



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS: FISILOGIA



## Efeitos do tratamento com DHEA sobre o metabolismo de ratos

Ana Lucia Hoefel

Esta tese faz parte dos requisitos necessários para obtenção do título de doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Luiz Carlos Kucharski

Co-orientadora: Dra. Maria Flávia Ribeiro

Porto Alegre, setembro de 2015.

*PENSAMENTO*

“Escolha um trabalho que você ame, e não terá que trabalhar em um único dia de sua vida”.

Confúcio

## **Agradecimentos**

Ao Professor Luiz Carlos Kucharski, pela recepção em seu laboratório, pela dedicação, conhecimentos compartilhados, por ser o primeiro a chegar e o último a sair, quando tínhamos experimentos, por ser aquele orientador em quem eu sempre pude contar, em todos os dias do meu doutorado, és um exemplo a ser seguido;

À Professora Maria Flávia Marques Ribeiro, que confiou em mim, muito contribuindo para meu aprendizado e crescimento profissional, compartilhando importantes conselhos e constante incentivo;

Ao querido professor Clóvis Wannmacher pelo apoio e carinho.

Às professoras Roselis Silveira Martins da Silva, Anapaula Vinagre e Márcia Trapp e os colegas e amigos do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada e do Laboratório de Interação Neuro-humoral, especialmente as colegas Claudia Vieira Marques e Aline Gonçalves, Cláudia Chiarel de Almeida e Ana Lúcia Cecconello pela parceria nos experimentos e pelo agradável convívio;

À Professora Adriane Belló-Klein pela confiança e oportunidade do aprendizado no Canadá. À professora Neelam Khaper pela recepção, carinho e aprendizado. Ao colega-amigo Rafael Fernandes, pelo companheirismo no dia-a-dia quando estávamos tão longe de casa. Por ser meu '*Cérebro*' no Canadá; às colegas canadenses Stephanie April Puukila e Heidi Forsyth parceiras nos experimentos realizados no Canadá.

A quem esteve ao meu lado durante todo este período, me dando forças quando eu pensava que não conseguiria...;

As minhas primas Sônia e Sandra Assmann, minhas amigas-irmãs Ana Paula Tibola e Simone Luz por estarem sempre por perto e entenderem minha ausência, ao meu amigo querido Nelson Brugger que me estimulou em momentos difíceis.

Aos colegas, professores, técnicos e funcionários do Departamento de Fisiologia e do Curso de Pós-Graduação;

Aos meus pais, Hélio, Maria (Guida) que sempre estiveram ao meu lado neste período, que me apoiaram em todos os momentos e Eloá (*in memoriam*) meu anjo lá no céu, e ao meu irmão Paulo Roberto, por estarem presentes sempre que eu precisei, serem sempre melhores do que eu esperava, por me amarem e incentivarem;

Aos meus parentes, amigos e amigas e todas as pessoas que, de um jeito ou de outro, participaram da minha vida durante esse trabalho;

Ao CNPq, CAPEs e programa CAPEs DFAIT pelo auxílio financeiro;

À UFRGS pela minha formação e possibilidade de realizar este trabalho;

À DEUS por tudo.

OBRIGADO

Lista de abreviaturas .....	7
Lista de Figuras .....	11
Lista de Tabelas.....	13
RESUMO .....	14
ABSTRACT .....	17
1. Introdução .....	20
1.1 Obesidade .....	20
1.2 Resistência à Insulina e Síndrome Metabólica.....	23
1.3 Doenças Cardiovasculares.....	25
1.4 Desidroepiandrosterona.....	30
1.5 Efeito da DHEA sobre o metabolismo de machos e fêmeas .....	36
2. OBJETIVOS .....	40
2.1 Objetivo Geral.....	40
2.2 Objetivos Específicos.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	42
3.1. Local de realização dos experimentos.....	42
3.2 Experimentos <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> .....	42
3.2.1 Animais .....	42
3.2.2 Experimento 1: Ratos machos e fêmeas tratados com diferentes doses de DHEA ....	43
3.2.3 Experimento 2: ratos machos tratados com DHEA e dieta hipercalórica .....	44
3.3 Experimento 3: Cultura de cardiomiócitos.....	47
3.3.1 Cultura de cardiomiócitos .....	47
3.3.2 Câmara de hipóxia.....	49
3.3.3 Tratamento com DHEA e condições de hipóxia .....	50
3.4 Técnicas de análise metabólica e processamento das amostras .....	51
3.4.1 Testes de Tolerância à Glicose (TTG) .....	51
3.4.2 Preparação das amostras e tecidos.....	51

3.4.3 Oxidação de glicose (produção de $^{14}\text{CO}_2$ ).....	52
3.4.4 Oxidação de leucina (produção de $^{14}\text{CO}_2$ ).....	52
3.4.5 Conversão de glicose e leucina a lipídeos.....	53
3.4.6 Conversão de leucina a proteína.....	54
3.4.7 Síntese de Glicogênio a partir de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glicose e alanina.....	55
3.4.8 Conteúdo de glicogênio.....	55
3.4.9 Captação de glicose.....	56
3.4.10 Dosagens bioquímicas no soro.....	56
3.4.11 Dosagens de DHEA e Testosterona no soro.....	57
3.5 Análise da expressão de proteínas (Western Blotting).....	57
3.5.1 Amostras teciduais.....	57
3.5.2 Expressão de proteínas em células (cardiomiócitos).....	58
3.6 Citometria de fluxo.....	60
3.7. Análise Estatística.....	60
4. RESULTADOS.....	61
4.1 Experimento 1: Ratos machos e fêmeas tratados com diferentes doses de DHEA.....	61
4.2 Experimento 2: Ratos machos tratados com DHEA e dieta hipercalórica.....	70
4.3 Experimento 3: cultura de cardiomiócitos (H9C2) tratados com DHEA e submetidos à hipóxia/reoxigenação.....	83
5. DISCUSSÃO.....	89
6. CONCLUSÕES.....	115
7. PERSPECTIVAS:.....	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
ANEXO.....	150

## **Lista de abreviaturas**

[<sup>3</sup>H]-DHEA: Desidroepiandrosterona radioativa

2DG-<sup>14</sup>C: glicose: Dois-desoxiglicose Radioativa

3βHSD1/ 3βHSD: 3β hidroxisteroide desidrogenase 1 ou 2

ACTH: Hormônio Adenocorticotrófico

ADP: Adenosina Difosfato

AGL: Ácidos Graxos Livres

Akt/PKB: Proteína Cinase B

ALT: Alanina Aminotransferase

AMP: Adenosina Monofosfato

ANOVA: Análise de Variância

AO: Antioxidante

ATP: Adenosina Trifosfato

AUC: Área Sob a Curva

cAMP: AMP cíclico

CAT: Catalase

CD: Grupo Controle DHEA

COBEA: Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório Animal

CREAL: Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

CT: Colesterol Total

CTRL Veículo: Grupo Controle veículo

Cu/Zn: Superóxido Dismutase Citosólica

CV: Grupo Controle Veículo

DAC: Doença Arterial Coronariana

DCV: Doenças Cardiovasculares

DHEA: Desidroepiandrosterona

DHEA10: Grupo DHEA 10 mg/kg

DHEA25: Grupo DHEA 25 mg/kg

DHEA50: Grupo DHEA 50 mg/kg

DHEAS: Desidroepiandrosterona Sulfatada

DMEM: Meio de *Eagle* Modificado Dulbeco

DMTII: Diabetes Mellitus Tipo 2

eNOS: Óxido Nítrico Sintase Endotelial

EO: Estresse Oxidativo

EROS: Espécies Reativas de Oxigênio

EUA: Estados Unidos da América

GMPC: Guanosina Monofosfato Cíclico

GSK3 $\beta$ : Glicogênio Sintase Cinase-3 $\beta$

H<sub>2</sub>DCFDA: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetate

HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica

HD: Grupo Hipercalórico DHEA

HDL: Lipoproteína de Alta Densidade (*Hight Density Cholesterol*)

HIF1- $\alpha$ : Fator 1- $\alpha$  Induzível por Hipóxia

HO<sub>2</sub><sup>°</sup>: Hidroxiperoxil

HV: Grupo Hipercalórico Veículo

IAM: Infarto Agudo do Miocárdio

ICC: Insuficiência Cardíaca Congestiva

IMC: Índice de Massa Corporal

KOH: Hidróxido de Potássio

KRB: Tampão Krebs Ringer Bicarbonato

LaMEC: Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada



LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade (Low Density Lipoprotein)

LDLox: LDL oxidada

LINH: Laboratório de Interação Neuro-Humoral

MAPK: Proteína Cinase Ativada por Mitógenos

Mn-SOD: Superóxido Dismutase Mitocondrial

NaCl: Cloreto de Sódio

NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADPH: Nicotinamida Dinucleotídeo Fosfato

NaOH: Hidróxido de Sódio

NCEP: Programa Nacional de Educação para o Colesterol (*National Cholesterol Education Program*)

NFK-B: Fator Nuclear kappa-B

O<sub>2</sub><sup>°</sup>: Radical Superóxido

OH<sup>°</sup>: Radical Hidroxil

PARP: poli-ADP-Ribose-Polimerase

PBS: Tampão Fosfato Salina

PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinase

PKC: Proteína Cinase C

PPAR: Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*)

PVDF: Membrana de Polivinilideno Difluoreto

RI: Resistência à Ação da Insulina

RO<sup>°</sup>: Radical Alcoxil

RO<sub>2</sub><sup>°</sup>: Radical Peroxil

SDS-PAGE: Dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida

SFB: Soro Fetal Bovino

SM: Síndrome Metabólica

SNC: Sistema Nervoso Central

TA: Tecido Adiposo

TCA: Ácido Tricloroacético

TDMEM: Meio de *Eagle* Modificado Dulbecco Tratamento

TG: Triglicerídeos

TTBS: Tampão Tris Salina

TTG: Teste de Tolerância à Glicose

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mapa da prevalência de sobrepeso no mundo .....	21
<b>Figura 2.</b> Mapa da prevalência de obesidade no mundo .....	22
<b>Figura 3.</b> Síntese e metabolização de DHEA .....	31
<b>Figura 4.</b> Grupos experimentais do primeiro experimento.....	44
<b>Figura 5.</b> Grupos experimentais do segundo experimento .....	45
<b>Figura 6.</b> Desenho experimental do segundo experiment .....	47
<b>Figura 7.</b> Grupos experimentais do terceiro experimento .....	49
<b>Figura 8.</b> Câmara de hipóxia utilizada para os experimentos de cultura de linhagem de cardiomiócitos .....	50
<b>Figura 9.</b> Níveis séricos de DHEA e testosterona total em ratos machos e fêmeas ovariectomizadas 30 dias após implantação de <i>pellets</i> com diferentes doses de DHEA. 62	
<b>Figura 10.</b> Metabolismo da glicose no fígado de ratos machos e fêmeas ovariectomizadas e tratados com diferentes doses de DHEA .....	65
<b>Figura 11.</b> Metabolismo da glicose em tecido adiposo retroperitoneal de ratos machos e fêmeas ovariectomizadas e tratados com diferentes doses de DHEA .....	66
<b>Figura 12.</b> Captação de glicose em músculo sóleo de ratos machos e fêmeas ovariectomizadas e tratados com diferentes doses de DHEA. ....	67
<b>Figura 13.</b> Metabolismo da leucina em músculo sóleo de ratos machos e fêmeas ovariectomizadas e tratados com diferentes doses de DHEA. ....	69
<b>Figura 14.</b> Dados de ingestão energética e de peso corporal de ratos machos que consumiram dieta hipercalórica ou dieta controle e receberam tratamento com DHEA em <i>pellets</i> (25 mg/kg ou veículo durante as últimas oito semanas). ....	71
<b>Figura 15.</b> Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTG) e Área sob a Curva (AUC) (Figura acima do gráfico) de ratos machos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA.....	72
<b>Figura 16.</b> Metabolismo da glicose em fígado de ratos machos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA.....	74
<b>Figura 17.</b> Síntese de glicogênio em fígado de ratos machos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA.....	75

<b>Figura 18.</b> Metabolismo da glicose em tecido adiposo retroperitoneal de ratos machos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA .....	77
<b>Figura 19.</b> Metabolismo da glicose no músculo sóleo de ratos machos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA. 79	79
<b>Figura 20.</b> Captação de glicose em gastrocnêmio de ratos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA.....	80
<b>Figura 21.</b> Conteúdo de pAKT em curacao de ratos machos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA.....	81
<b>Figura 22.</b> Produção de diclorofluorecina diacetato (DCFH) em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação e tratados ou não com DHEA.84	84
<b>Figura 23.</b> Conteúdo de PARP (poli-ADP-ribose-polimerase) em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação tratados ou não com DHEA. .	85
<b>Figura 24.</b> Expressão da proteína Bax em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação tratados ou não com DHEA .....	85
<b>Figura 25.</b> Expressão da proteína Bcl2 em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação tratados ou não com DHEA .....	86
<b>Figura 26.</b> Relação da expressão Bcl/Bax em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação tratados ou não com DHEA .....	86
<b>Figura 27.</b> Expressão da enzima superóxido dismutase (SOD) em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação tratados ou não com DHEA ..	87
<b>Figura 28.</b> Expressão da enzima catalase (CAT) em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação tratados ou não com DHEA.....	88
<b>Figura 29.</b> Expressão da proteína caspase em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação tratados ou não com DHEA .....	89
<b>Figura 30.</b> Proposta da ação metabólica da DHEA no metabolismo de carboidratos em animais submetidos a uma dieta hipercalórica. ....	117

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Composição das dietas utilizadas no protocolo experimental .....	46
<b>Tabela 2.</b> Ingredientes utilizados no preparo da dieta hipercalórica artesanal .....	47
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros bioquímicos do soro de ratos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA.....	72
<b>Tabela 4.</b> Peso dos tecidos (gramas) de ratos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA. ....	82
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros teciduais de ratos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA. Triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e concentração de glicogênio. ....	83

## RESUMO

Estudos que avaliam o metabolismo fornecem subsídios para entender como os organismos reagem em relação a tratamentos e dietas. O sobrepeso e a obesidade estão alcançando elevadas proporções ao redor do mundo e os governos, e a própria sociedade, têm se empenhado na tentativa de combater esta epidemia. Outro aspecto que devemos relacionar nos estudos de metabolismo é a questão de gênero, pois a maioria dos estudos utiliza como modelo experimental ratos e camundongos machos. Entretanto, quando se propõe protocolos de tratamento, temos a tendência a extrapolar os resultados também para as fêmeas, o que na realidade não parece muito adequado. Atualmente, essa ideia vem mudando e alguns pesquisadores têm considerado a proposta de realizar estudos experimentais utilizando machos e fêmeas, até mesmo para experimentos que utilizem células. Ainda em relação ao metabolismo, podemos evidenciar o problema da obesidade que tem se tornado uma epidemia mundial recebendo o nome de “Globesidade”. As dietas hiperlipídicas e hipercalóricas têm levado a população mundial a apresentar alterações de seu metabolismo principalmente relacionadas às dislipidemias, as quais podem ter como consequência o desenvolvimento de alterações cardiovasculares. Assim, os estudos experimentais que investigam o metabolismo do coração também se tornam importantes, particularmente em nível celular, pois é o local onde os eventos metabólicos acontecem. A Desidroepiandrosterona (DHEA) é um hormônio esteroide que tem efeitos sobre o metabolismo, síndrome metabólica, obesidade, resistência à insulina e doenças cardiovasculares. Há na literatura, alguns estudos que relatam que a administração de DHEA produz efeitos diferentes em machos e em fêmeas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da DHEA em: a) ratos Wistar, machos e fêmeas ovariectomizadas, com dieta padrão e que recebiam tratamento com diferentes doses de DHEA, b) ratos Wistar machos, submetidos ou não a uma dieta hipercalórica e tratados com DHEA (25mg/kg), c) linhagem celular (H9C2) de ventrículo cardíaco de ratos submetidas, ou não, à hipóxia e reoxigenação e tratadas com DHEA. A análise dos resultados mostrou que o tratamento com DHEA tem efeito sobre o metabolismo e os resultados são diferentes quando comparamos machos e fêmeas ovariectomizadas. A avaliação do metabolismo da glicose no fígado mostrou que este substrato tem uma utilização diferente entre os sexos, sendo que nos machos a conversão de glicose a CO<sub>2</sub> é maior do que nas fêmeas ovariectomizadas, mas o tratamento com DHEA não teve

efeito. A conversão de glicose em lipídeos foi maior nos machos e o tratamento com DHEA diminuiu a lipogênese hepática a partir de glicose somente nas fêmeas ovariectomizadas. Com relação à síntese de glicogênio a partir de glicose, houve diferença entre os sexos, sendo que as fêmeas ovariectomizadas apresentaram níveis maiores que os machos e o efeito do tratamento ocorreu apenas nas fêmeas. O metabolismo da glicose no tecido adiposo também mostrou diferença entre os sexos, sendo a captação de glicose maior nas fêmeas e o tratamento com DHEA reduziu essa captação apenas nas fêmeas. No músculo, a captação de glicose é maior nas fêmeas do que nos machos e a administração de DHEA não produziu efeito significativo. O metabolismo da leucina mostrou diferença entre os sexos, sendo sua oxidação e a síntese de lipídeos e proteínas menor nas fêmeas do que nos machos. Em machos que receberam dietas hipercalóricas, a DHEA não reduziu a ingestão alimentar e o ganho de peso, porém, teve efeito melhorando o resultado do teste de tolerância à glicose. O peso total do fígado nos animais com dieta hipercalórica foi maior quando comparado aos animais com dieta normocalórica e a DHEA não reverteu este parâmetro. No metabolismo hepático da glicose, tanto o tratamento com DHEA quanto a dieta hipercalórica produziram uma redução da oxidação de glicose (glicose convertida em CO<sub>2</sub>). A síntese hepática de glicogênio a partir de alanina foi reduzida com o tratamento com DHEA nos grupos que receberam dieta hipercalórica. A dieta hipercalórica diminuiu, em aproximadamente 19%, a captação de glicose no tecido adiposo quando comparado ao grupo com dieta normocalórica e os animais tratados com DHEA apresentaram um aumento na captação de glicose independente da dieta, inclusive revertendo a redução causada pela dieta hipercalórica. Na oxidação de glicose, houve interação entre dieta e tratamento no tecido adiposo, ou seja, o tratamento com DHEA diminuiu significativamente a oxidação de glicose no grupo controle e produziu um aumento no grupo com dieta hipercalórica. No músculo gastrocnêmio, a captação de glicose foi reduzida com a dieta hipercalórica. A produção de CO<sub>2</sub> e a síntese de glicogênio no músculo sóleo aumentaram somente nos grupos que receberam a dieta hipercalórica. No músculo cardíaco, o tratamento com DHEA aumentou a concentração de glicogênio apenas no grupo com dieta hipercalórica. Além disso, neste mesmo tecido, a DHEA causou um aumento de 55% na expressão proteica da pAKT no grupo com dieta hipercalórica. No estudo com cardiomiócitos foram avaliados parâmetros de proteção contra a formação de radicais livres após as células serem submetidas à

hipóxia e reoxigenação, e foi encontrado que o tratamento com DHEA diminui a quantidade de radicais livres intracelulares. Também foi avaliada a expressão das enzimas SOD e CAT, as quais não tiveram uma alteração significativa com o tratamento. Em relação ao processo de apoptose, a expressão da caspase 3 apresentou uma redução no grupo tratado com DHEA nas células submetidas à hipóxia-reoxigenação. Assim, podemos concluir que a DHEA não alterou significativamente os parâmetros metabólicos nos ratos machos enquanto que nas fêmeas a DHEA produziu efeitos significativos sobre o metabolismo destas. Nos ratos submetidos à dieta hipercalórica a DHEA melhorou o metabolismo de carboidratos. Em relação aos cardiomiócitos, observamos que a DHEA protege parcialmente as células após um evento de hipóxia-reoxigenação. Porém, mais estudos necessitam ser realizados a fim de investigar os mecanismos que são ativados após o tratamento com DHEA e que podem alterar os padrões metabólicos e celulares.



## ABSTRACT

Studies evaluating the metabolism provide subsidies to understand how organisms react in relation to treatments and diets. Overweight and obesity are reaching high proportions around the world and governments, and society itself, they have been engaged in trying to combat this epidemic. Another aspect that we should relate to metabolism studies is a gender issue because most studies used as an experimental model male rats and mices. However, when proposing treatment protocols, we extrapolate the results also for females, which in reality does not seem very appropriate. Today, this idea is changing and some researchers have considered the proposal to conduct experimental studies using male and female, even for experiments using cells. Also in relation to metabolism, we can highlight the problem of obesity which has become a worldwide epidemic given the name "Globesity". The hyperlipidemic and hypercaloric diets have led to the present world population changes in its metabolism mainly related to dyslipidemia, which may result in the development of cardiovascular diseases. Thus, experimental studies investigating the metabolism of the heart also become important, particularly at the cellular level, where the metabolic events take place. The dehydroepiandrosterone (DHEA) is a steroid hormone that has effects on metabolism, metabolic syndrome, obesity, insulin resistance and cardiovascular disease. In the literature, some studies report that DHEA administration produces different effects on males and females. The objective of this study was to evaluate the DHEA effect: a) wistar rats, male and female, with standard diet and received treatment with different doses of DHEA, b) male wistar rats, submitted or not to a hypercaloric diet and treated with DHEA (25 mg / kg), c) cell line (H9C2) cardiac ventricle of rats subjected or not to hypoxia and reoxygenation and treated with DHEA. The results showed that DHEA treatment has an effect on the metabolism and the results are different when comparing the males and females. The evaluation of glucose metabolism in the liver showed that this substrate has a different use between the sexes, and in males the glucose oxidation to CO<sub>2</sub> is higher than in females, but the treatment with DHEA had no effect. The lipids formation from glucose was higher in males and treatment with DHEA decreased the hepatic lipogenesis from glucose only in females. Regarding the synthesis of glycogen from glucose, there were differences between the sexes, and females had higher levels than males and the treatment effect was observed only in females. Glucose metabolism in adipose tissue also showed differences between the

sexes, with the uptake of glucose greater in females and DHEA treatment reduced this finding only in females. In muscle glucose uptake is higher in females than in males and DHEA administration did not produce significant effect. The metabolism of leucine showed differences between the sexes, and their oxidation and synthesis of lipids and proteins smaller in females than in males. In males fed with a high fat diet, DHEA did not reduce food intake and weight gain, however, had an effect of improving the results of glucose tolerance test. The total weight of liver in animals with higher calorie diet was compared to animals with diet and normocaloric DHEA did not reverse this parameter. In the hepatic metabolism of glucose, either treatment with DHEA as hypercaloric diet produced a reduction in glucose oxidation (glucose converted to CO<sub>2</sub>). Liver glycogen synthesis from alanine was reduced with treatment with DHEA in the groups that received hypercaloric diet. The high calorie diet decreased by approximately 19%, glucose uptake in adipose tissue when it was compared to the group with normocaloric diet and the animals treated with DHEA had an increase independent dietary glucose and reversing the reduction caused by hypercaloric diet. In glucose oxidation was no interaction between diet and adipose tissue treatment, its mean that the treatment with DHEA significantly decreased glucose oxidation in the control group and the group produced an increase in calorie diet. In the gastrocnemius muscle glucose uptake was reduced with a high calorie diet. The CO<sub>2</sub> production and glycogen synthesis in soleus muscle increased only in the groups receiving the high calorie diet. In cardiac muscle, treatment with DHEA increased glycogen concentration only in the group with hypercaloric diet. Moreover, in this same tissue, DHEA caused a 55% increase in protein expression of pAKT in the group with hypercaloric diet. In the study with cardiomyocyte the protection parameters were evaluated against free radical formation after cells were subjected to hypoxia and reoxygenation, and it was found that treatment with DHEA decreases the amount of intracellular free radicals. We also evaluated the expression of enzymes SOD and CAT, which did not have a significant change with treatment. Regarding the process of apoptosis, caspase 3 expression showed a reduction in group treated with DHEA in cells subjected to hypoxia-reoxygenation. Thus, we can conclude that DHEA did not significantly changes in the metabolic parameters in males while in females DHEA to produce significant effects. In rats with high calorie diet DHEA improved carbohydrate metabolism. Regarding cardiomyocytes, we found that DHEA partially protects cells after a hypoxia-

reoxygenation event. Further studies need to be conducted in order to investigate the mechanisms that are activated after treatment with DHEA that can changes the cellular metabolism.

