2001). A acetilcolina, o VIP, o polipeptídeo pituitário ativador da adenilato ciclase (“pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide”, PACAP) e o peptídeo liberador de gastrina (GRP) são liberados das terminações nervosas parassimpáticas. A noradrenalina, a galanina e o neuropeptídeo Y são liberados das terminações nervosas simpáticas (MOLINA, 2010). A ativação do nervo vago estimula a secreção de insulina, de glucagon, de somatostatina e de polipeptídeo pancreático (GILON e HENQUIN, 2001, MOLINA, 2010). Em relação à ação simpática, altas concentrações de adrenalina e noradrenalina estimulam receptores α_2 -adrenérgicos na célula β e inibem a secreção de insulina, mas em concentrações baixas, estas catecolaminas ativam receptores β -adrenérgicos e estimulam a secreção de insulina (COORE e RANDLE, 1964; PORTE et al., 1966; DAS et al., 2006).

1.6.4. Ação parácrina nas células da ilhota pancreática

O acoplamento entre células da ilhota, via junções comunicantes, foi primeiro documentado por microscopia eletrônica (ORCI et al., 1975) e, após, utilizando-se transferência de corante (MICHAELS e SHERIDAN, 1981; MEDA et al., 1986). Estes estudos evidenciaram acoplamentos homólogos (entre células do mesmo tipo) e heterólogos (entre células de tipos diferentes) (KANNO et al., 2002). Nadal et al. (1999), utilizando microscopia confocal e indicadores fluorescentes de Ca^{2+} , demonstraram que, embora as células β funcionem em sincronia, as células α e δ variam independentemente das células β , o que contraria Meda et al. (1986). Göpel et al. (1999) não obtiveram nenhuma evidência para o acoplamento elétrico entre células heterólogas da ilhota.

A **Figura 1.6** sumariza a interação parácrina que ocorre na ilhota pancreática.

A auto-regulação positiva (autócrina) da insulina (insulina induzindo síntese e/ou secreção de insulina) em presença de 3 mM de glicose foi demonstrada por Aspinwall et al. (1999). Estes autores acreditam que a secreção é dependente da liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (ASPINWALL et al., 2000). Outrossim, foi observado que a insulina ativa o canal K_{ATP} , hiperpolariza a célula β e suprime a oscilação de Ca^{2+} evocada por glicose 10 mM (KHAN et al., 2001).

A célula β possui microvesículas semelhantes às sinápticas, que contém ácido γ -aminobutírico (GABA) (THOMAZ-REETZ e DeCAMILLI, 1994), além dos grânulos de núcleo denso contendo insulina. Existem evidências que as células α e δ expressam receptores $GABA_A$ (RORSMAN et al., 1989) e é possível que o GABA liberado das microvesículas da célula β module o potencial de membrana das células α e δ , influenciando a liberação de glucagon e de somatostatina (KANNO et al., 2002).

Em presença de altos níveis de glicose, a secreção de glucagon é inibida por insulina, GABA e Zn^{2+} secretados pela célula β (GROMADA et al., 2007; ISHIHARA et al., 2003).

A somatostatina serve como um inibidor de amplo espectro das secreções endócrinas e exócrinas. Entretanto, a concentração de somatostatina sanguínea, originária principalmente do sistema gastrointestinal, é muito baixa para afetar as células-alvo dentro das ilhotas. Assim, a somatostatina liberada das células δ é considerada como inibidor local da secreção de insulina e de glucagon das células β e α , respectivamente (STAGNER e SAMOLS, 1992). Por outro lado, foi

observado que a liberação de somatostatina pela célula δ pode ser controlada pelas secreções das células α e β (UNGER e ORCI, 1977).

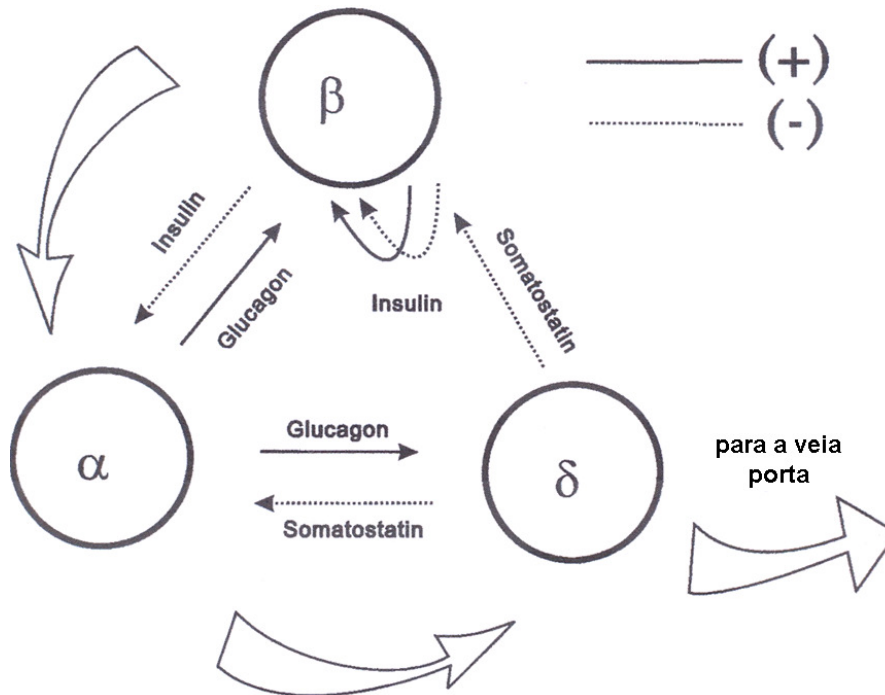


Figura 1.6: Interações entre os produtos de secreção dos principais tipos de células da ilhota. São mostrados os efeitos dos hormônios da ilhota sobre as células α , β e δ . A direção do fluxo sanguíneo dentro da ilhota está indicado por setas abertas (KANNO et al., 2002).

1.7. TESTOSTERONA E AÇÃO NÃO CLÁSSICA

Os hormônios andrógenos apresentam um grande espectro de ação sobre os tecidos reprodutivos, músculo, osso, folículos pilosos pele, fígado e rins, além de agir sobre os sistemas hematopoiético, imune e nervoso central (MOORADIAN et al., 1987). Os efeitos androgênicos estão associados à masculinização e à reprodução. Já os efeitos anabólicos estão relacionados com a síntese protéica no músculo esquelético e a mineralização do osso (KICMAN, 2008).

A testosterona é o andrógeno de maior circulação plasmática. Dois andrógenos de ação mais fraca, desidroepiandrosterona e androstenediona, são sintetizados principalmente na glândula adrenal (em pequena quantidade também no cérebro). Eles exercem 5 a 10% da atividade da testosterona (MAINWARING, 1977). A androstenediona é convertida em testosterona principalmente na célula de Leydig e em tecidos periféricos, ou aromatizada em estradiol. A testosterona é metabolizada em um potente andrógeno 5 α -diidrotestosterona pela enzima 5 α -redutase ou em estradiol pela P450-aromatase (estrogênio sintase). (**Figura 1.7**)

No modelo clássico de ação de esteróides, estes hormônios, como a testosterona e seu metabólito 5 α -diidrotestosterona, difundem-se através da membrana plasmática e ligam-se ao receptor intracelular de andrógeno (“androgen receptor” - AR). O AR é membro de uma superfamília de receptores nucleares, os quais funcionam como fatores de transcrição induzíveis por ligantes. A ligação de andrógenos ao AR induz a dimerização do receptor, a união dos AR a sequências específicas do DNA, chamadas de elemento de resposta ao hormônio, e o recrutamento de corretores para promover ou inibir a expressão dos genes-alvo e subsequente síntese protéica (BEATO, 1989; ZHOU et al., 1994; QUIGLEY et al., 1995; HE et al., 1999; ROY et al., 1999).

Nas últimas duas décadas numerosos trabalhos científicos demonstraram que algumas respostas dos esteróides envolvem um mecanismo não clássico, isto é, não genômico e de ação rápida (segundos a minutos) (FORADORI et al., 2008; WALKER, 2009; WASSERMANN e LOSS, 2004). Em 1941, Selye descreveu uma ação de andrógenos com latência de segundos e uma rápida velocidade da resposta, sugerindo uma ação direta do hormônio na membrana plasmática. A rápida ação de esteróides recebeu atenção em 1967 quando Szego e Davis

reportaram que doses fisiológicas de 17β -estradiol administradas intravenosamente aumentaram em 15 segundos a concentração uterina de AMPc em camundongos ovariectomizados. Estas ações foram definidas por McEwen et al. (1978) como um “efeito não genômico”. O conceito de que esteróides podem atuar rápida e especificamente foi subsequentemente formalizado, baseado em trabalho com esteróides neuroativos (PAUL e PURDY, 1993; KELLY e LEVIN, 2001; WASSERMANN e LOSS, 2004).

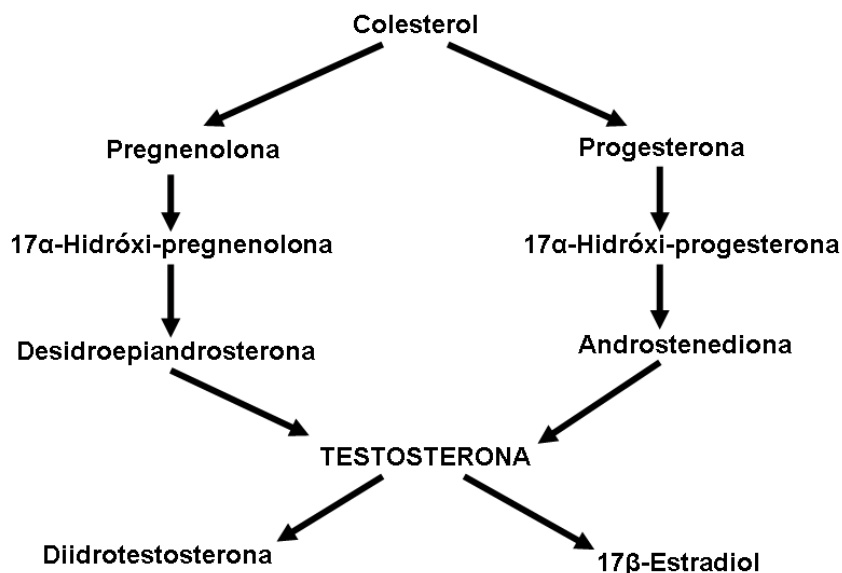


Figura 1.7: Via biossintética de andrógenos. A síntese de andrógenos inicia a partir do colesterol. A desidroepiandrosterona e a androstenediona são produzidas, principalmente, no córtex adrenal. A androstenediona é convertida em testosterona ou estradiol, principalmente, nos testículos e nos tecidos periféricos. A testosterona pode ser convertida em um andrógeno mais potente, a diidrotestosterona pela 5α -redutase, ou em estradiol pela aromatase (MICHELS e HOPPE, 2008).

O efeito rápido e específico da testosterona na membrana plasmática em concentrações fisiológicas foi observado primeiro por Yamada em 1979. O autor observou que a testosterona estimula o ritmo de disparo do potencial de ação em neurônios do núcleo septal do hipotálamo anterior com uma latência

de resposta de 2 a 30 segundos. Koenig et al. (1982) relataram que concentrações fisiológicas de testosterona (1-10 nM) induziram uma rápida estimulação (<1 min) de endocitose e transporte de aminoácido e de glicose em córtex renal de camundongo.

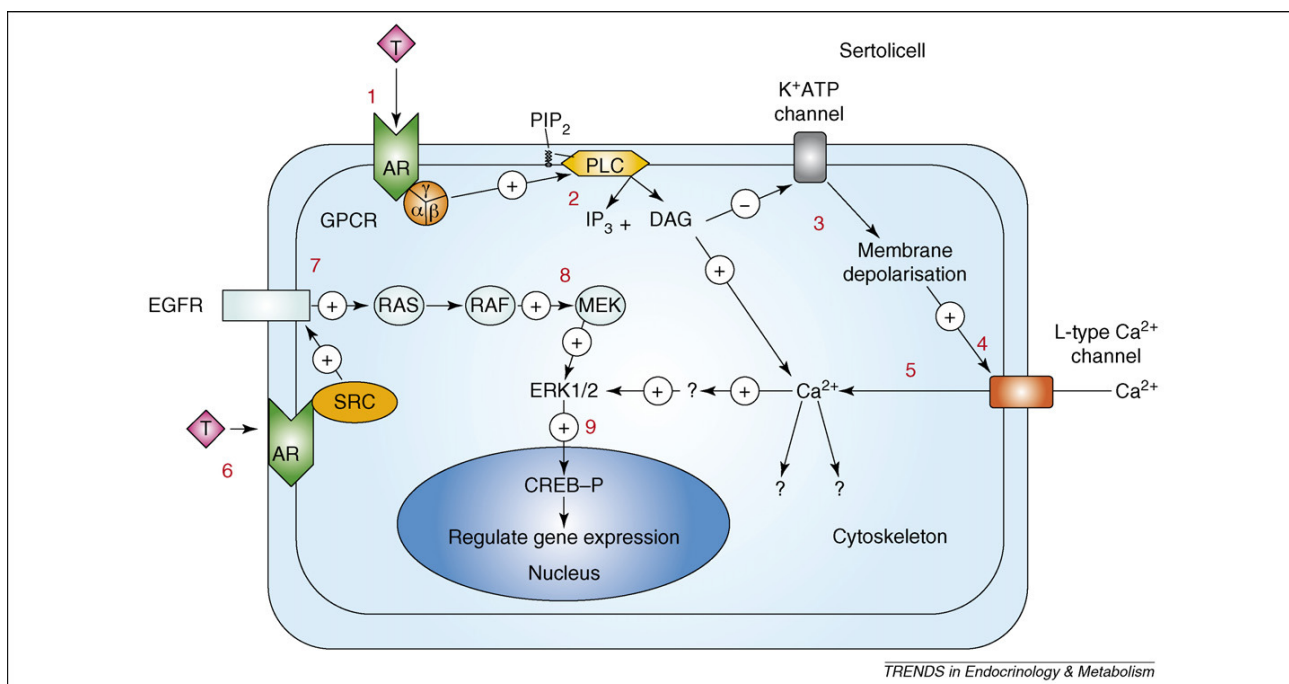
Baseados nos resultados acima descritos e na similaridade da ação não clássica de outros esteróides foram estabelecidos critérios básicos para caracterizar a ação não clássica de andrógenos (FORADORI et al., 2008): **1) velocidade.** Os efeitos devem ocorrer em uma fração de tempo (segundos a minutos) não suficientemente longa para que ocorra a transcrição/tradução gênica. O modelo clássico prediz que a latência entre a exposição ao esteróide e as respostas observadas não podem ser mais curtas que o tempo necessário para o esteróide desencadear a transcrição gênica seguida pela síntese protéica. **2) mediado pela membrana plasmática.** A resposta hormonal pode envolver receptores embebidos na membrana ou associados a ela, ou proteínas de ligação. A ação hormonal pode ser induzida mesmo quando o esteróide está conjugado às moléculas que impeçam sua entrada na célula ou a translocação para o núcleo quando ligado ao receptor. O exemplo mais comum é o uso de testosterona conjugada à albumina sérica bovina. **3) carência da ativação da maquinaria de transcrição/tradução.** Experimentos demonstraram que alguns efeitos dos andrógenos não são bloqueados por inibidores da transcrição gênica e da tradução, indicando que certas respostas dos esteróides podem ser obtidas quando a transcrição ou a síntese protéica está alterada ou é impossível (FORADORI et al., 2008).

Segundo MICHELS e HOPPE (2008), o efeito não clássico de esteróides pode ser potencialmente mediado: **1)** por ligação direta do hormônio a um sítio

de ligação específico na ausência de AR; **2)** pelo clássico AR intracelular; **3)** por um AR transmembrana distinto do clássico, isto é, receptor acoplado a uma proteína G transmembrana, ou **4)** via modificações na fluidez da membrana via interação de esteróides hidrofóbicos com a cabeça polar de fosfolípídeos de membrana (microdomínios) (WILLMER, 1961; DUVAL et al., 1983) Os primeiros três mecanismos são frequentemente usados para explicar os efeitos rápidos dos esteróides, enquanto o último costuma ser negligenciado (MICHELS e HOPPE, 2008).

A existência de um novo AR ligado à membrana tem sido postulada por estudos de ligação específica de andrógenos à membrana plasmática em diferentes tipos celulares, incluindo células endoteliais (FIGUEROA-VALVERDE et al., 2002), células de câncer de mama (HATZOGLOU et al., 2005), células de câncer prostático (KAMPA et al., 2002), osteoblastos (ARMEN e GAY, 2000), macrófagos (GUO et al., 2002) e linfócitos T (BENTEM et al., 1999a; BENTEM et al., 1999b). Infelizmente, o AR de membrana não foi ainda purificado ou clonado não permitindo, assim, sua caracterização definitiva (FORADORI et al., 2008). Um candidato é o receptor AR45, variante do AR que não possui parte do domínio N-terminal codificado pelo exon 1. Este receptor foi descoberto no coração e no músculo esquelético (AHRENS-FATH et al., 2005). Ainda não está claro se este AR truncado exerce um papel significativo na ação de andrógenos nesses tecidos (FORADORI et al., 2008).

Os andrógenos podem atuar sobre diversas vias de sinalização e estas vias estão conectadas umas às outras (**Figura 1.8**).



1. Testosterona (T) liga-se ao receptor de andrógeno associado à membrana (AR).
 2. Ativação de PLC para produzir 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e DAG. 3. Inibição do canal K_{ATP} por IP_3 e/ou DAG, levando à despolarização da membrana. 4. Influxo de Ca^{2+} leva ao aumento na $[Ca^{2+}]_i$. 5. $[Ca^{2+}]_i$ atua, através de uma via desconhecida, na ativação de ERK. O influxo de Ca^{2+} pode também ter outros efeitos (exemplo: citoesqueleto). 6. Uma via alternativa para a ativação de ERK. Testosterona liga-se a um receptor associado à membrana, o qual acopla-se com e ativa a cinase Src. 7. Ativação direta de EGFR por SRC (ativado por AR ligado à testosterona) estimula Ras, a qual, por sua vez, ativa a cinase RAF. 8. Cinase RAF estimula MEK, o qual, por sua vez, ativa ERK. 9. A via ERK fosforila CREB para modular a expressão gênica, determinando efeitos na espermatogênese. **Abreviações:** AR, receptor de andrógeno associado à membrana; CREB, proteína ligadora do elemento de resposta ao AMPc; DAG, diacilglicerol; EGFR, receptor do fator de crescimento epidérmico; ER, retículo endoplasmático; GPCR, receptor acoplado à proteína G; IP_3 , inositol trisfosfato; PLC, fosfolipase C; SRC, cinase Src; RAS, proteína Ras GTPase; RAF, cinase Raf; T, testosterona; ? indica efeitos que requerem estudos futuros (RAHMAN e CHRISTIAN, 2007).

1.7.1. Efeitos da testosterona sobre a membrana de diferentes células

A existência de um receptor androgênico de membrana (mAR) na superfície celular tem sido presumida por vários autores com base na existência de sítios de ligação a andrógenos específicos (HEINLEIN e CHANG, 2002;

WALKER, 2003). Sítios de ligação à testosterona foram constatados na superfície de células T esplênicas com a utilização de testosterona conjugada à albumina sérica bovina (T-BSA) e ligada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC). A fluorescência da T-BSA-FITC foi localizada junto com a da ConArhodamine, um marcador de membrana plasmática (BENTEN et al., 1999a). O trabalho de Benten et al. (1999b) evidenciou a presença de receptores funcionais para testosterona na superfície de macrófagos IC-21 de ratos *iAR-free* (isto é, ratos que não possuem receptores de andrógenos intracitoplasmáticos). A membrana plasmática não é permeável à T-BSA-FITC. Assim o uso do hormônio conjugado tornou possível localizar os sítios de ligação à testosterona na membrana plasmática de macrófagos IC-21 intactos por microscopia laser “confocal scanning”. Os receptores de testosterona na superfície destas células são funcionalmente ligados à homeostase do Ca^{2+} intracelular. A ligação da T-BSA provoca incremento da $[Ca^{2+}]_i$ dentro de segundos devido, predominantemente, aos estoques intracelulares de Ca^{2+} . Além disso, os dados revelam que os receptores de membrana da testosterona são também acoplados à fosfolipase C (PLC) via uma proteína G (BENTEN et al., 1999b).

Em concentrações fisiológicas (1-10 nM), a testosterona estimula rapidamente (menos de 1 minuto) a endocitose e o transporte de aminoácidos e de glicose no córtex renal de ratos, representando uma resposta direta e específica mediada por receptor localizado na superfície da célula-alvo (KOENIG et al., 1982). Em miócitos cardíacos de rato, concentrações nanomolares de testosterona induziram uma rápida elevação (menos de 5 segundos) na atividade da ornitina descarboxilase e na concentração de poliaminas (espermina e espermidina), assim como uma aguda (30-60 segundos) estimulação do fluxo de

Ca^{2+} e dos transportes de membrana dependentes de Ca^{2+} (endocitose e transporte de aminoácidos e de glicose) (KOENIG et al., 1989).

Em neurônios do gânglio pélvico maior de ratos (células-alvo da testosterona que controlam o trato urogenital), a testosterona alterou o potencial de repouso da membrana, causando lenta despolarização com curta latência (1-2 minutos) em concentrações fisiológicas (1 nM) (FÉLIX et al., 2001).

A testosterona aumenta rapidamente a concentração de Ca^{2+} intracelular em células de Sertoli de ratos de 17-20 dias de idade (GORCZYNSKA e HANDELSMAN, 1995). Os mesmos autores sugerem que o hormônio exerça seus efeitos através de uma via rápida de sinalização de membrana. A existência de um sistema alternativo de receptores de superfície celular para andrógenos em células de Sertoli de ratos imaturos (pré-púberes) tem sido postulada por meio de medidas do fluxo de cálcio. A testosterona também aumenta a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em células de Sertoli de ratos imaturos (LEITE et al., 1999). Em células de Sertoli de ratos irradiados *in utero* com ^{60}Co entre os dias 19 e 20 de gestação (WASSERMANN et al., 1992), a testosterona induziu uma imediata (menos de 1 segundo) e transitória despolarização da membrana. Usando a mesma preparação, Miranda et al. (1998) mostraram que a sulfoniluréia glibenclamida estimula em 20 segundos a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ através dos canais de cálcio dependentes de voltagem e induziu prolongada despolarização da membrana das células de Sertoli.

Von Ledebur et al. (2002) demonstraram que a aplicação tópica de testosterona (0,1-0,25 μM) em túbulos seminíferos de ratos imaturos induziu imediata despolarização (menos de 1 segundo) em células de Sertoli empaladas. Este efeito aumentou com o tempo, atingindo o máximo em 5 minutos. Após

lavagem da preparação com solução fisiológica, o potencial de membrana retornou a valores próximos daqueles do potencial de repouso em 5 minutos. Esta resposta da célula de Sertoli foi específica, visto que o estradiol e a progesterona não produziram efeitos sobre o potencial de membrana desta célula.

As ações da glibenclamida sobre o potencial de membrana das células de Sertoli são despolarização e aumento da resistência, ambas irreversíveis (VON LEDEBUR et al., 2002). Os efeitos homólogos da testosterona e da glibenclamida na resposta eletrofisiológica das células de Sertoli apontam para o envolvimento dos canais K_{ATP} na ação do hormônio (WASSERMANN e LOSS, 2004).

Em adição ao receptor clássico intracelular, a ação da testosterona é mediada por sítios identificados na membrana (KONOPLYA e POPPOF, 1992). A ligação da testosterona ao GPCR resulta em uma rápida ativação de PLC, a qual, por sua vez, hidrolisa o fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) a inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). Consequentemente, a depleção de PIP₂ inibe a condutância através do canal K_{ATP} , devido ao desequilíbrio de cargas iônicas. O fechamento do canal K_{ATP} despolariza a membrana da célula de Sertoli e aumenta o influxo de Ca^{2+} na célula (LOSS et al., 2007).

Ao mesmo tempo, a ação da PLC em estimular o metabolismo de PIP₂ e produzir IP₃ causa a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, o qual atua como um segundo mensageiro com efeitos múltiplos (BERRIDGE et al., 1998). O PIP₂ e o Ca^{2+} podem atuar inversamente na estabilidade da cadeia do citoesqueleto que sustenta a membrana plasmática (JANMEY, 1994). Proteínas de ligação à actina, tal como a gelsolina, são ativadas por Ca^{2+} e levam a uma despolimerização dos filamentos de actina F; o PIP₂ antagoniza estas reações estabilizando estes filamentos (SAMBRANO et al., 2003).

Em adição a estas ações rápidas de membrana e de citoesqueleto, a testosterona mostrou rápida indução (dentro de 15 minutos) da fosforilação e da ativação de proteína cinase regulada por Ras (**extracellular signal-regulated kinase**), de proteína cinase regulada por mitogênicos (ERK MAPK) e de proteína ligadora do elemento de resposta ao AMPc (**cAMP response element binding protein – CREB**) em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade (WALKER, 2003). O aumento dos níveis de $[Ca^{2+}]_i$ induzido por testosterona ativam o CREB; os bloqueadores do influxo de Ca^{2+} podem inibir a fosforilação de CREB em células de Sertoli (WALKER, 2003). Cheng et al. (2007) relataram que o rápido efeito da testosterona em célula de Sertoli (1-120 minutos) resulta na migração de AR para a membrana plasmática, facilitação da interação AR-Src e indução da fosforilação e ativação da proteína cinase Src. Subsequentemente, a via MAP cinase é estimulada através da via EGFR. Assim, a via de sinalização não clássica da testosterona é capaz de regular numerosos fatores de transcrição, incluindo CREB (BISCARDI et al., 1999).

Fix et al. (2004) demonstraram a importância da regulação do fator de transcrição CREB pela testosterona para a manutenção da espermatogênese. Inicialmente, pensava-se que CREB era fosforilado na célula de Sertoli, predominantemente, por meio das vias de sinalização mediadas por AMPc e Ca^{2+} , e iniciadas pela ligação de FSH a receptores acoplados à proteína G na membrana da célula de Sertoli (SIMONI et al., 1997). Entretanto, a ação da testosterona na célula de Sertoli não aumenta os níveis de AMPc, mas eleva o $[Ca^{2+}]_i$, sugerindo que a testosterona pode atuar através de uma via que é complementar àquela utilizada por FSH (FIX et al., 2004).