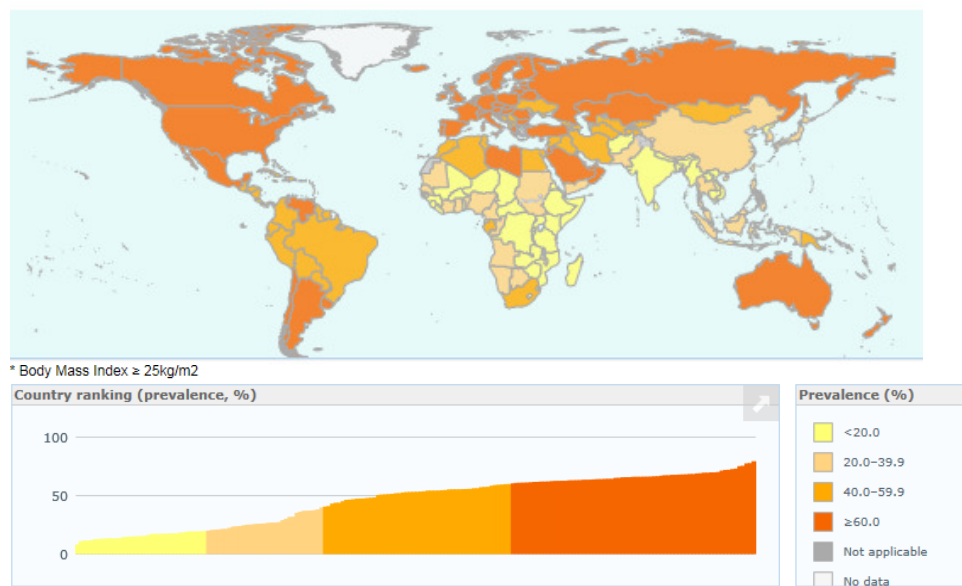
## **1. Introdução**

### **1.1 Obesidade**

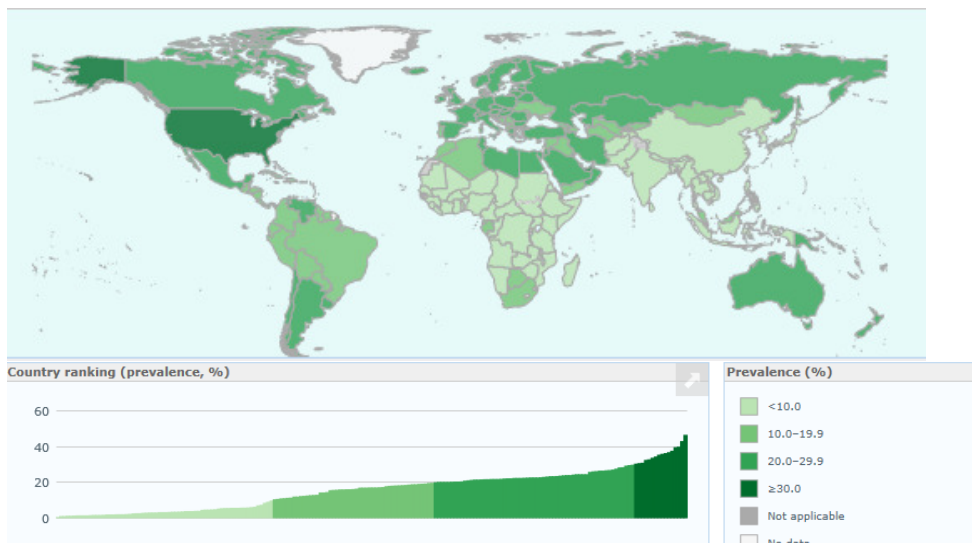
A dieta é um fator determinante na manutenção da saúde. Existe uma forte associação entre dietas pobres em nutrientes e incidência de doenças crônicas (Hunter, Zhang e Kris-Etherton, 2010; Perichart-Perera *et al.*, 2010; Siri-Tarino *et al.*, 2010). Estas doenças sobrecarregam os serviços de saúde gerando aumento dos custos e a mortalidade (Who, 2003; Lifshitz e Lifshitz, 2014; Yang *et al.*, 2014). Das mortes por doenças crônicas, quase metade podem ser atribuídas às doenças cardiovasculares (DCV), à obesidade e ao diabetes mellitus tipo II (DMTII) (Who, 2003). A obesidade, por sua vez, tem sido associada com comorbidades como resistência sistêmica à ação da insulina (RI), hiperinsulinemia, hiperglicemia, hiperleptinemia, diabetes mellitus tipo II (DMTII) e doenças cardiovasculares (DCV) como hipertensão arterial sistêmica (HAS), aterosclerose, infarto agudo do miocárdio (IAM), insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e doenças cerebrovasculares (Sclafani e Springer, 1976; Akiyama *et al.*, 1996; Jang *et al.*, 2003; Woods *et al.*, 2003; Dourmashkin *et al.*, 2005).

A prevalência de sobrepeso e obesidade está aumentando exponencialmente em todos os países. No mundo todo, mais de um bilhão de pessoas estão com excesso de peso e mais de 300 milhões estão obesos (Troiano e Flegal, 1998; Who, 2003; Smyth e Heron, 2006). Nos Estados Unidos, em 2010, 40,6 milhões de mulheres, 37,6 milhões de homens e mais de 5 milhões de crianças estavam obesos (Eckel e Krauss, 1998; Allison *et al.*, 1999; Stein e Colditz, 2004; Ogden *et al.*, 2014). Segundo dados da OMS, em 2014 (Who, 2015) a prevalência de sobrepeso (Figura 1) e obesidade (Figura 2) eram maiores nos países da América (Norte, Central e Sul) e regiões da Europa Ocidental, onde a prevalência foi de 61% de sobrepeso e 27% de obesidade (homens e mulheres) e menores no sudeste da Ásia onde a prevalência foi de 22% de sobrepeso e

5% de obesidade (homens e mulheres) (Who, 2015). Nos Estados Unidos, a prevalência de sobrepeso, em 2014, foi >60% e de obesidade >30% (Who, 2015). Em todos os países, a incidência de sobrepeso e obesidade foi maior entre as mulheres (Who, 2015). O Brasil, seguindo a mesma tendência mundial, tem apresentado aumento na incidência de excesso de peso e obesidade em todas as faixas etárias a partir de 5 anos (Ibge, 2010). Estima-se que em cerca de dez anos, o excesso de peso poderá alcançar dois terços da população adulta do Brasil (Ibge, 2010).



**Figura 1.** Mapa da prevalência de sobrepeso no mundo. Adaptado de World Health Organization (WHO, 2015)



**Figura 2.** Mapa da prevalência de obesidade no mundo. Adaptado de World Health Organization (Who, 2015)

Esta incidência crescente da obesidade tem sido chamada de ‘pandemia’ e ‘globesidade’ (Hansen, Gilman e Odland, 2010; Lifshitz e Lifshitz, 2014). A transição nutricional, ou seja, as alterações que ocorreram nos padrões dietéticos e de estilo de vida e suas conseqüentes alterações em padrões epidemiológicos e demográficos (Popkin, 2003), tem sido apontada como uma das responsáveis pelas elevadas taxas de incidência/prevalência de obesidade que atingem diversos países no mundo, independente de sexo, idade ou nível socioeconômico (Popkin, 1994; Drewnowski e Popkin, 1997; Lim *et al.*, 2012; Monteiro e Cannon, 2012). Porém, apesar de ser um dos assuntos mais estudados na atualidade, a etiologia da obesidade ainda não está totalmente elucidada, porque a obesidade é uma patologia complexa e multifatorial, resultante de uma complexa interação entre fatores comportamentais, genéticos, endócrinos, fisiológicos e psicológicos (Arcari *et al.*, 2009). O método mais utilizado para o diagnóstico de sobrepeso e obesidade é o índice de massa corporal (IMC), obtido a partir da equação peso em  $\text{kg}/\text{m}^2$  que, apesar de não ser padrão ouro (é muito sensível, porém pouco específico), seus pontos de corte apresentam boa correlação com a obesidade (Nieto-Garcia, Bush e Keyl, 1990). Valores de IMC superiores a  $25 \text{ kg}/\text{m}^2$  indicam sobrepeso e superiores a  $30 \text{ kg}/\text{m}^2$  obesidade (Finucane *et al.*, 2011; Who, 2015).

O peso corporal é determinado pelo equilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético, sendo que seu controle é realizado em diferentes níveis: circuitos neurais encefálicos evoluíram para processar informações sobre o consumo de alimentos a fim de controlar o comportamento alimentar, células endócrinas gastrointestinais produzem e secretam hormônios sacietogênicos em resposta à presença

de alimentos e o tecido adiposo produz hormônios que sinalizam centralmente o status de peso corporal (Woods *et al.*, 2004; Benoit *et al.*, 2009). A integração dos sinais, centrais e periféricos, ocorre no hipotálamo a fim de regular o equilíbrio energético em curto prazo e o peso corporal a longo prazo (Woods *et al.*, 2004). No hipotálamo, áreas e neurônios distintos expressam sinais orexígenos e anorexígenos e regulam a ingestão de alimentos e o peso corporal (Woods *et al.*, 2004; Benoit *et al.*, 2009).

A obesidade é caracterizada por acúmulo de gordura e aumento do peso corporal, porém, estes não são as únicas consequências desta patologia (Woods *et al.*, 2003). O tecido adiposo (TA) não é apenas um reservatório de energia, mas um órgão endócrino multifuncional que produz peptídeos e proteínas (Trayhurn e Wood, 2004). Os adipócitos secretam um grupo heterogêneo de adipocitocinas como, citocinas, hormônios, fatores de crescimento, proteínas de fase aguda, prostaglandinas, glicocorticoides e esteroides sexuais, cujos efeitos atingem fígado, pâncreas, músculo esquelético, rins, hipotálamo e o sistema imune (Fruhbeck *et al.*, 2001). Na obesidade, ocorre desbalanço secretório nas adipocitocinas, o que leva a um estado de inflamação, resistência à insulina, hipertensão arterial sistêmica e síndrome metabólica (SM) (Pickup e Crook, 1998; Newson *et al.*, 2014).

## **1.2 Resistência à Insulina e Síndrome Metabólica**

Entre os distúrbios metabólicos relacionados com a obesidade o mais incidente é a resistência à insulina (RI), cuja característica é o prejuízo na resposta fisiológica à ação da insulina com incapacidade desta de diminuir a produção hepática de glicose e aumentar sua utilização pelos tecidos (Walker, 1995; Hegarty *et al.*, 2003). Em estados de RI as células  $\beta$  são forçadas a aumentar a produção de insulina, a fim de manter a homeostase da glicose (DeFronzo, 2009). Esta demanda aumentada leva à hiperplasia e hipertrofia celular, estresse oxidativo local e, finalmente, apoptose das células  $\beta$  e o

desenvolvimento do DMII (Unger e Orci, 2001; Defronzo, 2009). Um dos mecanismos que levam à resistência à insulina é a obesidade e estes mecanismos envolvem citocinas inflamatórias, ácidos graxos não esterificados no plasma e seus metabólitos, espécies reativas de oxigênio (EROS), hipóxia e estresse do retículo endoplasmático (Dali-Youcef *et al.*, 2013). Em 1988, Reaven (Reaven, 1997) foi o primeiro a propor a existência de uma síndrome que seria associada com a resistência à insulina e a denominou como síndrome X, hoje denominada síndrome metabólica (SM), cuja característica era a presença concomitante de resistência à insulina, hiperglicemia, hiperlipidemia e hipertensão. Anos mais tarde, DeFronzo (DeFronzo, 2009) demonstrou que a resistência à insulina precedia, e era fator determinante para o DMII e as doenças cardiovasculares. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da síndrome metabólica são a inatividade física e o consumo de dieta aterogênica (rica em gorduras saturadas, colesterol e carboidratos refinados) (Deedwania e Gupta, 2006). Estes hábitos contribuem para o desenvolvimento da obesidade visceral, resistência à insulina, dislipidemia, inflamação e estresse oxidativo (Deedwania e Gupta, 2006). A obesidade visceral é componente importante na SM já que está correlacionada com inflamação sistêmica (Schmidt *et al.*, 2015; Wensveen *et al.*, 2015). O diagnóstico da síndrome metabólica é complexo e, em 2002, o *National Cholesterol Education Program* (NCEP) propôs um conceito diagnóstico para SM; segundo o NCEP o diagnóstico da síndrome metabólica é realizado quando três ou mais dos seguintes fatores estiverem presentes: circunferência da cintura aumentada (>102 cm para homens e > 88 cm para mulheres), hipertrigliceridemia (>150 mg/dL), hipertensão, *High Density Cholesterol* (HDL) baixo <40 mg/dL para homens e < 50 dL para mulheres), hiperglicemia (glicemia entre 100 – 126mg/dL) (Ncep, 2001; Grundy *et al.*, 2005).



A presença de SM aumenta o risco de problemas cardiometabólicos em um período de 5 a 10 anos (Alberti *et al.*, 2009), com aumento no risco de desenvolvimento de patologias associadas, 5 vezes maior de DMII, 2 vezes maior de doença arterial coronariana (DAC), e 1,6 vezes de aumento da mortalidade total (Deedwania e Gupta, 2006).

### **1.3 Doenças Cardiovasculares**

As doenças cardiovasculares (DCV) estão entre as principais causas de morte no mundo (Who, 2003). Além de elevada mortalidade, geram custos altos para os serviços de saúde, sendo que nos Estados Unidos da América (EUA), o custo anual total com DCV em 2012 foi de 312,6 bilhões de dólares (Go *et al.*, 2013). No Brasil, doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de 1/3 de todos os óbitos (Brasil, 2014). Dados do Ministério da Saúde (DATASUS) (Brasil, 2015) revelaram que no ano de 2012, 22,62% (1.181.166) das mortes ocorridas foram relacionadas com DCVs. No mesmo ano, as hospitalizações por estas mesmas causas totalizaram 833.559 (7,51%) com um custo de aproximadamente R\$ 1,8 bilhões (Brasil, 2015).

Entre as DCV estão hipertensão arterial, infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca, doenças cerebrovasculares e aterosclerose. A aterosclerose é uma doença inflamatória que se manifesta de maneira progressiva e se caracteriza pelo acúmulo de lipídeos na parede de artérias como, por exemplo, as coronárias (Ross, 1999; Lusic, 2000). Entre os fatores de risco para aterosclerose estão hiperlipidemia, hábito de fumar e hipertensão (Lusic, 2000); (Rader e Daugherty, 2008). Na aterosclerose, o processo de formação da placa na parede do vaso resulta no estreitamento da luz arterial (Lusic, 2000; Rader e Daugherty, 2008). As lipoproteínas de baixa densidade (*Low-density-lipoprotein* – LDL colesterol) infiltram-se através da parede do vaso devido à disfunção endotelial presente nos estágios iniciais da

aterosclerose, ali sofrem oxidação por radicais livres tornando-se LDL-oxidadas (LDL-ox). Estas acabam atraindo monócitos/macrófagos para o local levando ao aumento da expressão de mediadores inflamatórios e aumentando ainda mais a disfunção endotelial, o que adicionalmente aumenta a infiltração de monócitos/macrófagos (Lusis, 2000; Rader e Daugherty, 2008). Os macrófagos fagocitam as LDL-ox iniciando a formação de células espumosas (*foam cells*) e atraem mais monócitos/macrófagos, os quais fagocitam mais LDL-ox formando mais *foam cells* num ciclo vicioso (Lusis, 2000; Rader e Daugherty, 2008), que, por fim, acarreta isquemia local. Durante a isquemia, a interrupção do fluxo sanguíneo leva à diminuição dos níveis de adenosina trifosfato (ATP) celular com concomitante acúmulo de lactato, tornando o pH celular diminuído e ativando proteases intracelulares (Mccord, 1985). A diminuição do pH por sua vez, leva a modificações na cinética de diversas enzimas (Mccord, 1985). Embora ocorra a queda dos níveis de ATP, a demanda é ininterrupta, conseqüentemente, o ATP vai sendo degradado até adenosina difosfato (ADP), depois adenosina monofosfato (AMP) e, finalmente, adenosina que rapidamente se difunde para o meio extracelular e é degradada em inosina e hipoxantina (Granger, 1988). Sob condições normais de oxigenação, a enzima xantina desidrogenase metaboliza a hipoxantina à xantina e depois ácido úrico sem a utilização de oxigênio e sem formar radicais livres pois o acceptor de elétrons neste caso é o NAD (nicotanamida adenina dinucleotídeo) (Parks e Granger, 1986; Granger, 1988). Porém sob condições de hipóxia, a atividade da enzima xantina desidrogenase passa a ser de oxidase (Parks e Granger, 1986). A atividade de oxidase produz radicais livres durante a reação de oxidação da hipoxantina em xantina que ocorre somente na presença de oxigênio (Parks e Granger, 1986); logo, durante a isquemia ocorre acúmulo de hipoxantina e xantina oxidase no tecido (Parks e Granger, 1986). Na reperfusão, toda a hipoxantina acumulada é oxidada em xantina com a

utilização de oxigênio, formando espécies reativas de oxigênio (EROs) no processo pois, os elétrons não são transferidos para o NAD, mas sim para o oxigênio que depois é convertido em superóxido, iniciando a cascata de formação de espécies reativas de oxigênio (Parks e Granger, 1986). A expressão '*Espécies Reativas de Oxigênio*' inclui radicais de oxigênio quanto outros compostos não radicais que são agentes oxidantes que podem ser facilmente convertidos em radicais, como por exemplo, radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), hidroxiperoxil ( $HO_2^{\bullet-}$ ), peroxil ( $RO_2^{\bullet}$ ), alcoxil ( $RO^{\bullet}$ ) entre outros (Halliwell e Gutteridge, 2007; Halliwell, 2011). Fisiologicamente EROs são sinalizadores celulares e mediadores de cascatas de sinalização celular em células aeróbias (Hancock, Desikan e Neill, 2001; Droge, 2002). Mas está bem descrito na literatura que a produção excessiva de EROs leva a um desbalanço entre o sistema pró-oxidante e antioxidante, levando ao estresse oxidativo (EO). Estresse Oxidativo pode levar à dano celular, incluindo dano ao ácido desoxirribonucléico (DNA), necrose e apoptose. Em situações de dano ao DNA a enzima poli-ADP(ribose)-polimerase é ativada (Burkle e Virag, 2013). Necrose e apoptose são coordenadas por proteínas como Bax e Bcl2, além de algumas caspases (Biala e Kirshenbaum, 2014; Correia *et al.*, 2015; Doerflinger, Glab e Puthalakath, 2015; Juraver-Geslin e Durand, 2015). As células possuem sistemas de defesa contra EROs, são sistemas de destoxificação que costumam ser eficientes na proteção celular contra EROs (Halliwell e Gutteridge, 2007; Halliwell, 2011). A enzima superóxido dismutase (SOD) é a primeira linha de defesa contra a formação de espécies reativas de oxigênio, e encontra-se sob duas isoformas, uma mitocondrial, cujo cofator é o mineral manganês e outra citosólica, cujos cofatores podem ser cobre ou zinco. Mn-SOD (mitocondrial) e Cu/Zn-SOD (citosólica) reduzem o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A catalase (CAT) que atua na dismutação de  $H_2O_2$  em oxigênio e água. Ainda, o tripeptídeo  $\gamma$ -glutamil-cisteínil-

glicina (GSH) que pode estar na forma reduzida (GSH) ou na forma oxidada (GSSG). A interconversão da glutatona nas suas formas reduzida e oxidada é dependente da presença de glutatona peroxidase (GPx) e Glutatona redutase (GR) que trabalham em conjunto e cujo resultado final é a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 2007; Halliwell, 2011).

Muitos estudos que avaliam os efeitos deletérios de situações de hipóxia/reoxigenação têm sido realizados em linhagem celular de cardiomiócitos (Chen *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2015; Nehra *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015). Esta metodologia tem sido considerada adequada quando a finalidade é verificar vias e mecanismos envolvidos, bem como a formação de espécies reativas de oxigênio e os consequentes danos celulares resultantes do desbalanço oxidativo. É bem estabelecido que o processo de formação de espécies reativas de oxigênio aumenta ainda mais o status inflamatório local piorando o quadro do paciente cardiopata (Kim *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Virzi *et al.*, 2015).

Concomitante com as alterações morfológicas que ocorrem durante o remodelamento cardíaco pós-isquemia, ocorrem alterações bioquímicas e metabólicas, com diminuição na fosforilação oxidativa e na glicólise celular e consequente aumento dos níveis de triglicerídeos intramusculares (Ashrafian, Frenneaux e Opie, 2007). Após o infarto, ocorrem alterações no metabolismo cardíaco, cujas células diminuem a capacidade de oxidar ácidos graxos (Afanas'ev *et al.*, 2013). O coração consome mais energia do que qualquer outro órgão e para manter toda esta demanda pode utilizar como substratos desde ácidos graxos e glicose até aminoácidos, lactato e corpos cetônicos (Abozguia *et al.*, 2009). Como um atleta aeróbico, o coração oxida preferencialmente ácidos graxos para a síntese de ATP (Taegtmeyer, McNulty e Young, 2002). De todo o ATP produzido por meio da oxidação de ácidos graxos, 95% é

produzido via  $\beta$ -oxidação mitocondrial com um custo 12% maior de oxigênio por unidade de ATP do que com a utilização de glicose, razão pela qual, durante o processo isquêmico ocorre alteração na utilização de substratos, aumentando a captação e utilização de glicose e diminuindo a utilização de ácidos graxos. Isso pode resultar num consumo de oxigênio até 40% menor (Stanley, Recchia e Lopaschuk, 2005).

Na insuficiência cardíaca congestiva, mesmo que não ocorra interrupção de fluxo, há um aumento na captação e utilização de glicose e diminuição na oxidação de ácidos graxos pelos cardiomiócitos, é o processo denominado “*reversão para um fenótipo metabólico fetal*” (Luptak *et al.*, 2007). No músculo cardíaco fetal, a oxidação de ácidos graxos é baixa e logo após o nascimento ocorre troca no metabolismo cardíaco com aumento na oxidação de ácidos graxos e hiperregulação de receptores nucleares que mediam esta troca, como por exemplo, o receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) (Madrado e Kelly, 2008). A ativação da via glicolítica anaeróbia finalmente induz a expressão do Fator Induzível por Hipóxia- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) estimulando a hipertrofia (Opie, 2004).

Uma menor oferta de ATP ao cardiomiócito leva a efeitos hiperadrenérgicos compensatórios que acabam aumentando a liberação de ácidos graxos livres (AGLs) no plasma (AGL) (Opie, 2004). Quando ocorre liberação excessiva de ácidos graxos livres, sem a concomitante utilização pelos tecidos, ocorre acúmulo de metabólitos tóxicos em tecidos não-adiposos como músculo (esquelético e cardíaco), células  $\beta$  pancreáticas e fígado (Unger e Orci, 2001). Isso finalmente pode induzir a inflamação crônica com infiltração e ativação de macrófagos, acarretando disfunção e morte celular e resistência à insulina em um processo denominado lipotoxicidade (Prieur, Roszer e Ricote, 2010). A oxidação de ácidos graxos é um processo que ocorre, exclusivamente, em nível mitocondrial via fosforilação oxidativa e consumo de oxigênio (Smith, Marks e

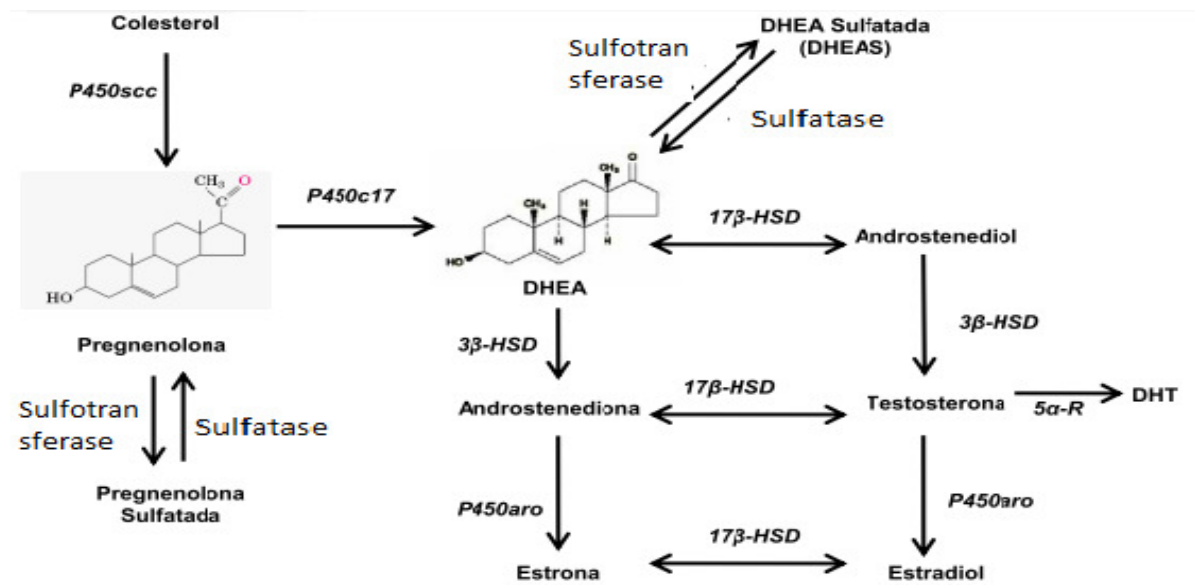
Lieberman, 2007). A resistência à insulina associada com estados de obesidade diminui o número e a atividade de mitocôndrias (Sivitz e Yorek, 2010) e a redução da atividade mitocondrial acaba reduzindo a eficiência metabólica do músculo, contribuindo mais ainda para a hipertrofia (Ashrafian, Frenneaux e Opie, 2007).