Finalmente, o aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular induzido por FSH e testosterona na célula de Sertoli parece ter diferentes efeitos celulares. Por exemplo, a captação de Ca^{2+} estimulada por FSH estaria relacionada à proliferação celular (DAHIA e RAO, 2006), enquanto que o aumento do Ca^{2+} produzido por testosterona é, ao menos em parte, relacionado à migração celular do epitélio germinativo (CHENG e MRUK, 2002).

1.8. ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS E NANDROLONA

Em homens, os andrógenos são essenciais para sustentar a função reprodutiva. Eles também exercem um importante papel em outras funções, como a manutenção dos tecidos muscular esquelético e ósseo, e a função cognitiva (KICMAN, 2008).

Esteróides anabólicos androgênicos são substâncias sintéticas similares aos hormônios sexuais masculinos, possuindo efeitos androgênicos e anabólicos. Esses esteróides anabólicos são utilizados desde a década de 50 para desenvolver a performance atlética e muscular, aumentando a massa corporal livre de gordura, o tamanho do músculo esquelético e sua força (VAN AMSTERDAM et al., 2010). Além disso, o uso da testosterona e seus congêneres tem sido proposto como contraceptivo masculino e como agente de redistribuição da massa de gordura abdominal em homens obesos de meia idade (COMHAIRE, 1994; CUMMINGS e BREMNER, 1994). A sua ação contraceptiva por depressão da secreção de LH e de FSH hipofisários, destituindo os testículos dos sinais estimulatórios necessários para a espermatogênese, determina uma marcada diminuição na contagem de espermatozóides e infertilidade na maioria dos

homens (AMORY, 2008). Esteróides anabólicos androgênicos também têm sido utilizados na reposição de massa muscular em pacientes com excessiva perda desse tecido, como ocorre em infectados com HIV e em outras doenças (PARR et al., 2010).

Algumas modificações têm sido introduzidas na molécula de testosterona na tentativa de maximizar o efeito anabólico, minimizar o efeito androgênico e diminuir a metabolização hepática do hormônio (KICMAN, 2008). Para resistir a esta metabolização e atingir níveis plasmáticos desejáveis, mais de 1.000 derivados da testosterona têm sido sintetizados e podem ser divididos em três classes. **Classe A** são ésteres 17- β -hidróxi de testosterona com uma elevada solubilidade em lipídeos, requerendo administração intramuscular. **Classe B** são alquilados na posição 17- α -hidróxi e podem ser administrados via oral. **Classe C** são compostos alquilados nos anéis A, B ou C da testosterona, podendo igualmente ser administrados por via oral (HALL e HALL, 2005).

Para a preparação parenteral, o grupo 17- β -hidróxi é esterificado com uma metade ácida (decanoato, laurato, cicloexilpropionato e fenilpropionato para a nandrolona) para prevenir a rápida absorção do veículo oleoso. Uma vez na circulação, ocorre rápida hidrólise pela ação de esterases plasmáticas, liberando o composto ativo. Em geral, quanto mais longa a cadeia, mais lenta é a liberação na circulação, prolongando, assim, a duração da ação (KICMAN, 2008). O decanoato de nandrolona (decanoato de 19-nortestosterona), por não possuir o grupo metil no carbono 19, não é aromatizado em estradiol. Por este motivo, foi o anabólico androgênico escolhido em nossos experimentos (**Figura 1.10**).

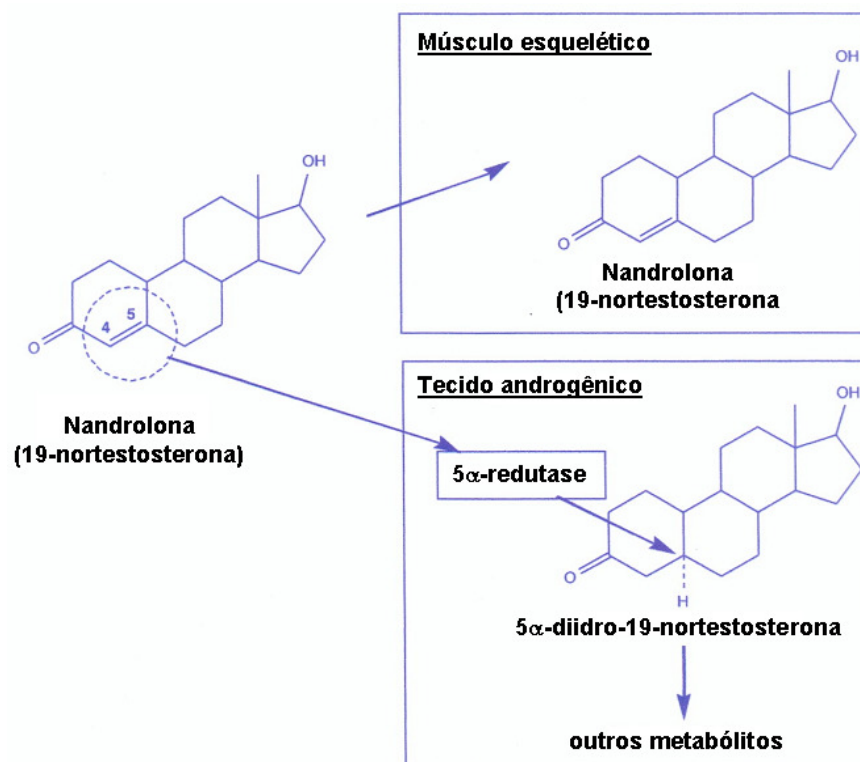


Figura 1.9: Estrutura e metabolismo da nandrolona. Em tecidos androgênicos, a nandrolona (19-nortestosterona) é prontamente convertida pela enzima 5 α -redutase em 5 α -diidro-19-nortestosterona, isto é, a liga dupla entre C4 e C5 é reduzida. Este metabólito liga-se com fraca afinidade ao receptor de andrógeno, comparado com nandrolona. Pode ocorrer metabolismo posterior devido à alta atividade da enzima 3 α -hidroxiesteróide-desidrogenase (a qual reduz o grupo 3-ceto) no tecido androgênico. No músculo esquelético, a atividade da 5 α -redutase é negligenciável e, portanto, a própria nandrolona liga-se com forte afinidade ao receptor androgênico (KICMAN, 2008).

2. HIPÓTESE DE TRABALHO

Já foi demonstrada a ação clássica (efeito genômico) da testosterona sobre a síntese e a liberação de insulina em pâncreas de rato. A testosterona e os hormônios androgênicos anabolizantes atuam na célula β pancreática também de modo não clássico? Esta ação rápida estimularia a secreção de insulina através do fechamento do canal K_{ATP} , despolarizando a célula β e abrindo canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. O consequente aumento de Ca^{2+} intracelular determinaria a secreção de insulina. Também postula-se que esta ação não clássica dos androgênicos possa ocorrer através da ativação da via da fosfolipase C.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o mecanismo de ação não clássica (ação rápida) da testosterona e do anabolizante androgênico nandrolona sobre a secreção de insulina e o transporte de Ca^{2+} em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos machos adultos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Determinar a ação não clássica específica da testosterona sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas.

3.2.2. Determinar se outros esteróides sexuais apresentam efeito similar aos andrógenos sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas.

3.2.3. Determinar o papel do aminoácido alanina na ação não clássica dos androgênios testosterona e nandrolona e da mistura de aminoácidos (glutamina, lisina, alanina e leucina) na ação não clássica da testosterona sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas.

3.2.4. Determinar a ação da testosterona sobre o transporte do aminoácido [^{14}C]-metilaminoisobutírico em ilhotas pancreáticas.

3.2.5. Determinar a participação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L e dos canais K_{ATP} na ação não clássica da testosterona e da nandrolona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas.

3.2.6. Determinar a participação da via da fosfolipase C na ação não clássica da testosterona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados três ratos Wistar machos por experimento. Os animais pesavam entre 180 e 220 g e foram fornecidos pelo biotério da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, onde permaneciam em ambiente com temperatura constante (cerca de 24°C), iluminação de 12h claro/12h escuro controlada e alimentação *ad libitum* com ração peletada (Purina, Nutripal, Porto Alegre, RS). Os ratos foram mantidos em jejum alimentar por 12 horas (água *ad libitum*) antes de serem decapitados para a utilização de seu pâncreas nos experimentos. Este estudo foi realizado de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – 1988.

4.2. SOLUÇÃO- TAMPÃO KREBS-RINGER BICARBONATO (KRb)

Em todos os experimentos foi utilizada solução tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRb) como meio de incubação. O KRb foi preparado imediatamente antes da realização dos experimentos. Todos os reagentes eram de pureza 'pró-análise' (P.A) da E. Merck (Darmstadt, Alemanha). O preparo da solução foi feito a partir de soluções-estoque conforme **tabela 4.1**.

Para o preparo do KRb, foram adicionados volumes iguais de cada solução estoque, acrescentando-se por último o sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio, nesta ordem. A solução era então completada até seu volume final com água destilada, para obtenção das concentrações finais descritas na **tabela 4.1**. A solução era gaseificada com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5, v/v), até o pH 7,4. A osmolalidade desta solução é similar àquela do líquido extracelular de mamíferos.

A solução assim obtida era mantida em gelo durante a preparação do experimento.

Tabela 4.1: Composição salina e concentrações presentes nas soluções estoque de KRb e na solução final.

Substância	Concentração das soluções-estoque (g.L⁻¹)	Concentração final na solução KRb (mM)
NaCl CLORETO DE SÓDIO	180,00	146,0
KCl CLORETO DE POTÁSSIO	9,20	4,7
KH ₂ PO ₄ FOSFATO DE POTÁSSIO MONOBÁSICO	4,22	1,2
NaHCO ₃ BICARBONATO DE SÓDIO	54,60	25,0
MgSO ₄ .7H ₂ O SULFATO DE MAGNÉSIO	7,64	1,2
CaCl ₂ .2H ₂ O CLORETO DE CÁLCIO	9,60	2,5
C ₆ H ₁₂ O ₆ GLICOSE	13,63	3,0
HEPES	1,88	8,0

4.3. ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

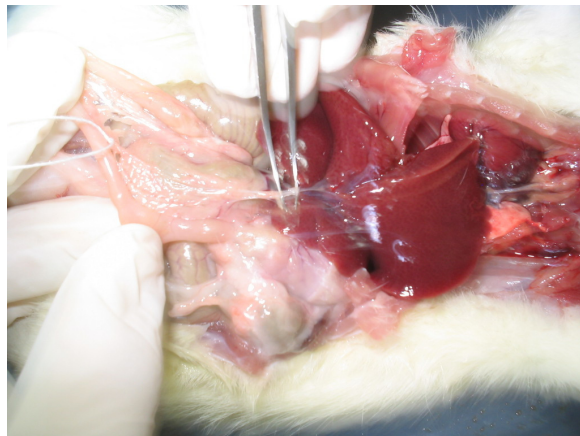
As ilhotas pancreáticas foram isoladas pela técnica de Lacy e Kostianovsky (LACY e KOSTIANOVSKY, 1967) e modificada por Grillo et al. (2005). Em cada

animal foi realizada uma incisão abdominal central para a visualização do pâncreas (**Fig. 4.A**). O ducto biliar era dissecado (**Fig. 4.B e 4.C**), obstruído por ligadura com fio cirúrgico na região próxima à união com o duodeno (**Fig. 4.D**) e canulado em um ponto próximo ao fígado. Pela cânula eram introduzidos através do ducto biliar, lentamente, com uma seringa, 20 mL de Krebs-HEPES [Krebs-Ringer bicarbonato (KRb) suplementado com glicose (3 mM)] até que o pâncreas estivesse claramente distendido (**Fig. 4.E e 4.F**). Esta concentração de glicose é subestimulatória ou sublimiar, isto é, incapaz de estimular a secreção de insulina pela célula β . O pâncreas era então cuidadosamente removido e colocado em placa de Petri, também contendo KRb-HEPES (**Fig. 4.G**). As ilhotas pancreáticas eram isoladas por digestão com a enzima colagenase XI (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) (METZ, 1986). O tecido pancreático era reduzido (2 x 2 mm), e incubado em 1 mL de tampão contendo 3 mg/mL de colagenase. Após incubação por 20 minutos, a 37°C, com agitação vigorosa, a mistura era transferida para tubos cônicos (110 x 15 mm) e ressuspendida com 10 mL com KRb-HEPES livre de colagenase. Após, era centrifugada em temperatura ambiente por 3 minutos a 45 xG (LERNMARK, 1974) em centrífuga Excelsa (modelo FANEM, São Paulo, SP, Brasil). O sobrenadante era descartado e o sedimento era ressuspendido em meio KRb-HEPES fresco. Este procedimento de lavagem era repetido cinco vezes, sendo que nas duas últimas lavagens era realizada sedimentação sem centrifugação, por 10 minutos. Amostras de 10 μ L (5 μ g. mL⁻¹ de proteína) (nos experimentos de secreção de insulina) ou de 50 μ L (25 μ g. mL⁻¹ de proteína) (nos experimentos de captação de ⁴⁵Ca²⁺) do sedimento final (ilhotas isoladas) eram transferidas para tubos tipo “Eppendorff” contendo o meio de incubação KRb-

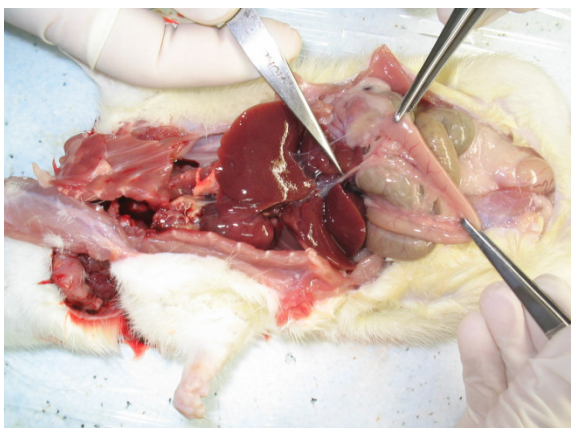
HEPES e com concentração de glicose variável de acordo com o protocolo experimental (LERNMARK, 1974; BARJA-FIDALGO et al., 1991).



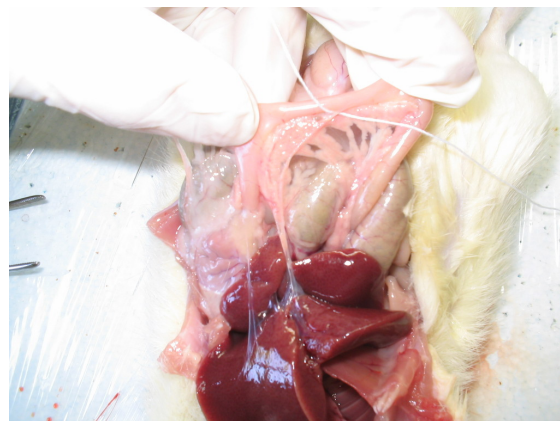
Figura 4.A) Exposição do abdome.



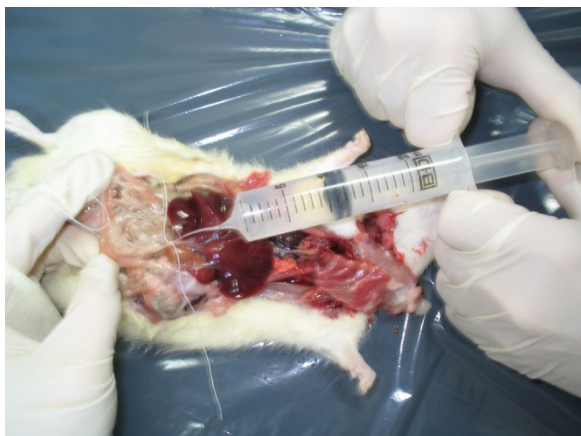
4.B) Dissecção do ducto biliar.



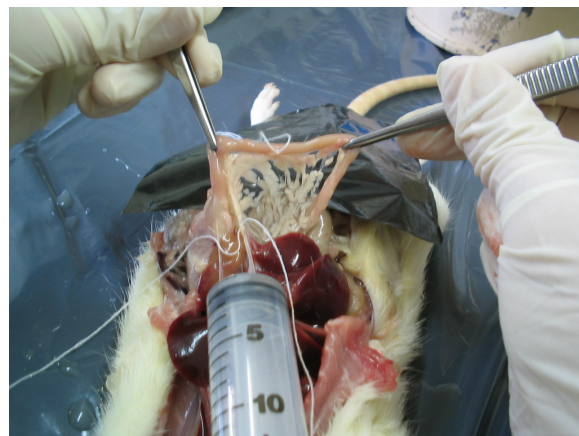
4.C) Ducto biliar dissecado.



4.D) Ligadura do ducto biliar próximo ao duodeno



4.E) Canulação do ducto biliar.



4.F) Pâncreas distendido.



4.G) Pâncreas removido para uma placa de Petri.

4.4. EXPERIMENTOS DE SECREÇÃO DE INSULINA

As ilhotas isoladas (10 μ L) foram pré-incubadas por 30 minutos em um incubador metabólico Dubnoff em tampão KRb-HEPES com glicose 3 mM. Este tempo de pré-incubação permite às ilhotas se adaptarem ao meio de incubação, além de possibilitar a internalização de prováveis hormônios ligados à membrana plasmática das células. A concentração de glicose 3 mM é subestimulatória, isto é, não afeta a secreção de insulina pela célula β e fornece energia para esta durante o período de pré-incubação.

4.4.1. Em presença de concentrações crescentes de glicose

As ilhotas isoladas (10 μ L) foram pré-incubadas por 15 minutos em um incubador metabólico Dubnoff em 500 μ L de tampão KRb-HEPES com glicose 3 mM a 37°C, pH 7,4 e gaseificação constante com carbogênio (O₂:CO₂; 95:5; v/v).

Após este tempo de pré-incubação as ilhotas eram centrifugados por 2 minutos a 45 x G. e o sedimento ressuspenso em 500 µL de tampão KRb-HEPES com glicose nas concentrações de 0, 3 ou 5 mM, respectivamente, sendo, então, incubadas por 15 minutos. A primeira pré-incubação de 15 minutos permite às ilhotas se adaptarem ao meio de incubação, além de possibilitar a internalização de prováveis hormônios ligados à membrana plasmática das células. A segunda pré-incubação de 15 minutos com diferentes concentrações de glicose permite a possível ação deste carboidrato sobre as ilhotas. A seguir foram acrescentados 500 µL de tampão KRb-HEPES acrescidos ou não de testosterona (1µM) sendo incubadas por 180 segundos. A incubação foi interrompida em banho de gelo. Os tubos com as ilhotas eram centrifugados por 2 minutos a 45 x G. O sobrenadante era coletado e a insulina era quantificada por radioimunoensaio. Foi utilizada a dose suprafisiológica de 1µM de testosterona para mostrar efetivamente o efeito, além da possibilidade de uso terapêutico no tratamento da diabetes mellitus tipo II. A testosterona foi obtida de Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA. Este hormônio foi diluído em etanol absoluto até uma diluição final de 0,1%. Experimentos anteriores do laboratório demonstraram que a concentração de etanol utilizada para a diluição dos esteróides não altera a secreção de insulina (dados não publicados).

4.4.2. Em presença de testosterona, testosterona ligada à albumina sérica bovina (T-BSA), estradiol ou progesterona.

As ilhotas isoladas (10µL) foram pré-incubadas por 30 minutos em um incubador metabólico Dubnoff em 500 µL de tampão KRb-HEPES com glicose 3 mM a 37°C, pH 7,4 e gaseificação constante com carbogênio (O₂:CO₂; 95:5; v/v).

Após a adição de 500 μ L de KRb-HEPES com ou sem testosterona (25nM a 1 μ M), testosterona ligada a albumina sérica bovina (T-BSA) (1 μ M), estradiol (10 nM) ou progesterona (1 μ M) foram incubadas por mais 3 minutos. A incubação foi interrompida em banho de gelo. Os tubos com as ilhotas eram centrifugados por 2 minutos a 45 x G. O sobrenadante era coletado e a insulina era quantificada por radioimunoensaio. A progesterona, o estradiol e a testosterona-BSA foram obtidas de Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA. A testosterona, a progesterona e o estradiol foram diluídos em etanol absoluto até uma diluição final de 0,1%.

4.4.3. Em presença de aminoácidos

Os aminoácidos são importantes estimuladores da secreção de insulina pela célula β pancreática. Com o intuito de estudarmos um possível sinergismo entre as ações dos andrógenos e dos aminoácidos sobre a secreção de insulina foram realizados os experimentos a seguir.

4.4.3.1. Em presença de alanina

As ilhotas isoladas (10 μ L) foram pré-incubadas por 30 minutos em um incubador metabólico Dubnoff em 500 μ L de tampão KRb-HEPES com glicose 3 mM a 37°C, pH 7,4 mais alanina (5 mM) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) e gaseificação constante com carbogênio (O₂:CO₂; 95:5; v/v). Após foi feita a adição de 500 μ L de KRb-HEPES com testosterona (1 μ M) ou nandrolona (1 μ M) e as amostras foram incubadas por mais 3 minutos. A incubação foi interrompida em banho de gelo. Os tubos com as ilhotas eram centrifugados por 2 minutos a 45 x G. O sobrenadante era coletado e a insulina era quantificada por

radioimunoensaio. A nandrolona foi obtida do composto comercial Deca-Durabolin (decanoato de nandrolona, ampola com $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de veículo).

4.4.3.2. Em presença de mistura de aminoácidos

Os experimentos com a mistura de aminoácidos foram realizados segundo o protocolo descrito em **4.4.3.** em presença de testosterona ($1\mu\text{M}$). As concentrações da mistura de aminoácidos utilizadas foram as seguintes: **MIX1** [glutamina (2 mM), lisina (1,5 mM), alanina (1 mM), leucina (1 mM)], **MIX2** [glutamina (4 mM), lisina (3 mM), alanina (2 mM), leucina (2 mM)] ou **MIX4** [glutamina (8 mM), lisina (6 mM), alanina (4 mM), leucina (4 mM)]. A incubação foi interrompida em banho de gelo. Os tubos com as ilhotas eram centrifugados por 2 minutos a $45 \times G$. O sobrenadante era coletado e a insulina era quantificada por radioimunoensaio.

4.5. EXPERIMENTOS DE TRANSPORTES

4.5.1. Captação de aminoácidos

Os aminoácidos são importantes estimuladores da secreção de insulina pela célula β , seja por possuírem carga positiva, por serem co-transportados com o íon sódio e/ou por fornecerem ATP através da sua metabolização. Estes três mecanismos determinam despolarização da membrana e consequente excitação da insulina. O objetivo do presente experimento foi estudar se a testosterona favorece a captação deste importante estimulador pela célula β .

As ilhotas isoladas (10 μ L) foram pré-incubadas por 30 minutos em um incubador metabólico Dubnoff em 1000 μ L de tampão KRb-HEPES com glicose 3 mM a 37°C, pH 7,4 e gaseificação constante com carbogênio (O₂:CO₂; 95:5; v/v). Após este período de pré-incubação as ilhotas eram centrifugados por 2 minutos a 45 x G. e o precipitado ressuspenso em 1000 μ L de tampão KRb-HEPES acrescido de 0,2 μ Ci de [1-¹⁴C] ácido α -metil aminoisobutírico (MeAIB) 50 mCi/mmol, Du Pont-NEN Research Products) mais testosterona (1 μ M) e incubados por 15, 30 ou 60 minutos nas condições acima descritas. Após o final da incubação os tubos eram centrifugados por 2 minutos a 45 x G. O sobrenadante (meio externo) era preservado. As ilhotas eram então transferidas para tubos Eppendorff contendo 1 mL de água destilada (meio interno). Os tubos com as ilhotas eram congelados por 24 horas e após sonicados por 30 segundos. Eram retiradas amostras de 100 μ L de cada frasco e do respectivo meio externo para contagem da radioatividade em 2 mL de líquido de cintilação Opti Phase Hisafe 3 (Wallac Oy, Turku, Finlândia) em um espectrômetro de cintilação LKB rack beta modelo 1215 (LKB-Producer AB, Bromma, Suécia). Os resultados foram expressos pela relação entre a radioatividade contida no tecido (meio interno) e no meio de incubação (meio externo) (T/M: cpm.mL⁻¹ meio interno/ cpm.mL⁻¹ do meio externo)

4.5.2. Captação de ⁴⁵Ca²⁺

Em todos os experimentos de captação de ⁴⁵Ca²⁺, as ilhotas isoladas (50 μ L) eram pré-incubadas por 45 ou 50 minutos em um incubador metabólico Dubnoff, em 250 μ L ou 500 μ L de tampão KRb-HEPES com glicose 3 mM mais

0,2 $\mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}^{2+}$ (1 $\text{mCi}\cdot\text{mg}^{-1}$, Du Pont – NEN Research Products) a 37°C, pH 7,4 em atmosfera constante de carbogênio ($\text{O}_2:\text{CO}_2$; 95:5; v/v). O tempo de pré-incubação de 45 ou 50 minutos era necessário para que a concentração interna de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ atingisse um platô de captação basal e as concentrações internas e externas se iguallassem. A meia vida do $^{45}\text{Ca}^{2+}$ é de 163 dias e o decaimento era calculado a partir de uma tabela fornecida pela Du Pont-NEN Research Products, em função da data de fabricação.

Para a interrupção da incubação, foi utilizada a técnica de Batra e Sjogren (1983), na qual é utilizado 1 mL de tampão frio com cloreto de lantânio (10 mM) Esta solução é isenta de cálcio e contém (em mM): NaCl 127.5, KCl 4.6, MgCl_2 1.2, LaCl_3 10, HEPES 10 e glicose 11 a 0°C, sendo adicionado no final da incubação aos frascos, para interromper o fluxo de cálcio. Após, os tubos eram centrifugados por 2 minutos a 45 x G. O sobrenadante era desprezado e as ilhotas eram lavadas duas vezes com a solução de cloreto de lantânio. As ilhotas eram, então, transferidas para tubos tipo Eppendorff contendo 1 mL de água destilada. Os tubos eram congelados por 24 horas e após sonicados por 30 segundos. Eram retiradas amostras de 50 μL de cada frasco para contagem da radioatividade em 2 mL de líquido de cintilação Opti Phase Hisafe 3 em um espectrômetro de cintilação LKB rack beta modelo 1215. O valor em cpm era convertido a pmoles de cálcio, de acordo com o decaimento da atividade específica do $^{45}\text{Ca}^{2+}$, fornecido pelo fabricante.