A elevada incidência e morbidade geradas pelas doenças cardiovasculares justificam o grande esforço de investigação buscando esclarecer suas causas e consequências, sempre com o objetivo de propor possíveis alternativas de tratamento e melhora da qualidade de vida dos pacientes.

#### **1.4 Desidroepiandrosterona**

A desidroepiandrosterona (DHEA) e seu sulfato (DHEAS) são hormônios esteroides sintetizados no córtex da adrenal, nas gônadas (testículos e ovários) e na placenta a partir do precursor colesterol. Esta síntese requer reações enzimáticas em sequência e inicia-se com a conversão do colesterol em pregnenolona. A formação de pregnenolona é a primeira reação da via e é catalisada pela enzima P450<sub>scc</sub> (*side chain cleavage*), localizada na superfície interna da membrana mitocondrial. Esta enzima remove a cadeia lateral de 6 carbonos do colesterol. A etapa limitante deste processo é o transporte do colesterol através da membrana mitocondrial, que é realizada pela proteína de regulação estereoidogênica aguda (StAR - *Steroidogenic acute regulatory protein*) (Dong e Zheng, 2012). A pregnenolona pode dar origem à progesterona por ação da enzima 3 $\beta$  hidroxisteroide desidrogenase 1 ou 2 (3 $\beta$ HSD1/ 3 $\beta$ HSD2) ou pode seguir a via que origina a desidroepiandrosterona (DHEA) (Baulieu, 1996; 1998; Baulieu *et al.*, 2000). Neste caso, deve sofrer  $\alpha$ -hidroxilação no carbono 17, dando origem à 17-hidroxipregnenolona, numa reação catalisada pela enzima P450<sub>c17</sub>. O passo seguinte da via é realizado pela mesma enzima, porém agora com atividade de liase entre os

carbonos 17-20, originando desidroepiandrosterona (Baulieu, 1996; 1998; Baulieu *et al.*, 2000). Portanto, a enzima P450c17 tem tanto a capacidade de hidroxilase quanto de liase, e a sua atividade de liase é determinante para a produção da DHEA (Figura 3). A maior parte da DHEA é produzida e secretada pelo córtex adrenal, cerca de 75 a 90% da DHEA encontrada no organismo humano. O percentual restante é produzido pelos testículos ou ovários (Webb *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Síntese e metabolização de DHEA. Adaptado de: (Mellon, Griffin e Compagnone, 2001)

Em humanos, a DHEA e sua forma sulfatada (DHEAS) são os esteroides mais abundantes produzidos pela adrenal. A concentração plasmática de DHEA é cerca de 20 vezes maior que a de qualquer outro hormônio esteroide circulante (Nakamura *et al.*, 2004). Tem sido argumentado que as informações sobre o papel fisiológico da DHEA são, principalmente, derivadas de experimentos em modelos animais como coelhos e ratos, muitos dos quais, naturalmente, produzem pequena quantidade de DHEA (Traish, Kang, *et al.*, 2011), porém, muitos estudos clínicos e epidemiológicos utilizando DHEA já foram também realizados, os quais serão citados no decorrer do texto.

Inicialmente, acreditava-se que a DHEA não exercia efeito hormonal direto, apenas servia como precursora para esteroides mais potentes, como por exemplo, testosterona (Ebeling e Koivisto, 1994).

Em humanos, os níveis de DHEA no sangue apresentam diferenças entre as fases de desenvolvimento, durante a vida fetal eles são elevados em ambos os sexos, e reduzem ao nascimento. Permanecem baixos até o início da puberdade e então se elevam, atingindo um pico por volta do 20 anos e declinam rápida e marcadamente após os 25 anos de idade (Orentreich *et al.*, 1984).

A secreção de DHEA pela adrenal é estimulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e segue um ritmo diurno semelhante ao do cortisol (Traish, Kang, *et al.*, 2011). A DHEAS, ao contrário, não mostra variação diurna (Allolio e Arlt, 2002). A DHEAS circulante serve como ‘reserva’ de DHEA (Bird, Masters e Clark, 1984; Komesaroff, 2008). Enquanto a meia vida da DHEA no sangue é de 1-3 horas a DHEAS possui meia-vida de 10 a 20 horas (Webb *et al.*, 2006).

O aspecto mais controverso da ação da DHEA na fisiologia humana é que nenhum receptor nuclear específico foi ainda identificado ou caracterizado para a DHEA (Traish, Kang, *et al.*, 2011). Além disso, o mecanismo de ação da DHEA também não está completamente esclarecido (Allolio e Arlt, 2002; Traish, Kang, *et al.*, 2011). Postula-se que possua ações diretas e indiretas. As ações indiretas da DHEA são mediadas por bioconversão a outros androgênios ou estrogênios, seguindo, desta forma o caminho de ação destes (Allolio e Arlt, 2002). Estas respostas pela via indireta podem levar horas para ocorrerem. No entanto, desde os anos 60 surgiram evidências de ação mais rápida para os esteroides, entre eles a DHEA (Baulieu *et al.*, 2000; Dubrovsky, 2005). Liu e Dillon (Liu e Dillon, 2002; Liu *et al.*, 2008) utilizando DHEA radioativa [<sup>3</sup>H]-DHEA identificaram e caracterizaram um receptor proteico ligado à membrana que



interage especificamente e com alta afinidade com a DHEA em células endoteliais, de coração, fígado e rim. Simoncini *et al.* (Simoncini *et al.*, 2003) e Liu e Dillon (Liu e Dillon, 2004) apontaram mais evidências de que as células endoteliais expostas a diferentes concentrações de DHEA produziam aumento nos níveis de nitrato e ativação de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) de maneira dose-dependente. Estudos que mostram a ação direta da DHEA sugerem que os receptores para a DHEA na membrana plasmática são ligados à proteína G (Williams *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004) e, ao que parece, envolve regulação das vias das proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) cinases e do AMP cíclico (cAMP) (Simoncini *et al.*, 2003).

A DHEA possui ações centrais e periféricas. É considerado um neuroesteróide, termo primeiro sugerido por Baulieu (Baulieu, 1998), referindo-se aos esteroides produzidos no sistema nervoso central (SNC), mesmo após a retirada das gônadas e glândulas adrenais de ratos. Desta forma, a DHEA pode ser sintetizada ‘de novo’, a partir do precursor colesterol no SNC (Corpechot *et al.*, 1981; Baulieu, 1996). Estudos mostram que no SNC a DHEA possui vários efeitos, entre eles, melhora da memória e aprendizagem, efeito neurotrófico e neuroprotetor e reduz o risco de ocorrência dos distúrbios degenerativos relacionados à idade, sendo algumas vezes referida como o hormônio da juventude (Baulieu *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2010; Traish, Kang, *et al.*, 2011).

Além das ações no SNC, a DHEA possui diversos efeitos periféricos, inclusive efeitos sobre o metabolismo. Ratos magros e obesos, tratados com DHEA na dieta (6g por kg de ração) durante seis semanas, tiveram resultados de redução no peso corporal, na deposição de gordura e na atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase e enzima málica, mostrando um efeito anti-obesidade (Cleary e Zisk, 1986; Tagliaferro *et al.*, 1986; Mohan *et al.*, 1990). Ratos Wistar fêmeas alimentadas com dieta hipelipídica

por 18 meses e suplementação com DHEA nos últimos três meses (5g por kg de dieta), tiveram aumento na expressão de adiponectina, alteração na composição dos ácidos graxos no tecido adiposo e melhora no perfil lipídico, e efeito protetor cardiovascular (Cleary e Zisk, 1986). Além disso, teve efeito anabólico no músculo esquelético e na composição corporal de ratos alimentados com dieta hiperlipídica (De Heredia *et al.*, 2007).

Em ratos não obesos, a DHEA (10mg/kg peso) aumentou a sensibilidade à insulina por aumentar o nível de fosforilação da fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K), tanto em fígado quanto em músculo (Campbell *et al.*, 2004). Em experimento realizado com linhagem celular 3T3-L1 a DHEA aumentou a captação de glicose de maneira dose-dependente (Perrini *et al.*, 2004). A administração de DHEA em ratos (10 mg/kg peso) promoveu aumento no conteúdo de proteína cinase B (Akt/PKB) fosforilada, no sistema nervoso central e no fígado (Janner Dda *et al.*, 2010; Jacob *et al.*, 2011). Akt/PKB, uma serina-treonina cinase é uma proteína citosólica de 57 kDa que é envolvida no sistema de sinalização intracelular ativado pela insulina, participando da regulação do metabolismo da glicose, síntese de proteínas, crescimento, proliferação e sobrevivência celular (Chin, Majdzadeh e D'mello, 2005). O efeito da DHEA em aumentar a quantidade de Akt/PKB fosforilada pode indicar melhora no metabolismo da glicose, o que pode ser benéfico para estados de resistência à insulina e síndrome metabólica (Jacob *et al.*, 2010; Janner Dda *et al.*, 2010). Além dos estudos mostrando seu efeito na Akt e seus alvos *downstream*, outros estudos relacionam a DHEA com o receptor ativado por proliferador de peroxissoma- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) (Ryu *et al.*, 2003). PPAR $\alpha$  é um fator de transcrição ativado por ligante que se liga a um elemento específico no DNA conhecido como elemento de resposta ao PPAR (PPARE) em genes-alvo (Kelly *et al.*, 1998; Madrazo e Kelly, 2008). O PPAR $\alpha$  é ativador transcricional de vários genes que

codificam enzimas envolvidas na captação e na via de oxidação de ácidos graxos; sua função principal é regular a homeostase energética (Schoonjans, Staels e Auwerx, 1996). O tratamento de animais com dose elevada de DHEA (300 mg/kg peso) mostrou a capacidade do hormônio de ativar a proliferação de peroxissomas (Yamada *et al.*, 1991). A DHEA também aumenta a secreção de interleucina-2 em células T humanas *in vitro* e a atividade de células natural *killer*, além de inibir a liberação de interleucina-6 por células mononucleadas, indicando efeito antiinflamatório (Dillon, 2005).

Muitos ensaios clínicos com humanos foram realizados utilizando tratamento com DHEA. Weiss e colaboradores administraram 50 mg de DHEA por kg peso, para homens e mulheres, com idades entre 65 e 75 anos durante 12 meses, e observaram que a administração diária com DHEA reduziu a circunferência abdominal, aumentou a sensibilidade à insulina e diminuiu os níveis de citocinas circulantes (Weiss *et al.*, 2011). Villareal e Holloszy (2004), avaliaram o efeito da reposição diária com 50 mg de DHEA durante 6 meses, em humanos idosos, sobre a deposição de gordura abdominal e parâmetros de resistência à insulina. Houve diminuição na área de gordura visceral, -13 cm<sup>2</sup> no grupo tratado com DHEA versus +3 cm<sup>2</sup> no placebo e aumento no índice de sensibilidade à insulina (Villareal e Holloszy, 2004).

Diversos estudos têm sido realizados a fim de verificar se existe alguma relação entre a DHEA e doenças cardiovasculares (Jones e Saad, 2009; Traish *et al.*, 2009; Traish e Kypreos, 2011; Traish, Miner, *et al.*, 2011). Um estudo avaliou 1.000 homens durante 9 anos e verificou que baixos níveis de DHEA eram preditores de doença isquêmica cardíaca independente do perfil lipídico (Feldman *et al.*, 2001). Em pacientes com insuficiência adrenal, a restauração dos níveis plasmáticos de DHEA reduziu o colesterol total e melhorou a sensibilidade à insulina, além de prevenir a perda de densidade mineral óssea (Rutkowski *et al.*, 2014).

A DHEA parece estimular a proliferação endotelial e reduzir a adesão de monócitos ao endotélio, além de diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio, fatores estes, envolvidos na proteção cardiovascular (Kawano *et al.*, 2003; Simoncini *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008). O aumento do LDL por si só não é fator de risco para aterosclerose, mas a presença de LDL oxidada sim, desta forma, a presença de agentes antioxidantes poderia promover proteção cardiovascular (Ross, 1995). Antioxidantes são substâncias que reagem com radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo (Droge, 2002). Já está muito bem descrito na literatura, a utilização de agentes antioxidantes como vitamina C (Ames, Shigenaga e Hagen, 1993), vitamina E (Do *et al.*, 2015), flavonoides como quercetina, miricetina, esperidina, rutina, antocianinas, catequinas (Murai *et al.*, 2015), entre outros e seu efeito antioxidante e de proteção contra radicais livres. Esteroides também têm sido descritos como inibidores da lipoperoxidação em tecidos e células (Sugioka, Shimosegawa e Nakano, 1987; Riant *et al.*, 2009). A DHEA usualmente não é citada como sendo um agente antioxidante, porém, alguns estudos têm sugerido um potencial efeito antioxidante da DHEA (Schauer *et al.*, 1990; Rom e Harkin, 1991; Aragno *et al.*, 2009). Em ratos, a administração aguda de uma única dose de DHEA (100, 50 e 10mg/kg peso) promoveu frações de LDL mais resistentes à peroxidação lipídica induzida por cobre (Bocuzzi *et al.*, 1997). Em estudo *in vitro*, a DHEA retardou a oxidação de LDL (Lopez-Marure *et al.*, 2007). Acredita-se que este efeito de proteção do LDL da oxidação pode ser relevante na atividade antiaterogênica da DHEA.

### **1.5 Efeito da DHEA sobre o metabolismo de machos e fêmeas**

O metabolismo celular é complexo e apresenta diferenças entre homens e mulheres, embora, na maioria das vezes, os estudos experimentais sejam realizados

apenas em machos. Fuller and Insel (2014) expuseram este fato e questionam se estamos fazendo correto. Quando testamos hipóteses sobre metabolismo, na maioria das vezes utilizamos diversidade de tratamento e de experimentos, mas, o fazemos somente em machos. A *National Institutes of Health* tem considerado a proposta de exigir, em todos os ensaios clínicos e experimentais, a representação de ambos os sexos, tanto em experimentos que usam células quanto os que usam animais (Clayton e Collins, 2014).

Tem sido amplamente estudado o efeito dos hormônios sexuais no metabolismo celular e tecidual (Toth *et al.*, 2000a; b; Marieb e Hoehn, 2009; Barrett *et al.*, 2014). O estrogênio tem um papel importante na regulação do metabolismo da gordura: baixos níveis desse hormônio em mulheres menopausadas foram associados com perda de gordura subcutânea. Além disto, em fêmeas de animais transsexuais (macho-fêmea), que receberam tratamento com estrogênio mostraram aumento na gordura subcutânea (Elbers *et al.*, 1999; Toth *et al.*, 2000a). A testosterona, por sua vez, é relacionada com aumento na massa e na força muscular (Handelsman, 2000; Kelly e Jones, 2015).

A influência do cromossomo sexual no metabolismo celular é assunto recente. Em 2013, Link *et al.* (Link *et al.*, 2013), realizaram um estudo a fim de verificar o efeito dos cromossomos sexuais (X e Y) em parâmetros metabólicos e observaram que os cromossomos controlam adiposidade, comportamento alimentar, presença de gordura no fígado e homeostase da glicose e estes efeitos foram independentes dos hormônios sexuais gonadais. Além disso, o controle da homeostase da energia no sistema nervoso central (SNC) tanto em indivíduos saudáveis quanto em patologias é diferente entre machos e fêmeas (Shi *et al.*, 2008; Lovejoy e Sainsbury, 2009; Shi e Clegg, 2009; Arnetz, Ekberg e Alvarsson, 2014; Henderson, 2014). Mulheres possuem mais gordura corporal, tecido adiposo subcutâneo abdominal e gluteofemoral e menos tecido adiposo branco visceral do que homens e estas diferenças são apenas em parte devido à presença

dos hormônios sexuais (Link *et al.*, 2013). A superfície corporal e a massa livre de gordura são fatores determinantes do gasto energético e, do valor calórico a ser ingerido, logo, mulheres têm gasto energético menor do que homens (Tooze *et al.*, 2007). Isto, por si só, indica claramente que existe diferença no metabolismo entre machos e fêmeas.

O gênero é responsável por importantes diferenças na incidência e prevalência de várias doenças relacionadas com a idade (Franceschi *et al.*, 2000). Dados de levantamentos demográficos mostram que existem diferenças nas taxas de mortalidade entre homens e mulheres na terceira idade (Franceschi *et al.*, 2000). Homens morrem mais cedo, mas quando chegam à idade centenária, se comparados com mulheres centenárias eles são mais saudáveis (Franceschi *et al.*, 2000). Homens e mulheres também respondem de forma diferente a estados patológicos, por exemplo, na presença de diabetes, o risco de desenvolver doença cardiovascular é maior em mulheres do que em homens (Anagnostis *et al.*, 2014).

No plasma a DHEAS é a forma predominante, enzimas sulfatases teciduais transformam esta DHEAS em DHEA de forma eficaz (Orentreich *et al.*, 1984). Acredita-se que isto ocorra devido à maior estabilidade da forma sulfatada (Goncharov e Katsia, 2013).

Os níveis de DHEAS apresentam diferenças entre as idades, durante a vida fetal estão elevados, caem ao nascimento e voltam a aumentar durante a adolescência. O pico de concentração se dá na idade média de 20-24 anos em homens (3470 ng/mL) e 15-19 anos em mulheres (2470 ng/mL) e permanecem elevados até aproximadamente 25 anos, após este período caem progressivamente em ambos os sexos. No envelhecimento estima-se que seus níveis sejam 80% menores do que na adolescência, por este motivo,

alguns autores tem se referido à DHEA como hormônio da juventude (Orentreich *et al.*, 1984).

O envelhecimento é relacionado com o surgimento de doenças, principalmente, cardiovasculares (Franceschi *et al.*, 2000), assim, diversos estudos têm sido realizados a fim de verificar se existe relação entre a DHEA, cujos níveis encontram-se baixos no envelhecimento, e doenças cardiovasculares. Pesquisa epidemiológica realizada com 1709 homens, com idades entre 40-70 anos, mostrou que existe uma relação inversa entre a concentração de DHEAS (DHEA e seu sulfato, DHEAS) no plasma e doenças cardiovasculares (Feldman *et al.*, 1998).

Estudo realizado por Barret-Connor e colaboradores (Barrett-Connor e Goodman-Gruen, 1995b; a), com homens e mulheres, encontrou diferenças entre homens e mulheres com relação à DHEA e o risco cardiovascular. Em homens, foi encontrada uma relação inversa entre concentração plasmática de DHEA e risco cardiovascular, já em mulheres a relação foi direta, ou seja, maiores níveis plasmáticos de DHEA eram associados com maior risco cardiovascular.

Porsova-Dutoit e colaboradores (Porsova-Dutoit, Sulcova e Starka, 2000) ao fazerem uma revisão crítica sobre o papel protetor da DHEA/DHEAS sobre a aterosclerose e doença arterial coronariana não encontraram evidências de proteção em mulheres e os homens com baixos níveis plasmáticos de DHEA/DHEAS podem ser considerados como em situação de risco para o desenvolvimento de evento cardiovascular fatal.

Neste contexto, é importante considerar o efeito da administração de DHEA sobre aspectos específicos do metabolismo da glicose e lipídeos uma vez que o rompimento da homeostasia com relação a estes parâmetros leva a prejuízos metabólicos como obesidade e suas comorbidades, especificamente resistência à

insulina, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares. Muitos estudos têm sido realizados utilizando o tratamento com DHEA, tanto em modelos de cultura celular quanto em modelos animais e também em humanos. Apesar disso, os mecanismos de ação deste hormônio ainda não estão plenamente entendidos quando se investiga sua atuação sobre o metabolismo intermediário e conseqüentemente sobre o desenvolvimento de doenças associadas a distúrbios metabólicos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos da DHEA sobre o metabolismo de ratos, machos e fêmeas submetidos ou não, ao tratamento com o hormônio, bem como seu efeito em ratos machos submetidos, concomitantemente ao tratamento com DHEA e dieta hipercalórica e verificar respostas celulares de cardiomiócitos tratados com DHEA e submetidos a uma condição de hipóxia seguida de reperfusão.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- a) Estabelecer modelo experimental de indução de obesidade.
- b) Estabelecer protocolo de tratamento com DHEA determinando o tempo e a dose efetiva para o tratamento.
- c) Comparar o efeito da administração de DHEA em parâmetros metabólicos de ratos machos e fêmeas.
- d) Avaliar o efeito da dieta hipercalórica associada ao tratamento com DHEA sobre parâmetros metabólicos de ratos machos.



- e) Avaliar o papel da DHEA sobre as vias de sobrevivência celular e estresse oxidativo em modelo de cardiomiócitos *in vitro* submetidos à condição de isquemia e reperfusão.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Local de realização dos experimentos**

Os experimentos *in vivo* e *ex vivo* foram realizados no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) e no Laboratório de Interação Neuro-Humoral (LINH), ambos do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os experimentos *in vitro*, com cultura de cardiomiócitos, foram realizados no Laboratório da Dra. Neelam Khaper na Universidade de Lakehead, Ontário, Canadá.

#### **3.2 Experimentos *in vivo* e *ex vivo***

##### **3.2.1 Animais**

Ratos machos e fêmeas com 60 dias de idade, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS, foram colocados em caixas (cinco animais por caixa) e mantidos em condições padrão de biotério (temperatura controlada 21°C, num ciclo claro/escuro de 12 h). Foram tomadas todas as precauções a fim de reduzir o número de animais utilizados e de minimizar seu sofrimento. Todos os procedimentos realizados estavam de acordo com os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório Animal (COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da UFRGS (24122). Os animais foram alimentados com dieta normocalórica padrão (2,90 kcal/g, 63% de carboidratos, 25% de proteína e 12% de lipídeos) ou dieta hipercalórica quando indicado.

## **3.2.2 Experimento 1: Ratos machos e fêmeas tratados com diferentes doses de DHEA**

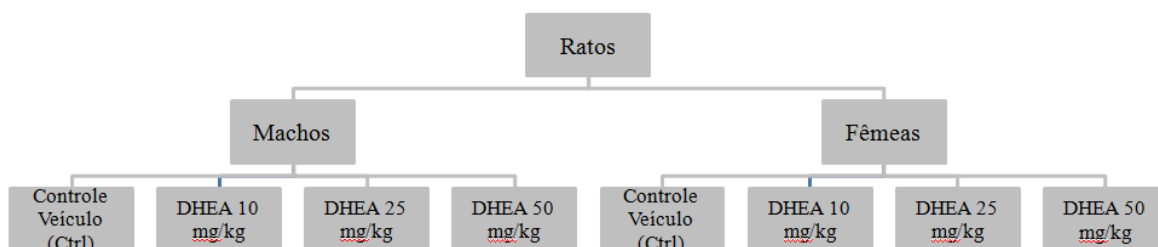
### **3.2.2.1 Desenho experimental**

Em humanos as doses de DHEA comumente administradas são 50mg/kg (Villareal e Holloszy, 2004; Weiss *et al.*, 2011), desta forma, optou-se por utilizar neste estudo, 3 doses, uma dose menor (10 mg/kg), uma dose intermediária (25mg/kg) e uma dose maior, semelhante à utilizada em estudos clínicos com humanos (50 mg/kg). Ratos Wistar albinos, machos e fêmeas com 60 dias, foram divididos em grupos, conforme representado na Figura 4. De cada sexo, foram formados quatro grupos: a) grupo controle, que recebeu apenas veículo (Veículo - Ctrl), b) grupo com DHEA na dose de 10 mg/kg (DHEA10), c) grupo com DHEA na dose de 25 mg/kg (DHEA25) e d) grupo com DHEA na dose de 50 mg/kg (DHEA50). Para a confecção dos *pellets* utilizou-se tubos de silicone Medicone® 2x3mm. A implantação destes bem como o procedimento cirúrgico nas fêmeas foi realizada com os animais sob anestesia (xilazina 5 mg/kg e cetamina 100 mg/kg) administradas por via intraperitoneal.

Todas as fêmeas utilizadas no experimento foram ovariectomizadas cirurgicamente. Os machos foram anestesiados apenas para a colocação dos *pellets* e as fêmeas foram anestesiadas para o procedimento cirúrgico de ovariectomia que ocorreu no mesmo momento da colocação dos *pellets*.

Os *pellets* eram implantados subcutaneamente na região dorsal superior dos animais. A dose foi calculada para 30 dias de tratamento e, após este período os animais foram mortos por decapitação, as estruturas foram dissecadas e os tecidos, fígado, tecido adiposo e músculo sóleo foram processados para as diferentes técnicas experimentais. Ainda, tecido adiposo retroperitoneal, tecido adiposo marrom e fígado

foram pesados para obtenção do peso total do tecido. O sangue troncular foi coletado, centrifugado e o soro armazenado para dosagens séricas posteriores.



**Figura 4.** Grupos experimentais do primeiro experimento

### 3.2.2.2 Tratamento com DHEA

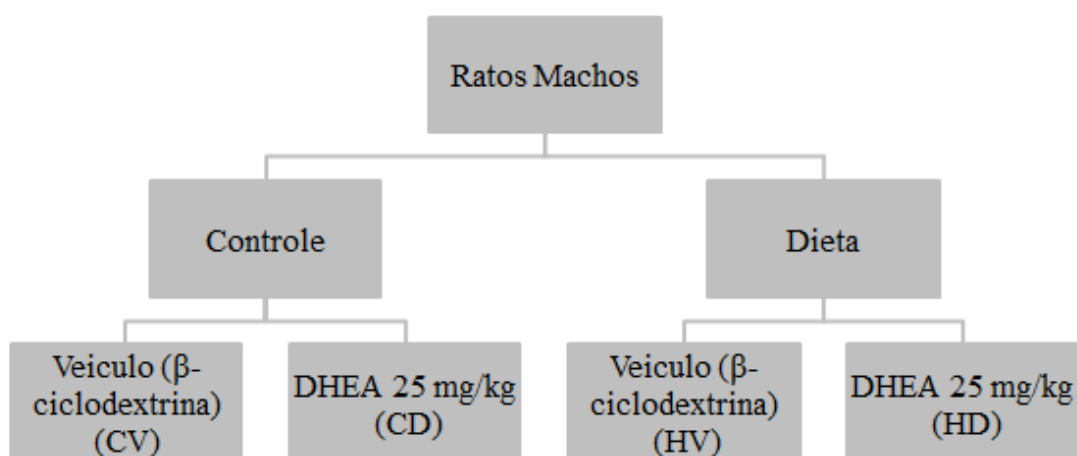
A DHEA (desidroepiandrosterona; Calbiochem®) foi dissolvida em  $\beta$ -ciclodextrina (50% p:v) e administrada subcutaneamente por meio de *pellets* de silicone, contendo as doses de 10, 25 ou 50 mg/kg, diluídos em 20uL de  $\beta$ -ciclodextrina. O cálculo foi realizado para a manutenção da dose (10, 25 ou 50mg/kg) durante 4 semanas. Foi realizado um estudo piloto (5 animais) onde administrou-se uma dose única de DHEA e verificou-se a concentração semanal do hormônio durante 30 dias de seguimento (verificação do tempo de liberação do hormônio), onde observou-se uma manutenção da concentração de DHEA ao longo deste período. O grupo sem DHEA recebeu *pellet* com  $\beta$ -ciclodextrina (veículo). Os *pellets* foram mantidos durante 30 dias.

### 3.2.3 Experimento 2: ratos machos tratados com DHEA e dieta hipercalórica

#### 3.2.3.1 Desenho experimental e tratamento

Para este experimento foram utilizados ratos machos adultos, com 60 dias no início do experimento. Devido ao grande número de animais necessários para a realização de todas as técnicas experimentais, optou-se por utilizar, neste experimento,

apenas ratos machos e com uma única dose de DHEA. A escolha da dose ocorreu a partir dos resultados preliminares encontrados nos experimentos com machos e fêmeas ovariectomizadas e também por esta dose tratar-se de uma dose intermediária. Foram formados quatro grupos (Figura 5): a) grupo que recebeu a dieta padrão normocalórica e sem DHEA (apenas veículo), denominado grupo controle veículo (CV); b) grupo que recebeu dieta padrão e DHEA, denominado grupo controle DHEA (CD); c) grupo com dieta hipercalórica sem DHEA (apenas veículo), denominado grupo dieta veículo (HV) e d) grupo que recebeu dieta hipercalórica e DHEA, denominado grupo dieta DHEA (HD). O período experimental foi de 23 semanas de dieta. Nas últimas 8 semanas, os animais receberam tratamento com DHEA (Figura 6). A DHEA foi administrada subcutaneamente por meio de *pellets* na dose de 25 mg/kg diluídos em 20 $\mu$ L de  $\beta$ -ciclodextrina, o cálculo foi realizado para a manutenção de 25mg/kg durante 4 semanas. Os *pellets* foram substituídos no início da quinta semana (30 dias), tendo o tratamento duração total de 60 dias.



**Figura 5.** Grupos experimentais do segundo experimento

### 3.2.3.2 Dieta

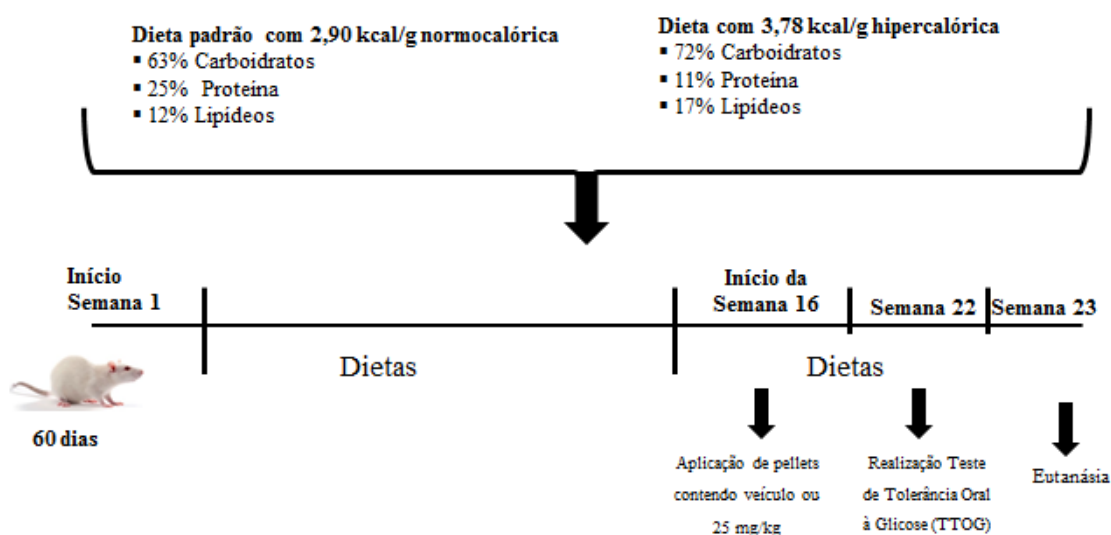
Para este protocolo experimental foram utilizadas duas dietas (Figura 6; Tabela 1 e Tabela 2). Uma dieta normocalórica padrão de biotério, industrializada - Nuvilab® com 2,90 kcal/g (63% de carboidratos, 25% de proteína e 12% de gordura) e uma dieta hipercalórica formulada a partir de um protocolo realizado em nosso laboratório com 3,78 kcal/g (72% carboidrato, 11% de proteína e 17% de lipídeos). A dieta hipercalórica foi baseada na composição da dieta ocidental, que é rica em carboidratos refinados, com menor oferta protéica e pobre em fibras e nutrientes essenciais (Deer *et al.*, 2015). Todos os animais tinham livre acesso à comida e água durante todo o período experimental. A ingestão calórica foi medida diariamente e os animais foram pesados semanalmente.

**Tabela 1.** Composição das dietas utilizadas no protocolo experimental

Nutrientes	Normocalórica Nuvilab®		hipercalórica artesanal	
	g	Kcal %	g	Kcal %
Proteína	18,0	25,0	16,5	17,5
Carboidrato	45,5	63,0	67,75	71,8
Lipídeo	4,0	12,0	4,5	10,7
Kcal/g		<b>2,9</b>		<b>3,78</b>

**Tabela 2.** Ingredientes utilizados no preparo da dieta hipercalórica artesanal

Composição Dieta Artesanal (g/100g)	
Ração Nuvilab®	50,0
Amido de milho	25,0
Açúcar	20,0
Caseína	7,5
Banha de porco	2,5



**Figura 6.** Desenho experimental do segundo experiment

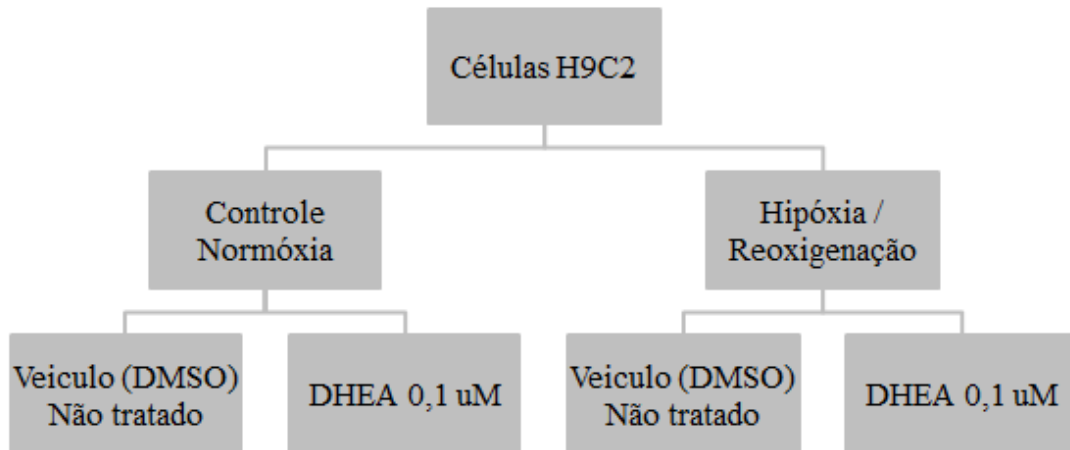
### 3.3 Experimento 3: Cultura de cardiomiócitos

#### 3.3.1 Cultura de cardiomiócitos

Para os experimentos de cultura celular, utilizou-se a linhagem celular H9C2 derivada de coração embrionário de ratos (ventriculo) provenientes da American Type

Culture Collection (Manassas, VA, EUA). O esquema de grupos e tratamentos está representado na Figura 7. As células foram cultivadas em frascos de 25 cm<sup>3</sup> em meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Hyclone, Pittsburgh, PA, USA), com 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina – In vitrogen, Carlsbad, CA, USA) a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub> e 100% de umidade com a finalidade de proliferação e aumento do número de células. As células foram semeadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> e mantidas a 37 °C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem 80% de confluência (aproximadamente 24h). Quando a confluência foi atingida o meio foi substituído por DMEM sem SFB e sem antibiótico (TDMEM), sendo formados quatro grupos: 1) grupo controle - células incubadas a 37 °C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, sem hormônio e sem serem submetidas à hipóxia/reoxigenação; 2) grupo controle com DHEA - células submetidas às condições do grupo controle mais DHEA na concentração de 0,1 µM; 3) grupo hipóxia/reoxigenação, com as células submetidas a um período de 24 horas de hipóxia (1% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) a 37 °C, seguido de um período de 2 horas de reoxigenação a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, e 4) grupo hipóxia/reoxigenação - submetido às mesmas condições do grupo hipóxia/reoxigenação mais 0,1 µM de DHEA.

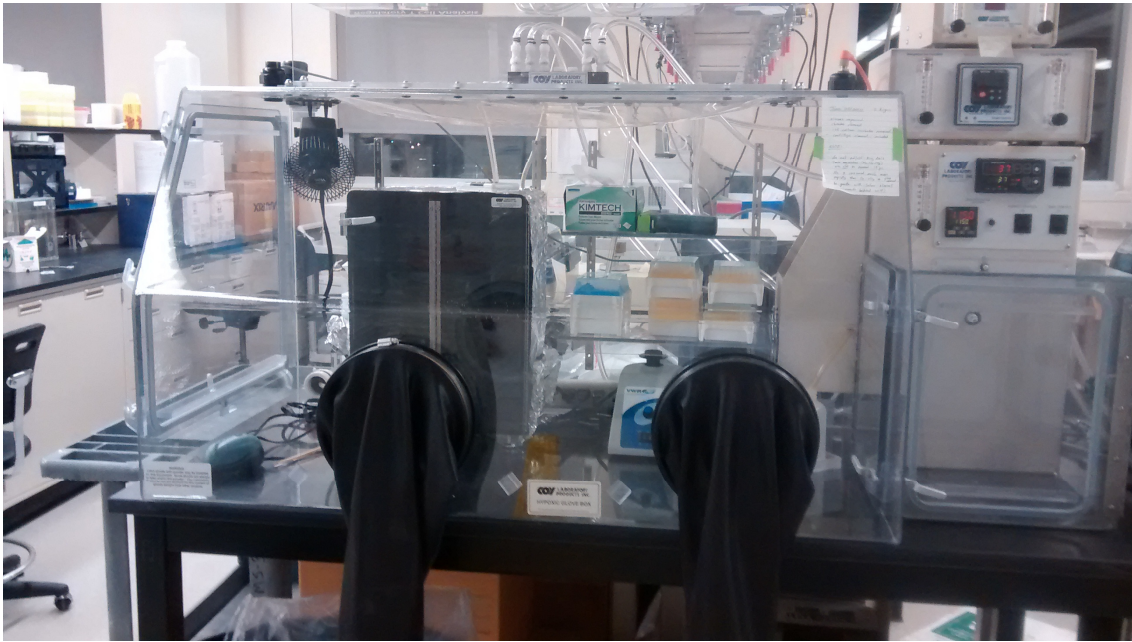




**Figura 7.** Grupos experimentais do terceiro experimento

### 3.3.2 Câmara de hipóxia

Para a realização da hipóxia experimental, foi utilizada uma câmara úmida de hipóxia com controlador automático (Coy, Grass Lake, MI, EUA), como mostrado na Figura 8. Foram padronizadas as condições de temperatura de 37°C e uma atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> e 1% de O<sub>2</sub>. O interior da câmara de cultura umidificada foi recoberta com folha de papel alumínio para evitar reações fotossensíveis entre as células e o meio de incubação. As culturas celulares foram removidas rapidamente da câmara de cultura para uma segunda incubadora de cultura de tecidos (~ 20°C) que possuía uma câmara de vácuo, a fim de eliminar qualquer presença de oxigênio. Ao abrir e fechar a câmara para adição ou remoção das células, os níveis de O<sub>2</sub> não variam mais do que 1% dentro da câmara de hipóxia. Os níveis de oxigênio foram mantidos em 1% de forma constante no interior da câmara.



**Figura 8.** Câmara de hipóxia utilizada para os experimentos de cultura de linhagem de cardiomiócitos

### 3.3.3 Tratamento com DHEA e condições de hipóxia

Inicialmente, testou-se 3 doses de DHEA (0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ ) em 12 horas de hipóxia, a fim de estabelecer a dose a ser utilizada no experimento. Após este período realizou-se o ensaio de viabilidade celular. A partir dos resultados obtidos neste experimento piloto, optou-se por utilizar a dose de 0,1  $\mu\text{M}$  para os experimentos posteriores. Para o preparo das doses de DHEA utilizou-se uma solução ‘mãe’ de DHEA na concentração de 1M (EMD Biosciences, San Diego, CA, EUA) dissolvida em DMSO (100%), devido à baixa solubilidade da DHEA, e armazenada em temperatura ambiente. Para os tratamentos com DHEA, foram realizadas diluições em série, desta vez em meio de cultura TDMEM (DMEM não suplementado com soro e antibiótico, denominado ‘tratamento’), a fim de atingir as concentrações desejadas no meio de cultura dentro dos frascos de 25  $\text{cm}^3$ . Para o experimento cujo resultado encontra-se nesta tese, na concentração de 0,1  $\mu\text{M}$ , as células foram tratadas com DHEA por 26 horas, durante o período de hipóxia/reoxigenação ou em condições de normóxia pelo

mesmo período. Quando submetidas à hipóxia, as células foram colocadas na câmara de hipóxia (1% O<sub>2</sub>) durante 24 horas e após este período submetidas à reoxigenação por 2 horas a 37 °C numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. O tempo de tratamento para células em normóxia foi de 26 horas.

### **3.4 Técnicas de análise metabólica e processamento das amostras**

#### **3.4.1 Testes de Tolerância à Glicose (TTG)**

O teste de tolerância à glicose (TTG) foi realizado apenas no experimento dois (machos com dieta hipercalórica e DHEA). O TTG foi realizado após 22 semanas de dieta e sete semanas de tratamento com DHEA. A glicose foi injetada intraperitonealmente (2 mg.kg<sup>-1</sup> ip) (Hoefel *et al.*, 2011) e o sangue foi coletado através de pequena punção na cauda, imediatamente antes (glicemia basal), bem como 30, 60, e 120 minutos depois da administração da glicose. Em cada ponto de tempo, a glicose foi medida por um glicosímetro (AccuChek Activo, Roche Diagnostics, USA).

#### **3.4.2 Preparação das amostras e tecidos**

Os animais foram eutanasiados pela manhã, por decapitação sem anestesia, realizada em sala separada do local onde se alojavam os ratos. Amostras de sangue foram coletadas em tubos com gel separador anticoagulante e centrifugadas a 3000rpm (800 x g) para separação do soro para dosagens posteriores. Os tecidos foram retirados, pesados, colocados em placas de Petry sobre o gelo e lavados com tampão Krebs-Ringer bicarbonato pH 7.4 (KRB). Em seguida, os tecidos foram fatiados e colocados nos tubos específicos para cada técnica realizada (captação de glicose, oxidação de glicose e leucina, síntese de glicogênio, síntese de proteína e lipogênese). Os tecidos não utilizados nos experimentos de incubação foram imediatamente congelados para

realização de outras análises metabólicas (concentração de glicogênio, para fígado e coração, de colesterol total e triglicerídeos, para fígado e *western blotting* para coração).

### **3.4.3 Oxidação de glicose (produção de $^{14}\text{CO}_2$ )**

Para mensurar a produção de  $\text{CO}_2$ , síntese de lipídeos e de proteínas, aproximadamente 100 mg de tecido (fígado, tecido adiposo retroperitoeal e músculo sóleo) foram fatiados e irrigados com solução fisiológica gelada (KRB). Em seguida, os tecidos foram secos em papel filtro e colocados em tubos tipo '*penicilina*' com 1,0 mL KRB mais 5 mM de glicose fria e 0,1  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ] glicose (Amersham International). A fase gasosa foi mantida utilizando-se carbogênio ( $\text{O}_2$ :  $\text{CO}_2$ , 95:5% v/v). Os tubos foram vedados com tampa de borracha onde se acoplou um vidro em formato de "J" com um poço central, na qual era inserido uma tira de papel 3MM para captação do  $\text{CO}_2$  resultante da oxidação da glicose marcada. A incubação foi realizada a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora em banho metabólico Dubnoff (60 ciclos/min) de acordo com o método de Dunlop (Dunlop, Van Elden e Lajtha, 1975). A reação de oxidação foi interrompida injetando-se 0,25 mL de TCA 50% no meio de incubação e 0,25 mL de NaOH nos poços centrais, através da tampa de borracha. A reação de "captação do  $^{14}\text{CO}_2$ " ocorreu *overnight*. Após este período, o conteúdo do centro do poço foi coletado e transferido para viais com 10 mL do líquido de cintilação e a radioatividade foi medida utilizando contador LKB-Wallac para determinar a formação do  $^{14}\text{CO}_2$  de acordo com o método de Fagundes (Dos Santos Fagundes *et al.*, 2001). Os valores de produção de  $\text{CO}_2$  foram expressos como pmol de  $^{14}\text{C}$  glicose por mg de tecido/hora

### **3.4.4 Oxidação de leucina (produção de $^{14}\text{CO}_2$ ) - músculo sóleo**

Para a medida da produção de  $\text{CO}_2$ , síntese de lipídeos e de proteínas a partir de leucina, aproximadamente 100 mg de músculo sóleo foram fatiados e irrigados com

solução fisiológica gelada (KRB); em seguida, os tecidos foram secos em papel filtro e colocados em tubos tipo ‘penicilina’ com 1,0 mL KRB mais 5mm de glicose fria, 0,2 mM de leucina fria e 0,1  $\mu\text{Ci}$  [U- $^{14}\text{C}$ ] leucina (Amersham International). A fase gasosa foi mantida utilizando-se carbogênio ( $\text{O}_2$ :  $\text{CO}_2$ , 95:5% v/v). Os tubos foram vedados com tampa de borracha onde se acoplou um vidro em formato de “J” com um poço central na qual era inserido uma tira de papel 3MM para captação de  $\text{CO}_2$  resultante da oxidação da leucina marcada. A incubação foi realizada a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora em banho metabólico Dubnoff (60 ciclos/min) de acordo com o método de Dunlop (Dunlop, Van Elden e Lajtha, 1975). A reação de oxidação foi interrompida injetando-se 0,25 mL de TCA 50% no meio de incubação e 0,25 mL de NaOH nos poços centrais, através da tampa de borracha. A reação de “captação do  $^{14}\text{CO}_2$ ” ocorreu *overnight*. Após este período, o conteúdo do centro do poço foi coletado e transferido para viais com 10 mL de líquido de cintilação e a radioatividade foi medida utilizando contador LKB-Wallac para determinar a formação do  $^{14}\text{CO}_2$  de acordo com o método de Fagundes (Dos Santos Fagundes *et al.*, 2001). Valores de produção de  $\text{CO}_2$  foram expressos como pmol de  $^{14}\text{C}$  leucina/mg tecido/hora

### **3.4.5 Conversão de glicose e leucina a lipídeos - músculo sóleo**

Para a verificação da conversão de glicose a lipídeos os tecidos (fígado e músculo sóleo) foram retirados dos tubos de penicilina e lavados com KRB para retirar o excesso de radioatividade não incorporado nas reações bioquímicas. Em seguida, os tecidos foram homogeneizados com TCA 10%, transferidos para tubos de ensaio e centrifugados 49.500 g durante 10 minutos. Após a centrifugação, o TCA foi descartado e adicionou-se clorofórmio: metanol (2:1) seguido de centrifugação a 49.500 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado com uma pipeta Pasteur e colocado em viais

para evaporação. O processo de extração com clorofórmio:metanol foi repetido 3x conforme o método de Folch (Folch, Lees e Sloane Stanley, 1957). A fase clorofórmio:metanol foi evaporada emiais e após a evaporação adicionou-se 10 mL de líquido de cintilação e a radioatividade foi medida utilizando contador LKB-Wallac.

#### **3.4.6 Conversão de leucina a proteína - músculo sóleo**

Para a medida de leucina incorporada em proteínas, o tecido restante no tubo da extração dos lipídeos na fase anterior, foi colocado na capela para completa evaporação da umidade. Após a evaporação, foi adicionado ácido fórmico ao *pellet* e a amostra transferida para vias com 8mL de líquido de cintilação. A radioatividade foi medida utilizando contador LKB-Wallac.

Amostras com aproximadamente 100 mg do tecido (músculo sóleo) foram incubadas em tubos contendo 1 mL de KRB com 5mM de glicose e 0,1  $\mu$ Ci [2DG-<sup>14</sup>C]glicose (Amersham International). A fase gasosa foi equilibrada usando 5% CO<sub>2</sub>:95% O<sub>2</sub>. Os tubos foram colocados numa incubadora metabólica do tipo Dubnoff com agitação constante (60 ciclos/minutos) durante 60 minutos a 37°C. Após o período de incubação, os tecidos foram removidos do meio de incubação e lavados duas vezes com KRB gelado. Em seguida, foi retirado o excesso de tampão em papel filtro e o tecido foi colocado em tubos contendo 1 mL de água destilada. Para determinar a captação celular de glicose conforme método de Machado (Machado, Wassermann e Marques, 1991), os tecidos foram rompidos utilizando duas fervuras alternadas com dois congelamentos. A quantificação de radioatividade foi realizada em contador de cintilação líquida e os resultados foram expressos como razão tecido/meio (T/M), que é dpm/mL de meio interno por dpm /mL do meio de incubação.