Os resultados de captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foram expressos como pmol de $\text{Ca}^{2+}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

4.5.2.1. *Em presença de concentrações crescentes de glicose*

As ilhotas isoladas (50µL) foram pré-incubadas por 45 minutos em um incubador metabólico Dubnoff em 500 µL de tampão KRb-HEPES com $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mais glicose 3 mM a 37°C, pH 7,4 e gaseificação constante com carbogênio ($\text{O}_2:\text{CO}_2$; 95:5; v/v). Após este tempo de pré-incubação as ilhotas eram centrifugados por 2 minutos a 45 x G e o precipitado ressuspensão em 500 µL de tampão KRb-HEPES com $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mais 0, 5, 8, ou 11 mM de glicose, respectivamente, sendo, então, incubadas por 15 minutos. A seguir, foram acrescentados 500 µL de tampão KRb-HEPES com $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mais as concentrações de glicose acima citadas, acrescidos ou não de testosterona (0,1µM) e incubados por 60 segundos. A incubação foi interrompida conforme descrito em **4.5.2**. Utilizou-se a dose de 0,1µM de testosterona por ser aquela em que, em nossas condições experimentais, a secreção de insulina atinge um platô de estimulação.

4.5.2.2. *Em presença de nifedipina, diazoxida, glibenclamida ou tolbutamida*

As ilhotas isoladas (50µL) foram pré-incubadas por 50 minutos em um incubador metabólico Dubnoff em 250 µL de tampão KRb-HEPES com $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mais glicose 3 mM a 37°C, pH 7,4 e gaseificação constante com carbogênio ($\text{O}_2:\text{CO}_2$; 95:5; v/v). Após, foi feita a adição de 250 µL de KRb-HEPES com $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mais glicose 3 mM e nifedipina (1µM) ([1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-3,5-pyridinedicarboxylic acid dimethyl], Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA), diazoxida (100µM) (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA), glibenclamida (25µM) ou tolbutamida (10µM). A seguir, novamente pré-incubadas por 10 minutos. Após, foram acrescentados 500 µL de tampão KRb-HEPES com

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ mais as concentrações das respectivas drogas, acrescidos ou não dos androgênios: testosterona ($1\mu\text{M}$) em presença de nifedipina, testosterona ($0,1\mu\text{M}$) em presença de diazoxida, testosterona ($0,1\mu\text{M}$) e nandrolona ($0,1\mu\text{M}$) nos experimentos com glibenclamida e tolbutamida. Após, os frascos foram incubados por 60 segundos. A incubação foi interrompida conforme descrito em **4.5.2**.

No experimento com nifedipina, utilizamos a dose suprafisiológica de $1\mu\text{M}$ de testosterona para mostrar efetivamente o efeito. Nos experimentos com diazoxida e as sulfoniluréias, utilizamos a dose de $0,1\mu\text{M}$ de testosterona e nandrolona por ser aquela em que, em nossas condições experimentais, a secreção de insulina atinge um platô de estimulação.

A diazoxida foi preparada com $0,05\text{N}$ de NaOH em cada experimento e sua concentração final, em Krb foi $0,001\text{N}$. A glibenclamida e a tolbutamida foram fornecidas por Research Biochemicals International, Natick, MA, USA. A solução estoque de glibenclamida foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocada a uma temperatura de -20°C até sua utilização. As soluções-estoque foram diluídas em solução-tampão salina de Krebs (KRb) descrita acima. Experimentos anteriores do laboratório demonstraram que a concentração de $0,1\%$ de DMSO utilizada para a diluição da glibenclamida não altera a secreção de insulina (dados não publicados).

4.5.2.3. Em presença do inibidor da fosfolipase C U73122

As ilhotas isoladas ($50\mu\text{L}$) foram pré-incubadas por 45 minutos em um incubador metabólico Dubnoff em $250\mu\text{L}$ de tampão KRb-HEPES com $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mais glicose 3 mM a 37°C , pH $7,4$ e gaseificação constante com carbogênio ($\text{O}_2:\text{CO}_2$; $95:5$; v/v). Após, foi feita a adição de $250\mu\text{L}$ de KRb-HEPES com $^{45}\text{Ca}^{2+}$

mais glicose 3 mM e U73122 (2 μ M) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO,USA) e, a seguir, novamente pré-incubadas por 15 minutos. Após, foram acrescentados 500 μ L de tampão KRb-HEPES com $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mais U73122, acrescentados ou não de testosterona (1 μ M). Os frascos foram incubados, então, por 60 segundos. A incubação foi interrompida conforme descrito em **4.5.2**.

4.6. QUANTIFICAÇÃO DE INSULINA

A insulina foi quantificada por radioimunoensaio para insulina de rato (RIA-Kit, Linco Research, INC, St. Charles, MO, EUA). Este radioimunoensaio possui seu próprio controle através de padrões de insulina purificada de rato em concentrações crescentes de 0,1 a 10,0 ng.mL⁻¹ de tampão.

Os resultados de secreção de insulina foram expressos como ng de insulina.mg⁻¹ de proteína.

4.7. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Utilizou-se albumina sérica bovina como padrão (1mg.mL⁻¹).

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos o erro padrão da média (SEM).

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni para comparação entre os grupos nos seguintes experimentos:

- efeito de andrógenos, 17β -estradiol e progesterona sobre a secreção de insulina;
- efeito da testosterona sobre o transporte de aminoácido.
- efeito da testosterona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em presença de nifedipina ou U73122;
- efeito da testosterona, tolbutamida e glibenclamida sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

Utilizou-se ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni nos seguintes experimentos:

- efeito da testosterona sobre a secreção de insulina e a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em presença de concentrações crescentes de glicose;
- efeito de andrógenos e alanina, e da testosterona e mistura de aminoácidos sobre a secreção de insulina;
- efeito da testosterona sobre a secreção de insulina em presença de diazoxida.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

Foi utilizado o programa GraphPad InStat versão 3.01 para Windows 95/NT, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA.

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DA TESTOSTERONA SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA EM ILHOTAS PANCREÁTICAS

5.1.1. Influência da glicose na ação da testosterona sobre a secreção de insulina

A testosterona (1 μM) aumentou a secreção de insulina em 68% no meio livre de glicose e em presença de 3 mM de glicose em relação ao controle. Assim, o hormônio estimulou em concentrações sublimiáres (0 e 3 mM), mas não aumentou a secreção de insulina em relação ao controle na concentração limiar de 5 mM de glicose. No grupo controle a glicose na concentração de 5mM aumentou significativamente ($p < 0,05$) a secreção de insulina em relação aos grupos 0 e 3mM.

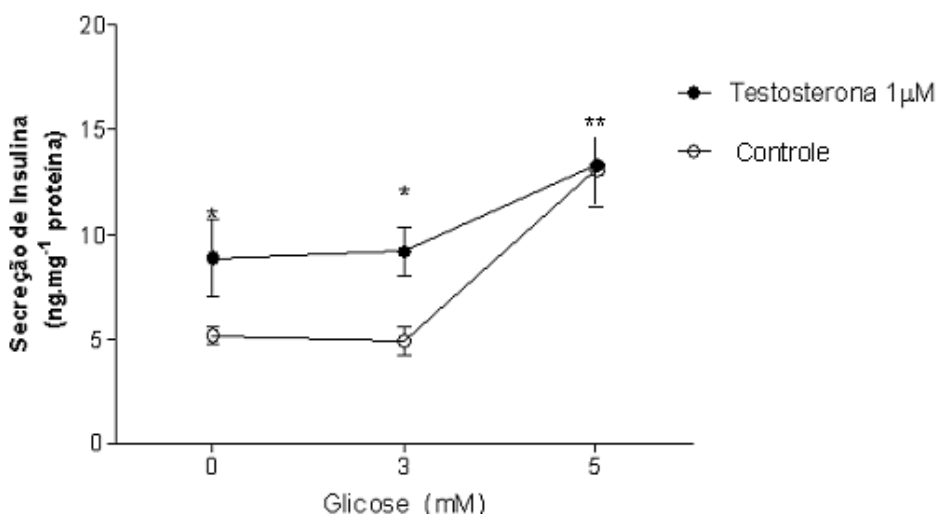
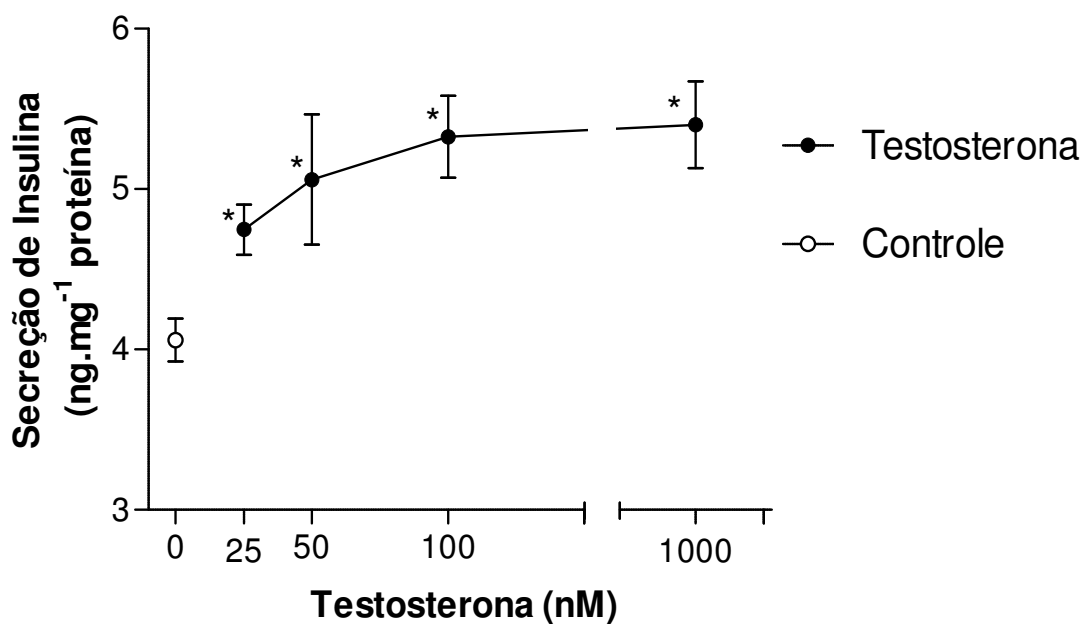


Figura 5.1.1: Efeito da testosterona sobre a secreção de insulina em presença de diferentes concentrações de glicose. As ilhotas foram pré-incubadas por 15 minutos com glicose 3 mM e a seguir, novamente pré-incubadas por 15 minutos com glicose nas concentrações de 0, 3 e 5 mM, respectivamente. Após, foram incubadas por 180 segundos na presença ou não de testosterona (1 μM) nas diferentes concentrações de glicose. Os valores representam as médias e as barras verticais os erros padrões. Foram utilizados 6 amostras de 3 pâncreas. Diferença significativa * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; ** $p < 0,05$ em relação aos grupos 0 e 3mM de glicose.

5.1.2. Curva dose-resposta de testosterona sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas

A secreção de insulina estimulada pela testosterona em ilhotas pancreáticas foi dependente da concentração do hormônio (**Figura 5.2.a**). Na concentração plasmática fisiológica para ratos (25 nM), a testosterona estimulou a secreção de insulina (17%; $p < 0,05$). Nas concentrações de 50 nM, 100 nM e 1000 nM (1 μ M), a secreção de insulina aumentou em 26%, 30% e 34%, respectivamente. Já a testosterona ligada à albumina (1 μ M) aumentou a secreção de insulina em 10% (**Figura 5.2.b**).

A



B

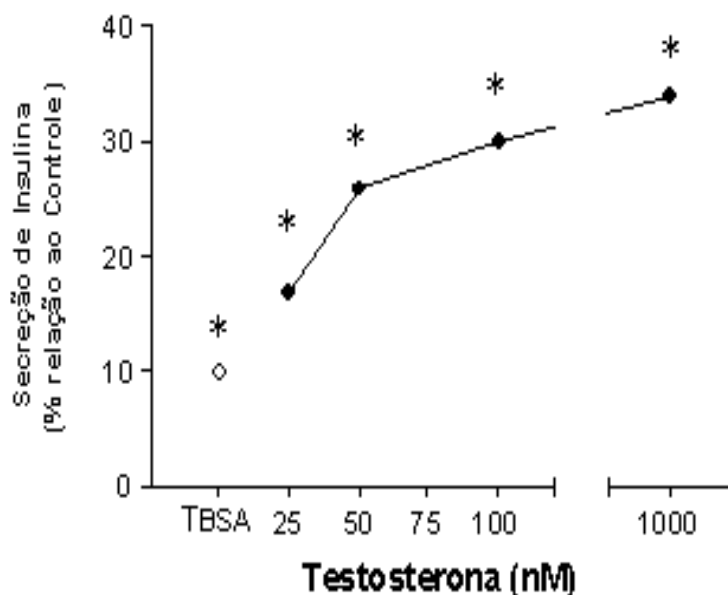


Figura 5.1.2: Curva dose-resposta de testosterona sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas. (A) Curva dose-resposta de testosterona sobre a secreção de insulina. As ilhotas foram pré-incubadas por 30 minutos com glicose 3 mM e incubadas por 180 segundos na ausência ou na presença de testosterona nas seguintes concentrações: 25 nM, 50 nM, 100 nM e 1000 nM (1 μ M) (1 μ M), **(B)** Efeito da testosterona ligada à albumina e de diferentes concentrações de testosterona sobre a secreção de insulina em ilhotas isoladas de pâncreas de rato (% em relação ao controle). **TBSA** - testosterona ligada à albumina (na dose de 1 μ M). Os valores representam as médias e as barras verticais os erros padrões. Foram utilizados 6 amostras de 3 pâncreas. Diferença significativa * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.1.3. Ação da testosterona, da testosterona ligada à albumina (T-BSA), do 17 β -estradiol e da progesterona sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas

A secreção de insulina por ilhotas pancreáticas foi significativamente aumentada (34%; $p < 0,05$) pela presença de testosterona (1 μM) por 180 segundos. Essencialmente, resultados similares foram obtidos com T-BSA (1 μM), mas este mostrou menor potência (10%; $p < 0,05$). A presença de 17 β -estradiol (10 nM) ou progesterona (1 μM) não modificou a secreção basal de insulina, diferentemente do mostrado por testosterona e T-BSA. Todos os experimentos foram realizados em presença de 3 mM de glicose no meio de incubação.

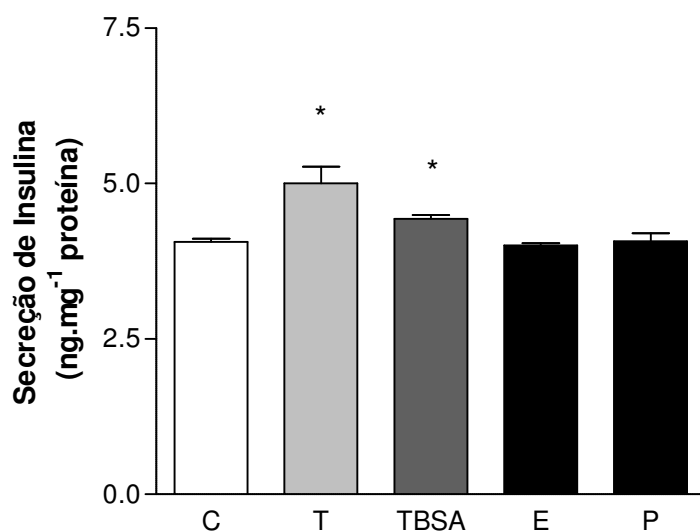


Figura 5.1.3: Ação da testosterona, da testosterona ligada à albumina (T-BSA), do 17 β -estradiol e da progesterona sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas. As ilhotas foram pré-incubadas por 30 minutos com glicose 3 mM e incubadas por 180 segundos com ou sem testosterona (1 μM), testosterona ligada à albumina (TBSA) (1 μM), 17 β -estradiol (10 nM), ou progesterona (1 μM). **C** – controle; **T** – testosterona (1 μM); **TBSA** - testosterona ligada à albumina (1 μM); **E** – estradiol (10 nM); **P** – progesterona (1 μM). Os valores representam as médias e as barras verticais os erros padrões. Foram utilizados 6 amostras de 3 pâncreas. Diferença significativa * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

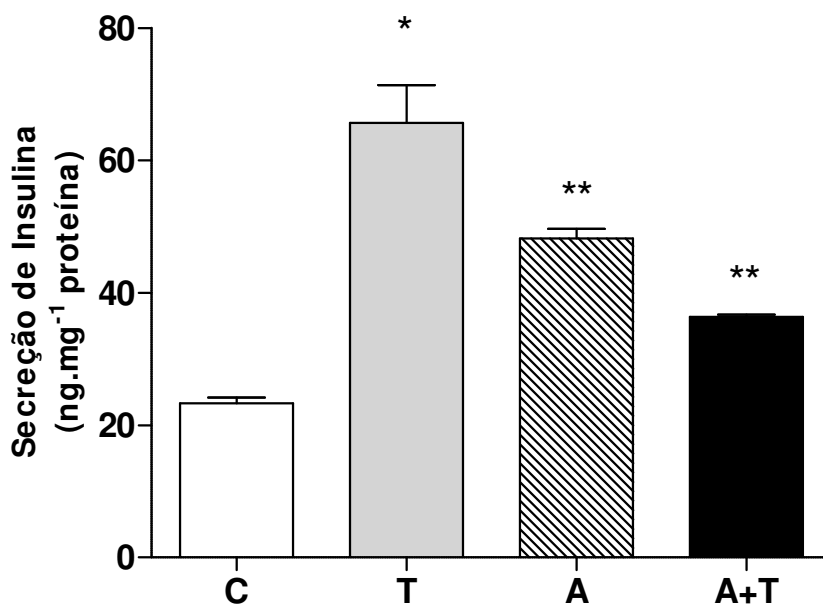
5.2. EFEITO DE AMINOÁCIDOS NA AÇÃO ESTIMULATÓRIA DA TESTOSTERONA E DA NANDROLONA SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA

5.2.1. Efeito da alanina na ação da testosterona e da nandrolona sobre a secreção de insulina

Houve aumento (182%; 107%) significativo da secreção de insulina em presença de testosterona (1 μ M) e alanina (5mM), respectivamente, em relação ao controle. Entretanto, quando a testosterona foi associada com alanina, ocorreu uma diminuição de 25% ($p < 0,05$) da secreção de insulina em relação à alanina e 50% em relação ao grupo testosterona.

A secreção de insulina estimulada pela nandrolona foi de 104% ($p < 0,05$) e pela alanina foi de 107% ($p < 0,05$), em relação ao controle. Quando a nandrolona foi associada com alanina ocorreu um aumento de 77% da secreção de insulina em relação ao grupo controle.

A



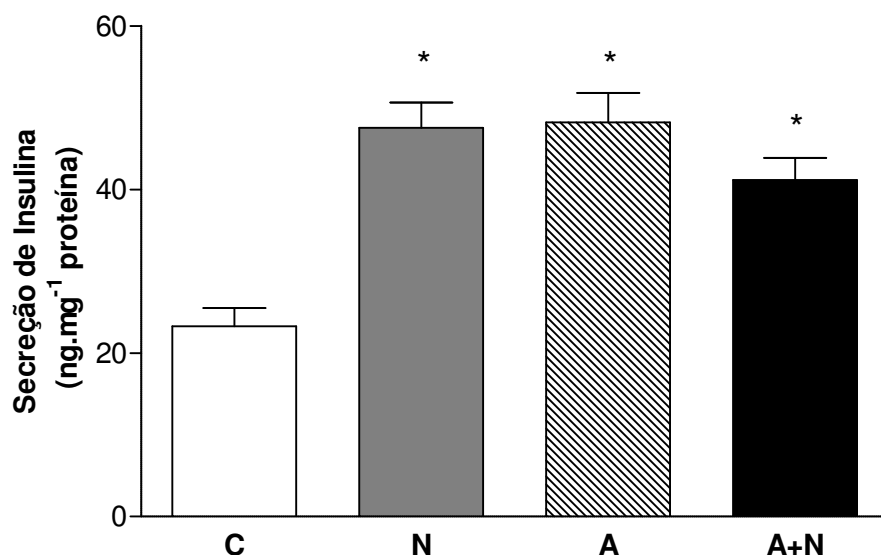
B

Figura 5.2.1: Comparação dos efeitos estimulatórios de andrógenos e alanina sobre a secreção de insulina. As ilhotas foram pré-incubadas por 30 minutos com ou sem alanina (5 mM) e incubadas por 180 segundos com ou sem testosterona (1 μ M) (**A**) ou nandrolona (1 μ M) e/ou alanina (5 mM) (**B**). **C** – controle; **T** – testosterona; **N** – nandrolona; **A** – alanina; **A+T** – alanina incubada com testosterona; **A+N** – alanina incubada com nandrolona. Os valores representam as médias e as barras verticais os erros padrões. Foram utilizados 6 amostras de 3 pâncreas. Diferença significativa * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; ** $p < 0,05$ em relação ao grupo testosterona.

5.2.2. Efeito da mistura de aminoácidos (MIX) na ação da testosterona sobre a secreção de insulina

A testosterona estimulou significativamente a secreção de insulina quando incubada por 3 minutos na ausência de MIX. Porém, o hormônio estimulou fortemente a secreção quando associado com MIX2. Não houve aumento significativo da secreção de insulina quando a testosterona foi incubada com MIX1 ou MIX4. Em relação a MIX4, o valor de secreção alcançado pelo controle é o mesmo que aquele obtido quando associado à testosterona.

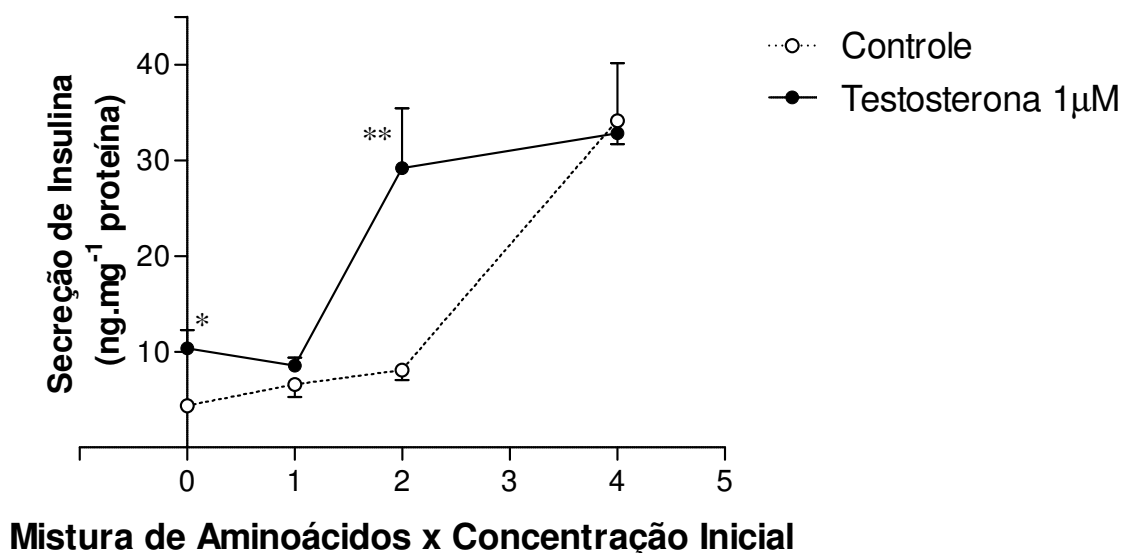


Figura 5.2.2: Efeito da testosterona sobre a secreção de insulina quando associado com diferentes concentrações de mistura de aminoácidos (MIX).

As ilhotas eram pré-incubadas por 30 minutos com glicose 3 mM. Após, incubadas por 180 segundos com ou sem testosterona (1 μM) seguido por mais 180 minutos com ou sem mistura de aminoácidos: **MIX1** [glutamina (2 mM), lisina (1,5 mM), alanina (1 mM), leucina (1 mM)], **MIX2** [glutamina (4 mM), lisina (3 mM), alanina (2 mM), leucina (2 mM)] ou **MIX4** [glutamina (8 mM), lisina (6 mM), alanina (4 mM), leucina (4 mM)]. Os valores representam as médias e as barras verticais os erros padrões. Foram utilizados 6 amostras de 3 pâncreas. Diferença significativa * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle na ausência de MIX; ** $p < 0,02$ em relação ao grupo controle com MIX2.

5.3. EFEITO DA TESTOSTERONA SOBRE O TRANSPORTE DE AMINOÁCIDO NÃO METABOLIZÁVEL EM ILHOTAS PANCREÁTICAS

5.3.1. Ação da testosterona sobre o transporte de aminoácido não metabolizável em ilhotas pancreáticas

A testosterona não estimulou significativamente a captação do aminoácido não metabolizável ácido metilaminoisobutírico [^{14}C] ([^{14}C]MeAIB) em nenhum dos tempos de incubação testados. Mesmo com um tempo prolongado de 60 minutos, no qual o controle apresentou a maior captação, o hormônio não foi capaz de estimular o transporte deste aminoácido.

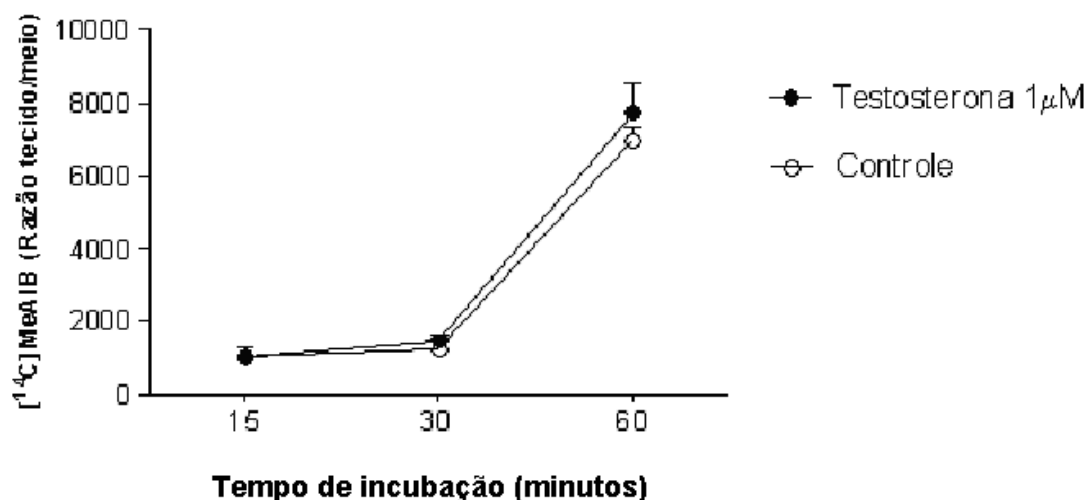


Figura 5.3.1: Ação da testosterona sobre o transporte de aminoácido não metabolizável em ilhotas pancreáticas. As ilhotas isoladas foram pré-incubadas por 30 minutos com glicose 3 mM e incubadas por 15, 30 ou 60 minutos com [^{14}C]MeAIB com ou sem testosterona (1 μM). Os valores representam as médias e as barras verticais os erros padrões. Foram utilizados 6 amostras de 3 pâncreas. Não houve diferença significativa entre os grupos controle e testosterona nos três tempos de incubação.