### **3.4.7 Síntese de Glicogênio a partir de [U-<sup>14</sup>C] glicose e alanina**

Para a síntese de glicogênio, fatias de tecido (fígado e músculo sóleo) com aproximadamente 100 mg foram incubadas em tubos contendo tampão fisiológico KRB, 5 mM de glicose fria e 0,1 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicose (Amersham International) (para síntese a partir de glicose em fígado e músculo) ou 5mM de glicose fria, 0,2 mM de alanina fria e 0,1 µCi [U-<sup>14</sup>C]alanina (Amersham International) para a síntese a partir de alanina no fígado). A fase gasosa foi equilibrada com carbogênio (5% CO<sub>2</sub>:95% O<sub>2</sub>) e a incubação realizada em banho metabólico (60 ciclos/minuto) durante 1 hora a 37°C. A reação de síntese foi interrompida por adição dos tubos em gelo. Em seguida, o tecido foi lavado e a extração do glicogênio realizada segundo método de Dolnikoff (Dolnikoff *et al.*, 2001). Resumidamente, os tecidos foram colocados em tubos de ensaio com 1 mL de KOH 30% e fervidos a 100 °C para completa digestão do tecido (aproximadamente 45 minutos). Após a fervura, foi adicionado etanol na concentração de 70% para favorecer a precipitação do glicogênio e as amostras foram centrifugadas a 1500 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado (processo repetido por 3x). Ao *pellet* foi adicionado líquido de cintilação e em seguida a radioatividade foi medida em contador LKB-Wallac com 95% de eficiência.

### **3.4.8 Conteúdo de glicogênio tecidual - fígado e coração**

Os tecidos (fígado e coração) foram congelados a -20°C até as análises. A extração de glicogênio foi realizada de acordo com o método de Van Handel (Van Handel, 1965) e foi medido como glicose após a hidrólise ácida do glicogênio. Utilizou-se como padrão o glicogênio de fígado de coelho. O conteúdo de glicose após a hidrólise ácida foi determinado pelo método da glicose oxidase (Glicose PAP.Liquiform Kit Labtest) e medido em placas de 96 poços modelo Zenyth 200rt (UV-Vis), utilizando

espectrofotômetro com comprimento de onda de 505nm. Os resultados foram expressos como g% de glicogênio.

### **3.4.9 Captação de glicose**

Amostras de músculo sóleo e gastrocnêmio e tecido adiposo foram incubadas em tubos contendo 1 mL de KRB com 5 mM de glicose e 0,1 uCi [2DG-14C] glicose (Amersham International). A fase gasosa foi equilibrada usando 5% de CO<sub>2</sub>: 95% de O<sub>2</sub>. Os tubos foram colocados num incubador de Dubnoff, e mantidos sob agitação constante durante 60 minutos a 37 ° C. Após a incubação, o tecido foi removido da solução de incubação, lavado duas vezes em KRB gelado e em seguida adicionados a tubos de ensaio contendo água destilada. O tecido foi rompido através de fervuras permitindo a liberação intracelular (Machado, Wassermann e Marques, 1991). Em seguida, quantificou-se a radioatividade a partir do meio fervido (meio interno) e a radioatividade do meio de incubação (meio externo). Os resultados estão expressos como relação de tecido (meio interno) / meio (meio externo) (T/M), dpm por mL.

### **3.4.10 Dosagens bioquímicas no soro**

As dosagens séricas de glicose, triglicerídios (TG), colesterol total (CT), colesterol de alta densidade (HDL), ácido úrico, ureia e creatinina foram determinadas usando métodos enzimáticos e medidas por espectrofotômetro e os resultados foram expressos em mg/dL. A alanina aminotransferase (ALT) também foi determinada por métodos enzimáticos (Labtest, MG, Brasil) e os resultados foram expressos como U/L. Os kits enzimáticos foram adquiridos da empresa Labtest Diagnostica SA. Todas as dosagens seguiram o protocolo do fabricante.



### **3.4.11 Dosagens de DHEA e Testosterona no soro**

As dosagens de DHEA e testosterona foram determinadas por kit de ELISA (Enzo life Sciences®) e os resultados são expressos como pg/mL.

## **3.5 Análise da expressão de proteínas (Western Blotting)**

### **3.5.1 Amostras teciduais**

Amostras de coração dos animais do experimento dois foram homogeneizadas com tampão de lise, pH 7,4, como descrito por Janner *et al* (Janner Dda *et al.*, 2010). Após a determinação do conteúdo proteico pelo método de Bradford (Bradford, 1976), as proteínas foram separadas por SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida - 10%) usando o sistema Miniprotean (Bio-Rad, Hercules, EUA). Antes de carregar as proteínas no gel, as amostras foram aquecidas a 90°C durante 2 min para desnaturar as proteínas. No gel carregou-se 80 µg de proteína em tampão de carga (0,375 mol/L de Tris, pH 6,8, glicerol a 50%, SDS a 10%, 0,5 mol/L-mercaptoetanol e 0,002% de azul de bromofenol) em cada poço. Utilizou-se padrão de peso molecular *full range* (Full-Range Rainbow, GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brasil). Após a electroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond; Amersham, EUA), utilizando um sistema de transferência eletroforética em tanque (mini Trans-blot Bio-Rad). A seguir, a fim de bloquear as ligações inespecíficas, as membranas foram incubadas com tampão a 10% de leite em pó sem gordura diluído em tampão Tris salina (TTBS) (20 mmol/L de Tris-HCl, pH 7,5; 150 mmol/L de NaCl; 0,05% de Tween-20, pH 7,4) durante 60 min (Jacob *et al.*, 2008). O anticorpo primário diluído (anticorpo policlonal de coelho contra p-Akt-Ser473 de 60 kDa, Santa Cruz Biotechnology) em TTBS e na concentração de 1:1000, foi adicionado à membrana e incubado *overnight* a 4 °C. Após essa incubação, as membranas foram lavadas três

vezes com TTBS e incubadas durante 2 h em temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-rabbit (Millipore). Após a incubação com o anticorpo secundário, lavou-se novamente as membranas três vezes com TTBS (20 mmol/L de Tris-HCl; 150 mmol/L de NaCl, pH 7,5) e procedeu-se à revelação por quimioluminescência. Para isso, utilizou-se um sistema de detecção baseado em substratos luminescentes, com exposição das membranas ao filme autorradiográfico Hyperfilm (Amersham®) por aproximadamente 1 minuto. A autorradiografia gerada foi analisada por meio do software Image J® e os resultados foram expressos como relação P-Akt/Ponceau. A coloração da membrana com ponceau (Ponceau S, Sigma-Aldrich) permite a visualização e quantificação das proteínas transferidas para a membrana. Para minimizar as variações interensaio, as amostras de todos os grupos experimentais foram processadas em paralelo. A expressão das proteínas foi expressa como unidades densitométricas arbitrárias.

### **3.5.2 Expressão de proteínas em células (cardiomiócitos)**

Realizou-se western blotting para a quantificação da expressão celular das seguintes proteínas: Mn-SOD (SOD-Mitocondrial), Catalase (CAT), Bax, Bcl-2, poli-ADP-ribose-polimerase (PARP) e caspase-3 de acordo com (Bryan *et al.*, 2011). Após os tratamentos experimentais, as células foram homogeneizadas em 400 µL de tampão Pathscan contendo 25mM de Tris, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 2mL de Triton-X fluorido de sódio e coquetel com inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e, em seguida, centrifugadas a 8000 x g por 10 minutos a 4°C. A concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Foram usados 30 µg de proteína (Bradford, 1976) de cada amostra, os quais foram aquecidos a fim de desnaturar as proteínas e em

seguida, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio), com gel de 8 a 15%, de acordo com o peso molecular da proteína. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de polivinilideno difluoreto (PVDF) usando um sistema de transferência (mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell), a 110v por 1-2 h. Depois da transferência, as membranas foram bloqueadas utilizando tampão de bloqueio com 5% de leite desnatado preparado em TTBS (solução salina de tampão tris - 20 mmol /L de Tris, 137 mmol / L de NaCl, pH 7,4, com 0,1% de Tween-20) por 90 min. Depois do bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com TTBS e incubadas por 16 a 18 horas (*overnight*) a 4°C com os seguintes anticorpos primários: Bax e Bcl-2 (Santa Cruz® Biotechnology), PARP (Abcam®), caspase-3 (Cell Signaling®), Mn-SOD (Millipore®) e catalase (Sigma Aldrich®). Os anticorpos primários (preparados em TBS-T com 5% de leite) ligados à membrana foram detectados utilizando anticorpos secundários conjugados com peroxidase *anti-rabbit* ou *anti-mouse*, os quais foram preparados em TTBS 5% de leite (1:1000-1: 5000). Os anticorpos secundários foram incubados durante 2 horas em temperatura ambiente e sob agitação constante. Antes de proceder à revelação por quimiluminescência, as membranas foram lavadas por três períodos de 10 minutos com TTBS (TrisHCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). A reação de quimiluminescência ocorreu através de um sistema de detecção baseado em substratos luminescentes, e as imagens fluorescentes foram capturadas usando ChemiDoc MP (BioRad). Os dados foram expressos como média da densidade óptica quantificado pelo software Quantity One®. O controle de carga utilizado para a normalização foi anti- $\beta$ -actina (Santa Cruz Bio).

### **3.6 Citometria de fluxo**

A verificação do estresse oxidativo, na forma de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs) foi determinado através do ensaio 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) (Yang *et al.*, 2013) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Após o tratamento (DHEA e/ou hipóxia), ~ 7-8 x 10<sup>6</sup> células H9C2 foram lavadas com solução salina de tampão fosfato (PBS) e incubadas durante 30 minutos com H<sub>2</sub>DCFDA, de acordo com as instruções do fabricante. O meio com H<sub>2</sub>DCFDA foi então aspirado e as células foram lavadas com PBS. Após a lavagem com o tampão fosfato, as células foram cuidadosamente removidas das garrafas através de tripsinização, passadas para tubos de ensaio e centrifugadas a 350 g durante 5 minutos a 4 °C. Em seguida, a fluorescência relativa de células não tratadas e tratadas foi medido por meio de citometria de fluxo (Becton Dickinson citômetro de fluxo FACSCalibur), de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.7. Análise Estatística**

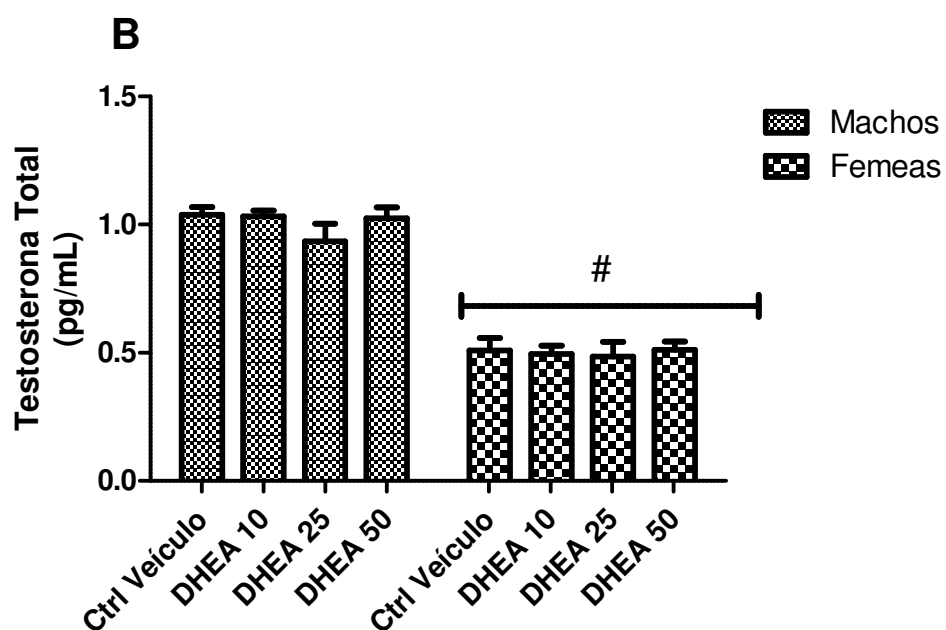
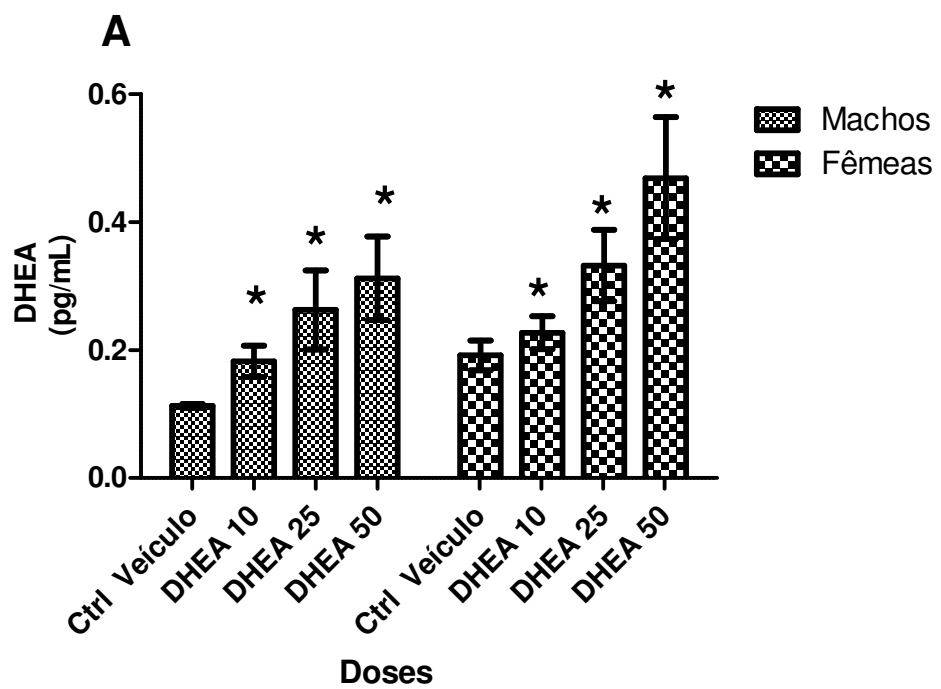
A análise dos dados com relação à homogeneidade foi realizada através do teste de Levene e as comparações entre os diferentes grupos foram realizadas empregando-se ANOVA de duas vias (machos: fêmeas; dieta: tratamento; hipóxia: tratamento) ou análise de medidas repetidas (avaliação do consumo alimentar e ganho de peso) ou área sob a curva (AUC para TTG) seguida pelo teste post-hoc de Tukey-Kramer, quando os valores de F foram significativos. O nível de significância adotado foi de P <0,05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Experimento 1: Ratos machos e fêmeas ovariectomizadas tratados com diferentes doses de DHEA

Passados trinta dias da colocação dos *pellets* com diferentes doses de DHEA foi realizada a dosagem sérica da concentração de DHEA (Figura 9A). A concentração sérica de DHEA aumentou significativamente em todas as doses administradas, mostrando que o *pellet* foi efetivo em liberar DHEA e que esta se manteve em níveis maiores do que nos animais controle no 30º dia de tratamento.

Como a DHEA pode ser convertida em testosterona, e muitas vezes o efeito da DHEA pode ser atribuído à testosterona, a concentração sérica de testosterona total nos ratos machos e nas fêmeas ovariectomizadas foi dosada, para verificar se a DHEA administrada estaria sendo convertida em testosterona (Figura 9B). Observou-se que o tratamento com DHEA não aumentou os níveis de testosterona total. A concentração de testosterona total mostrou diferença estatística entre os sexos ( $p < 0,001$ ), sendo que os machos apresentaram maiores níveis, e não houve interação entre sexo e tratamento.



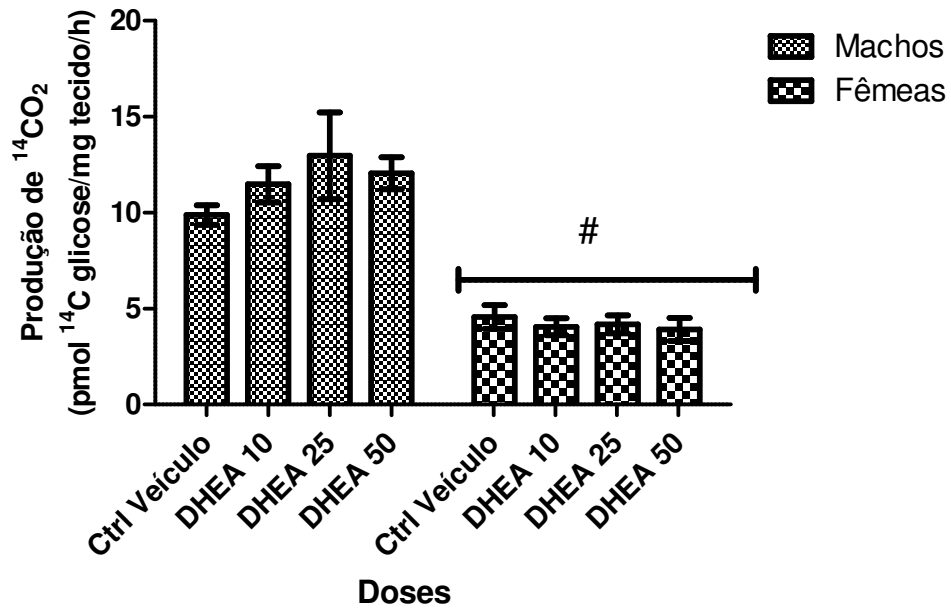
**Figura 9.** Níveis séricos de DHEA e testosterona total em ratos machos e fêmeas ovariectomizadas 30 dias após implantação de *pellets* com diferentes doses de DHEA.

A) Concentração de DHEA; B) Concentração de testosterona total. Os valores representam a média  $\pm$  EPM,  $n=5-6$  animais em cada grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey-Kramer. Ctrl Veículo: Grupo controle com veículo; DHEA10: Grupo com DHEA

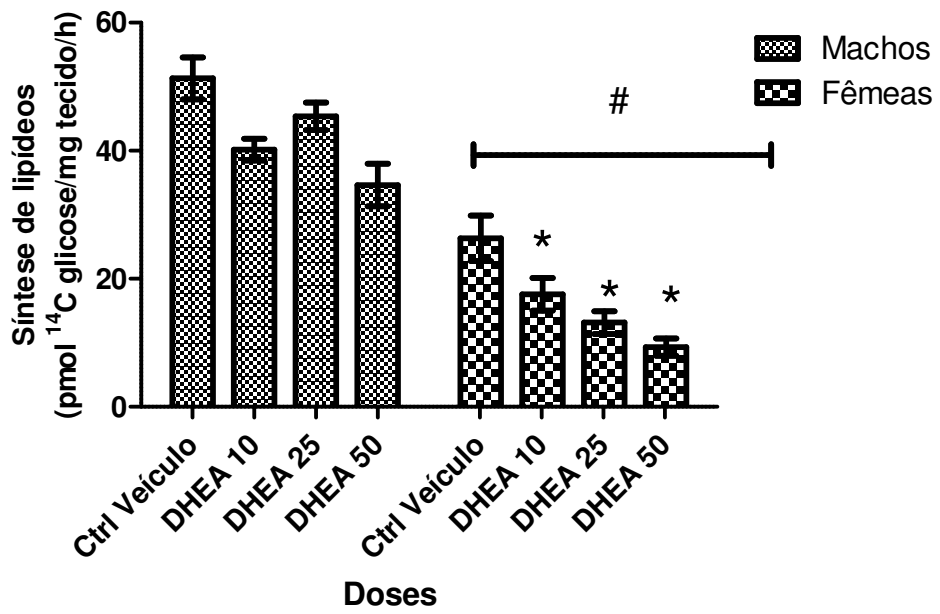
10mg/kg; DHEA25: Grupo com DHEA 25mg/kg; DHEA50: Grupo com DHEA 50mg/kg. \*Diferença significativa em relação ao controle. #Diferença significativa entre machos e fêmeas ( $p < 0,05$ ).

O metabolismo da glicose no fígado de machos e fêmeas ovariectomizadas submetidos ao tratamento com diferentes doses de DHEA está representado na Figura 10. A oxidação de glicose mostrou diferença estatística apenas entre os sexos ( $p < 0,001$ ), não mostrando efeito do tratamento com diferentes doses de DHEA. Nas fêmeas, a oxidação de glicose chega a ser aproximadamente 53% menor do que os valores encontrados nos machos (Figura 10A). Com relação à síntese de lipídeos utilizando o mesmo substrato (Figura 10B), nos machos a síntese de lipídeos também é maior do que nas fêmeas ( $p < 0,001$ ) e neste parâmetro, houve efeito do tratamento com diferentes doses de DHEA ( $p < 0,001$ ). Nas fêmeas, observa-se que conforme aumenta a dose de DHEA menor é a síntese de lipídeos no fígado, embora não haja diferença significativa entre as doses. A síntese de glicogênio no fígado (Figura 10C) mostrou diferença estatística entre os sexos ( $p < 0,001$ ), efeito do tratamento ( $p = 0,037$ ) e interação entre sexo e tratamento ( $p = 0,004$ ). Neste parâmetro, a síntese de glicogênio no fígado das fêmeas é aproximadamente 73% maior do que os valores encontrados nos machos. Além disso, nos machos o tratamento com DHEA não altera a síntese de glicogênio, enquanto nas fêmeas as maiores doses de DHEA (25 e 50mg/kg) reduziram a síntese de glicogênio.

A

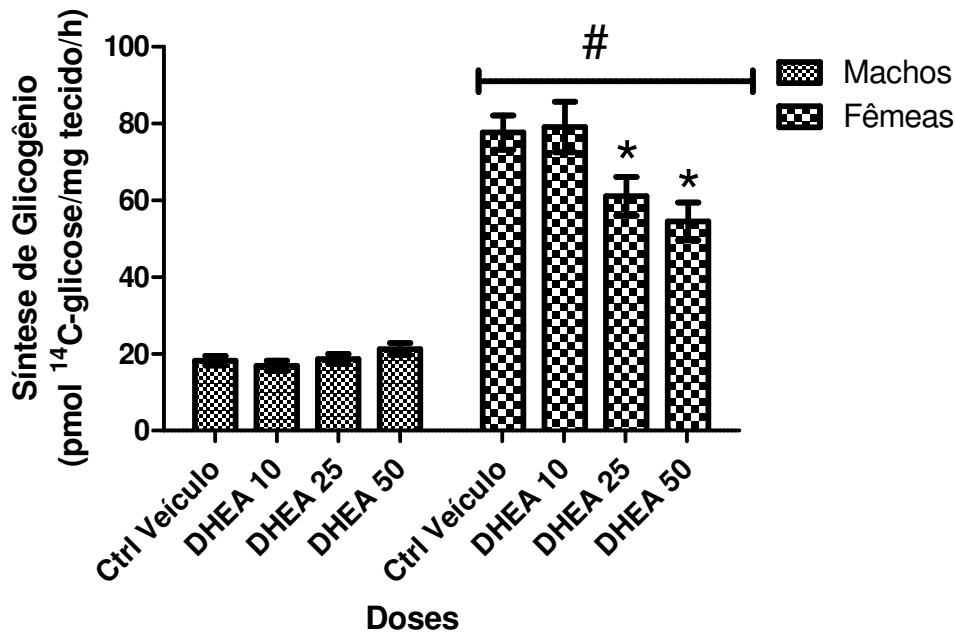


B





C

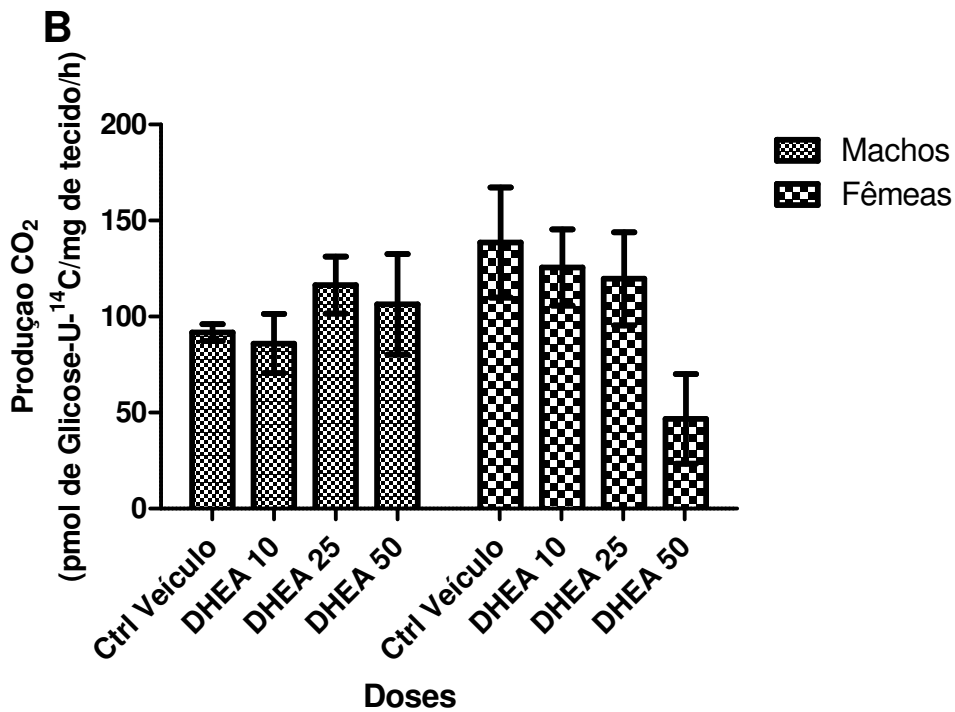
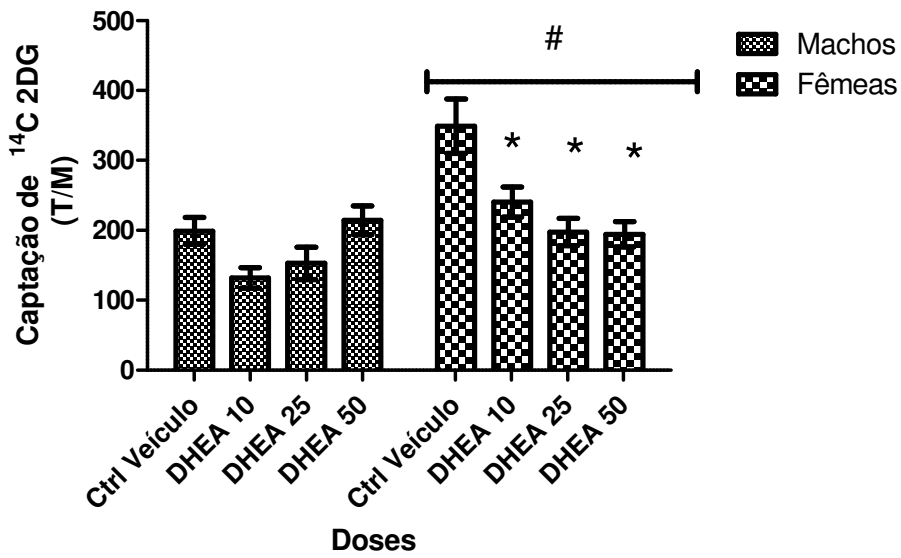


**Figura 10.** Metabolismo da glicose no fígado de ratos machos e fêmeas ovariectomizadas e tratados com diferentes doses de DHEA: A) Oxidação de glicose a CO<sub>2</sub>; B) Incorporação de glicose a lipídeos; C) Síntese de glicogênio a partir de glicose. Os valores representam a média ± EPM, n=5-6 animais em cada grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey–Kramer. Ctrl veículo: Grupo controle com veículo; DHEA10: Grupo com DHEA 10mg/kg; DHEA25: Grupo com DHEA 25mg/kg; DHEA50: Grupo com DHEA 50mg/kg. \*Diferença significativa em relação ao controle; #Diferença significativa entre machos e fêmeas (p<0,05)

A Figura 11 mostra o metabolismo da glicose no tecido adiposo retroperitoneal de machos e fêmeas ovariectomizadas submetidos ao tratamento com diferentes doses de DHEA. Na captação de glicose (Figura 11A), a análise estatística mostrou interação entre sexo e tratamento (p=0,009) e diferença entre os sexos (p<=0,001), sendo que nos machos a captação de glicose no tecido adiposo retroperitoneal é menor do que nas fêmeas. Além disso, houve efeito do tratamento (p=0,001) e este efeito é dependente do sexo, pois apenas nas fêmeas a captação de glicose no tecido adiposo é menor nos grupos tratados com DHEA em todas as doses utilizadas. A oxidação de glicose no tecido adiposo (Figura 11B) não mostrou diferença estatística entre os sexos (p=0,623),

nem entre tratamentos ( $p=0,262$ ) e também não houve interação entre sexo e tratamento ( $p=0,09$ ).