5.4. EFEITO DA TESTOSTERONA SOBRE A CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ EM ILHOTAS PANCREÁTICAS, PAPEL DOS CANAIS DE Ca^{2+} TIPO L

5.4.1. Influência da glicose na ação da testosterona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

O hormônio estimulou significativamente ($p < 0,05$) a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ na ausência de glicose (aumento de 28% em relação ao controle) e nas concentrações de 5 mM (limiar) (86%) e 8 mM (53%), mas não aumentou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em relação ao controle na concentração supralimiar de 11 mM de glicose. A estimulação da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ pela testosterona foi maior na presença de 8 mM de glicose. No grupo controle as diferentes concentrações de glicose no meio de incubação não alteraram significativamente a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

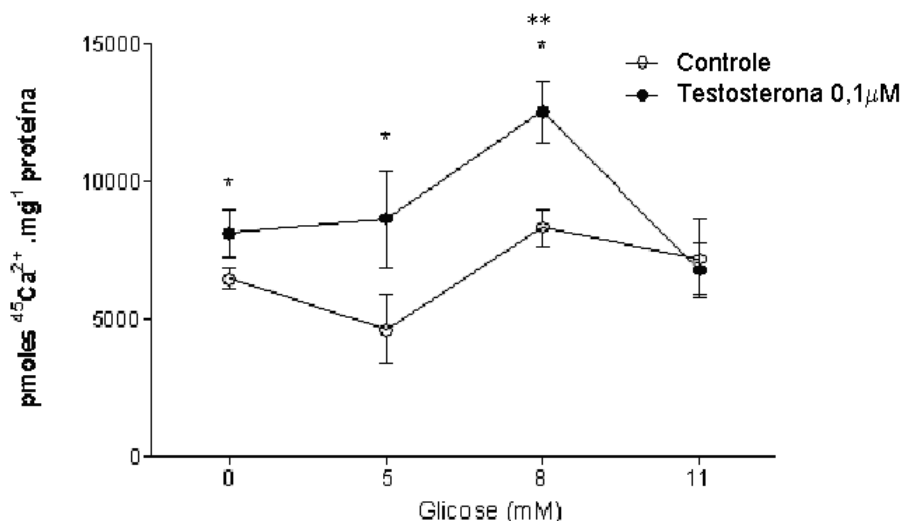


Figura 5.4.1: Efeito da testosterona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em presença de diferentes concentrações de glicose. As ilhotas foram pré-incubadas por 45 minutos com glicose 3 mM e a seguir, novamente pré-incubadas por 15 minutos com glicose nas concentrações de 0, 5, 8 e 11 mM, respectivamente. Após, foram incubadas por 60 segundos na presença ou não de testosterona (0,1µM) nas diferentes concentrações de glicose. Os valores representam as médias e as barras verticais os erros padrões. Foram utilizados 6 amostras de 3 pâncreas. Diferença significativa * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; ** $p < 0,02$ em relação ao grupo testosterona sem glicose.

5.4.2. Efeito do bloqueador de canais de Ca^{2+} tipo L, nifedipina, sobre a ação estimulatória da testosterona na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

A pré-incubação e a incubação com nifedipina ($1\ \mu\text{M}$) não alterou a captação basal de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. A testosterona ($1\ \mu\text{M}$) estimulou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em 61% ($p < 0,05$) em relação ao controle. Já quando a testosterona foi incubada com nifedipina, seu efeito estimulatório foi bloqueado.

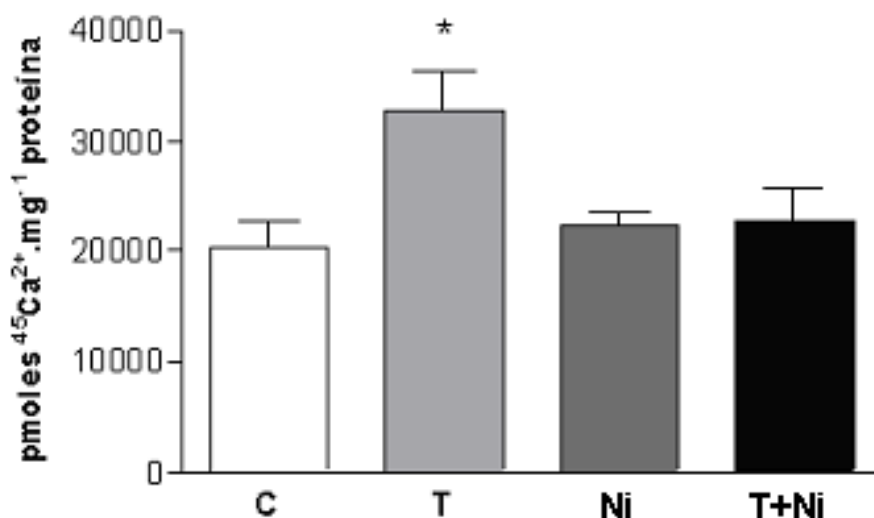


Figura 5.4.2: Efeito antagonista do bloqueador de canais de Ca^{2+} tipo L, nifedipina, sobre a ação estimulatória da testosterona na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

As ilhotas foram pré-incubadas por 50 minutos com glicose 3 mM e a seguir, novamente pré-incubadas por 10 minutos com ou sem nifedipina ($1\ \mu\text{M}$). Após, foram incubadas por 60 segundos na presença ou não de testosterona ($1\ \mu\text{M}$) e/ou nifedipina. **C** – controle; **T** – testosterona; **Ni** – nifedipina; **T+Ni** – testosterona incubada com nifedipina. Os valores representam as médias e as barras verticais os erros padrões. Foram utilizados 6 amostras de 3 pâncreas. Diferença significativa * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.5. PAPEL DOS CANAIS K_{ATP} NA AÇÃO DA TESTOSTERONA E DA NANDROLONA SOBRE A CAPTAÇÃO DE $^{45}Ca^{2+}$ EM ILHOTAS PANCREÁTICAS

5.5.1. Efeito do estimulador da abertura de canais K_{ATP} , diazoxida, na ação da testosterona sobre a captação de $^{45}Ca^{2+}$ em ilhotas pancreáticas

A diazoxida, estimuladora da abertura de canais K_{ATP} , determina a hiperpolarização da célula β , o que impede a abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e a consequente entrada deste íon na célula. A pré-incubação e a incubação com diazoxida (100 μ M) determinou uma diminuição de 27% na captação de $^{45}Ca^{2+}$ em relação ao controle. Isto indica que parte da captação basal de Ca^{2+} pela ilhota está vinculada ao fechamento de canais K_{ATP} . A testosterona (0,1 μ M) estimulou a captação de $^{45}Ca^{2+}$ em 33% em relação ao controle. Já quando a testosterona foi incubada com diazoxida, seu efeito estimulatório foi anulado.

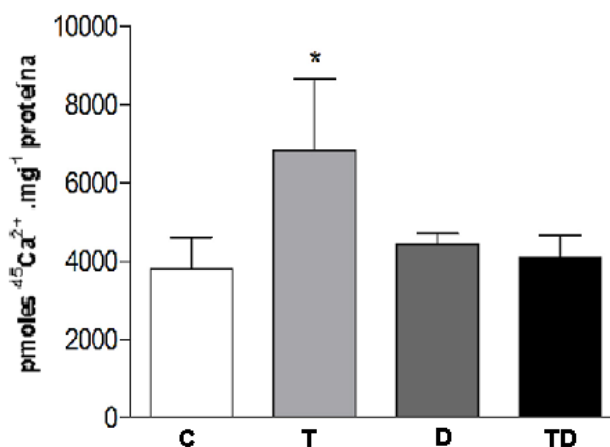


Figura 5.5.1: Efeito antagonista da diazoxida sobre a ação estimulatória da testosterona na captação de $^{45}Ca^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. As ilhotas foram pré-incubadas por 50 minutos com glicose 3 mM e a seguir, novamente pré-incubadas por 10 minutos com ou sem diazoxida (100 μ M). Após, foram incubadas por 60 segundos na presença ou não de testosterona (0,1 μ M) e/ou diazoxida. **C** – controle; **T** – testosterona; **D** – diazoxida; **TD** – testosterona incubada com diazoxida. Os valores representam as médias e as barras verticais os erros padrões. Foram utilizados 6 amostras de 3 pâncreas. Diferença significativa * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

5.5.2. Ação de andrógenos e de sulfoniluréias sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas

A captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas de Langerhans isoladas foi estimulada em 60 segundos pela presença de testosterona (0,1 μM), que aumentou a captação em 64%. A nandrolona (0,1 μM) também aumentou a captação em 90%. Resultados similares foram obtidos em incubação de 1 minuto em presença dos bloqueadores do canal K_{ATP} glibenclamida (25 μM) e tolbutamida (10 μM), aumentando a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em 50% e 71%, respectivamente.

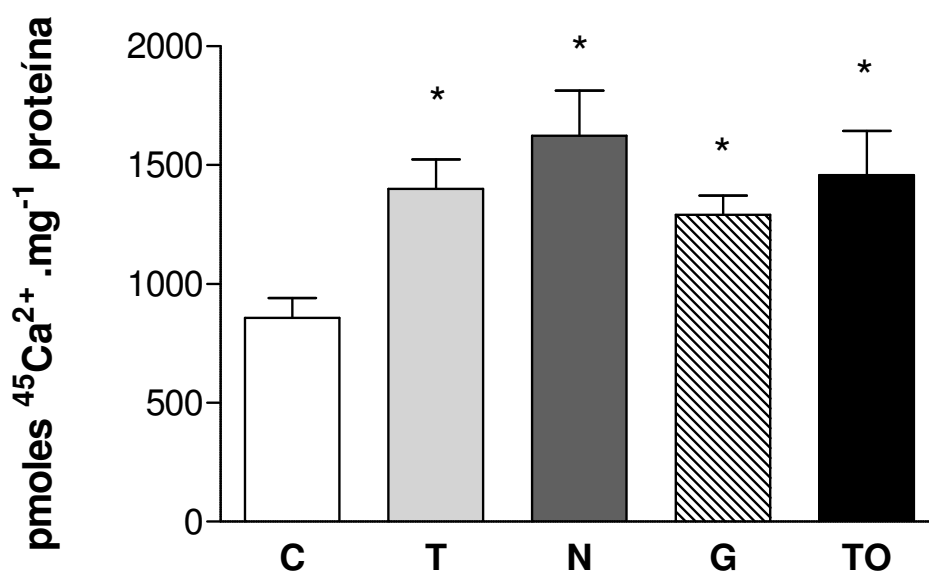


Figura 5.5.2: Ação de andrógenos e de sulfoniluréias sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas. As ilhotas foram pré-incubadas por 50 minutos com glicose 3 mM e a seguir, novamente pré-incubadas por 10 minutos com ou sem glibenclamida (25 μM) ou tolbutamida (10 μM). Após, foram incubadas por 60 segundos com testosterona (0,1 μM), nandrolona (0,1 μM), glibenclamida ou tolbutamida. **C** – controle; **T** – testosterona; **N** – nandrolona; **G** – glibenclamida; **TO** – tolbutamida. Foram utilizadas 6 amostras de 3 pâncreas. Diferença significativa * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.6. PAPEL DA FOSFOLIPASE C NA AÇÃO DA TESTOSTERONA SOBRE A CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ EM ILHOTAS PANCREÁTICAS

5.6.1. Efeito do inibidor da fosfolipase C, U73122, na ação da testosterona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

U73122 é um inibidor da fosfolipase C. A pré-incubação e a incubação com U73122 (2 μM) determinou apenas a captação basal de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, à semelhança da captação no controle. Isto indica que a ativação da fosfolipase C não está envolvida na captação basal de Ca^{2+} pela ilhota.

A testosterona (1 μM) estimulou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em 95% em relação ao controle. Já quando a testosterona foi incubada com U73122, seu efeito estimulatório foi anulado.

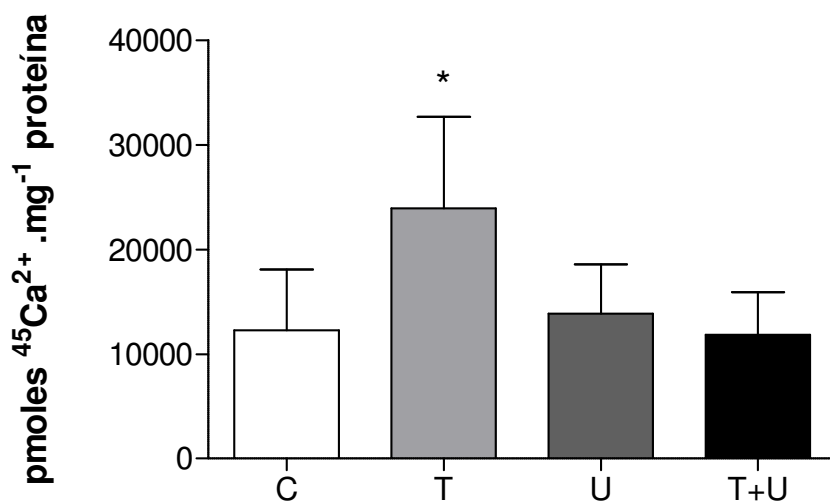


Figura 5.6.1: Efeito antagonista do inibidor da fosfolipase C, U73122, sobre a ação estimulatória da testosterona na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. As ilhotas foram pré-incubadas por 45 minutos com glicose 3 mM e a seguir, novamente pré-incubadas por 15 minutos com ou sem U73122 (2 μM). Após, foram incubadas por 60 segundos na presença ou não de testosterona (1 μM) e/ou U73122. **C** – controle; **T** – testosterona; **U** – U73122; **T+U** – testosterona incubada com U73122. Foram utilizados 6 amostras de 3 pâncreas. Diferença significativa * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

6. DISCUSSÃO

O efeito da testosterona sobre a liberação de insulina pela célula beta das ilhotas de Langerhans foi demonstrado, em 2001, por Morimoto et al. Estes autores evidenciaram que esta ação ocorria pela via clássica de transdução de sinal da testosterona (MORIMOTO et al., 2001; MORIMOTO et al, 2010).

Na década de 1980 a hipótese que a testosterona também poderia agir de forma rápida via receptor de membrana foi bastante investigada em diferentes tipos celulares. Em 2005, Grillo et al. demonstraram a ação rápida da testosterona sobre a secreção de insulina em ilhotas isoladas.

O presente trabalho dá continuidade às investigações sobre a ação não clássica da testosterona com o objetivo de esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos na ação deste hormônio sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas.

As incubações de ilhotas em presença de testosterona confirmam os resultados obtidos por Grillo et al. (2005) que demonstraram a ação estimulatória não clássica deste hormônio sobre a secreção de insulina.

Sabidamente, a T-BSA não se difunde através da membrana plasmática das células, assim, o efeito estimulatório deste hormônio sobre a secreção de insulina pancreática sugere uma ação hormonal de membrana. Entretanto, o efeito da T-BSA foi de menor magnitude quando comparado àquele obtido com a testosterona livre. A molécula de testosterona livre pode se ligar a um receptor de membrana e também se difundir através da membrana, ligando-se aos receptores intracelulares clássicos. Este mecanismo parece aumentar a capacidade de resposta da testosterona sobre a secreção de insulina.

Segundo Michels e Hoppe (2008), o efeito não clássico de esteróides pode ser potencialmente mediado: **1)** por ligação a um sítio na membrana; **2)** por ligação ao clássico AR intracelular, através da ativação de Src cinase, por exemplo; **3)** por um AR de membrana distinto não clássico, isto é, receptor acoplado a uma proteína G transmembrana, ou **4)** via modificações na fluidez da membrana (microdomínios). Os primeiros três mecanismos são frequentemente usados para explicar os efeitos rápidos dos esteróides enquanto o último costuma ser negligenciado.

Morimoto et al. (2001) demonstraram que testosterona aumenta a concentração de RNAm de insulina, *in vitro* e *in vivo*. Estes autores também demonstraram que, em condições fisiológicas, os níveis circulantes de testosterona em ratos pré-púberes e em adultos têm correspondência com a expressão gênica de insulina no pâncreas e em sua concentração sérica. A drástica redução no conteúdo de testosterona, através da gonadectomia, diminuiu a expressão gênica de insulina e sua proporção no plasma. Os autores demonstraram que o conteúdo sérico de insulina é restaurado e aumenta em 5 a 7 dias após o início da reposição de testosterona em ratos adultos gonadectomizados (MORIMOTO et al., 2001). Em situações fisiopatológicas, como em mulheres com síndrome do ovário policístico que apresentam hiperandrogenismo, também é relatado aumento na liberação de insulina (DIAMANTI-KANDARAKIS, 2008).

Os resultados obtidos no presente trabalho apontam para a utilização de segundos mensageiros intracelulares tanto por via receptor clássico como o não clássico. Esta hipótese explicaria, em parte, a diferença na magnitude da resposta de liberação de insulina entre a T-BSA e a testosterona livre.

Foi descrito que a ação da testosterona na membrana celular estaria associada à ativação de PLC via proteína G_q (WASSERMANN e LOSS, 2004). Esta ativação hidroliza PIP2 a IP3 e DAG, levando a redução da concentração de PIP2 próximo ao canal K_{ATP} , reduzindo as cargas negativas de superfície e aumentando a sensibilidade do canal ao ATP, o que leva à inibição do mesmo, com conseqüente despolarização da membrana e abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L (WASSERMANN e LOSS, 2004). Os experimentos com o inibidor de fosfolipase C (U73122) demonstram uma redução da captação de cálcio pela ilhota, sugerindo diminuição na liberação de insulina por menor concentração intracelular de cálcio. Dados da literatura (RAHMAN e CHRISTIAN, 2007) sugerem a participação do DAG e do IP3 como segundos mensageiros da ação da testosterona sobre a célula de Sertoli. Considerando que os resultados do presente estudo demonstraram a participação da fosfolipase C na transdução do sinal da testosterona na célula β da ilhota pancreática de rato, sugere-se a participação do DAG e do IP3 como segundos mensageiros. Contudo, experimentos adicionais serão necessários para comprovar essa hipótese na célula β .

A secreção de insulina estimulada pela testosterona em ilhotas pancreáticas é dependente da dose. Na concentração plasmática fisiológica de rato de 25 nM, a testosterona estimulou, significativamente, a secreção de insulina em 17%. Com a dose de 100 nM, a secreção de insulina estimulada pela testosterona atingiu seu valor máximo com 30% de aumento. Entretanto, na dose de 1000 nM (1 μ M) o aumento da secreção de insulina foi similar àquele obtido com 100nM. Experimentos têm mostrado que as vesículas secretórias existem em diferentes grupos funcionais. Somente 1 a 5% dos grânulos pertencem ao

grupo prontamente disponível para fusão com a membrana plasmática (“readily releasable pool” – RPP) (ELIASSON et al, 1997; NEHER, 1998). Os grânulos pertencentes a esse grupo sofrem exocitose sem qualquer modificação após estimulação. A liberação de tais grânulos explicaria a 1ª fase da secreção de insulina (liberação rápida) e seu fim marcaria a depleção deste grupo. O tempo de incubação utilizado neste trabalho experimental foi somente de três minutos, o que sugere que a insulina liberada pertence à primeira fase de secreção. Desta forma, um aumento de concentração do hormônio em 10 vezes (1000nM), mas com um tempo curto de incubação não seria suficiente para estimular a segunda fase da secreção insulínica. Assim, o platô indicaria a utilização dos grânulos prontamente disponíveis, pois 95 a 99% dos grânulos pertencentes ao grupo não disponível necessitam sofrer uma série de reações dependentes, por exemplo, de ATP e de Ca^{2+} (coletivamente referidas como mobilização) para obterem a capacidade de liberação (ELIASSON et al, 1997; NEHER, 1998).

Com o objetivo de verificar se outros hormônios esteróides sexuais teriam efeito similar aos andrógenos sobre a secreção de insulina, as ilhotas foram incubadas em presença de 17β -estradiol ou progesterona. Em nossos experimentos, o 17β -estradiol e a progesterona não estimularam a secreção de insulina em incubação de três minutos e em presença de 3mM de glicose. Nadal et al. (1998) demonstraram que em presença de concentrações estimulatórias (8,3mM) de glicose e, não em condições basais, o 17β -estradiol, em doses crescente (0,5 a 10 nM), aumentou a variação da concentração do íon cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) na célula β pancreática. No presente trabalho foi utilizada uma dose de 17β -estradiol semelhante àquela testada por Nadal et al. (1998), contudo, a concentração de glicose no meio foi sublimiar (3 mM), sugerindo que, para

ocorrer liberação de insulina por ação de 17β -estradiol, seria necessária a presença de glicose em concentração estimulatória (8,3 mM). Nadal et al. (1998) não constataram efeito do 17β -estradiol em presença de concentrações elevadas de glicose (11mM).

Contrariamente, a progesterona na dose 10 μ M e em presença de diferentes concentrações elevadas (8,4 a 28 mM) de glicose inibe a secreção de insulina em ilhotas isoladas (STRAUB et al., 2001). No presente estudo, não foi verificada ação da progesterona sobre a secreção de insulina. Provavelmente, devido às doses de progesterona e de glicose utilizadas: a dose de progesterona foi de 1 μ M e de glicose 3mM.

Desta forma, pode-se sugerir que o efeito estimulatório sobre a secreção de insulina é específico dos andrógenos nas condições experimentais deste trabalho.

Na literatura, está bem documentado que a glicose é o maior estímulo para a liberação de insulina em mamíferos. Com o objetivo de avaliar se a ação da testosterona sobre a secreção de insulina seria intermediada pela glicose ou teria uma ação independente deste metabólito foram utilizadas diferentes doses de glicose no meio de incubação da testosterona.

No grupo controle (sem testosterona) o aumento da secreção de insulina só ocorreu na concentração de 5mM de glicose. O aumento da secreção de insulina em presença de 3mM de glicose mais testosterona foi similar aquele verificado na ausência de glicose, sugerindo que o efeito deste hormônio independe da presença de baixas concentrações de glicose. Entretanto, quando as ilhotas foram incubadas em presença de concentração estimulatória de glicose (5mM) mais testosterona, o efeito estimulador da glicose, quando comparado

àquele do grupo controle, foi menor. Os dados do presente trabalho indicam que a testosterona estimula o fechamento do canal K_{ATP} . Esta ação ocorre em três minutos na ausência ou em presença de doses sublimiáres de glicose, sugerindo que não ocorre um efeito somatório entre a glicose e a testosterona sobre a liberação de insulina pelas células β pancreáticas.

O efeito estimulador da glicose sobre a secreção de insulina ocorre via metabolização deste carboidrato com aumento da concentração de ATP intracelular, o que requer um tempo maior. Em músculo esquelético de ratos foi demonstrado que a testosterona estimula a atividade da enzima glicogênio sintase e inibe a atividade da enzima glicogênio fosforilase (RAMAMANI et al., 1999). Recentemente, em músculo esquelético de camundongo, Haren et al. (2010) demonstraram que a testosterona estimula genes envolvidos com a síntese e reprime os genes dos inibidores da síntese de glicogênio (proteína inibidora -1 da fosfatase e fosforilase cinase- γ). Os resultados do presente trabalho sugerem que a testosterona estimularia o fechamento dos canais de K_{ATP} , aumentando a secreção de insulina, provavelmente, via mensageiros químicos como a fosfolipase C. Contudo, quando em presença de doses estimulatórias ou supra-fisiológicas de glicose, a testosterona estimularia a síntese de glicogênio na célula β , desviando a glicose da via glicolítica, levando, assim, à redução da resposta estimulatória da glicose sobre a secreção de insulina. Desta forma, esses dados sugerem que o efeito estimulador da testosterona sobre a secreção de insulina ocorreria quando as concentrações de glicose no meio fossem baixas.

Para observar a ação da testosterona sobre o canal K_{ATP} , foi usada diazoxida, que aumenta a probabilidade de abertura deste canal, levando a um

consequente aumento de condutância ao potássio, hiperpolarizando a membrana. Quando associada a diazoxida com a testosterona observa-se uma inibição do efeito estimulatório do andrógeno sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, o que indica que a ação da testosterona envolva o fechamento do canal K^+_{ATP} e consequente despolarização da membrana da célula beta. Mecanismo semelhante foi constatado em células de Sertoli (LOSS et al., 2004) e em miócitos lisos vasculares (NAKASHIMA e VANHOUTTE, 1995) por ação da testosterona. Este achado foi comprovado nos experimentos com a glibenclamida e tolbutamida, que sabidamente fecham os canais de K^+_{ATP} . Os resultados demonstram que doses fisiológicas de testosterona e $0,1\mu\text{M}$ de nandrolona estimulam a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em magnitude semelhante às doses de $25\mu\text{M}$ de glibenclamida e $10\mu\text{M}$ de tolbutamida, confirmando que a testosterona e seu análogo nandrolona agem sobre a liberação de insulina em células beta por fechamento de canais de K^+_{ATP} .

Está bem demonstrado na literatura que a entrada de íon cálcio na célula beta é necessário para que ocorra a liberação de insulina. A testosterona aumentou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ na ausência de glicose e em presença de doses estimulatórias de glicose. Utilizando-se a nifedipina, um potente bloqueador de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L, a ação da testosterona sobre a captação de cálcio foi anulada, confirmando o envolvimento destes canais tipo L na ação estimulatória da testosterona sobre a secreção de insulina nas células β . Os dados demonstram que o objetivo final da ação da testosterona é a abertura dos canais de cálcio para que ocorra a exocitose dos grânulos de secreção da insulina. Entretanto, quando a dose de glicose utilizada foi supra-fisiológica o efeito da testosterona sobre o transporte de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foi drasticamente reduzido. Este achado corrobora os resultados anteriores obtidos, quando se constatou que em

presença de concentrações de glicose acima de 5 mM ocorre uma redução na capacidade estimulatória da testosterona sobre a secreção de insulina.