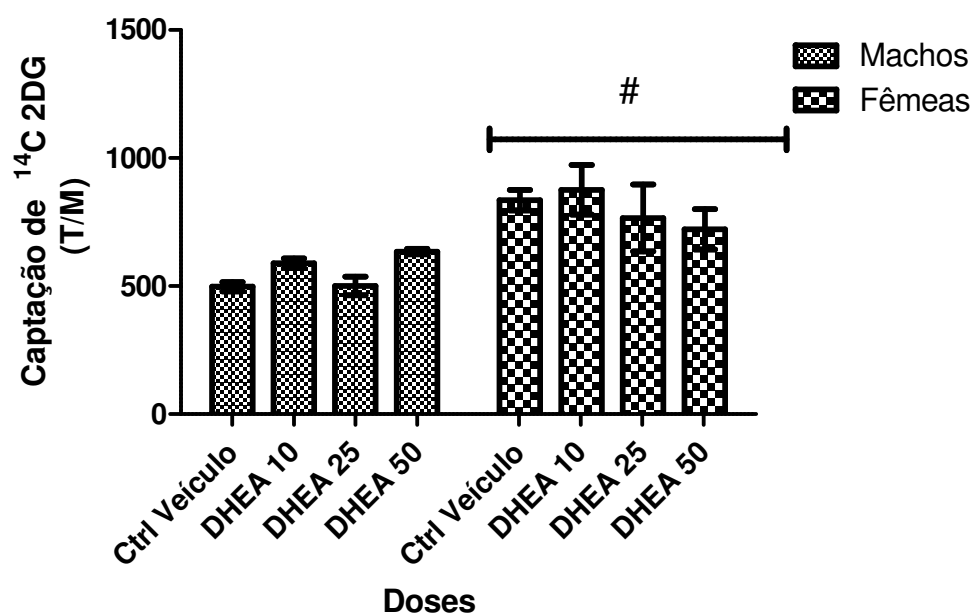
**A**



**Figura 11.** Metabolismo da glicose em tecido adiposo retroperitoneal de ratos machos e fêmeas ovariectomizadas e tratados com diferentes doses de DHEA: A) Captação de glicose; B). Oxidação de

glicose. Valores representam a média  $\pm$  EPM, n=5-6 animais em cada grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey–Kramer. Ctrl veículo: Grupo controle com veículo; DHEA10: Grupo com DHEA 10mg/kg; DHEA25: Grupo com DHEA 25mg/kg; DHEA50: Grupo com DHEA 50mg/kg. \*Diferença significativa em relação ao controle; #Diferença significativa entre machos e fêmeas ( $p<0,05$ )

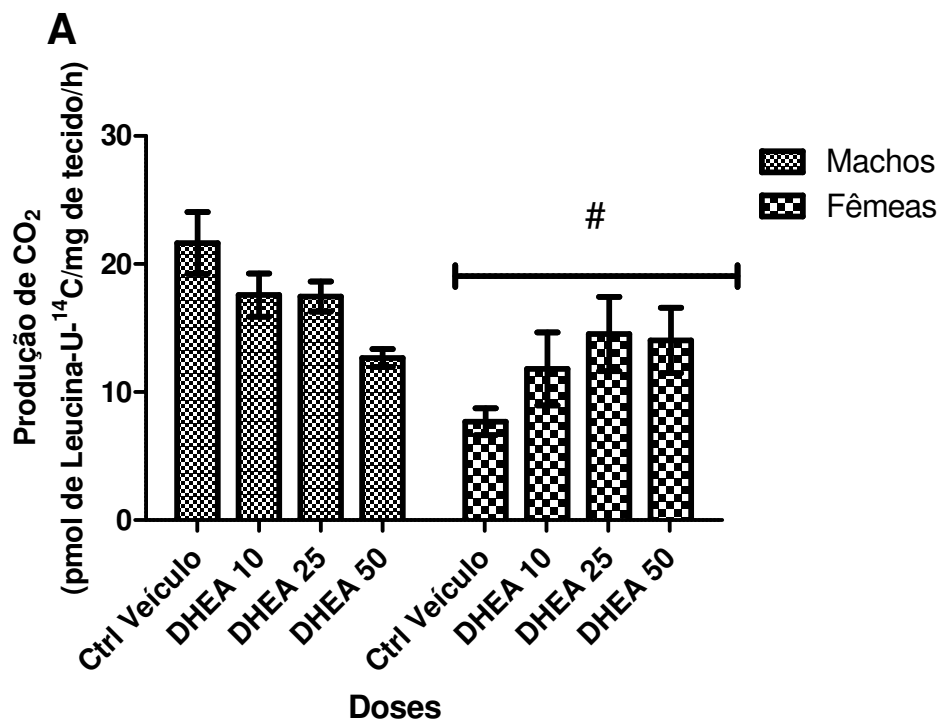
A Figura 12 mostra a captação de glicose em músculo sóleo de machos e fêmeas. A captação de glicose apresentou diferença entre os sexos ( $p<0,001$ ), nas fêmeas a captação é 40% maior do que nos machos e o tratamento não influenciou a captação ( $p=0,493$ ), porém, houve interação entre sexo e tratamento ( $p=0,007$ ).

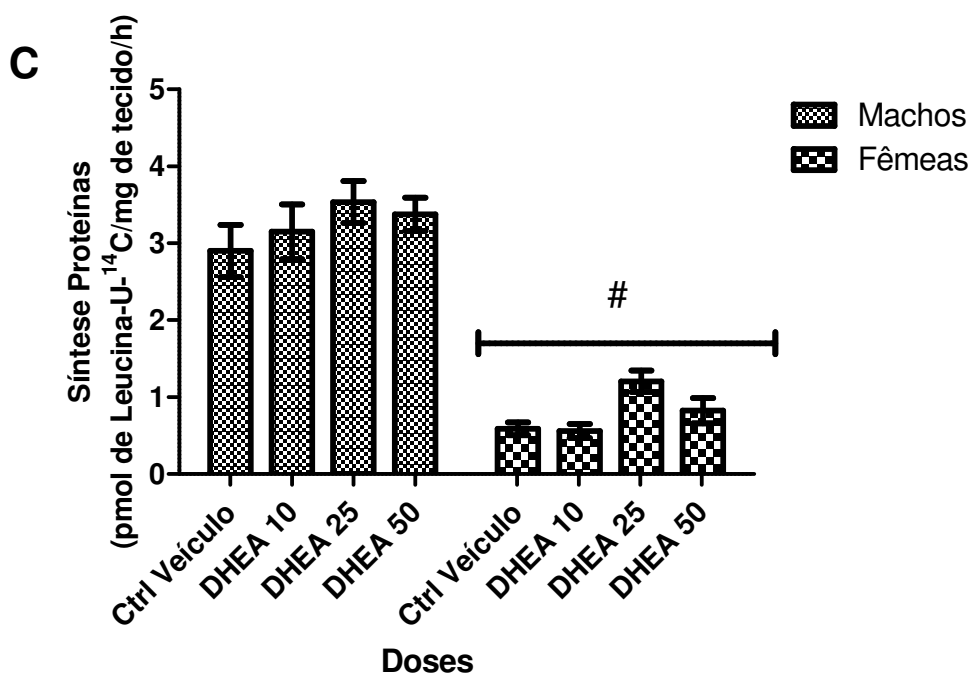
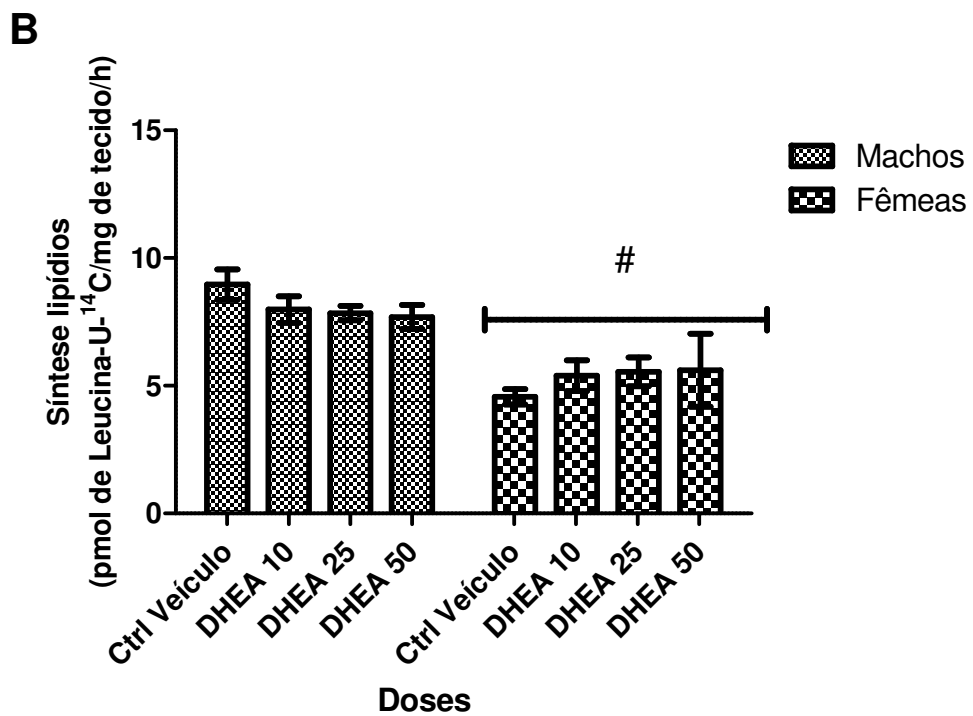


**Figura 12.** Captação de glicose em músculo sóleo de ratos machos e fêmeas ovariectomizadas e tratados com diferentes doses de DHEA. Valores representam a média  $\pm$  EPM, n=5-6 animais em cada grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey–Kramer. Ctrl veículo: Grupo controle com veículo; DHEA10: Grupo com DHEA 10mg/kg; DHEA25: Grupo com DHEA 25mg/kg; DHEA50: Grupo com DHEA 50mg/kg. #Diferença significativa entre machos e fêmeas ( $p<0,05$ ).

A Figura 13 mostra o metabolismo da leucina em músculo sóleo de machos e fêmeas submetidos ao tratamento com DHEA. Na oxidação de leucina (Figura 13A)

houve interação entre sexo e tratamento ( $p=0,022$ ), diferença entre os sexos ( $p<0,001$ ) e não houve efeito do tratamento ( $p=0,291$ ). No entanto, nos machos, na maior dose (50 mg/kg), a oxidação de leucina foi 42% menor do que nos animais sem tratamento, enquanto que nas fêmeas o efeito foi oposto: na dose de 10mg/kg a oxidação de leucina foi 53% maior e nas doses de 25 e 50 mg/kg a oxidação de leucina foi aproximadamente 80% maior do que nos animais do grupo sem tratamento. A conversão de leucina a lipídeos (Figura 13B) mostrou diferença entre os sexos ( $p<0,001$ ), sendo que nas fêmeas a conversão de leucina a lipídeos é menor do que nos machos. Não houve efeito do tratamento ( $p=0,383$ ) nem interação entre sexo e tratamento ( $p=0,077$ ). A síntese de proteínas a partir de leucina (Figura 13C) apresentou diferença entre os sexos ( $p<0,001$ ), sendo que nos machos, de forma geral, a síntese proteica a partir de leucina foi aproximadamente 80% maior do que nas fêmeas. Não houve efeito do tratamento na síntese proteica ( $p=0,07$ ) nem interação entre sexo e tratamento ( $p=0,968$ ).



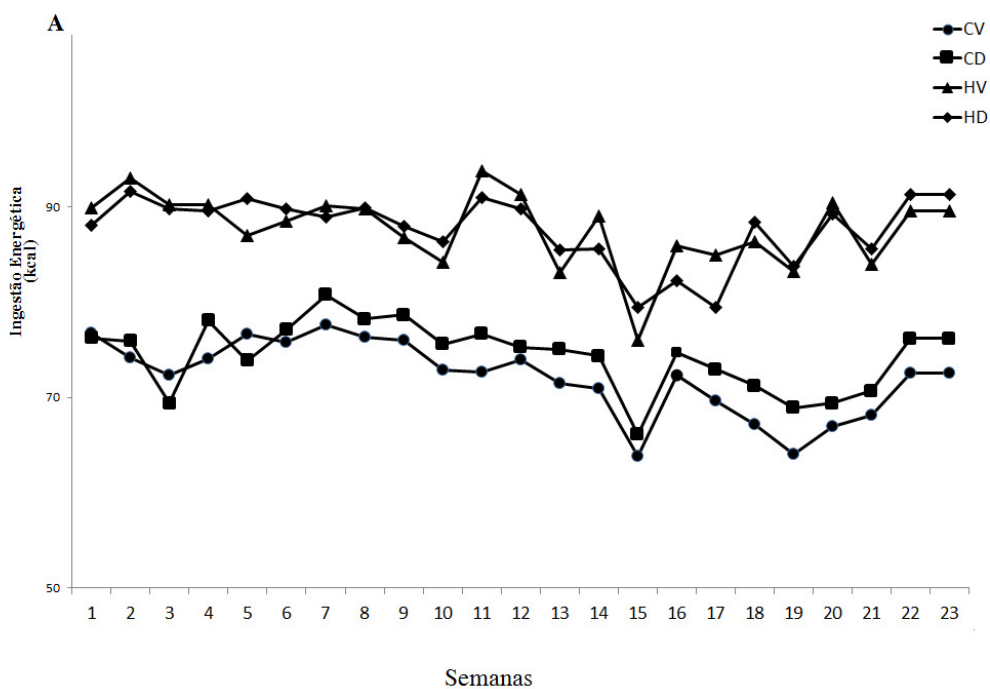


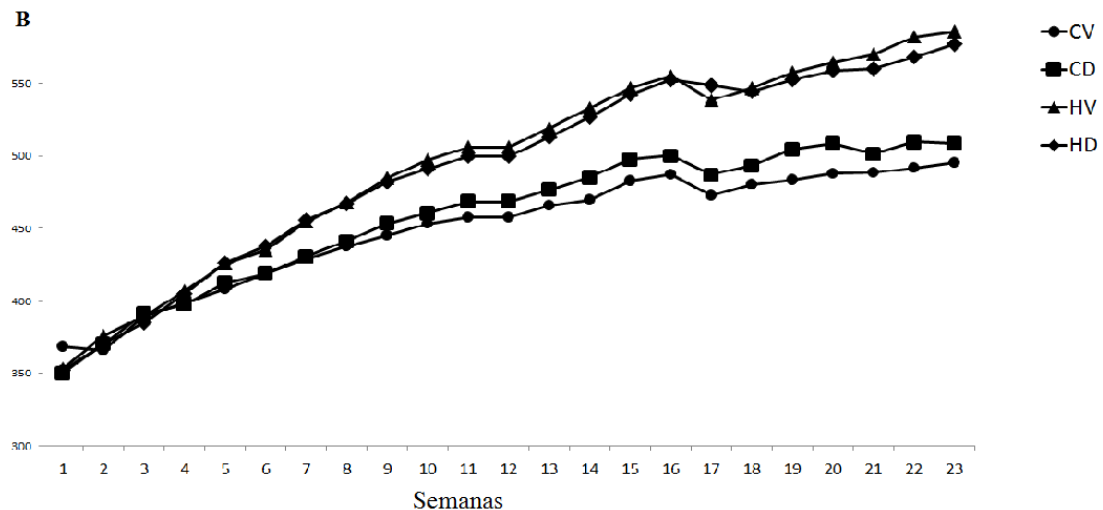
**Figura 13.** Metabolismo da leucina em músculo sóleo de ratos machos e fêmeas ovariectomizadas e tratados com diferentes doses de DHEA. A) Oxidação; B) Síntese de lipídeos C) Síntese de proteínas. Valores representam a média  $\pm$  EPM,  $n=5-6$  animais em cada grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey-Kramer. Ctrl veículo: Grupo controle com veículo;

DHEA10: Grupo com DHEA 10mg/kg; DHEA25: Grupo com DHEA 25mg/kg; DHEA50: Grupo com DHEA 50mg/kg.#Diferença significativa entre machos e fêmeas (p<0,05).

#### 4.2 Experimento 2: Ratos machos tratados com DHEA e dieta hipercalórica

Os dados da Figura 14A mostram a média da ingestão calórica dos ratos durante as 23 semanas do experimento. A análise estatística para medidas repetidas mostrou que a ingestão calórica dos ratos HV e HD foi sempre maior que a dos outros grupos. Animais que ingeriram dieta hipercalórica *ad libitum* apresentaram maior ganho de peso final, 65,6% para o HV, 66,4% para HD, 36% CV e 45% CD (p <0,01) quando comparados com seu peso inicial, respectivamente (Fig. 14B). O tratamento com DHEA não alterou a ingestão calórica nem o ganho de peso (Fig. 14A e 14B).





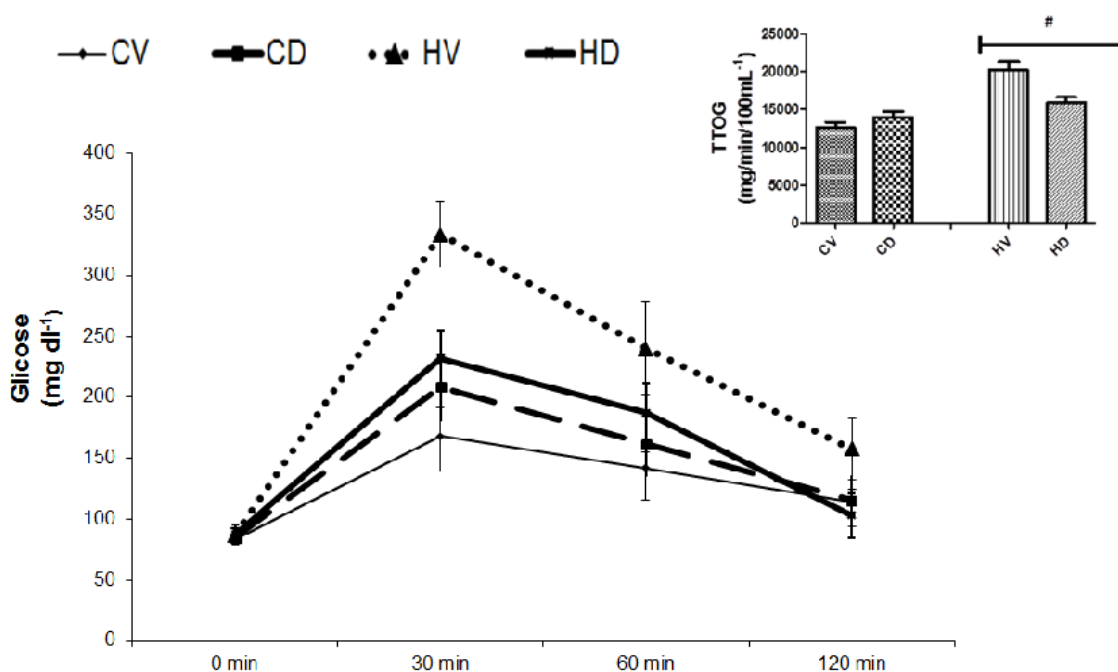
**Figura 14.** Dados de ingestão energética e de peso corporal de ratos machos que consumiram dieta hipercalórica ou dieta controle e receberam tratamento com DHEA em *pellets* (25 mg/kg ou veículo durante as últimas oito semanas) A) Ingestão energética; B) Peso corporal. Os valores representam média  $\pm$  EPM de 8–10 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey–Kramer. CV=Grupo Controle com Veículo; CD= Grupo Controle com DHEA; HV=Grupo dieta Hipercalórica com veículo; HD= Grupo dieta Hipercalórica com DHEA ( $p < 0,05$ ).

A concentração de glicose (Tabela 1) mostrou um efeito significativo da dieta e do tratamento e interação significativa entre dieta e tratamento ( $p < 0,001$ ). A dieta provocou aumento e o tratamento com DHEA reduziu a glicemia nos animais com dieta hipercalórica. No teste de tolerância à glicose (Figura 15) (TTG) foi observado um efeito significativo da dieta e houve interação entre dieta e tratamento ( $p < 0,005$ ). Os animais que receberam a dieta hipercalórica sem DHEA (HV) tiveram maior área sob a curva (AUC – ‘*area under the curve*’) (Figura 15). Os animais que receberam a dieta hipercalórica com DHEA (HD) apresentaram área sob a curva 21% menor quando comparados com animais com dieta hipercalórica sem DHEA (HV) (Fig. 15 reduzida).

**Tabela 3.** Parâmetros bioquímicos do soro de ratos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA.

	CV	CD	HV	HD	ANOVA*
Glicose (mg/dL)	89,45±1,8	89,57±1,08	102,28±1,04	91,79±1,42	D, T, §
Triglicérides (mg/dL)	120,13±10,33	124,22±5,54	174,56±10,11	172,59±15,73	D
Colesterol Total (mg/dl)	87,2±6,65	81,00±5,64	86,70±3,39	82,00±5,61	NS
ALT (U/L)	21,30±1,85	17,90±1,93	36,90±2,61	21,69±2,96	D, T, §
HDL (mg/dL)	35,53±3,19	34,00±1,19	36,03±1,31	36,00±2,78	NS
Ácido Úrico (mg/dL)	1,58±0,07	1,31±0,08	2,06±0,12	1,67±0,09	D, T
Uréia (mg/dL)	1,87±0,04	1,28±0,06	1,94±0,08	1,58±0,17	T
DHEA	ND	1,55±0,43	ND	1,70±0,41	T

Os valores representam a média ± EPM de 6–10 animais por grupo. Os dados foram analisados através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey-Kramer \*  $p < 0,05$ . D=efeito da dieta; T=efeito do tratamento; NS=não significativo; §=interação entre dieta e tratamento. CV=Grupo Controle com Veículo; CD= Grupo Controle com DHEA; HV=Grupo dieta Hipercalórica com veículo; HD= Grupo dieta Hipercalórica com DHEA. ND=Não detectado. ALT=Alanina-Amino-Transferase. HDL=Colesterol de Densidade Eleada (*High Density Cholesterol*)

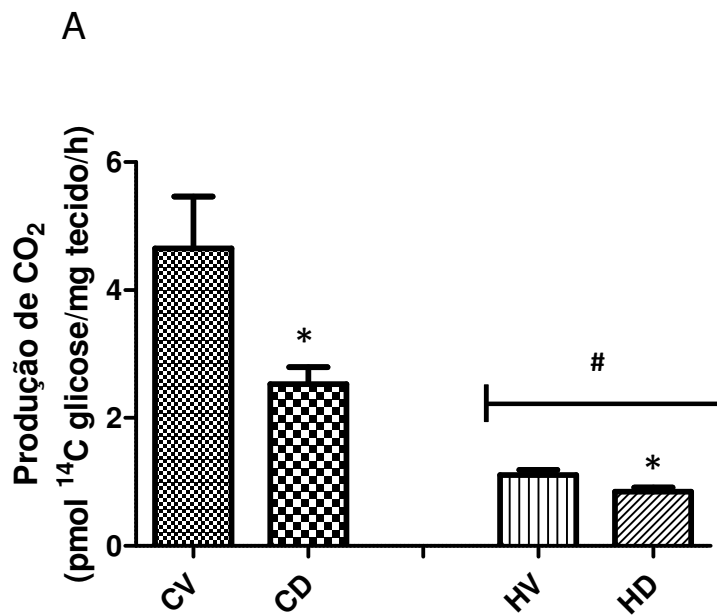


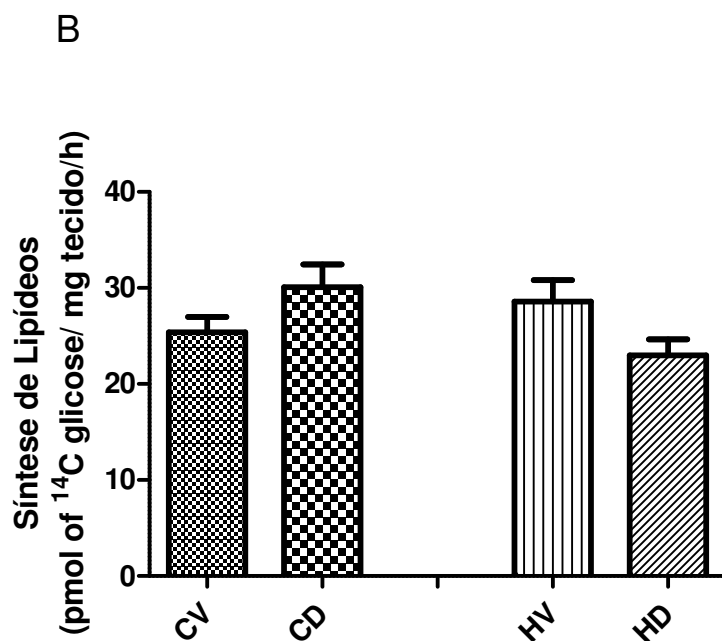
**Figura 15.** Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTG) e Área sob a Curva (AUC) (Figura acima do gráfico) de ratos machos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA. Valores representam a média ± EPM, n=6-7 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo *post-hoc* Tukey-Kramer. CV=Grupo Controle com



Veículo; CD= Grupo Controle com DHEA; HV=Grupo dieta hipercalórica com veículo; HD= Grupo dieta Hipercalórica com DHEA. # Efeito da dieta ( $p=0,0001$ ); Houve interação estatisticamente significativa entre dieta e tratamento ( $p=0,005$ ).

No fígado, tanto o tratamento com DHEA quanto a dieta hipercalórica produziram uma redução da oxidação de glicose (glicose convertida em  $\text{CO}_2$ ) (Fig. 16A) e a análise estatística mostrou interação entre a dieta e o tratamento ( $p = 0,045$ ). A síntese de lipídios no fígado foi semelhante em todos os grupos (Fig. 16B).



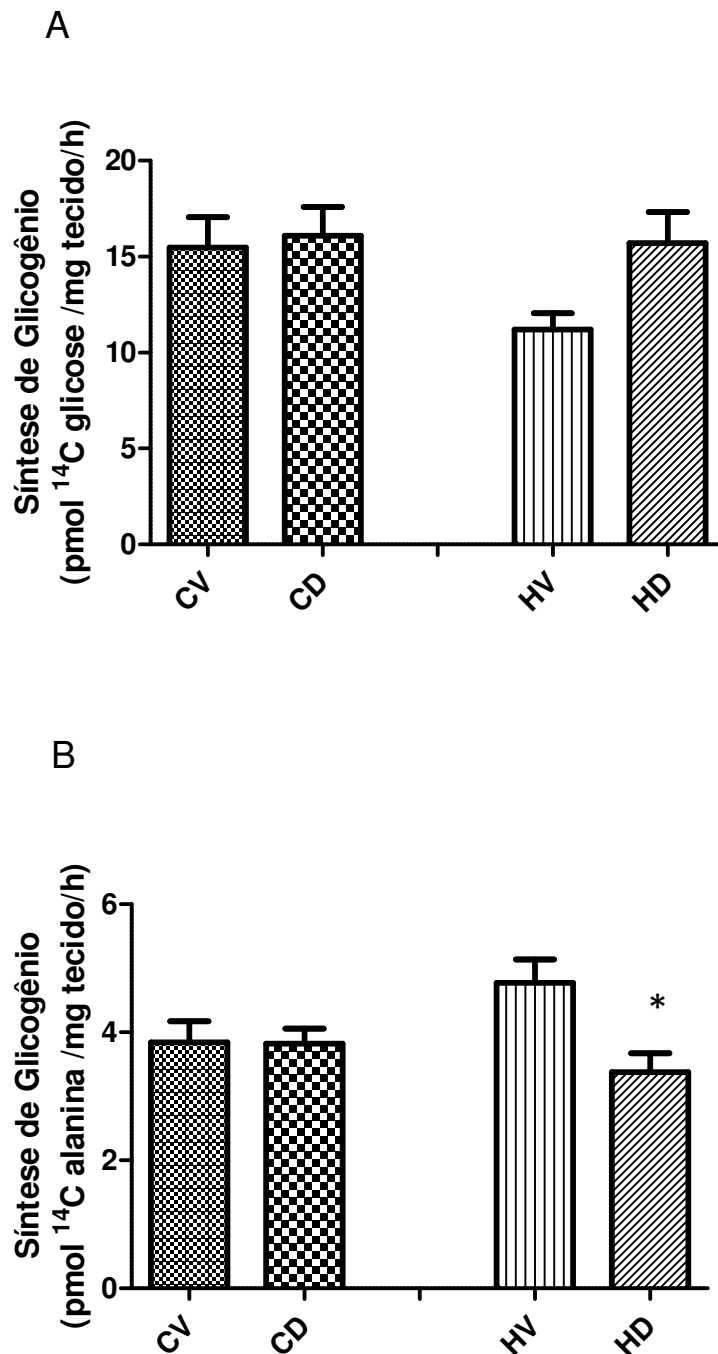


**Figura 16.** Metabolismo da glicose em fígado de ratos machos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA. A) Produção de CO<sub>2</sub>; B) Síntese de Lipídeos. Valores representam a média ± EPM, n=6-7 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey–Kramer.

CV=Grupo Controle com Veículo; CD= Grupo Controle com DHEA; HV=Grupo dieta hipercalórica com veículo; HD= Grupo Dieta Hipercalórica com DHEA. #Efeito da dieta (p<0,001); \*Efeito do tratamento (p=0,002). Houve interação estatisticamente significativa entre dieta e tratamento na produção de CO<sub>2</sub> (p=0,045).

A Figura 17 mostra a síntese de glicogênio hepático, pela via direta (Figura 17A) e indireta (Figura 17B). Quando avaliamos a síntese de glicogênio a partir da glicose (Figura 17A), não foi encontrada diferença significativa, mas o tratamento com DHEA nos animais que receberam dieta hipercalórica aumentou a síntese de glicogênio até próximo aos níveis dos animais com dieta padrão. É interessante observar que, quando foi oferecida alanina como substrato para a síntese de glicogênio (Figura 17B), foi encontrada uma interação significativa entre dieta e tratamento. O tratamento com DHEA diminuiu significativamente a síntese de glicogênio apenas no grupo HD e a dieta

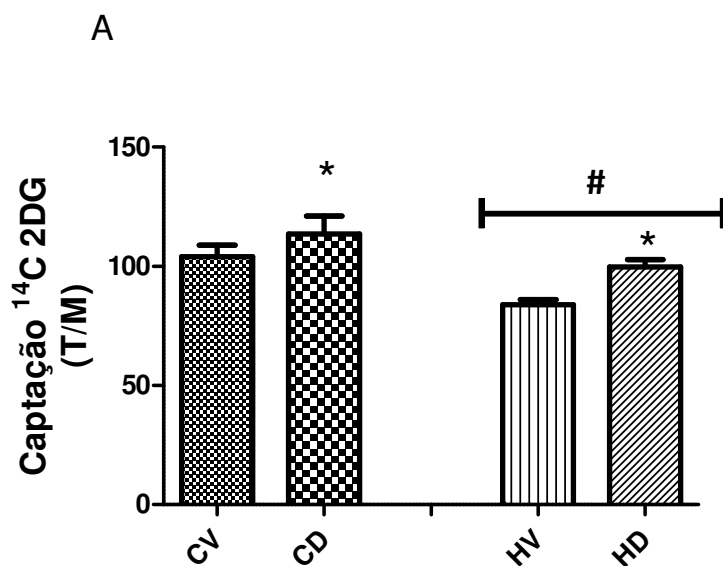
hipercalórica produziu um aumento de 24% na síntese de glicogênio quando comparado com o grupo controle veículo.

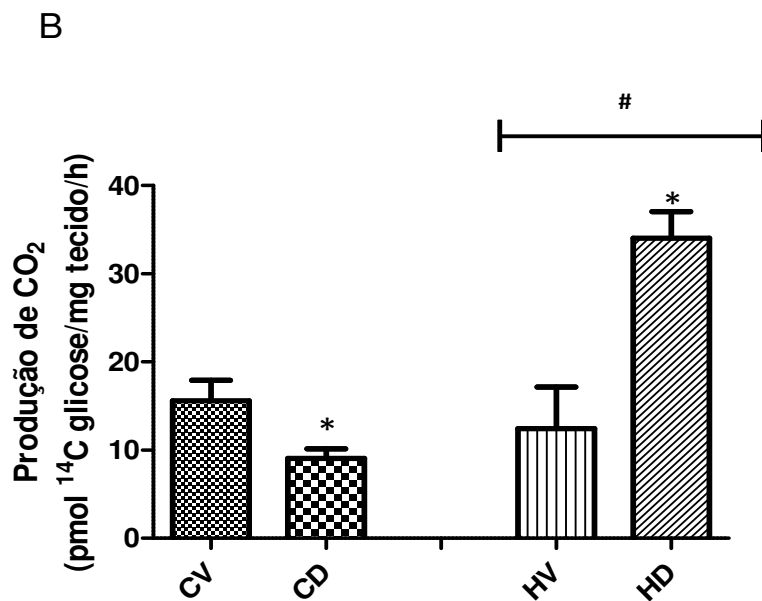


**Figura 17.** Síntese de glicogênio em fígado de ratos machos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA. A) A partir de glicose; B) A partir de alanina. Valores representam a média  $\pm$  EPM, n=6-7 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo *post-hoc* Tukey-Kramer. CV=Grupo Controle com Veículo; CD=

Grupo Controle com DHEA; HV=Grupo dieta hipercalórica com veículo; HD= Grupo dieta Hipercalórica com DHEA. \*Efeito do tratamento ( $p<0,05$ ). Houve interação estatisticamente significativa entre dieta e tratamento na síntese de glicogênio a partir de alanina ( $p=0,04$ ).

A fim de avaliar o efeito do tratamento e da dieta sobre o metabolismo do tecido adiposo, foi medida a captação e oxidação de glicose. Como observado na Figura 18A, a análise estatística mostrou efeito significativo da dieta e do tratamento. A dieta hipercalórica diminuiu a captação de glicose comparada ao grupo controle e os animais tratados com DHEA apresentaram um aumento na captação de glicose independente da dieta. Dados de oxidação de glicose no tecido adiposo são apresentados na Figura 18B. Os valores mostraram um efeito significativo da dieta e do tratamento e também a interação entre a dieta e o tratamento ( $p = 0,008$ ). O tratamento com DHEA diminuiu significativamente a oxidação de glicose no grupo controle e produziu um aumento no grupo com dieta hipercalórica.

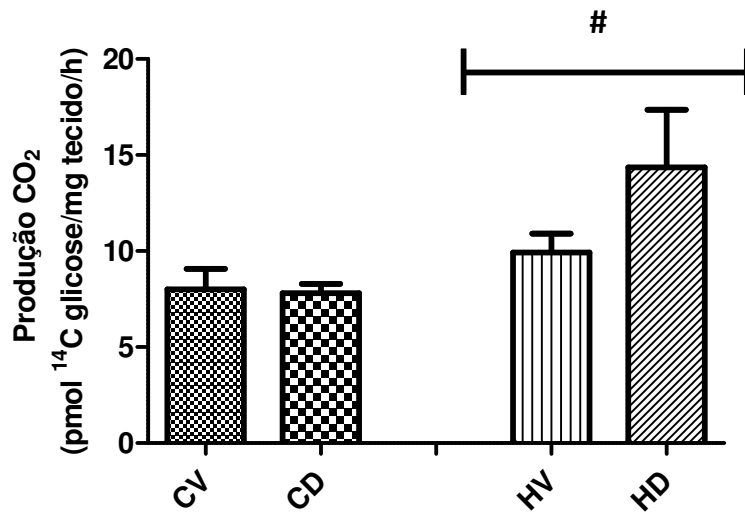




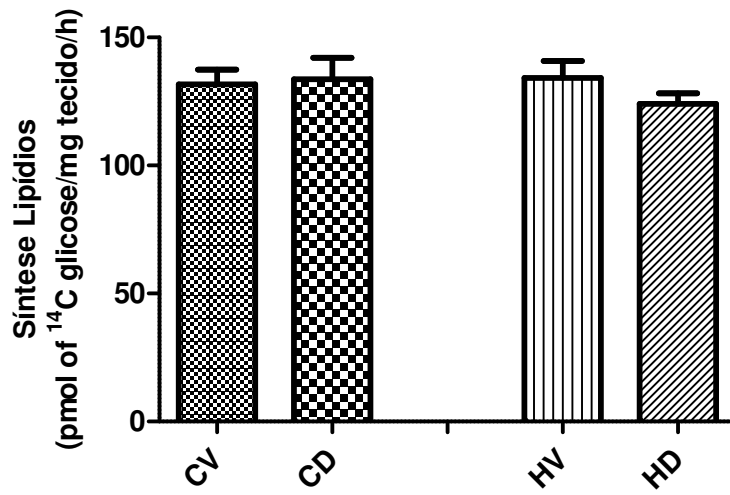
**Figura 18.** Metabolismo da glicose em tecido adiposo retroperitoneal de ratos machos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA. A) Captação de glicose; B) Produção de CO<sub>2</sub>. Valores representam a média ± EPM, n=6-7 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey-Kramer. CV=Grupo Controle com Veículo; CD= Grupo Controle com DHEA; HV= Grupo dieta Hipercalórica com veículo; HD= Grupo dieta Hipercalórica com DHEA. #Efeito da dieta (p< 0,05). \*Efeito do tratamento (p<0,05). Houve interação estatisticamente significativa entre dieta e tratamento na produção de CO<sub>2</sub> (p=0,008).

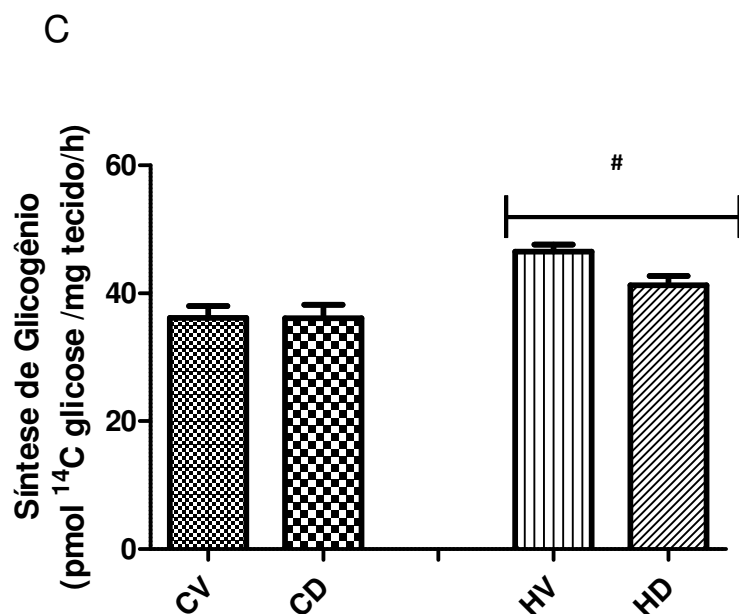
Para avaliar o efeito do tratamento e da dieta sobre o metabolismo muscular, foi medida a oxidação de glicose (Figura 19A), a síntese de lipídios (Figura 19B) e a síntese de glicogênio no músculo sóleo (Figura 19C). Na oxidação de glicose (produção de CO<sub>2</sub>) e síntese de glicogênio a análise estatística mostrou aumento significativo nos grupos com dieta hipercalórica comparado aos grupos com dieta controle. A síntese de lipídios não mostrou diferença significativa nem devido à dieta nem ao tratamento.

A



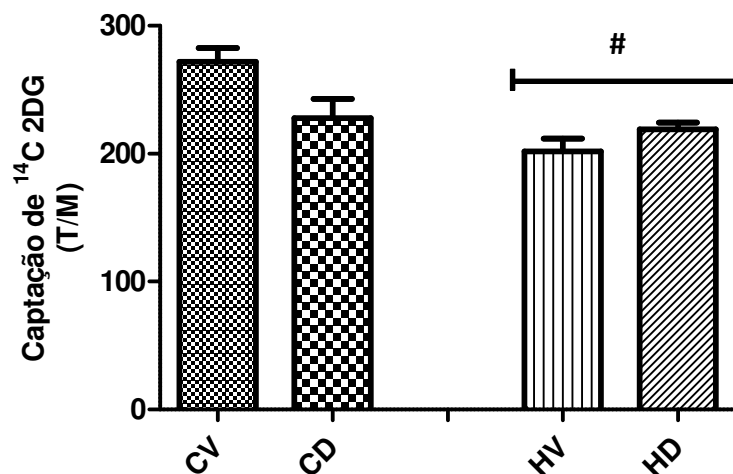
B





**Figura 19.** Metabolismo da glicose no músculo sóleo de ratos machos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA: A) Produção de CO<sub>2</sub>; B) Síntese de Lipídeos; C) Síntese de glicogênio. Valores representam a média ± EPM, n=6-7 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey–Kramer. CV=Grupo Controle com Veículo; CD= Grupo Controle com DHEA; HV=Grupo dieta Hipercalórica com veículo; HD= Grupo dieta Hipercalórica com DHEA. #Efeito da dieta (p< 0,003).

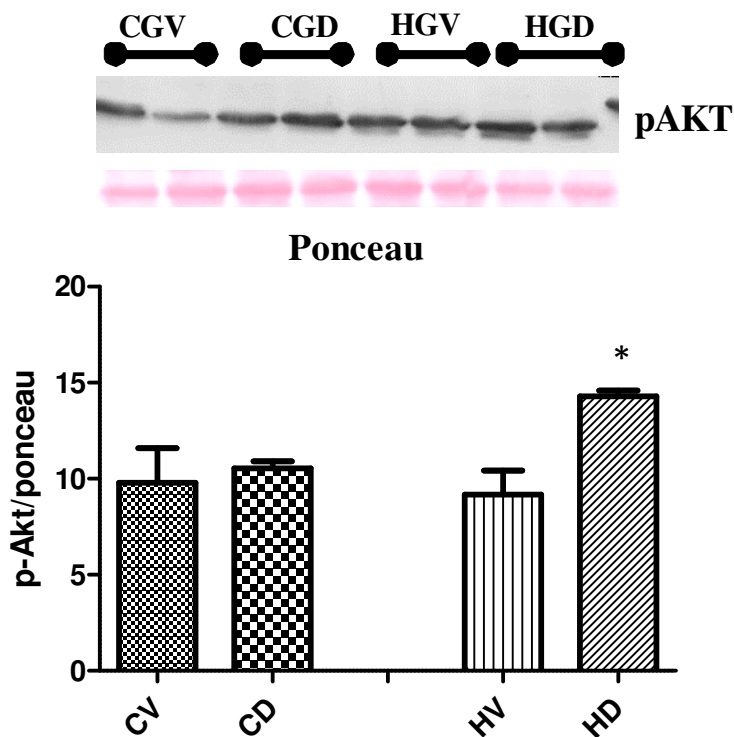
A Figura 20 mostra a captação de glicose no músculo gastrocnêmio. A análise estatística mostrou efeito da dieta e interação entre a dieta e o tratamento (p=0,008), sendo que os grupos com dieta hipercalórica apresentaram uma redução na captação de glicose (p<0,001).



**Figura 20.** Captação de glicose em gastrocnêmio de ratos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA. Valores representam a média  $\pm$  EPM, n=6-7 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey–Kramer. CV=Grupo Controle com Veículo; CD= Grupo Controle com DHEA; HV=Grupo dieta Hipercalórica com veículo; HD= Grupo dieta Hipercalórica com DHEA. # Efeito da dieta ( $p < 0,001$ ). Houve interação estatisticamente significativa entre dieta e tratamento ( $p=0,008$ ).

A quantidade da proteína pAKT no coração é apresentada na Figura 21. A análise estatística revelou que existe um efeito significativo do tratamento ( $p < 0,05$ ) e interação entre a dieta e tratamento ( $p < 0,05$ ), onde a DHEA causou um aumento de 55% na expressão proteica da pAKT no grupo com dieta hipercalórica.





**Figura 21.** Conteúdo de pAKT em curacao de ratos machos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA. Os valores representam a média  $\pm$  EPM,  $n=4-5$  animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey–Kramer. CV=Grupo Controle com Veículo; CD= Grupo Controle com DHEA; HV=Grupo dieta Hipercalórica com veículo; HD= Grupo dieta Hipercalórica com DHEA. \*Efeito do tratamento ( $p=0,01$ ). Houve interação estatisticamente significativa entre dieta e tratamento ( $p=0,046$ ).

Os parâmetros bioquímicos sanguíneos são apresentados na Tabela 1. Como esperado, os níveis de DHEA no soro foram significativamente maiores nos grupos CD e HD. Não houve diferença nos níveis de colesterol total e colesterol HDL. Os níveis de triglicérides aumentaram nos animais que receberam dieta hipercalórica e o tratamento com DHEA não teve efeito neste parâmetro. Os níveis de alanina-aminotransferase (ALT) apresentaram um efeito significativo da dieta e do tratamento e também foi observada interação significativa entre a dieta e o tratamento ( $p < 0,005$ ), onde a dieta hipercalórica provocou aumento nos níveis da enzima no soro, além disto, o tratamento com DHEA reduziu níveis de ALT no soro independente da dieta. Os animais com dieta

hipercalórica apresentaram níveis de ácido úrico no soro que eram maiores do que nos outros sem a dieta hipercalórica. O tratamento com DHEA reduziu níveis de ácido úrico em ambos os grupos. Os grupos tratados com DHEA têm níveis mais baixos de uréia independente da dieta que os animais receberam.

A Tabela 2 mostra o peso dos tecidos: tecido adiposo marrom, tecido adiposo branco retroperitoneal e fígado. O tecido adiposo marrom mostrou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) da dieta e do tratamento, mas sem a interação entre eles. A dieta hipercalórica aumentou o peso do tecido adiposo marrom e o tratamento com DHEA aumentou o peso no grupo com dieta controle e dieta hipercalórica. O peso do tecido adiposo branco e fígado foram maiores nos grupos com dieta hipercalórica e o tratamento com DHEA não reverteu este efeito.