Foi demonstrado, *in vivo*, que os aminoácidos derivados de dieta com proteínas em combinação com glicose podem aumentar a secreção de insulina em ilhotas contendo células beta pancreáticas ou em linhagens celulares de células beta (CHARLES e HENQUIN, 1983; KIMBALL et al., 2002; SENER e MALAISSE, 1980). A L-glutamina e L-alanina são os aminoácidos mais abundantes no sangue e nos fluidos extracelulares, seguidos por aminoácidos de cadeias ramificadas (valina, leucina e isoleucina) (HENQUIN et al., 2006).

Somente poucos aminoácidos aumentam isoladamente a secreção de insulina pelas células beta, embora seus mecanismos sejam diversos (FAJANS et al., 1967; MCCLENAGHAN et al., 1996). Entretanto, alguns aminoácidos individualmente (ex., a glutamina) não estimulam secreção de insulina, *in vitro*, quando adicionados em concentrações fisiológicas. Combinações de aminoácidos ou dose mais elevadas que as fisiológicas são mais efetivas sobre esta ação (HENQUIN et al., 2006). Aminoácidos catiônicos, como L-lisina, agem diretamente despolarizando a membrana da célula beta em pH fisiológico na presença de glicose. Outros aminoácidos, co-transportados com Na⁺ (ex. alanina), também podem despolarizar a membrana e induzir a secreção de insulina através da ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem. Outros sinais mitocondriais também podem ter impacto sobre a secreção de insulina (MAECHLER, 2002). O metabolismo mitocondrial é também ativado por aminoácidos tais como alanina, glutamina ou glutamato. O ciclo do ácido tricarboxílico gera equivalentes redutores os quais são transferidos para a cadeia

transportadora de elétrons, determinando a geração de ATP (NEWSHOLME et al., 2007).

Em células β , a L-glutamina é consumida de maneira intensa devido à alta renovação das proteínas que ocorre nesta célula. Entretanto, quando este aminoácido é administrado isoladamente, ele é rapidamente metabolizado pela célula β , porém não é capaz de estimular a secreção de insulina ou aumentar a liberação deste hormônio quando induzida pela glicose. Newsholme et al. (2007) postulam que quando a glutamina é administrada sozinha haveria formação de GABA a partir do glutamato. Entretanto, quando são administradas leucina mais glutamina, a secreção de insulina pela célula β aumenta. A leucina ativa a enzima glutamato desidrogenase (GDH), estimulando a entrada no ciclo do ácido tricarboxílico, aumentando a relação ATP/ADP e o consequente fechamento do canal K_{ATP} e despolarização da célula β , o que leva à liberação de insulina.

A incubação com L-alanina em concentração de 5mM estimula de forma significativa a secreção de insulina. A alanina pode estimular a liberação de insulina por três via: **1)** aumentando a produção de ATP na célula beta; **2)** por ser co-transportada com Na^+ , despolarizando, assim, a membrana celular; e/ou **3)** por aumento na concentração de AMPc intracelular (HENQUIN e MEISSNER, 1986; SENER e MALAISSE, 2002).

Outro fator importante que deve ser ressaltado é que a L-alanina estimula também a secreção de glucagon pelas células α . No presente trabalho, a incubação foi realizada com ilhotas isoladas; provavelmente, ocorreu também a liberação de glucagon por ação da L-alanina. Sabidamente, o glucagon estimula a liberação de insulina por via parácrina. Desta forma, a liberação de insulina por ação da alanina deve ter ocorrido por uma combinação de efeitos que envolvem o

metabolismo intracelular do aminoácido, entrada de sódio no co-transporte com a L-alanina, geração de segundo mensageiro (AMPc) e ação do glucagon.

Contudo, quando as ilhotas foram incubadas (30 min) com L-alanina e depois adicionadas testosterona ou nandrolona ao meio de incubação o efeito estimulatório da L-alanina sobre a secreção de insulina diminuiu em cerca de 25%. Sabidamente, a testosterona estimula a síntese de proteínas; desta forma, a adição destes andrógenos ao meio de incubação desviaria a L-alanina para a via de síntese protéica, reduzindo o substrato para a geração de ATP e subsequente liberação de insulina.

Apesar da testosterona estimular a síntese de proteínas, os resultados deste trabalho demonstram que este hormônio não estimulou a captação de [¹⁴C]MeAIB pelas ilhotas pancreáticas isoladas. Estes resultados são concordantes com aqueles descritos em células de Sertoli, nas quais a testosterona não estimulou significativamente a captação deste aminoácido (SPRITZER e WASSERMANN, 1985).

Com o objetivo de testar os efeitos sinérgicos dos aminoácidos e da testosterona sobre a secreção de insulina, foi utilizada uma mistura de aminoácidos (MIX) composta por glutamina, lisina, alanina e leucina, os resultados deste estudo confirmam os achados de Henquin et al. (2006). O MIX1 apresenta concentrações de glutamina e leucina que são semelhantes às aquelas encontradas intracelularmente (NEWSHOLME et al., 2007). A testosterona estimula marcadamente a secreção de insulina em presença de MIX2, porém ocorre um platô quando a concentração desses aminoácidos é 4 vezes (MIX4) maior que MIX1. Os resultados deste estudo sugerem que a presença de testosterona no meio de incubação com MIX2 teria uma ação sinérgica, pois no

grupo controle (sem testosterona) a mistura de aminoácidos só apresenta efeito significativo com valores de aminoácidos do MIX4. Estes achados sugerem que a testosterona estimularia a secreção de insulina quando os substratos energéticos no meio de incubação acham-se em baixas concentrações. Esta hipótese é confirmada quando ao meio de incubação foi adicionado o MIX4 e não ocorreu um aumento da secreção da insulina em presença de testosterona.

Os resultados desta tese sugerem que a testosterona e a nandrolona, agindo no sítio de ligação na membrana e intracelularmente, estimulariam a secreção de insulina pelas células β pancreáticas na ausência e na presença de baixas concentrações de substratos energéticos, como a glicose e os aminoácidos.

Esta ação estimulatória dos andrógenos sobre a secreção de insulina ocorreria via fechamento de canais K_{ATP} , que levam à despolarização celular e, como consequência, a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L e exocitose dos grânulos de secreção.

O trabalho também sugere que a testosterona, unindo-se a um sítio de ligação na membrana plasmática, utilizaria a fosfolipase C na transdução do sinal para a liberação dos grânulos de insulina na célula β .

O efeito estimulatório da testosterona e da nandrolona seria específico aos andrógenos, visto que o 17β -estradiol e a progesterona, nas condições experimentais deste trabalho, não reproduzem os efeitos daqueles hormônios.

Estes achados estão resumidos na **Figura 6**.

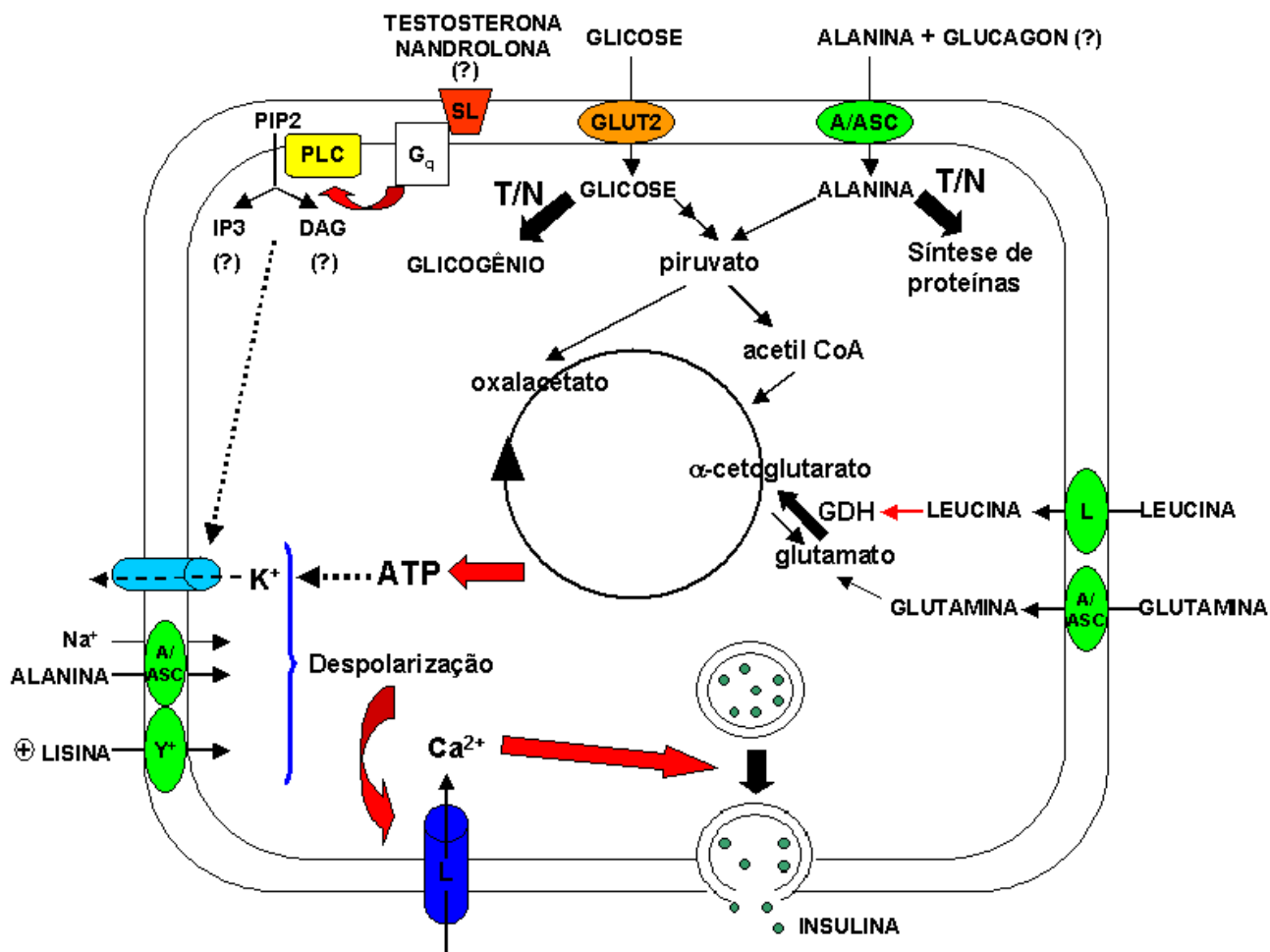


Figura 6: Mecanismo proposto para a estimulação da secreção de insulina e da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por testosterona e nandrolona na célula β . A testosterona (T) ou a nandrolona (N) liga-se ao sítio de ligação na membrana (SL) acoplado à proteína G_q , ativando-a. Esta estimula a fosfolipase C (PLC) que, por sua vez, degrada PIP2 em IP_3 e DAG. Sugere-se que possa haver inibição do canal K_{ATP} por IP_3 e/ou DAG, levando à despolarização da membrana. A glicose é captada na célula β pelo GLUT2. Por ação dos andrógenos, esta glicose é desviada preferencialmente para a síntese de glicogênio. A glicose também é metabolizada via glicólise, fornecendo piruvato, o qual é então metabolizado pelo ciclo do ácido tricarboxílico. O ciclo do ácido tricarboxílico gera equivalentes redutores os quais são transferidos para a cadeia transportadora de elétrons, determinando a geração de ATP. A alanina é captada na célula β pelo sistema de transporte A e/ou ASC, o qual é dependente do íon Na^+ . Por ação dos andrógenos, a alanina e os demais aminoácidos são desviados preferencialmente para a síntese de proteínas. Também a alanina ativa o metabolismo mitocondrial, gerando ATP. A glutamina, uma vez dentro da célula β , é transformada em glutamato. A leucina, captada pela célula, estimula a enzima GDH, a qual forma α -cetoglutarato a partir do glutamato, incrementando o ciclo do ácido tricarboxílico. O aumento nos níveis de ATP leva ao fechamento dos canais K_{ATP} e despolarização da membrana celular. A despolarização da membrana celular também ocorre pela captação de alanina acoplada ao Na^+ e do aminoácido catiônico lisina. Esta despolarização abre os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, aumentando $[\text{Ca}^{2+}]_i$, o que dispara a exocitose de insulina. **Seta contínua:** ação estimulatória; **seta pontilhada:** ação inibitória. **Abreviaturas:** A/ASC, L, γ^+ - sistemas de transporte de aminoácidos; AR - receptor de andrógenos; DAG - diacil glicerol; GDH - glutamato desidrogenase; GLUT2 - transportador de glicose 2; IP_3 - inositol-3,4,5-trifosfato; N - nandrolona; PIP2 - fosfatidil inositol-4,5-bifosfato; PLC - fosfolipase C; SL - sítio de ligação na membrana; T - testosterona.

7. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- 1) A testosterona e a nandrolona tem efeito estimulatório não clássico na célula β de ilhotas pancreáticas isoladas de rato, visto que aumentam a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em 1 minuto e estimulam a secreção de insulina em 3 minutos.
- 2) O efeito da testosterona sobre secreção de insulina independe da presença de baixas concentrações de glicose.
- 3) A secreção de insulina estimulada pela testosterona em ilhotas pancreáticas é dose dependente. O platô de estimulação observado entre as doses de 100 nM e 1000 nM em 3 minutos de incubação indicaria a utilização dos grânulos prontamente disponíveis (1ª fase da secreção de insulina).
- 4) Em nossos experimentos, o 17β -estradiol e a progesterona não estimularam a secreção de insulina em incubação de três minutos e em presença de 3mM de glicose.
- 5) A testosterona não estimula a captação de aminoácidos em ilhotas pancreáticas.
- 6) A testosterona em presença de MIX2 no meio de incubação teria uma ação sinérgica, Estes achados sugerem que a testosterona estimularia a secreção de insulina quando os substratos energéticos no meio de incubação acham-se em baixas concentrações.

- 7) A testosterona aumenta a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ através do canal de Ca^{2+} dependente de voltagem do tipo L.
- 8) A ação estimulatória da testosterona e a nandrolona sobre a secreção de insulina ocorre na seguinte sequência: fechamento do canal K_{ATP} , despolarização da célula β , abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e exocitose de insulina.
- 9) Os resultados do presente estudo demonstram a participação da fosfolipase C na transdução do sinal da testosterona na célula β da ilhota pancreática de rato, sugerindo-se a participação do DAG e do IP_3 como segundos mensageiros. Contudo, experimentos adicionais serão necessários para comprovar essa hipótese na célula β .
- 10) Teleologicamente, os efeitos dos andrógenos sobre a secreção de insulina em presença de baixas concentrações de substratos energéticos, seria de modular os efeitos catabólicos dos hormônios contra-reguladores da insulina e, assim, manter a homeostase.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-BRYAN, L. e BRYAN, J. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. **Endocr Rev**, 20:101–135, 1999.

AGUILAR-BRYAN, L.; NICHOLS, C.G.; WECHSLER, S.W. et al. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. **Science**, 268:423-426, 1995.

AHRENS-FATH, I.; POLITZ, O.; GESERICK, C. e HAENDLER, B. Androgen receptor function is modulated by the tissue-specific AR45 variant. **FEBS J.**, 272:74–84, 2005.

AITTONIEMI, J.; FOTINO, C.; CRAIG, T.J. et al. SUR1: a unique ATP-binding cassette protein that functions as an ion channel regulator. **Philosophical Transactions of Royal Society B**, 364:257-267, 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus (position statement). **Diabetes Care**, 29 (Supl 1):S43-S48, 2006.

AMMALA, C.; ASHCROFT, F.M. e RORSMAN, P. Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single β -cells. **Nature**, 363:356-358, 1993.

AMORY, J.K. Progress and prospects in male hormonal contraception. **Current Opin Endocrinol Diabetes Obes**, 15(3):255-260, 2008.

ANELLO, M.; GILON, P. e HENQUIN, J.C. Alterations of insulin secretion from mouse islets treated with sulphonylureas: perturbations of Ca^{2+} regulation prevail over changes in insulin content. **Br. J. Pharmacol.**, 127:1883-1891, 1999.

ARMEN, T.A. e GAY, C.V. Simultaneous detection and functional response of testosterone and estradiol receptors in osteoblast plasma membranes. **J. Cell. Biochem.**, 79:620–627, 2000.

ASHCROFT, F.M. e GRIBBLE, F.M. ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. **Diabetologia**, 42:903–919, 1999.

ASHCROFT, F.M.; HARRISON, D.E. e ASHCROFT, S.J.H. Glucose induces closure of single ion channels in isolated rat pancreatic beta-cells. **Nature**, 312:446-448, 1984.

ASHCROFT, F.M. e KAKEI, M. ATP-sensitive K⁺ channels in rat pancreatic beta-cells: modulation by ATP and Mg²⁺ ions. **J Physiol. (London)**, 416:349-367, 1989.

ASHCROFT, F.M. e RORSMAN, P. Electrophysiology of the pancreatic β -cell. **Prog Biophys Molec Biol**, 54:87-143, 1989.

ASPINWALL, C.A.; LAKEY, J.R. e KENNEDY, R.T. Insulin-stimulated insulin secretion in single pancreatic β -cells. **J. Biol. Chem.**, 274 (10):6360–6365, 1999.

ASPINWALL, C.A.; QIAN, W.J.; ROPER, M.G. et al.,. Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca²⁺ stores in insulin-stimulated insulin secretion in β -cells. **J. Biol. Chem.**, 275:22331–22338, 2000.

BARG, S.; ELIASSON, L.; RENSTROM, E. e RORSMAN, P. A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca²⁺ channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells. **Diabetes**, 51(supl 1):S74-S82, 2002.

BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARATILDEES, J.A. e CARLINI, C.R. Canatoxin, a plant protein, induces insulin release from isolated pancreatic islets. **Endocrinology**, 128:675-679, 1991.

BARRET-CONNOR, E. e KHAW, K.T. Endogenous sex hormone levels and cardiovascular disease in men: a prospective population based study. **Circulation**, 78:539-545, 1988.

BASARIA , S.; MULLER. D.C.; CARDUCCI, M.A. et al. Hyperglycemia and insulin resistance in men with prostate carcinoma who receive androgen-deprivation therapy. **Cancer**, 106:581-588, 2006.

BATRA, S. e SJOGREN, C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. **Life Sci.**, 32:315-319, 1983.

BEATO, M. Gene regulation by steroid hormones. **Cell**, 56:335–344, 1989.

BECK, P. e DAUGHADAY, W.H. Human placental lactogen: studies of its acute metabolic effects and disposition in normal man. **J Clin Invest**, 46:103-110, 1967.

BENTEN, W.P.; LIEBERHERR, M.; GIESE, G. et al. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. **FASEB J.**, 13:123–133, 1999a.

BENTEN, W.P.; LIEBERHERR, M.; STAMM, O. et al. Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. **Mol. Biol. Cell.**, 10:3113–3123, 1999b.

BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M.D. e LIPP, P. Calcium – a life and death signal. **Nature**, 395:645–648, 1998.

BEVILACQUA, S; BUZZIGOLI, G; BONADONNA, R. et al. Operation of Randle's cycle in patients with NIDDM. **Diabetes**, 39(3): 383–9, 1990.

BIRNBAUMER, L.; QIN, N.; OLCESE, R. et al. Structures and functions of calcium channel B subunits. **J. Bioenerg. Biomembr.**, 30: 357–375, 1998.

BISCARDI, J.S., MAA, M.C.; TICE, D.A. et al.. c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. **J. Biol. Chem.**, 274:8335–8343, 1999.

BLOOM, W. New type of granular cell in islets of Langerhans of man. **Anat. Rec.**, 49:363-371, 1931.

BOKVIST, K.; ELIASSON, L.; AMMALA, C. et al. Co-localization of L-type Ca^{2+} channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. **EMBO J**, 14:50-57, 1995.

BORSOTTO, M.; BARHANIN, J.; FOSSET, M. e LAZDUNSKI, M. The 1,4-dihydropyridine receptor associated with the skeletal muscle voltage-dependent Ca^{2+} channel. Purification and subunit composition. **J. Biol. Chem.**, 260:14255-14263, 1985.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72:248-254, 1976.

BRÄNSTRÖM, R.; CORKEY, B.E.; BERGGREN, P.O. e LARSSON, O. Evidence for a unique long chain acyl-CoA ester binding site on the ATP-regulated potassium channel in mouse pancreatic beta cells. **J. Biol. Chem.**, 272:17390-17394, 1997.

BRATANOVA-TOCHKOVA, T.K.; CHENG, H.; DANIEL, S. et al. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. **Diabetes**, 51 (supl 1):S83-S90, 2002.

BUNNAG, S.C.; BUNNAG, S. e WARNER, N.E. Microcirculation in the islets of Langerhans of mouse. **Anatomi Records**, 146:117-123, 1963.

CALLAGHAN, B.; ZHONG, J. e KEEF, K.D. Signaling pathway underlying stimulation of L-type Ca^{2+} channels in rabbit portal vein myocytes by recombinant $\text{G}\beta\gamma$ subunits **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 291:H2541-H2546, 2006.

CATTERALL, W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, 16:521–555, 2000.

CATTERALL, W.A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T.P. e STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. **Pharmacol Rev.**, 57(4):411-425, 2005.

CHANG, T.C.; TUNG, C.C. e HSIAO, Y.I. Hormonal changes in elderly men with non-insulin dependent diabetes mellitus and the hormonal relationships to abdominal adiposity. **Gerontology**, 40:260-267, 1994.

CHARLES, S. e HENQUIN, J.C. Distinct effects of various amino acids on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fluxes in rat pancreatic islets. **Biochem. J.**, 214:899–907, 1983.

CHENG, C.Y. e MRUK, D.D. Cell junctions' dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. **Physiol Rev.**, 82:825–874, 2002.

CHENG, J.; WATKINS, S.C. e WALKER W H. Testosterone activates MAP kinase via Src kinase and the EGF receptor in Sertoli cells. **Endocrinology**, 148:2066-2074, 2007.

COMHAIRE, F.H. Male contraception: hormonal, mechanical and other. **Human Reprod**, 9:586-590, 1994.

COORE, H.G. e RANDLE, P.J. Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated *in vitro*. **Biochem J.**, 93: 66, 1964.

CREUTZFELDT, W. e EBERT, R. New developments in the incretin concept. **Diabetologia**, 28:565-573, 1985.

CUMMINGS, D.E. e BREMNER, W.J. Prospects for new hormonal male contraceptives {Review}. **Endocrinology and Metab Clin of North America**, 23: 893-922, 1994.

CURRY, D.L.; BENNETT, L.L. e GRODSKY, G.M. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. **Endocrinology**, 83:572-584, 1968.

DAHIA, C.L. e RAO, A.J. Regulation of FSH receptor, PKI β , IL-6 and calcium mobilization: possible mediators of differential action of FSH . **Mol. Cell. Endocrinol.**, 247:73–81, 2006.

DAS, V.A.; ROBINSON, R. e PAULOSE, C.S. Enhanced β -adrenergic receptors in the brain and pancreas during pancreatic regeneration in weanling rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 289: 11–19, 2006.

DEAN, P.M. Ultrastructural morphometry of the pancreatic β -cell. **Diabetologia**, 9:115-119, 1973.

DELARUE, J. e MAGNAN, C. Free fatty acids and insulin resistance. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, 10(2): 142–8, 2007.

DE WAARD, M.; LIU, H.; WALKER, D. et al. Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels **Nature**, 385 (6615):446-50, 1997.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. **Expert Rev. Mol. Med.**, 10, e3, January 2008, doi:10.1017/S1462399408000598.

DOLPHIN, A.C. A short history of voltage-gated calcium channels. **British Journal of Pharmacology**, 147:S56-S62, 2006.

DOYLE, M.E. e EGAN, J.M. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. **Pharmacological Reviews**, 55/1:105-131, 2003.

DUNNE, M.J.; COSGROVE, K.E.; SHEPHERD, R.M. et al. Hyperinsulinism in infancy: from basic science to clinical disease. **Physiol Rev**, 84:239–275, 2004.

DUNNE, M.J.; WEST-JORDAN, J.A.; ABRAHAM, R. J. et al. The gating of nucleotide dependent K⁺ channels in insulin-secreting cells can be modulated by changes in the ratio ATP⁴⁻/ADP³⁻ and by non-hydrolyzable analogues of ATP and ADP. **J. Membr. Biol.**, 104:165-172, 1988.

DUPRE, J.; ROSS, S.A.; WATSON, D. et al. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. **J Clin Endocrinol Metab**, 37:826-828, 1973.

DUVAL, D.; DURANT, S. e HOMO-DELARCHE, F. Non-genomic effects of steroids. Interactions of steroid molecules with membrane structures and functions. **Biochim. Biophys. Acta**, 737:409-442, 1983.

EASOM, R.A. β -granule transport and exocytosis. **Cell Dev Biol**, 11:253-266, 2000.

EDDLESTONE, G.T.; GONÇALVES, A.; BANGHAM, J.A. e ROJAS, E. Electrical coupling between cells in islets of langerhans from mouse. **J Membr Biol**, 77:1-14, 1984.

ELIASSON, L.; RENSTROM, E.; DING, W.G. et al. Rapid ATP-dependent priming of secretory granules precedes Ca²⁺-induced exocytosis in mouse pancreatic β -cells. **J Physiol (Lond)**, 503:399-412, 1997.

ERTEL, E.A.; CAMPBELL, K.P.; HARPOLD, M.M. et al.. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, 25:533-535, 2000.

FAJANS, S.S.; FLOYD, J.C.; KNOPF, R.F. e CONN, J.W. Effects of amino acids and proteins on insulin secretion in man. **Recent Prog. Horm. Res.**, 23:617-662, 1967.

FELIG, P.; MARLISS, E.B. e CAHILL Jr, G.F. Metabolic response to human growth hormone during prolonged starvation. **J Clin Invest**, 50:411-421, 1971.

FÉLIX, B.; CATALIN, D.; MIOLAN, J-P. e NIEL, J-P. Effects of testosterone on the electrical properties and nicotinic transmission of the major pelvic and celiac ganglion neurones. **J. Neuroendocrinol.**, 13:193-198, 2001.

FERRANNINI, E.; VICHI, S.; BECK-NIELSON, H. et al. Insulin action and age. **Diabetes**, 54:947-956, 1996.

FIGUEROA-VALVERDE, L.; LUNA, H.; CASTILLO-HENKEL, C. et al. Synthesis evaluation of the cardiovascular effects of two, membrane impermeant, macromolecular complexes of dextran-testosterone. **Steroids**, 67:611-619, 2002.

FINDLAY, I. ATP-sensitive K⁺ channels in rat ventricular myocytes are blocked and inactivated by internal divalent cations. **Pflugers Arch**, 410:313-320, 1987.

FIX, C.; JORDAN, C.; CANO, P. e WALKER, W.H.. Testosterone activates mitogen activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 101:10919–10924, 2004.

FLOCKERZI, V.; OEKEN, H.J. e HOFMANN, F. Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal-muscle microsomes. **Eur J Biochem.**, 161(1):217-24, 1986.

FORADORI, C.D.; WEISER, M.J. E HANDA, R.J. Non-genomic actions of androgens. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 29:169–181, 2008.

GILON, P. e HENQUIN, J.C. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic β -cell function. **Endocrine Reviews**, 22:565-604, 2001.

GLOYN, A.L.; PEARSON, E.R.; ANTCLIFF, J.F. et al. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. **N Engl J Med**, 350:1838–1849, 2004.

GOPEL, S.; KANNO, T.; BARG, S. et al. Voltage-gated and resting membrane currents recorded from Bcells in intact mouse pancreatic islets. **J. Physiol. (London)**, 521:717–728, 1999.

GORCZYNSKA, E. e HANDELSMAN, J. Androgen rapidly increases the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. **Endocrinology**, 136:2052-2059, 1995.

GREENE, E.C. Anatomy of the Rat. **Trans Amer Phil Soc**, 27:1-370, 1935.

GRIBBLE, F.M.; DAVIS, T.M.E.; HIGHAM, C.E. et al. The antimalarial agent mefloquine inhibits ATP-sensitive K-channels. **Br J Pharmacol**, 131:756–760, 2000.

GRIBBLE, F.M.; PROKS, P.; CORKEY, B.E. e ASHCROFT, F.M. Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA. **J. Biol. Chem.**, 273:26383.-26387, 1998.

GRIBBLE, F.M. e REIMANN, F. Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. **Diabetologia**, 46:875–891, 2003a.

GRIBBLE, F.M. e REIMANN, F. Differential selectivity of insulin secretagogues. Mechanisms, clinical implications, and drug interactions. **Journal of Diabetes and Its Complications**, 17:11-15, 2003b.

GRIBBLE, F.M.; TUCKER, S.J. e ASHCROFT, F.M. The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K⁺ channel currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. **J. Physiol.**, 504:35-45, 1997.

GRILLO, M.L.; JACOBUS, A.P.; SCALCO, R. et al. Testosterone rapidly stimulates insulin release from isolated pancreatic islets through a non-genomic dependent mechanism. **Horm. Metab. Res.**, 37(11):662–665, 2005.

GROMADA, J.; FRANKLIN, I. e WOLLHEIM, C.B. α -cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. **Endocr.Rev.**, 28:84–116, 2007.

GROMADA, J.; HOY, M.; RENSTROM, E. et al. CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. **J Physiol**, 518:745-759, 1999.

GUO, Z.; BENTEN, W.P.; KRUCKEN, J. e WUNDERLICH, F. Nongenomic testosterone calcium signaling. Genotropic actions in androgen receptor-free macrophages. **J. Biol. Chem.**, 277:29600–29607, 2002.

HABER, E.P.; CURI, R.; CARVALHO, C.R.O. e CARPINELLI, A.R. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 45(3):219-227, 2001.

HAFFNER, S. Sex hormone binding protein, hyperinsulinemia, and insulin resistance and non –insulin dependent diabetes. **Horm Res**, 45:233-237, 1996.

HAFFNER, S.M.; KARHAPAA, P.; MYKKANEN, L. e LAAKSO, M. Insulin resistance, body fat distributions, and sex hormones in men. **Diabetes**, 43:212-219, 1994.

HALL, R.C., HALL, R.C., Abuse of supraphysiologic doses of anabolic steroids. **South Med J**, 98:550–555, 2005.

HAREN, M.T.; SIDDIQUI, A.M. e ARMBRECHT, H.J. Testosterone modulates gene expression pathways regulating nutrient accumulation, glucose metabolism and protein turnover in mouse skeletal muscle. **International Journal of Andrology**, 34, 55–68, 2010.

HARMAN, S.M.; METTER, E.J.; TOBIN, J.D. et al. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. **J Clin Endocrinol Metab**, 86:724-731, 2001.

HATZOGLOU, A.; KAMPA, M.; KOGIA, C. et al. Membrane androgen activation induces apoptotic regression of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. **J Clin Endocrinol Metab**, 90:893-903, 2005.

HE, B.; KEMPPAINEN, J.A.; , VOEGEL, J.J. et al. Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH(2)-terminal domain. **J. Biol. Chem.**, 274:37219-37225, 1999.

HEDESKOV, C.J. Mechanism of glucose-induced insulin secretion. **Physiological Reviews**, 60/2:442-509, 1980.

HEINLEIN, C.A. e CHANG, C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. **Mol. Endocrinol.**, 16:2181-2187, 2002.

HENQUIN, J.C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. **Diabetes**, 49:1751-1760, 2000.

HENQUIN, J.-C.; DUFRANE, D. e NENQUIN, M. Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. **Diabetes**, 55:3470–3477, 2006.

HENQUIN, J.C. e MEISSNER, H.P. Cyclic adenosine monophosphate differently affects the response of mouse pancreatic β -cells to various amino acids. **J. Physiol.**, 381:77-93, 1986.

HILGEMANN, D.W. e BALL, R. Regulation of cardiac Na^+ , Ca^{2+} exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP₂. **Science**, 273:956–959, 1996.

HOFMANN, F.; LACINOVÁ, L. e KLUGBAUER, N. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, 139:33-87, 1999.

HOWELL, S.L. e TYHURST, M. The cytoskeleton and insulin secretion. **Diabetes Metab Rev**, 2:107-123, 1986.

HUANG, L.; SHEN, H.; ATKINSON, M.A. e KENNEDY, R.T. Detection of exocytosis at individual pancreatic beta cells by amperometry at a chemically modified microelectrode. **Proc Natl Acad Sci USA**, 92:9608-9612, 1995.

ISHIHARA, H.; MAECHLER, P.; GJINOVCI, A. et al. Islet β -cell secretion determines glucagon release from neighbouring α -cells. **Nat. Cell Biol.**, 5:330–335, 2003.

JACKSON, R. Mechanism of age-related glucose intolerance. **Diabetes Care**, 13: 9-19, 1990.

JANMEY, P.A. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. **Annu Rev Phys**, 56:169–191, 1994.

JO, J.; CHOI, M.Y. e KOH, D-S. Beneficial effects of intercellular interactions between pancreatic islet cells in blood glucose regulation. **Journal of Theoretical Biology**, 257:312-319, 2009.

KAKEI, M. Receptor-operated regulation of ATP-sensitive K⁺ channels via membrane phospholipid metabolism. **Current Medicinal Chemistry**, 10:235-243, 2003.

KAKEI, M.; KELLY, R.P.; ASHCROFT, S.J.H. e ASHCROFT, F.M. The ATP-sensitivity of K⁺ channels in rat pancreatic B-cells is modulated by ADP. **FEBS Lett**, 208, 63-66, 1986.

KAKEI, M. e NOMA, A. Adenosine-5'-triphosphate-sensitive single potassium channel in the atrioventricular node cell of the rabbit heart. **J. Physiol.**, 352:265-284, 1984.

KALHAN, S.C. e ADAM, P.A.J. Inhibitory effect of prednisone on insulin secretion in man: model for duplication of blood glucose concentration. **J Clin Endocrinol Metab**, 41:600-610, 1975.

KAMP, T.J. e HELL, J.W. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase. **Circ. Res.**, 87:1095-1102, 2000.

KAMPA, M.; PAPAKONSTANTI, E.A.; HATZOGLOU, A. et al. The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors that increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. **FASEB J.**, 16:1429–1431, 2002.

KANNO, T.; GOPEL, S.O.; RORSMAN, P. e WAKUI, M. Cellular function in multicellular system for hormone-secretion: electrophysiological aspect of studies

on α -, β - and δ -cells of the pancreatic islet. **Neuroscience Research**, 42:79–90, 2002.

KANNO, T.; SUGA, S.; NAKANO, K. et al. Corticotropin-releasing factor modulation of Ca^{2+} influx in rat pancreatic β -cells. **Diabetes**, 48:1741-1746, 1999.

KELLY, M.J. e LEVIN, E.R. Rapid actions of plasma membrane estrogens receptors. **Trends Endocrinol. Metab.**, 12: 152-156, 2001.

KHAN, F.A.; GOFORTH, P.B.; ZHANG, M. e SATIN, L.S. Insulin activates ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic β -cells through a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway. **Diabetes**, 50(10):2192–2198, 2001.

KICMAN, A.T. Pharmacology of anabolic steroids. **British Journal of Pharmacology**, 154:502-521, 2008.

KIMBALL, S.R.; FARRELL, P.A. e JEFFERSON, L.S. Invited review: role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. **J. Appl. Physiol.**, 93:1168-1180, 2002.

KOBAYASHI, S. e FUJITA, T. Fine structure of mammalian and avian pancreatic islets with special reference to D cells and nervous elements. **Z Zellforsch Mikrosk Anat**, 100:340-363, 1969.

KOENIG, H.; FAN, C.C.; GOLDSTONE, A.D. et al. Polyamines mediate androgenic stimulation of calcium fluxes and membrane transport in rat heart myocytes. **Circ. Res.**, 64:415-426, 1989.

KOENIG, H.; GOLDSTONE, A.D. e LU, C.Y. Testosterone induces a rapid stimulation of endocytosis, amino acid and hexose transport in mouse kidney cortex. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 106:346-353, 1982.

KONOPLYA, E.F. e POPPOF, E.H. Identification of the classical androgen receptor in male rat liver and prostate cell plasma membrane. **Int. J. Biochem.**, 24:1979–1983, 1992.

KOYANO, T.; KAKEI, M.; NAKASHIMA, H. et al. ATP-regulated K⁺ channels are modulated by intracellular H⁺ in guinea-pig ventricular cells. **J Physiol.**, 463:747–766, 1993.

LACINOVÁ, L. Voltage gated calcium channels. *Gen. Physiol. Biophys.*, 24(Supl 1):1-82, 2005.

LACY, P.E. Beta cell secretion – from the standpoint of a Pathobiologist. **Diabetes**, 19:895-905, 1970.

LACY, P.E. e KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, 16:35-39, 1967.

LANDGRAF, R.; LEURS, M.M.C.; WEISSMANN, A. et al. Prolactin: a diabetogenic hormone. **Diabetologia**, 13:99-104, 1977.

LANE, M.A. The cytological characters of the areas of Langerhans. **Amer. J. Anat.**, 7:409-422, 1907.

LANG, J. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. **Eur J Biochem**, 259:3-17, 1999.

LEITE, L.; LUCHI, R.; VON LEDEBUR, E.I.C.F. et al. Testosterone induces immediate membrane depolarization and stimulates ⁴⁵Ca²⁺ uptake in Sertoli cells from rats of different maturation stages. **Med. Sci. Res.**, 27:25-28, 1999.

LERNMARK, A. The preparation of, and studies on, free cell suspensions from mouse pancreatic islets. **Diabetologia**, 10:431-438, 1974.

LEUNG, A.T.; IMAGAWA, T.; BLOCK, B. et al. Biochemical and ultrastructural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor from rabbit skeletal muscle. Evidence for a 52,000 Da subunit. **J Biol Chem.**, 263(2):994-1001, 1988.

LIPSCOMBE, D.; PAN, J.Q. e GRAY, A.C. Functional diversity in neuronal voltage-gated calcium channels by alternative splicing of Cav α 1. **Mol. Neurobiol.**, 26:21-44, 2002.

LOSS, E.S.; JACOBSEN, M.; COSTA, Z.S.M. et al. Testosterone modulates K⁺ATP channels in Sertoli cell membrane by PLC-PIP2 pathway. **Horm. Metab. Res.**, 36(8):519-525, 2004.

LOSS, E.S.; JACOBUS, A.P. e WASSERMANN, G.F. Diverse FSH and testosterone signaling pathways in the Sertoli cell. **Horm. Metab. Res.**; 39:1–7, 2007.

MACREZ, N.; MOREL, J.L.; KALKBRENNER, F. et al. A betagamma dimer derived from G13 transduces the angiotensin AT1 receptor signal to stimulation of Ca²⁺ channels in rat portal vein myocytes. **J Biol Chem.**, 272(37):23180-23185, 1997.

MAECHLER, P. Mitochondria as the conductor of metabolic signals for insulin exocytosis in pancreatic β -cells. **Cell Mol Life Sci**, 59(11):1803-1818, 2002.

MAINWARING, W.I. The mechanism of action of androgens, *Monogr Endocrinol* 10:1-178, 1977. *In*: MICHELS, G. e HOPPE, U.C. Rapid actions of androgens. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 29:182-198, 2008.

MATSCHINSKY, F.M. Banting Lecture 1995: a lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes**, 45:223-41, 1996.

MCCLLENAGHAN, N.H.; BARNETT, C.R.; O'HARTE, E.P.M. e FLATT, P.R. Mechanisms of amino acid induced insulin secretion from the glucose-responsive BRIN-BD11 pancreatic B-cell line. **J. Endocrinol.**, 151, 349-357, 1996.

MCEWEN, B.S.; KREYS, L.C. e LUINE, V.C. *In*: REICHLIN, S.; BALDESSARINI, R.J. e MARTIN, J.B. Eds. **The Hypothalamus**, New York , Raven Press, 1978, pág. 255-268.

MEDA, P., SANTOS, R.M. e ATWATER, I. Direct identification of electrophysiologically monitored cells within intact mouse islets of Langerhans. **Diabetes**, 35:232-236, 1986.

MEISSNER, H.P. Electrophysiological evidence for coupling between β cells of pancreatic islets. **Nature**, 262:502-504, 1976.

METZ, S.A. Ether-linked lysophospholipids initiate insulin secretion. Lysophospholipids may mediate effects of phospholipase A2 activation on hormone release. **Diabetes**, 35:808-817, 1986.

MICHAEL, J.; CARROLL, R.; SWITH, H. e STEINER, D.F. Studies on the molecular organization of rat insulin secretory granules. **J Biol Chem**, 262:16531-16535, 1987.

MICHAELS, R.L. e SHERIDAN, J.D. Islets of Langerhans: dye coupling among immunocytochemically distinct cell types. **Science**, 214, 801–803, 1981.

MICHELS, G. e HOPPE, U.C. Rapid actions of androgens. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 29:182-198, 2008.

MIRANDA, M.J.; LIEDKE, P.E.R.; LEITE, L. et al. Glibenclamide changes membrane potential and stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and amino acid accumulation in Sertoli cells of immature rats. **Med. Sci. Res.**, 26:703-706, 1998.

MIYAMURA, A.; KAKEI, M.; ICHINARI, K. et al. On the mechanism of ADP-induced alteration of sulphonylurea sensitivity in cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. **Br. J. Pharmacol.**, 130:1411-1417, 2000.

MOLINA, P.E. **Endocrine Physiology**. 3^a ed., The McGraw-Hill Companies, Inc., 2010.

MONTAGUE, W.; HOWELL, S.L. e GREEN, I.C. Insulin release and the microtubular system of the islets of Langerhans: effects of insulin secretagogues on microtubule subunit pool size. **Horm Metab Res**, 8:166-169, 1976.

MOORADIAN, A. D.; MORLEY, J.E.; KORENMAN, S.G. Biological actions of androgens. **Endocrine Reviews**, 8:1-28, 1987.

MORIMOTO, S.; FERNANDEZ-MEJIA, C.; ROMERO-NAVARRO, G. et al. Testosterone effect on insulin content, Messenger ribonucleic acid levels, promoter activity, and secretion in the rat. **Endocrinology**, 142:1442-1447, 2001.

MORIMOTO, S.; MORALES, A.; ZAMBRANO, E. e FERNANDEZ-MEJIA, C. Sex steroids effects on the endocrine pancreas. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology** 122:107–113, 2010.

MUKAI, E.; ISHIDA, H.; HORIE, M. et al. The antiarrhythmic agent cibenzoline inhibits K-ATP channels by binding to Kir6.2. **Biochem Biophys Res Commun**, 251:477–481, 1998.

NADAL, A.; QUESADA, I. e SORIA, B. Homologous and heterologous asynchronicity between identified α -, β - and δ -cells within intact islets of Langerhans in the mouse. **J. Physiol. (London)**, 517:85–93, 1999.

NADAL, A.; ROVIRA, J.M.; LARIBI, O. et al. Rapid insulinotropic effect of 17 β -estradiol via a plasma membrane receptor. **FASEB J.**, 12:1341–1348, 1998.

NAKASHIMA, M. e VANHOUTTE, P.M. Isoproterenol causes hyperpolarization through opening of ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle of the canine saphenous vein. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 272:379-384, 1995.

NAKAZAKI, M.; KAKEI, M.; KORIYAMA, N. e TANAKA, H. Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in free radical-mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic beta-cells.. **Diabetes**, 44:878-883,1995.

NEHER, E. Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. **Neuron**, 20:389-399, 1998.

NESHER, R. e CERASI, E. Modeling phase insulin release: immediate and time-dependent effects of glucose. **Diabetes**, 51:S53-S59, 2002.

NEWSHOLME, P.; BENDER, K.; KIELY, A. e BRENNAN, L. Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. **Biochemical Society Transactions**, 35:1180-1186, 2007.

NICHOLS, C.G.; SHYNG, S.-L.; NESTOROWICZ, A. et al. Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. **Science**, 272:1785-1787, 1996.

NOMA, A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. **Nature**, 305:147-148, 1983.

NOWYCKY, M.C.; FOX, A.P. e TSIEN, R.W. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. **Nature**, 316:440-446, 1985.

OLOFSSON, C.S.; GOPEL, S.O.; BARG, S. et al. Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells. **Pflugers Arch**, 444:43-51, 2002.

ORCI, L.; MALAISSE-LAGAE, F.; RAVAZZOLA, M. et al. Exocytosis-endocytosis coupling in the pancreatic beta cell. **Science**, 181:561-562, 1973.

ORCI, L.; MALAISSE-LAGAE, F.; RAVAZZOLA, M. et al. A morphological basis for intercellular communication between alpha- and beta-cells in the endocrine pancreas. **J. Clin. Invest.**, 56:1066–1070, 1975.

ORCI, L.; RAVAZZOLA, M. e AMHERDT, M. Direct identification of prohormone conversion site in insulin-secreting cells. **Cell**, 42:671-681, 1985.

PAOLISSO, G.; SCHEEN, A.S. e LEFEBVRE, P.J. Glucose handling, diabetes and aging. **Horm Res**, 34:52-57, 1995.

PARR, M.K.; FLENKER, U. e SCHARZER, W. Sports-related issues and biochemistry of natural and synthetic anabolic substances. **Endocrinol Metab Clin of North America**, 39:45-57, 2010.

PAUL, S.M. e PURDY, R.H. Neuroactive steroids. **FASEB J.**, 6: 2311-2322, 1993.

PIPELEERS, D. The biosociology of pancreatic β cells. **Diabetologia**, 30:277-291, 1987.

PITT, G.S. Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels. **Cardiovasc. Res.**, 73:641–647, 2007.

POLONSKY, K.S. e O'MEARA, M.M. Secretion and metabolismo of insulin, proinsulin, and C peptide. *In*: DE GROOT, L.J. et al. **Endocrinology**, 4^a ed. Filadélfia, W.B. Saunders Company, 2001, vol. 1, pág. 697-711.

POLONSKY, K.S. e RUBENSTEIN, A.H. Current approaches to measurement of insulin secretion. **Diabetes Metab Rev**, 2:315-329, 1986.

PORTE, D.J.; GRABER, A.L.; KUZUYA, T. e WILLIAMS, R.H. The effect of epinephrine on immunoreactive insulin levels in man. **J. Clin. Invest.**, 45: 228–236, 1966.

PRENTKI, M. e CORKEY, B.E. Is the beta cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? **Diabetes**, 45: 273-83, 1996.

PROKS, P.; REIMANN, F.; GREEN, N. et al. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. **Diabetes**, 51(supl 3):S368-S376, 2002.

QUIGLEY, C.A.; DE BELLIS, A.; MARSCHKE, K.B. et al. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. **Endocr. Rev.**, 16:271–321, 1995.

RAHMAN, F. e CHRISTIAN, H.C. Non-classical actions of testosterone: an update. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**, 18(10):371-378, 2007.

RAMAMANI, A.; M.M. ARULDHAS, M.M. e GOVINDARAJULU, P. Differential response of rat skeletal muscle glycogen metabolism to testosterone and estradiol. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 77:300–304, 1999.

RANDLE PJ. Mechanism modifying glucose oxidation in diabetes mellitus. **Diabetologia**; 37:S155-S161, 1994.

RANDLE, P.J.; GARLAND, P.B.; HALES, C.N. e NEWSHOLME, E.A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus". **Lancet**, 281(7285): 785–9, 1963.

RASMUSSEN, H.; ZAWALICH, K.C.; GANESAN, S. et al. Physiology and pathophysiology of insulin secretion. **Diabetes Care**, 13:655-666, 1990.

RENSTROM, E.; ELIASSON, L. e RORSMAN, P. Protein kinase A-dependent and –independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells. **J Physiol**, 502:105-118, 1997.

RETTIG, J. e NEHER, E. Emerging roles of presynaptic proteins in Ca^{++} -triggered exocytosis. **Science**, 298:781-785, 2002.

RHODES, C.J.; HALBAN, P.A. Newly synthesized proinsulin/insulin and stored insulin are released from pancreatic B cells predominantly via a regulated, rather than a constitutive, pathway. **J Cell Biol**, 105:145-153, 1987.

RICHARDS, M.W.; BUTCHER, A.J.; e DOLPHIN, A.C. Ca^{2+} channel β -subunits: structural insights AID our understanding. **Trends Pharmacol. Sci.**, 25:626-632, 2004.

RORSMAN, P.; BERGGREN, P.O.; BOKVIST, K. et al. Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABA A-receptor chloride channels. **Nature**, 341:233–236, 1989.

RORSMAN, P. e RENSTROM, E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cell. **Diabetologia**, 46:1029-1045, 2003.

RORSMAN, P. e TRUBE, G. Glucose dependent K^{+} -channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP. **Pflugers Arch**, 405:305-309, 1985.

ROSS, M.H.; KAYE, G.I. e PAWLINA, W. **Histology: a text and atlas**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003, 875 p.

ROY, A.K.; LAVROVSKY, Y.; SONG, C.S. et al. Regulation of androgen action. **Vitam. Horm.**, 55:309-352, 1999.

SAFA, P.; BOULTER, J. e HALES, T.G. Functional properties of Cav1.3 ($\alpha 1D$) L-type Ca^{2+} channel splice variants expressed by rat brain and neuroendocrine GH3 cells. **J. Biol. Chem.**, 276:38727-38737, 2001.

SAMBRANO, G.R.; CHANDY, G.; CHOI, S. et al. Unravelling the signal transduction network in B lymphocytes. **Nature**, 420:708–710, 2003.

SCHMIDT, W.E.; SIEGEL, E.G. e CREUTZFELDT, W. Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. **Diabetologia**, 28:704-707, 1985.

SCOTT, A.M.; ATWATER, I. e ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. **Diabetologia**, 21:470-475, 1981.

SEIDELL, J.C.; BJORNTORP, P.; SJOSTROM, L. et al. Visceral fat accumulation in men is positively associated with insulin, glucose, and C peptide levels, but negatively with testosterone levels. **Metabolism**, 39:897-901, 1990.

SEINO, S. e MIKI, T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. **Prog Biophys Mol Biol**, 81:133–176, 2003.

SELVIN, E.; FEINLEIB, M.; ZHANG, L. et al. Androgens and diabetes in men. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). **Diabetes Care**, 30(2): 234-238, 2007.

SELYE, H. Anaesthetic effects of steroid hormones. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, 46: 116-121, 1941.

SENER, A. e MALAISSE, W.J. L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. **Nature**, 288:187-189, 1980.

SENER, A. e MALAISSE, W.J. The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin released. Insulinotropic action of L-alanine. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1573:100-104, 2002.

SHEN, Y.; YU, D.; HIEL, H. et al. Alternative splicing of the Cav1.3 channel IQ domain, a molecular switch for Ca²⁺-dependent inactivation within auditory hair cells. **J. Neurosci.**, 26:10690-10699, 2006.

SHIMOKATA, H.; MULLER, D.C.; FLEG, J.L. et al. Age as independent determinant of glucose tolerance. **Diabetes**, 40:44-51, 1991.

SHULDINER, A.R. e MCLENITHAN, J.C. Genes and pathophysiology of type 2 diabetes: more than just the Randle cycle all over again. **J. Clin. Invest.**, 114(10): 1414–7, 2004.

SIEBER, M.; NASTAINCZYK, W.; ZUBOR, V. et al. The 165-kDa peptide of the purified skeletal muscle dihydropyridine receptor contains the known regulatory sites of the calcium channel. **Eur. J. Biochem**, 167:17-122, 1987.

SIMONI, M.; GROMOLL, J. e NIESCHLAG, E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. **Endocr. Rev.**; 18:739–773, 1997.

SPRITZER, P.M. e WASSERMANN, G.F. Amino acid uptake and protein synthesis in rat testes: stimulation by dissociable factors. **Horm. Metab. Res.**, 17:237-240, 1985.

STAGNER, J.L. e SAMOLS, E. The vascular order of islet cellular perfusion in the human pancreas. **Diabetes**, 41:93–97, 1992.

STEINER, D.F.; BELL, G.I.; RUBENSTEIN, A.H. e CHAN, S.J. Chemistry and biosynthesis of the islet hormones: insulin, islet amyloid polypeptide (amylin), glucagons, somatostatin, and pancreatic polypeptide. *In*: DE GROOT, L.J. et al. **Endocrinology**, 4^a ed. Filadélfia, W.B. Saunders Company, 2001, vol. 1, pág. 667-696.

STELLATO, R.K.; FELDMAN, H. A.; HAMDY, O. et al. Testosterone, sex hormone-binding globulin, and the development of type 2 diabetes in middle-aged men. Prospective results from the Massachusetts Male Aging Study. **Diabetes Care**, 23(4):490-494, 2000.

STRAUB, S.G.; SHARP, G.W.; MEGLASSON, M.D. e DE SOUZA, C.J. Progesterone inhibits insulin secretion by a membrane delimited, non-genomic action, **Biosci. Rep.**, 21 (5):653–666, 2001.

STURGESS, N.C.; ASHFORD, M.L.; COOK, D.L. e HALES, C.N. The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. **Lancet**, 2(8453):474-475, 1985.

SWANSTON-FLATT, S.K.; CARLSSON, L. e GYLFE, E. Actin filament formation in pancreatic beta-cells during glucose stimulation of insulin secretion. **FEBS Lett**, 117:299-302, 1980.

SWERDLOW, A.J.; HIGGINS, C.D.; SCHOEMAKER, M.J. et al. Mortality in patients with Klinefelter syndrome in Britain: a cohort study. **J Clin Endocrinol Metab**, 90:6516-6522, 2005.

SZEGO, C.M. e DAVIS, J.S. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 58:1711-1718, 1967.

TAKAHASHI, N.; KISHIMOTO, T.; NEMOTO, T. et al. Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet. **Science**, 297:1349-1352, 2002.

TAKAHASHI, M.; SEAGAR, M.J.; JONES, J.F. et al. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. **Proc Natl Acad Sci USA**, 84(15):5478-82, 1987.

TANG, Z.Z.; LIANG, M.C.; LU, S. et al. Transcript scanning reveals novel and extensive splice variations in human L-type voltage-gated calcium channel, Cav1.2 α 1 subunit. **J. Biol. Chem.**, 279:44335-44343, 2004.

TARASOV, A.; DUSONCHET, J. e ASHCROFT, F. Metabolic regulation of the pancreatic β -cell ATP-sensitive K^+ channel. A pas de deux. **Diabetes**, 53 (Supl 3):S113-S122, 2004.

THOMAS-REETZ, A.C. e DE CAMILLI, P. A role for synaptic vesicles in non-neuronal cells: clues from pancreatic β cells and from chromaffin cells. **FASEB J.**, 8:209–216, 1994.

TILLIL, H.; SHAPIRO, E.T.; MILLER, M.A. et al. Dose-dependent effects of oral and intravenous glucose on insulin secretion and clearance in normal humans. **Am J Physiol**, 254:E349-E357, 1988.

TRAISH, A. M.; SAAD, F.; GUAY, A. The dark side of testosterone deficiency: II. Type 2 diabetes and insulin resistance. **Journal of Andrology**, 30(1):23-32, 2009.

UNGER, R.H. e ORCI, L. Possible roles of the pancreatic D-cell in the normal and diabetic states. **Diabetes**, 26:241–244, 1977.

VAGHY, P.L.; STRIESSNIG, J.; MIWA, K. et al. Identification of a novel 1,4-dihydropyridine- and phenylalkylamine-binding polypeptide in calcium channel preparations. **J Biol Chem**, 262(29):14337-14342, 1987.

VALDEOLMILLOS, M.; SANTOS, R.M.; CONTRERAS, D. et al. Glucose-induced oscillations of intracellular Ca^{2+} -concentration matching bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. **FEBS Lett**, 259:19-23, 1989.

VAN AMSTERDAM, J.; OPPERHUIZEN, A. e HARTGENS, F. Adverse health effects of anabolic-androgenic steroids. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 57(1):117-23, 2010.

VERMEULEN, A.; KAUFMAN, J.M. e GIAGULLI, V.A. Influence of some biological indexes on sex hormone-binding globulin and androgen levels in aging or obese men. **J Clin Endocrinol Metab**, 81:1821-1826, 1996.

VIARD, P.; EXNER, T.; MAIER, U. et al. Gbetagamma dimers stimulate vascular L-type Ca²⁺ channels via phosphoinositide 3-kinase. **FASEB J.**, 13(6):685-94, 1999.

VON LEDEBUR, E.I.C.F.; ALMEIDA, J.P.; LOSS, E.S. e WASSERMANN, G.F. Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K⁺_{ATP} channels. **Horm. Metab. Res.**, 34:550-555, 2002.

WALKER, W.H. Nongenomic actions of androgens in Sertoli cells. **Curr. Top. Dev. Biol.**, 56:25-53, 2003.

WALKER, W.H. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. **Steroids**, 74:602–607, 2009.

WASSERMANN, G.F. e LOSS, E.S. Testosterone action on the Sertoli cell membrane: a K_{IR6.X} channel related effect. **Current Pharmaceutical Design**, 10: 2649-2656, 2004.

WASSERMANN, G.F.; MONTI BLOCH, L.; GRILLO, M.L. et al. Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. **Horm. Metab. Res.**, 24:326-328, 1992.

WILMER, E.N. Steroids and cell surfaces. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, 36:368-398, 1961.

WISER, O.; TRUS, M.; HERNANDEZ, A. et al. The voltage sensitive Lc-type Ca²⁺ channel is functionally coupled to the exocytotic machinery. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96:248-253, 1999.

WOLLHEIM, C.B. e SHARP, G.W. Regulation of insulin release by calcium. **Physiol Rev**, 61:914-973, 1981.

XU, T.; RAMMNER, B.; MARGITTAI, M. et al. Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. **Cell**, 99:713-722, 1999.

YAMADA, Y. Effects of testosterone on unit activity in rat hypothalamus and septum. **Brain Res.**, 172: 165-168, 1979.

YU, F.H. e CATTERALL, W.A. The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. **Sci STKE**, 253:re15, 2004.

ZAWALICH, W.S. e DIAZ, V.A. Prior cholecystokinin exposure sensitizes islets of Langerhans to glucose stimulation. **Diabetes**, 36:118-122, 1987.

ZHOU, Z.X.; WONG, C.I.; SAR, M. e WILSON, E.M. The androgen receptor: an overview. **Recent Prog. Horm. Res.**, 49:249–274, 1994.

ZUNKLER, B.J.; LINS, S.; OHNO-SHOSAKU, T. et al.. Cytosolic ADP enhances the sensitivity to tolbutamide of ATP-dependent K⁺ channels from pancreatic B-cells. **FEBS Lett.**, 239:241-244, 1988.

9. APÊNDICE

Confirmação da submissão do artigo “Androgens synergized with amino acid for induction of insulin secretion and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in isolated pancreatic islets” à revista **Life Sciences** e artigo enviado para publicação.

Correio :: Caixa de Entrada: FW: A manuscript number has been assigned - LFS-D-... Página 1 de 1

Correio
 Compor
 Pastas
 Pesquisar
 Filtros
 Calendário
 Tarefas
 Abrir
 Caixa de Entrada

Contatos
 Opções
 Problema
 Ajuda
 Sair

Você respondeu esta mensagem em 11-02-2011 21:09:45.

Você está utilizando 20,63 MB de 1024,00 MB (2,01%)

Caixa de Entrada: FW: A manuscript number has been assigned - LFS-D-11-00119 (1 de 78)

Marcar como: Mover Copiar Esta mensagem para
Retornar para Caixa de Entrada

Excluir Responder Encaminhar Redirecionar Ver Discussão Remetentes Bloqueados Remetentes Liberados
 Código Fonte da Mensagem Gravar como Imprimir Cabeçalhos

Data: Wed, 9 Feb 2011 16:41:30 -0200 [09-02-2011 16:41:30 BRST]

De: Ana Paula Jacobus <ana_paula_j@hotmail.com>

Para: marcelo <mgrillo@ufrgs.br>

Assunto: FW: A manuscript number has been assigned - LFS-D-11-00119

Mostrar esta mensagem HTML em uma nova janela?

Marcelo encaminho...

Ana Paula Jacobus

> From: lifesci@elsevier.com
 > To: ana_paula_j@hotmail.com
 > Date: Tue, 8 Feb 2011 14:54:28 +0000
 > Subject: A manuscript number has been assigned - LFS-D-11-00119
 >
 > Dear Dr Jacobus,
 >
 > Your submission entitled "Androgens synergized with amino acid for induction of insulin secretion and 45Ca2+ uptake in isolated pancreatic islets" has been assigned the following manuscript number: LFS-D-11-00119.
 >
 > You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author.
 > The URL is <http://ees.elsevier.com/lfs/>.
 >
 > Thank you for submitting your work to this journal.
 >
 > Kind regards,
 >
 > Gerard Duggan
 > Journal Manager
 > Life Sciences
 >

Excluir Responder Encaminhar Redirecionar Ver Discussão Remetentes Bloqueados Remetentes Liberados
 Código Fonte da Mensagem Gravar como Imprimir Cabeçalhos

Marcar como: Mover Copiar Esta mensagem para
Retornar para Caixa de Entrada

Androgens synergized with amino acid for induction of insulin secretion and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in isolated pancreatic islets

Marcelo L. Grillo¹, Rosana Scalco², Débora Olmedo¹, Ana Paula Jacobus³

1 Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

2 Unidade de Radioimunoensaio, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

3. Programa de Pós Graduação em Biociências e Inclusão, Centro Universitário Metodista do IPA, Porto Alegre, Brasil.

Corresponding Author: Ana Paula Jacobus: email: ana_paula_j@hotmail.com

Programa de Pós Graduação em Biociências e Inclusão, Centro Universitário Metodista do IPA, Porto Alegre, Brasil Rua Joaquim Pedro Salgado, 80 Porto Alegre, Brasil 90420-060.

Introduction

Testosterone rapidly increases $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake (in 60 seconds) and insulin secretion (within 180 seconds) by isolated Langerhans islets incubated *in vitro* at sub-stimulatory concentrations of glucose (3mM) (Grillo et al. 2005). The action of testosterone is dose-dependent from 25 nM to 1 μM and specific; neither 17 β -estradiol nor progesterone has any effect under these experimental conditions. These testosterone effects at the cell membrane as clearly demonstrated by the action of impermeant testosterone-BSA and by the speed of its actions (60-180 seconds) (Grillo et al. 2005).

Morimoto et al (2001) reported that testosterone increases insulin messenger RNA (mRNA) levels *in vivo* and *in vitro* in Langerhans islets. Also, they demonstrated that pancreatic islets incubated during 3 hours with testosterone (1 μM) increases their insulin content, being released in the absence or in the presence of glucose (up to 5.5 mM).

On the other hand, Nadal *et al.* (1998) reported that 17 β -estradiol in synergy with 8.3 mM glucose rapidly (<2 minutes) enhanced insulin secretion by 30% through a plasma membrane receptor. Also, the application of a physiological concentration of 17 β -estradiol in the presence of a stimulatory glucose concentration (8 mM) potentiated the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signal in 83% of the islets. Unlike testosterone, the effect of 17 β -estradiol was observed only during glucose stimulation of insulin release, but not in basal conditions. As described, the action of testosterone is visible in concentrations of glucose lower than 5.5 mM, and is more marked (evident) with glucose 0, 1 or 3 mM. This difference in the action between 17 β -estradiol and testosterone is not well understood.

Recently, it has been described that the high rate of insulin secretion by SUR1KO islets in low glucose results from a continuous unregulated influx of Ca^{2+} secondary to the lack of functional K^+_{ATP} channels (Ravier *et al.* 2009). Also, amino acids strongly increased insulin secretion by SUR1KO islets through a further electrogenic rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. After sulfonylurea

(tolbutamide) blockade of their K^+_{ATP} channels, normal islets qualitatively behaved like SUR1KO islets (Ravier *et al.* 2009).

Li *et al.* (2004) described that sulfonylurea glyburide increases glutamine sensitivity of normal β cells mimicking the SUR1^{-/-} condition. Following glyburide treatment, the effect of glutamine or glutamine + leucine combination on $[Ca^{2+}]_i$ was similar to that observed in SUR^{-/-} islets. Insulin secretion studies confirmed these observations: glutamine increases insulin release (Li *et al.*, 2004).

In Sertoli cells from rat testes, testosterone blocks the K^+_{ATP} channels producing, as with glibenclamide and tolbutamide, cell depolarization and increase in $^{45}Ca^{2+}$ uptake (von Ledebur *et al.* 2002; Loss *et al.* 2004; Wassermann and Loss 2005).

In addition, 0.1 μ M of testosterone stimulates $^{45}Ca^{2+}$ uptake in isolated Langerhans islets in similar amounts to 10 μ M of tolbutamide (Grillo *et al.* 2005).

Based on these results, the aim of this paper was to study the effect of amino acid mixture glutamine (glut), lysine (lys), alanine (ala) and leucine (leu) on insulin secretion and $^{45}Ca^{2+}$ uptake by isolated pancreatic islets pretreated with testosterone (or by stimulation of testosterone). To provide additional evidence of the interaction of testosterone action on K^+_{ATP} channels, diazoxide – a channel opener – was used at a low concentration and within a short time frame (Henquin 2000).

The results reported in this paper indicate a relationship between testosterone action and amino acid effect on insulin secretion by Langerhans islets. This suggests a possible physiological meaning to the fact that testosterone synergizes with amino acid mixture (or protein meal) in β cells for induction of insulin secretion.

Material and Methods:

Testosterone, leucine, alanine, glutamine, lysine and collagenase type XI were purchased from Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA. Diazoxide was obtained from Research Biochemicals International, Natick, MA, USA. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (specific activity 444 GBq/g) was purchased from New England Nuclear Life Science Products Inc., Boston, MA, USA.

Animals. Wistar rats were bred in our animal facilities and housed in an air-conditioned room (at about 24°C) with controlled lighting (lights on from 06:00 to 20:00 h). Pelleted food (Purina, Nutripal, Porto Alegre, RS, Brazil) and tap water were available *ad libitum*. Male Wistar rats (180 to 220g) were starved for 12 hours before being killed by decapitation.

Isolation of islets. The islets of Langerhans were isolated by a modification of the technique of Lacy and Kostianovsky (1967). The pancreas was visualized by a central abdominal incision. The bile duct was clamped at the tip of the duodenum and cannulated at a point sufficiently proximal to the liver. KRb-HEPES medium was introduced by syringe slowly (1 min) into the bile duct until the pancreas was clearly distended. The inflated pancreas was gently removed. The pancreas was collected in Petri dishes with KRb-HEPES medium.

The isolated pancreatic islets were obtained by collagenase digestion of a pool of pancreas from three animals (Metz 1986). The pancreases were placed in Krebs-Ringer bicarbonate (KRb) supplemented with HEPES (8mM) and glucose (3mM). The pancreatic tissue was cut into small pieces (ca. 2 x 2 mm), which were incubated in a plastic tube in 1 mL of the same medium supplemented with 3 mg of collagenase. After incubation for 20 min at 37°C with rapid shaking the incubation mixture was transferred to a conical tube (110 x 15 mm), resuspended to 10 mL with collagenase-free medium and centrifuged at room temperature for 3 min at 45 x g. The supernatant was discarded and the sediment resuspended in fresh KRb-HEPES medium. This washing procedure was repeated five times; in the last two washings the islets were allowed to settle without centrifugation. Aliquots (10µL) of the final sediment with the isolated islet were transferred to Eppendorff tubes with the KRb incubation medium supplemented with HEPES (8mM) and glucose (3mM) (Lernmark 1974; Barja-Fidalgo *et al.* 1991).

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake experiments. The isolated islets were pre-incubated for 60 minutes in a Dubnoff metabolic incubator to equilibrate in 500 µL KRb/HEPES buffer with the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (2.7 kBq) at 37°C, pH 7.4 and gassed with O₂:CO₂ (95:5; v/v). Diazoxide (100 µM) was added 10 minutes before the end of the pre-incubation period. The islets were incubated

for 2 minutes in 500 μL of KRb with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ with or without testosterone (100 nM). In order to halt the incubation, the technique reported by Batra and Sjogren (1983) was used with modifications. One ml of cold buffer with lanthanum chloride (10 mM) at 2°C was added to the samples to stop the calcium fluxes. The tubes were centrifuged for 1 min. to 300 rpm. The supernatant was preserved and the islets were washed twice with the cold lanthanum chloride solution. The islets were added to screw-cap tubes containing 1 ml of distilled water. They were frozen and afterwards sonicated for 30 seconds. Aliquots of 100 μL were taken from each sample for radioactivity measurement in Aquasol 2 in an LKB rack beta liquid scintillation spectrometer model 1215 (LKB-Producer AB, Bromma, Sweden). The counting efficiency was 85-90%.

Insulin Secretion. The islets were pre-incubated for 30 min in KRb with HEPES (8mM) at 37°C , pH 7.4. The islets were incubated for 180 seconds with and without testosterone (1 μM) followed by 180 seconds with or without the amino acid mixture: MIX [glutamine (2 mM), lysine (1.5 mM), alanine (1 mM), leucine (1 mM)], MIX2 [glutamine (2 mM), lysine (3 mM), alanine (2 mM), leucine (2 mM)], or MIX4 [glutamine (8 mM), lysine (6 mM), alanine (4 mM), leucine (4 mM)]. To stop the incubation process the tubes were placed at 0°C . The tubes with the islets were centrifuged for 3 minutes at $45 \times g$. The medium was collected and the insulin was quantified by RIA (RIA-Kit, Linco Research, INC., St. Charles, MO, USA).

In both experiments, the protein was assayed according to the method of Bradford (1976). The $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake results were expressed as pmol of Ca^{2+}/mg protein ratio ($n=6$). The insulin secretion results were expressed as ng of insulin/mg protein ratio ($n=6$).

Testosterone was diluted in ethanol to a final concentration of 0.1%. This stock solution was diluted in KRb to the active final concentration at the time of use. Diazoxide was freshly prepared in 0.05N of NaOH for each experiment and the final concentration of NaOH in the KRb was 0.001N

Statistical evaluation was performed using paired t-test and one-way ANOVA with Bonferroni's post test, using GraphPad InStat version 3.01, 32 bit for Windows 95/NT,

GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. Differences were considered to be significant when $p < 0.05$.

Results

Effect of testosterone on insulin secretion and on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake at different glucose concentrations. Insulin secretion stimulated by testosterone in pancreatic islets was dependent upon the glucose concentration. The hormone stimulated insulin secretion at subthreshold concentrations (0 and 3 mM), but it did not increase insulin secretion as did the control at the threshold concentration of 5 mM of glucose (Fig 1a). $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake stimulated by testosterone in pancreatic islets was dependent upon the glucose concentration. Testosterone increased $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in the absence of glucose and at concentrations of 5 mM (threshold) and 8 mM, but it did not increase insulin secretion as did the control at the suprathreshold concentration of 11 mM of glucose (Fig 1b).

Action of androgens and of sulfonylureas on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in isolated pancreatic islets. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in isolated islets of Langerhans was stimulated within 60 seconds by the presence of testosterone (0.1 μM) and of nandrolone (0.1 μM). Similar results were obtained by glibenclamide (25 μM) and tolbutamide (10 μM) within 1 minute of incubation. (Fig 2).

Comparison of stimulatory effects of androgens and alanine on insulin secretion. There was a significant increase in the stimulation of testosterone, nandrolone and alanine separately; however, when each androgen was associated with alanine, insulin secretion decreased, compared to each isolated androgen (Fig 3).

Effect of testosterone on insulin release associated with different concentrations of the amino acid mixture (MIX). Testosterone significantly stimulated insulin secretion in the absence of the MIX and also when associated with MIX2 (Fig 4).

Action of testosterone upon the transport of [¹⁴C] MeAIB in islets. Testosterone did not stimulate amino acid uptake in any of the incubation periods (Fig 5).

Antagonist effect of diazoxide on the stimulatory action of testosterone in ⁴⁵Ca²⁺ uptake in pancreatic islets. Diazoxide blocked ⁴⁵Ca²⁺ uptake when pre-incubated separately. Testosterone did not stimulate ⁴⁵Ca²⁺ uptake in the presence of K_{ATP} channel blocker (Fig 6).

Antagonist effect of phospholipase C inhibitor, U73122, on the stimulatory action of testosterone in ⁴⁵Ca²⁺ uptake. U73122 blocked ⁴⁵Ca²⁺ uptake when pre-incubated separately. Testosterone did not stimulate ⁴⁵Ca²⁺ uptake in the presence of phospholipase C inhibitor (Fig 7).

Antagonist effect of L-type Ca²⁺ channel blocker nifedipine on the stimulatory action of testosterone in ⁴⁵Ca²⁺ uptake. Nifedipine blocked ⁴⁵Ca²⁺ uptake when pre-incubated separately. Testosterone did not stimulate ⁴⁵Ca²⁺ uptake in the presence of L-type Ca²⁺ channel blocker (Fig 8).

Discussion

The action of testosterone on ⁴⁵Ca²⁺ uptake and on insulin secretion was studied in short-term experiments using isolated pancreatic islets of Langerhans. In earlier studies, impermeant testosterone-BSA significantly stimulated insulin secretion at a lower

percentage (10%). The action of the hormone is specific – neither 17 β -estradiol nor progesterone stimulated insulin secretion in the presence of 3 mM glucose. The action of testosterone on insulin secretion was dose-dependent, and at a physiological concentration of testosterone (25 nM) in rat plasma, the stimulus was 17% ($p < 0.05$). (Grillo *et al.*, 2005). Testosterone (0.1 μ M) stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake within 60 seconds in a similar proportion to tolbutamide (10 μ M) in isolated islets.

Testosterone rapidly increased insulin release (34%; 180 seconds) in the presence of non-stimulatory concentrations of glucose (0-3 mM). However, the hormone is ineffective with glucose 8.3 mM or at highest doses (Fig 1a). The action of testosterone on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake was more effective in 8mM than at lower and higher glucose concentrations (Fig 1b).

Morimoto *et al.* (2001) demonstrated that testosterone increases the *in vitro* and *in vivo* concentration of insulin mRNA. The stimulatory effect was also observed in the induction of insulin expression, both in its content and in its release into pancreatic β cells. These authors also showed that circulating testosterone levels in prepubertal and in adult rats under physiological conditions are related to insulin gene expression in the pancreas and in its serum concentration. The relationship between testosterone and insulin expression was also found in gonadectomized animals.

Morimoto *et al.* (2001) demonstrated that serum insulin levels are restored and increase within 5 to 7 days after the onset of testosterone replacement in adult gonadectomized rats

In pathophysiological situations, such as in women with polycystic ovary syndrome presenting with hyperandrogenism, there are reports of increased insulin release (Diamanti-Kandarakis, 2008).

The action of testosterone and nandrolone is partially similar to that of sulfonylureas such as glyburide and tolbutamide, but different from that of glibenclamide, which stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake (Fig 2) and insulin secretion (Fig 3) at low glucose concentrations, due

possibly to the different site of interaction of sulfonylureas with the SUR receptor (Gribble and Reimann, 2003). Some studies demonstrated that tolbutamide and meglitinide, blocking K^+_{ATP} channels, mimic the Sur1KO β cell model (Szollosi et al. 2010). These cells do not contain K^+_{ATP} channels (Szollosi et al. 2007) and, therefore, are depolarized and have an elevated $[Ca^{2+}]_i$ even when the glucose concentration is non-stimulatory.

Our results show that the amino acid mixture [MIX (Glut, Leu, Lys, Ala)] increases insulin secretion at different concentrations in MIX, MIX2 and MIX4. This increase was dose-dependent. The presence of testosterone associated with MIX2 increased insulin secretion to a higher level than did MIX2 alone (Fig 4).

Insulin secretion in Sur1KO β cells was stimulated by MIX. Normal islets of Langerhans pretreated with tolbutamide demonstrated the same effect when treated with MIX (Henquin *et al.* 2006).

This result indicates that high protein intake in the presence of adequate concentration of testosterone stimulates insulin secretion.

These effects clarify the physiological meaning of testosterone action. Both hormones have an anabolic effect (muscle, bone, etc.) stimulating protein synthesis; therefore: high protein intake plus testosterone leads to high insulin secretion, increasing protein synthesis by muscles or the amino acid uptake.

Therefore, it is possible that protein meal intake in the presence of testosterone induces insulin secretion, and the synergistic action of both hormones produces an anabolic effect.

It has been described that testosterone induces calcium influx through non-classical pathways associated with membrane receptors (Walker 2009). However, this stimulatory effect of testosterone on insulin secretion may be related to the increase in the intracellular concentration of calcium, glucose metabolism or variations in second messengers (Filardo *et al.* 2000; Scobey *et al.* 2001).

These results indicate that a high protein intake and the presence of adequate testosterone concentrations, when combined, can increase insulin secretion.

Nevertheless, it is still necessary to describe this mechanism, whereby testosterone has this effect on pancreatic β cells, as the action of the tested androgens (testosterone and nandrolone) revealed competition with the effect of alanine alone, possibly because they share the same pathway for activation of pancreatic β cells (Fig 3).

It was also observed that testosterone did not stimulate the transport of [^{14}C]MeAIB in β cells (Fig 5), as previously described for Sertoli cells (Spritzer and Wassermann 1985).

To assess the testosterone-induced activation pathway, some pharmacological strategies were used. To observe the action of testosterone on K_{ATP} channel, we used diazoxide, which facilitates the opening of this channel leading to an increase in potassium conductance, hyperpolarizing the membrane potential. When diazoxide is associated with testosterone, we perceive that the stimulatory effect of the androgen on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake is inhibited, indicating that the inhibition of the K_{ATP} channel plays a role in this effect elicited from testosterone (Fig 6). This mechanism has already been described for other tissues such as in Sertoli cells (Loss *et al.*, 2004) and vascular smooth muscle myocytes (Nakashima and Vanhoutte 1995).

It has been described that the action of testosterone on the cell membrane may be associated with PLC activation by Gq protein (Wassermann and Loss 2004). This activation hydrolyzes PIP2 to IP3 and diacylglycerol, causing a decline in PIP2 concentration near the K_{ATP} channel, reducing negative surface charges and increasing the sensitivity of the channel to ATP, inhibiting this channel, with consequent depolarization of the membrane and opening of L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels (Wassermann and Loss 2004). Our results for isolated pancreatic islets suggest that the stimulatory effect of testosterone on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake utilizes this pathway, as demonstrated for the K_{ATP} channel.

To assess the action of testosterone on PLC activation, we used U73122, an inhibitor of this enzyme. It has been shown that the stimulatory action of testosterone on

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake is blocked in the presence of this PLC inhibitor, indicating that the mechanism mentioned above plays a role in the action of the androgen upon the pancreatic β cell (Fig 7).

We also checked whether the inhibition of the L-type calcium channel changes the androgenic response to the influx of extracellular calcium. Using nifedipine, which blocked the calcium influx stimulated by testosterone, it was demonstrated that the pathway used by testosterone is related to the K_{ATP} channel, PLC, and opening of L-type calcium channels (Fig 8).

Our experiments showed that testosterone stimulates insulin release at low glucose concentrations. This finding, in consonance with the data obtained by other authors, indicates that the androgen does not have a remarkable influence upon the regulation of insulin secretion under postprandial conditions; however, the action of this androgenic hormone could be perceived on other parameters; for instance, when testosterone is associated with amino acid uptake by peripheral tissues, influenced by insulin.

FINAL REMARKS

These findings allow us to describe the action of testosterone on the membrane of pancreatic β cells in rats through its stimulatory effect on insulin secretion and on extracellular Ca^{2+} uptake. It was also observed that the glucose concentration of the medium may influence these effects, and in this case, testosterone was more efficient at substimulatory glucose concentrations (0 to 3 mM). It was also demonstrated that nandrolone had a similar action to that of testosterone under the same experimental conditions.

Using Ca^{2+} uptake as a marker of the action of testosterone and of nandrolone on pancreatic β cells, we observed that the androgenic action is closely related to the closure of the K_{ATP} channel, because the use of diazoxide, which facilitates the opening of this channel, inhibited the action of steroids. Therefore, when glibenclamide and tolbutamide – which are K_{ATP} channel blockers – were used, they produced a similar effect to that of testosterone on Ca^{2+} uptake. Androgenic action was also inhibited in the presence of nifedipine (L-type Ca^{2+} channel blocker); pancreatic β cells showed a reduction in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in the presence of this inhibitor.

The relationship between testosterone and the K_{ATP} channel can be associated with the pathway of PLC activation. In another type of cell, testosterone, via G_q protein, hydrolyzes PIP₂ using this enzyme and this effect leads to the closure of the K_{ATP} channel, as observed in the present study (Lieberherr and Grosse 1994). When we blocked PLC by adding U73122, the effect of testosterone on Ca^{++} uptake was nullified, indicating that this pathway is activated by the hormone in this cell.

In an attempt to find physiological relevance in these androgenic actions, we observed the relationship between amino acid uptake by β cells and the presence of testosterone and nandrolone. To do that, we used an amino acid mixture that increased insulin secretion in a dose-dependent fashion; however, the association of this mixture with testosterone stimulated insulin secretion only when MIX2 was used. Testosterone did not stimulate MeAIB uptake and competed with alanine alone, probably due to the same mechanism of action when insulin secretion was used as parameter.

All these results indicate that testosterone has an important effect on insulin secretion by pancreatic β cells when glucose levels are low. There might be a relationship between the presence of testosterone, amino acid uptake by β cells and insulin secretion at these glucose levels. We can infer that the stimulatory effect of testosterone on insulin secretion may increase amino acid uptake by the peripheral tissue when glucose levels are substimulatory for insulin, warranting a source of energy and/or the persistence of the cellular metabolism. Thus, testosterone can be an important hormone for insulin secretion during fasting periods.

Legends

Fig 1: Effect of testosterone on insulin secretion and on $^{45}Ca^{2+}$ uptake at different glucose concentrations. The islets were pre-incubated for 15 minutes with 3 mM of glucose and then pre-incubated again for 15 minutes with glucose at the concentrations of 0, 3 and 5 mM, respectively. After that, they were incubated for 180 seconds in the presence or absence of testosterone (1 μ M) at different glucose concentrations. * ($p < 0.05$). (Mean \pm SEM, n=6).

Fig 2: Action of androgens and of sulfonylureas on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in isolated pancreatic islets. The islets were pre-incubated for 50 minutes with 3 mM of glucose and then pre-incubated again for 10 minutes with or without glibenclamide (25 μM) or tolbutamide (10 μM). After that, they were incubated for 60 seconds in the presence or absence of testosterone (0.1 μM) or nandrolone (0.1 μM) and/or glibenclamide or tolbutamide. * ($p < 0.05$). (Mean \pm SEM, n=6).

Fig 3: Stimulatory effects of androgens and alanine on insulin secretion. The islets were pre-incubated for 30 minutes with or without alanine (5 mM) and incubated for 180 seconds with or without testosterone (1 μM) or nandrolone (1 μM) and/or alanine (5 mM). * ($p < 0.05$). (Mean \pm SEM, n=6).

Fig 4: Effect of testosterone on insulin release at different amino acid mixture (MIX) concentrations. The islets were pre-incubated for 30 minutes with 3 mM of glucose. After that, they were incubated for 180 seconds with or without testosterone (1 μM) followed by another 180 minutes with or without amino acid mixture: MIX [glutamine (2 mM), lysine (1.5 mM), alanine (1 mM), leucine (1 mM)], MIX2 [glutamine (4 mM), lysine (3 mM), alanine (2 mM), leucine (2 mM)] or MIX4 [glutamine (8 mM), lysine (6 mM), alanine (4 mM), leucine (4 mM)]. * ($p < 0.05$). (Mean \pm SEM, n=6).

Fig 5: Action of testosterone upon the transport of [^{14}C] MeAIB in islets. The isolated islets were pre-incubated for 30 minutes with 3 mM of glucose and incubated for 15, 30 or 60 minutes with [^{14}C]MeAIB (0.2 μCi /sample) with or without testosterone. * ($p < 0.05$). (Mean \pm SEM, n=6)

Fig 6: Antagonist effect of diazoxide on the stimulatory action of testosterone in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in pancreatic islets. The islets were pre-incubated for 50 minutes with 3 mM of glucose and then pre-incubated again for 10 minutes with or without diazoxide (100 μM). After that, they were incubated for 60 seconds in the presence or absence of testosterone (0.1 μM) and/or diazoxide. * ($p < 0.05$). (Mean \pm SEM, n=6).

Fig 7: Antagonist effect of phospholipase C inhibitor, U73122, on the stimulatory action of testosterone in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake. The islets were pre-incubated for 45 minutes with 3 mM of glucose and then pre-incubated again for 15 minutes with or without U73122 (2 μM). After that, they were incubated for 60 seconds in the presence or absence of testosterone (1 μM) and/or U73122. * ($p < 0.05$). (Mean \pm SEM, n=6).

Fig 8: Antagonist effect of L-type Ca^{2+} channel blocker nifedipine on the stimulatory action of testosterone in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake. The islets were pre-incubated for 50 minutes with 3 mM of glucose and then pre-incubated again for 10 minutes with or without nifedipine (1 μM). After that, they were incubated for 60 seconds in the presence or absence of (1 μM) and/or nifedipine. * ($p < 0.05$). (Mean \pm SEM, n=6).

References

Barja-Fidalgo C, Guimaraes JA, Carlini CR. Canatoxin, a plant protein, induces insulin release from isolated pancreatic islets. *Endocrinology* 1991; 128: 675-679.

Batra S, Sjogren C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. *Life Sci* 1983; 32: 315-319.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.

Diamanti-Kandarakis E. Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Expert Rev Mol Med* 2008 Jan 30; 10: e3.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton RA. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G-protein coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via transactivation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 1649-60.

Grasso P, Reichert LE Jr. Follicle-stimulating hormone receptor-mediated uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ by proteoliposomes and cultured rat Sertoli cells: evidence for involvement of voltage-activated and voltage-independent calcium channels. *Endocrinology* 1989; 125: 3029-3036.

Gribble FM, Reimann F. Differential selectivity of insulin secretagogues. Mechanisms, clinical implications, and drug interactions. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2003; 17: 11-15.

Grillo ML, Jacobus AP, Scalco R, Amaral F, Rodrigues DO, Loss ES, Wassermann GF. Testosterone rapidly stimulates insulin release from isolated pancreatic islets through a non-genomic dependent mechanism. *Horm Metab Res* 2005; 37(11): 662-665.

Henquin J-C, Dufrane D, Nenquin M. Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes* 2006; 55: 3470–3477.

Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16: 35-39.

Lernmark A. The preparation of, and studies on, free cell suspensions from mouse pancreatic islets. *Diabetologia* 1974; 10: 431-438.

Li C, Buettger C, Kwagh J, Matter A, Daikhin Y, Nissim IB, Collins HW, Yudkoff M, Stanley CA, Matschinsky FM. A signaling role of glutamine in insulin secretion. *J Biol Chem* 2004 Apr 2; 279(14): 13393-401.

Lieberherr M, Grosse B. Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Biol Chem* 1994; 269:7217-7223.

Loss, ES, Jacobsen M, Costa ZSM, Jacobus AP, Borelli F, Wassermann GF. Testosterone modulates K^+_{ATP} channels in Sertoli cell membrane via the PLC-PIP2 pathway. *Horm Metab Res* 2004; 36: 519-525.

Metz AS. Ether-linked lysophospholipids initiate insulin secretion. Lysophospholipids may mediate effects of phospholipase A2 activation on hormone release. *Diabetes* 1986; 35: 808-817.

Morimoto S, Fernandez-Mejia C, Romero-Navarro G, Morales-Peza N, Díaz-Sánchez V. Testosterone effect on insulin content, Messenger ribonucleic acid levels, promoter activity, and secretion in the rat. *Endocrinology* 2001; 142: 1442-1447.

Nadal A, Rovira JM, Laribi O, Leon-Quinto T, Andreu E, Ripoll C, Soria B. Rapid insulinotropic effect of 17 β -estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB J* 1998; 12: 1341-1348.

Nakashima M, Vanhoutte PM. Isoproterenol causes hyperpolarization through opening of ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle of the canine saphenous vein. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 379-384.

Ravier MA, Nenquin M, Miki T, Seino S, Henquin J-C. Glucose controls cytosolic Ca²⁺ and insulin secretion in mouse islets lacking adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channels owing to a knockout of the pore-forming subunit kir6.2. *Endocrinology* 2009; 150: 33-45.

Scobey MJ, Bertera S, Somers JP, Watkins SC, Zeleznik AJ, Walker WH. Delivery of a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate response element binding protein (CREB) to seminiferous tubules results in impaired spermatogenesis. *Endocrinology* 2001; 142: 948-954.

Spritzer PM, Wassermann GF. Amino acid uptake and protein synthesis in rat testes: stimulation by dissociable factors. *Horm Metab Res* 1985; 17: 237-240.

Szollosi A, Nenquin M, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Henquin J-C. Glucose stimulates Ca^{2+} influx and insulin secretion in 2-week-old β -cells lacking ATP-sensitive K^+ channels. *J Biol Chem* 2007; 282(3): 1747–1756.

Szollosi A, Nenquin M, Henquin JC. Pharmacological stimulation and inhibition of insulin secretion in mouse islets lacking ATP-sensitive K^+ channels. *Br J Pharmacol*. 2010;159(3): 669-77.

Von Ledeber EICF, Almeida JP, Loss ES, Wassermann GF. Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K^+ ATP channels. *Horm Metab Res* 2002; 34: 550-555.

Walker WH. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids* 2009; 74: 602–607.

Wassermann GF, Loss ES. Testosterone action on the Sertoli cell membrane: a $\text{K}_{\text{IR}}6.x$ channel related effect. *Current Pharmaceutical Design* 2004; 10: 2649-2656,.

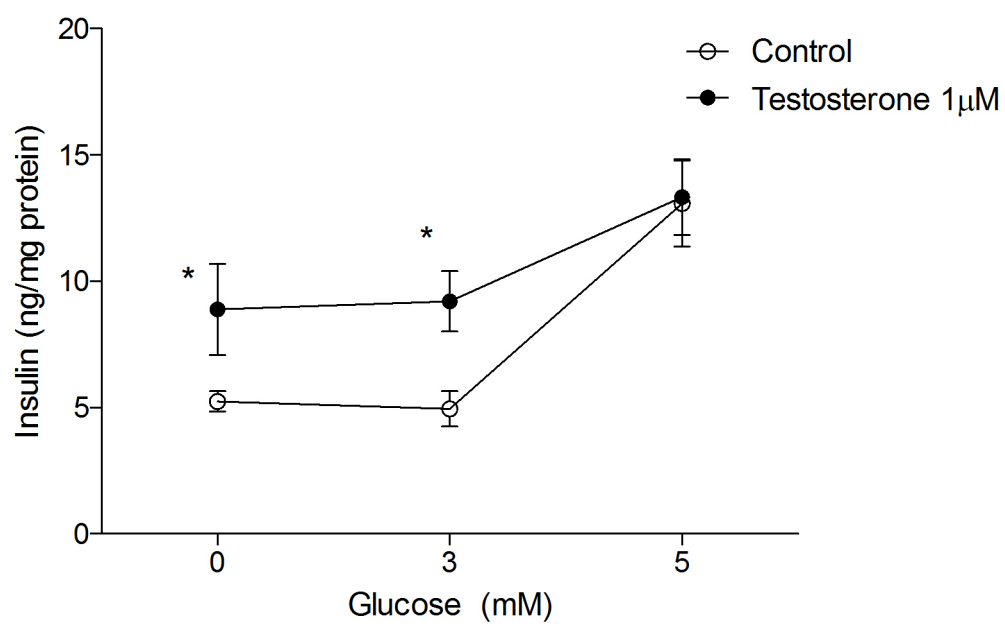


Fig 1a

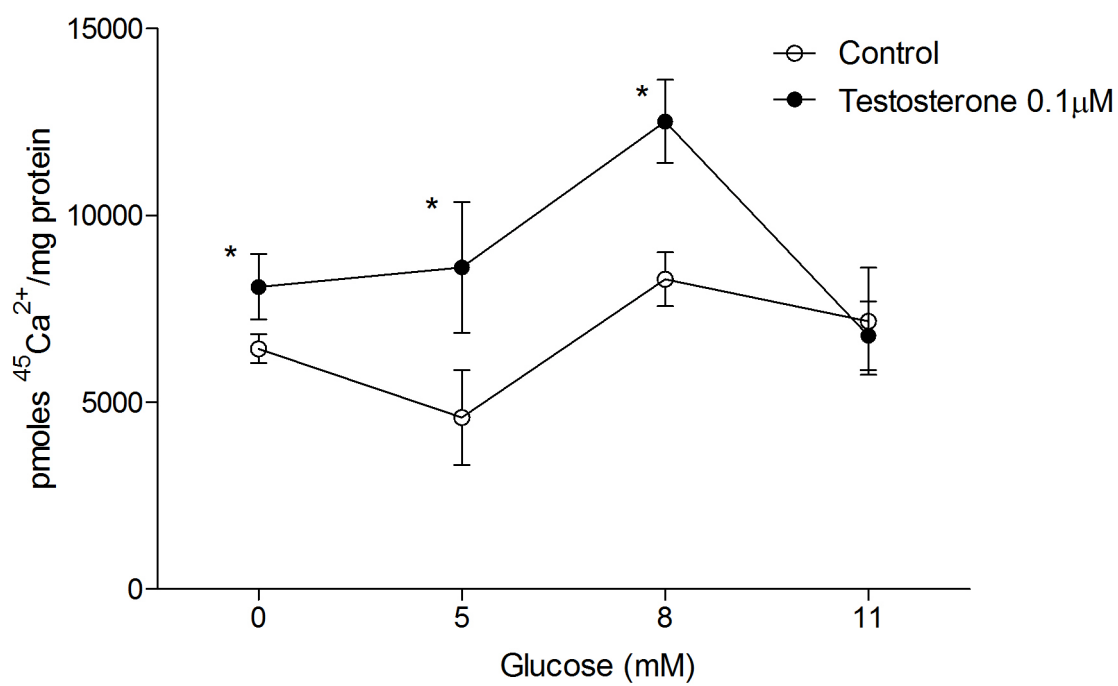


Fig 1b

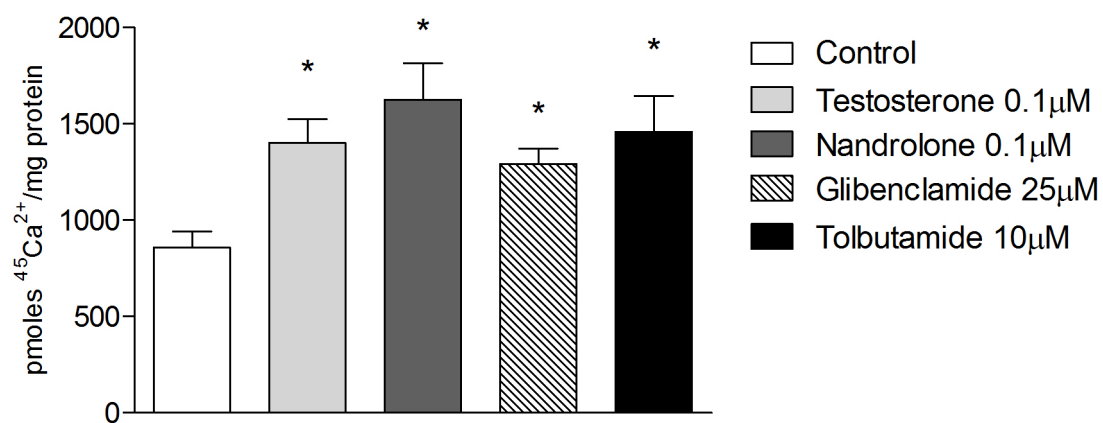


Fig 2

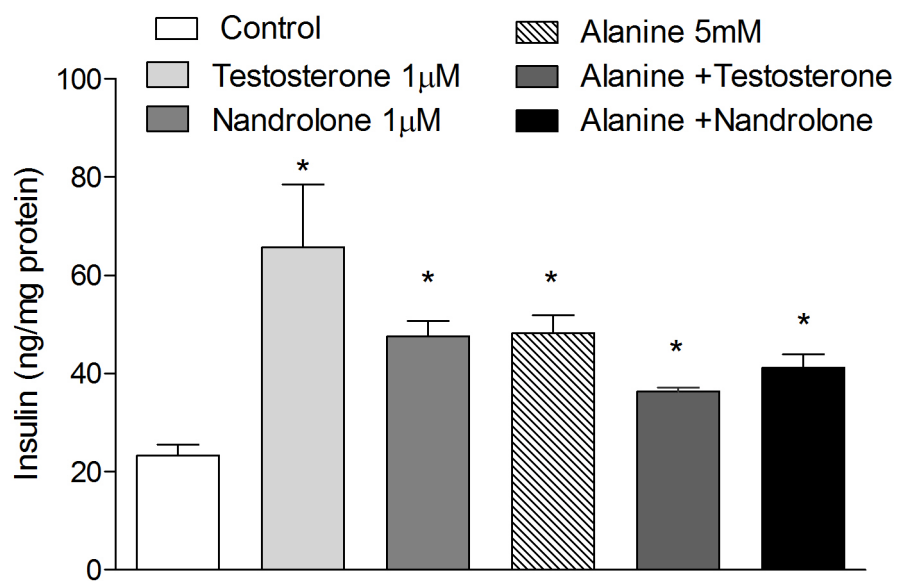


Fig 3

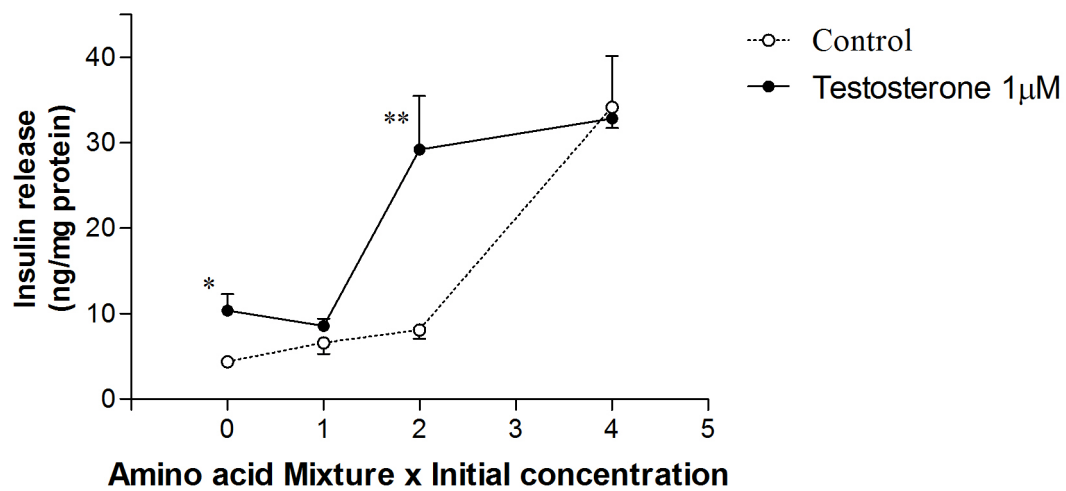


Fig 4

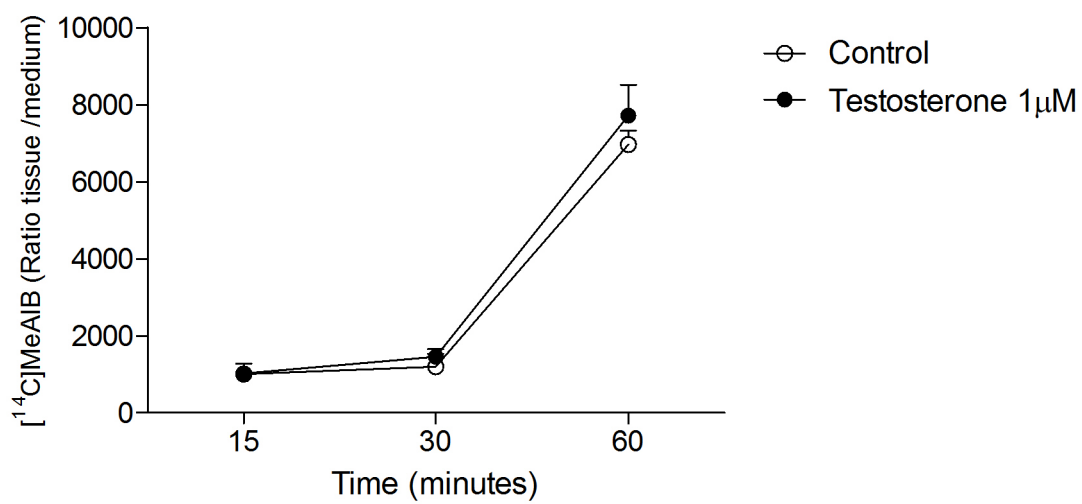


Fig 5

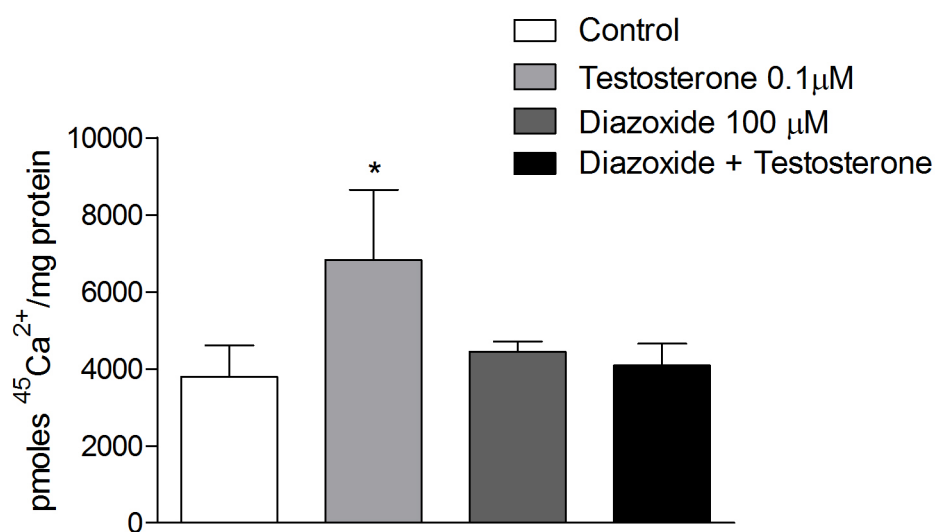


Fig 6

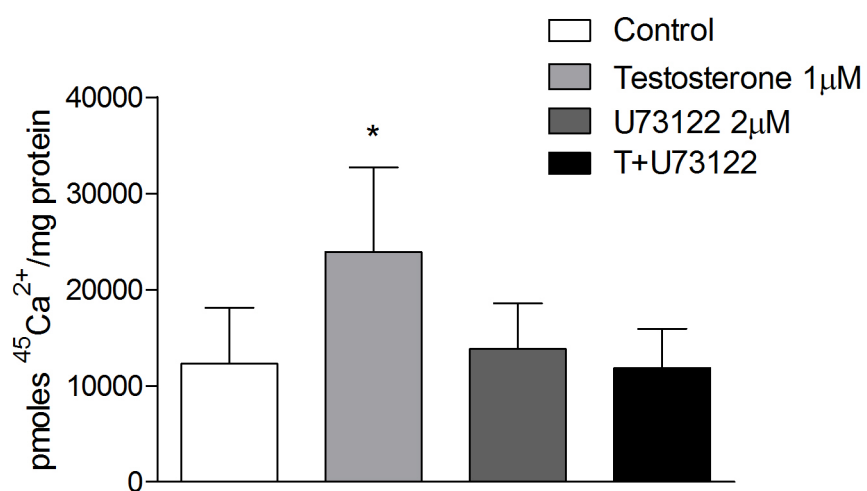


Fig 7

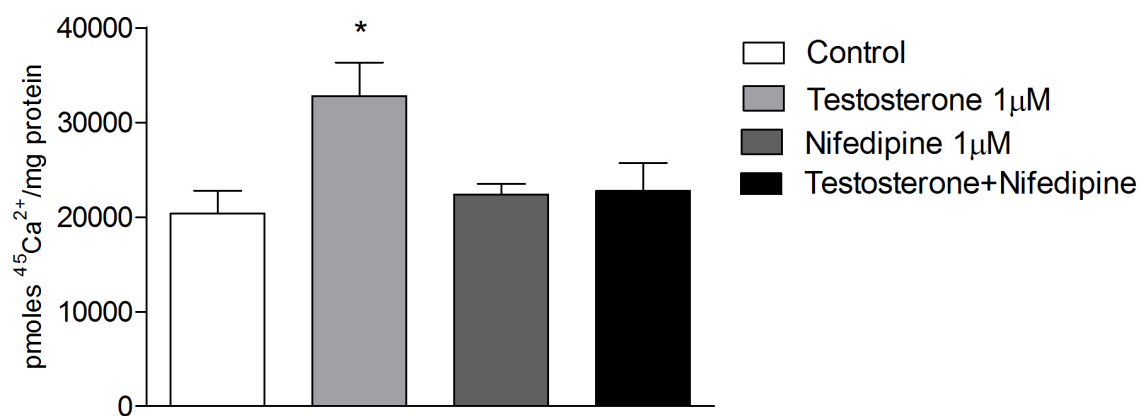


Fig 8