**Tabela 4.** Peso dos tecidos (gramas) de ratos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA.

	CV	CD	HV	HD	ANOVA*
Adiposo Marrom	0,53±0,03	0,62±0,07	0,77±0,07	1,00±0,05	D, T
Adiposo Branco	11,04±1,60	14,91±2,03	21,18±2,56	25,18±2,07	D
Fígado	15,75±0,65	15,19±1,49	17,02±1,31	19,4±0,47	D

Os valores representam a média ± EPM de 12–15 animais por grupo. Os dados foram analisados através de ANOVA de duas vias seguida do *post-hoc* Tukey-Kramer \* $P < 0,05$ . D=efeito da dieta; T=efeito do tratamento; NS=não significativo. CV=Grupo Controle com Veículo; CD= Grupo Controle com DHEA; HV=Grupo dieta Hipercalórica com veículo; HD= Grupo dieta Hipercalórica com DHEA.

Os parâmetros bioquímicos teciduais são apresentados na Tabela 3. Da mesma forma, que no sangue, os triglicerídeos do fígado foram maiores nos animais que receberam a dieta hipercalórica e a DHEA não teve efeito neste parâmetro. O glicogênio hepático não apresentou diferença entre os grupos. O colesterol total do fígado mostrou efeito significativo da dieta e do tratamento com DHEA ( $p < 0,05$ ). Em relação ao conteúdo de glicogênio no coração, houve um efeito significativo do tratamento ( $p =$

0,006) e uma interação entre a dieta e o tratamento ( $p= 0,004$ ), sendo que o tratamento com DHEA aumentou a concentração de glicogênio cardíaco apenas no grupo com dieta hipercalórica.

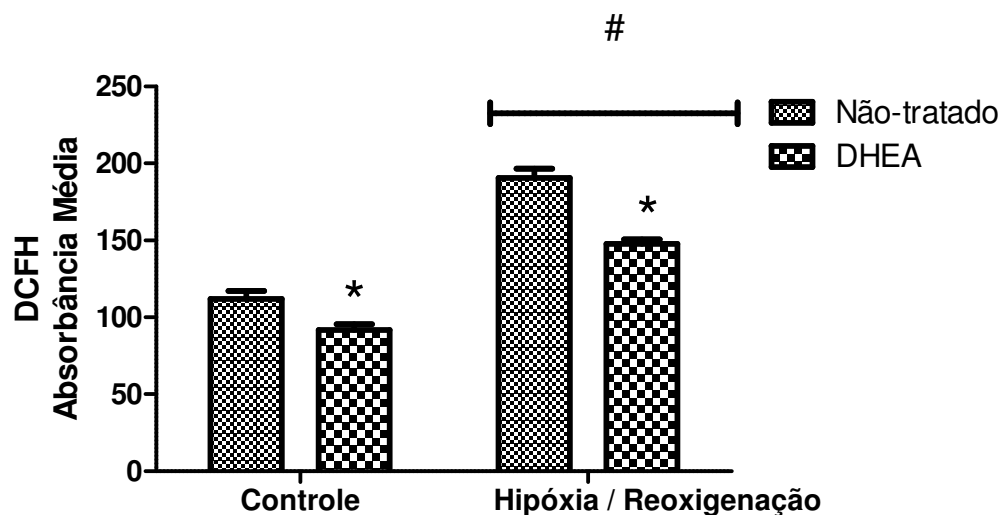
**Tabela 5.** Parâmetros teciduais de ratos tratados com dieta normocalórica ou hipercalórica e submetidos ou não ao tratamento com DHEA. Triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e concentração de glicogênio.

	<b>GV</b>	<b>GD</b>	<b>GV</b>	<b>GD</b>	<b>ANOVA*</b>
TG Fígado	1,73±0,04	1,75±0,02	1,96±0,09	1,83±0,11	D
CT Fígado	0,029±0,001	0,028±0,003	0,026±0,0006	0,021±0,001	D, T
Glicogênio Fígado	0,69±0,47	0,76±0,05	0,86±0,03	0,83±0,06	D
Glicogênio Coração	1,88±0,27	1,83±0,19	1,33±0,12	3,19±0,48	T,§

Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6–10 animais por grupo. Os dados foram analisados através de ANOVA de duas vias seguida do *post-hoc* Tukey-Kramer \* $P < 0,05$ . D=efeito da dieta, T=efeito do tratamento, NS=não significativo, §=interação entre dieta e tratamento. TG e CT são expressos em mg/g e o glicogênio em g%; CV=Grupo Controle com Veículo; CD= Grupo Controle com DHEA; HV=Grupo dieta Hipercalórica com veículo; HD= Grupo dieta Hipercalórica com DHEA.

### **4.3 Experimento 3: cultura de cardiomiócitos (H9C2) tratados com DHEA e submetidos à hipóxia/reoxigenação**

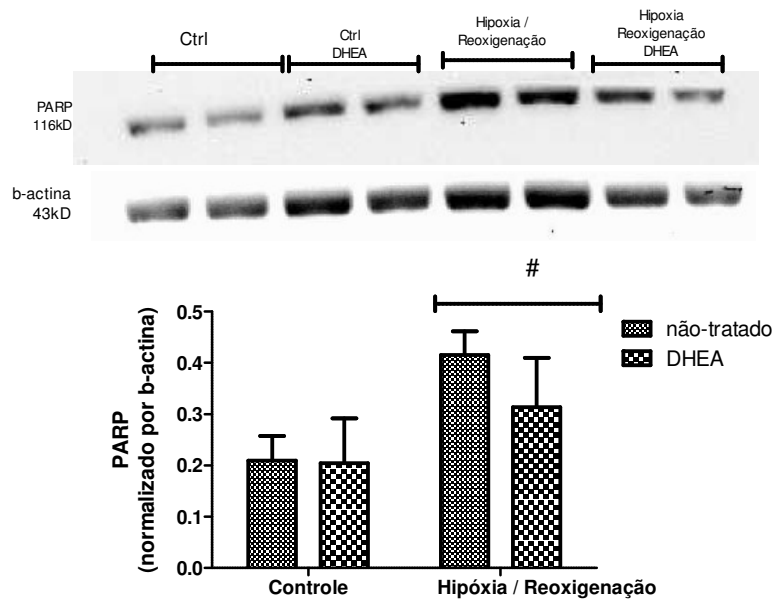
A linhagem de cardiomiócitos H9C2 foi exposta ao tratamento com DHEA ou veículo e submetidas ou não à hipóxia/reoxigenação. Após o tratamento, verificou-se a quantidade intracelular de EROs, a qual foi avaliada pelo método da diclorofluorecina diacetato (DCFH) (Figura 22). Neste parâmetro, observamos efeito da hipóxia e do tratamento com DHEA. Quando as células foram submetidas à hipóxia/reoxigenação houve aumento de EROs e o tratamento com DHEA reduziu os níveis de EROs intracelulares ( $p<0,001$ ). Nas células não submetidas à hipóxia, o tratamento com DHEA também diminuiu significativamente ( $p<0,001$ ) o conteúdo intracelular de EROs.



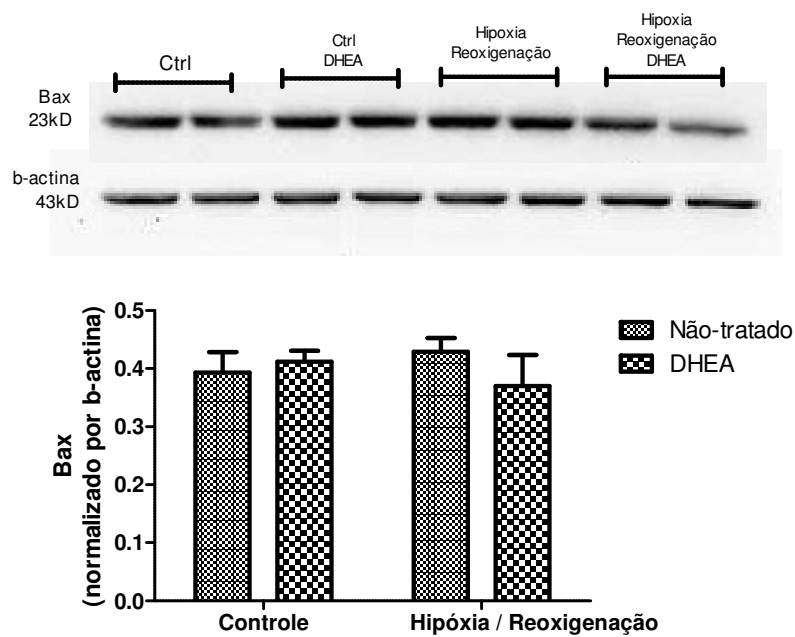
**Figura 22.** Produção de diclorofluorecina diacetato (DCFH) em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação e tratados ou não com DHEA.

Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM de 6 culturas por grupo. A análise de dados foi realizada através de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey-Kramer. #Efeito da Hipoxia-reoxigenação ( $p=0,001$ ); \*Efeito do tratamento ( $p=0,001$ ).

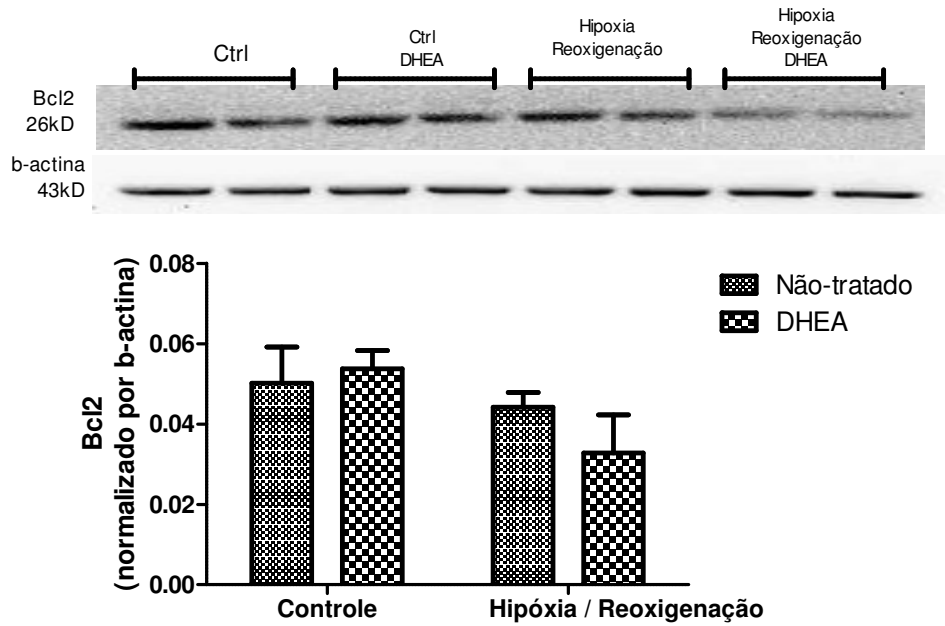
Como encontramos diferença significativa na formação intracelular de espécies reativas, decidimos verificar a expressão proteica de enzimas relacionadas com o estresse oxidativo, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e poli-ADP-ribose-polimerase (PARP) e a morte celular, a caspase3. A expressão da enzima Poli-ADP-ribose-polimerase (PARP) (Figura 23), foi maior nos grupos submetidos à hipóxia/ reoxigenação do que nos grupos controle ( $p=0,01$ ). Com relação à concentração das proteínas relacionadas com à apoptose, Bax e Bcl2, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos e na condição de hipoxia a qual as células foram submetidas (Figuras 24 e 25), entretanto quando se calculou a razão Bcl2x/Bax observou-se uma redução significativa da razão com a hipóxia e reoxigenação ( $p=0,03$ ) (Figura 26) e não houve efeito do tratamento.



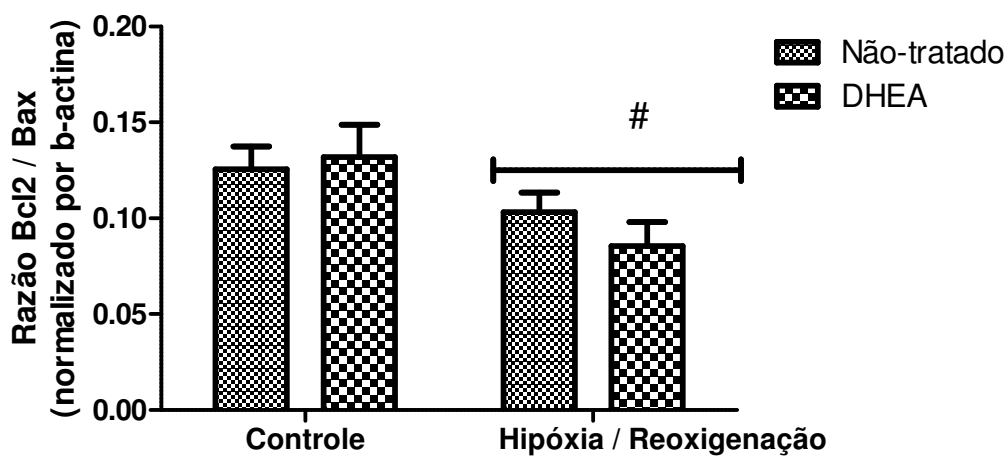
**Figura 23.** Conteúdo de PARP (poli-ADP-ribose-polimerase) em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação tratados ou não com DHEA. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM de 3 culturas por grupo. A análise de dados foi realizada através de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey-Kramer. # Efeito da Hipoxia-reoxigenação ( $p=0,01$ ).



**Figura 24.** Expressão da proteína Bax em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação tratados ou não com DHEA. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM de 3 culturas por grupo. A análise de dados foi realizada através de ANOVA de duas vias.



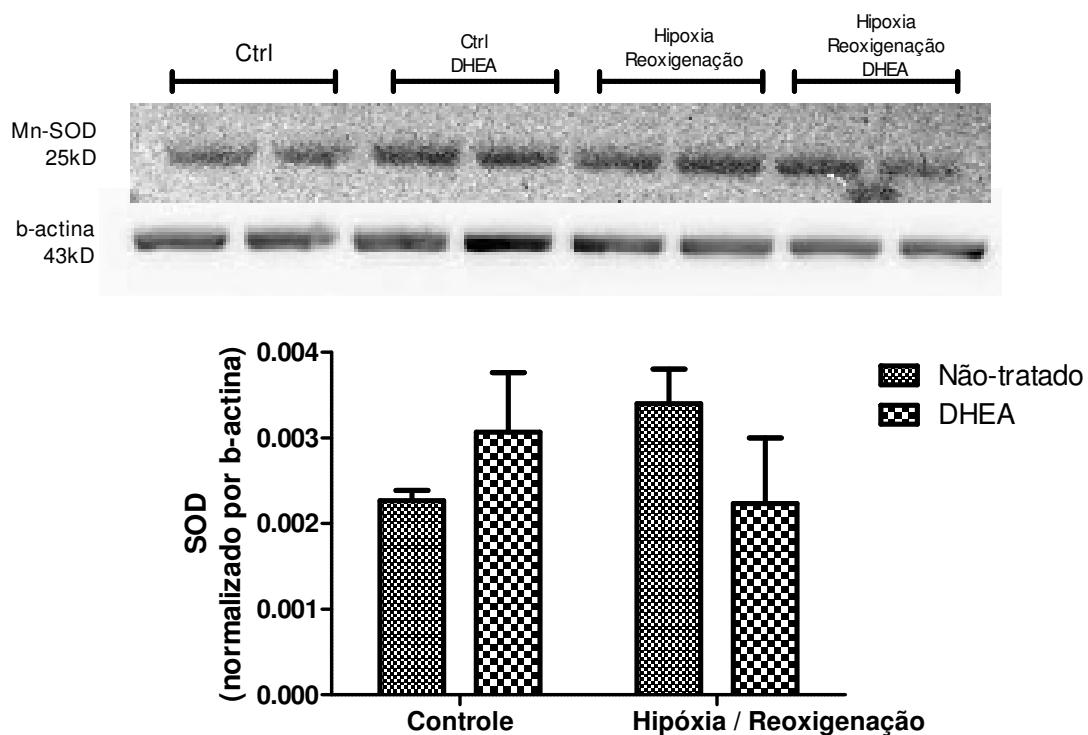
**Figura 25.** Expressão da proteína Bcl2 em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação tratados ou não com DHEA. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM de 3 culturas por grupo. A análise de dados foi realizada através de ANOVA de duas vias.



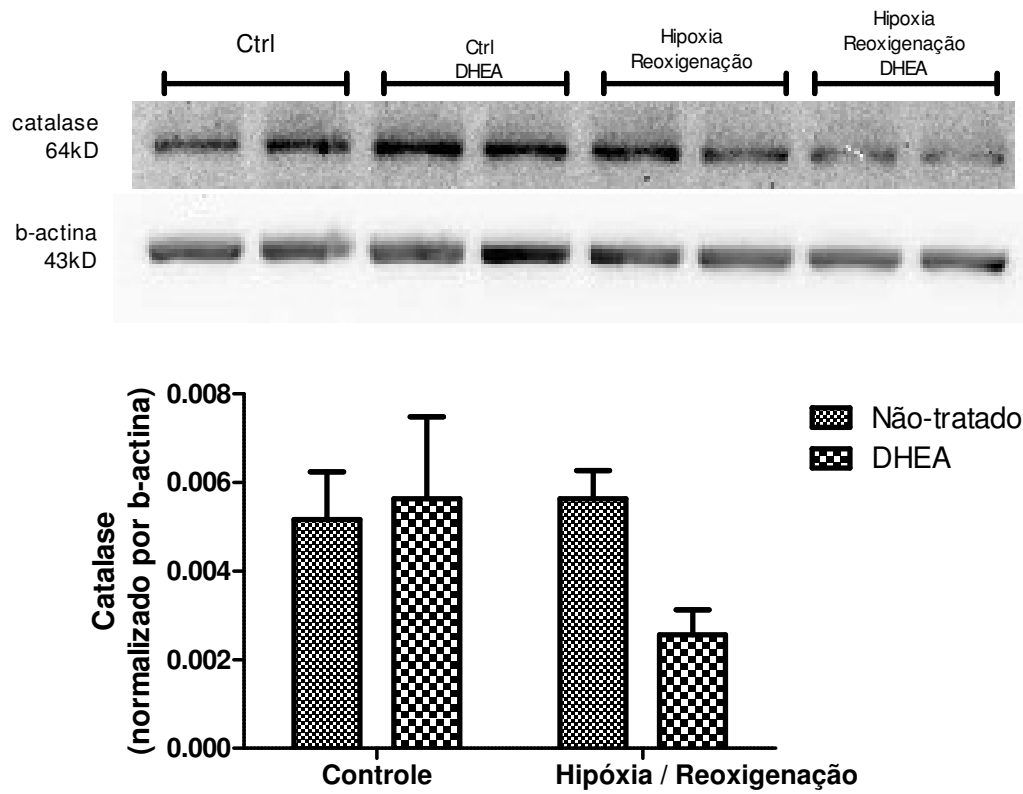
**Figura 26.** Relação da expressão Bcl/Bax em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação tratados ou não com DHEA. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM de 3 culturas por grupo. A análise de dados foi realizada através de ANOVA de 2 vias, seguida pelo teste de Tukey-Kramer. #Efeito da Hipoxia-reoxigenação ( $p=0,03$ ).

Com relação à expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (Figuras 27 e 28) a análise estatística não mostrou diferença

entre os tratamentos e a condição à qual as células foram submetidas. Entretanto, apesar de não ser significativo na análise estatística (ANOVA de duas vias), verificou-se uma redução na expressão da SOD e da CAT de 37% e 50%, respectivamente, no grupo submetido à hipóxia tratado com DHEA. Na figura 29 está representada a expressão da proteína caspase-3, onde se observa uma diminuição significativa no grupo hipóxia/reoxigenação tratado com DHEA, entretanto não se encontrou diferença significativa em relação à condição de normóxia e hipóxia.

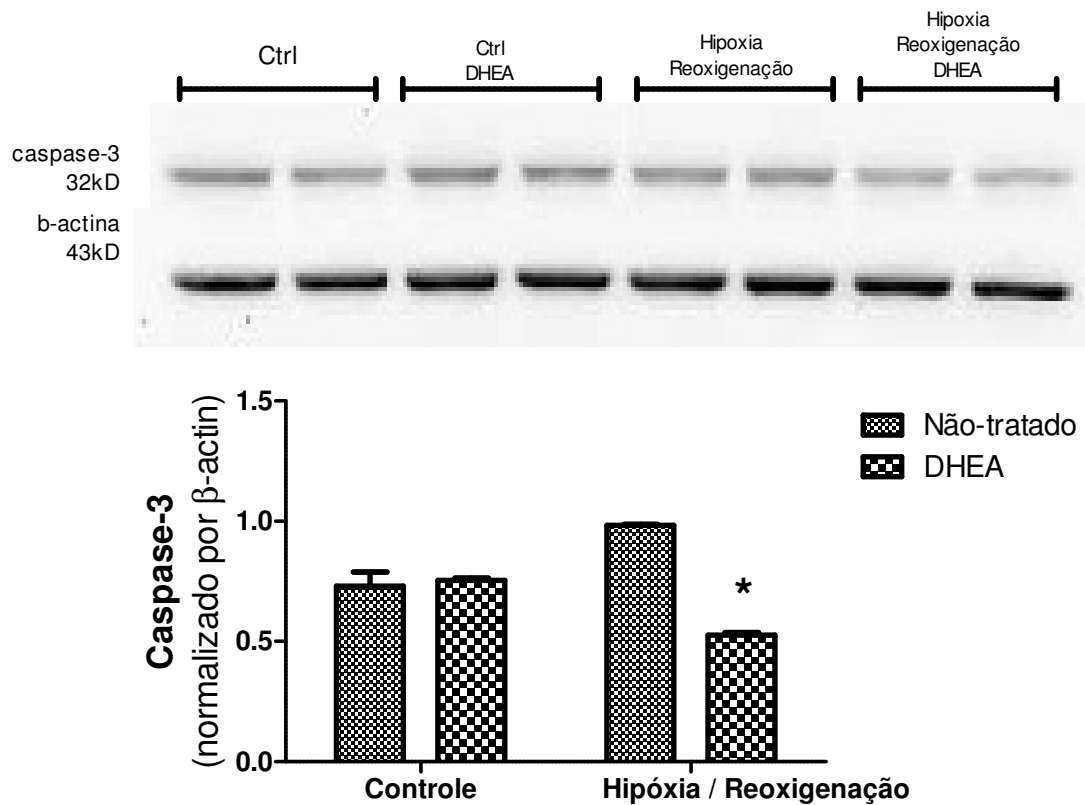


**Figura 27.** Expressão da enzima superóxido dismutase (SOD) em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação tratados ou não com DHEA. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM de 3 culturas por grupo. A análise de dados foi realizada através de ANOVA de duas vias.



**Figura 28.** Expressão da enzima catalase (CAT) em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação tratados ou não com DHEA. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM de 3 culturas por grupo. A análise de dados foi realizada através de ANOVA de duas vias.





**Figura 29.** Expressão da proteína caspase em cardiomiócitos H9C2 submetidos ou não à condição de hipóxia/reoxigenação tratados ou não com DHEA. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM de 3 culturas por grupo. A análise de dados foi realizada através de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey-Kramer. \*Efeito do tratamento ( $p < 0,001$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Os protocolos experimentais de forma geral têm utilizado como cobaias ratos machos. A grande maioria de estudos que abordam os efeitos de tratamentos específicos sobre o metabolismo utilizaram ratos machos e alguns outros, separadamente, utilizaram somente fêmeas. Entretanto, estudos comparando o metabolismo de machos e fêmeas são mais raros. Nosso estudo se propôs a investigar o metabolismo de ratos machos e fêmeas, submetidos ou não, ao tratamento com DHEA. Além disto, neste trabalho também foram utilizadas diferentes doses, em grupos de ratos machos e fêmeas

simultaneamente. Os conhecimentos obtidos a partir destes experimentos podem contribuir para um melhor entendimento do metabolismo destes (machos e fêmeas) e como o metabolismo responde a um tratamento específico a DHEA.

Nos anos 80 diversos estudos foram realizados, principalmente com animais, mas também com humanos, sugerindo para a DHEA efeitos benéficos como anti - obesidade, anti-inflamatório e anti-envelhecimento (Traish, Kang, *et al.*, 2011; Rutkowski *et al.*, 2014). Isto fez surgir a hipótese de um ‘*super-hormônio*’. Durante muitos anos a DHEA foi amplamente comercializada como suplemento dietético (Rutkowski *et al.*, 2014). Em humanos idosos a DHEA mostrou efeito imunomodulador (Rutkowski *et al.*, 2014), melhorando a sensação de bem-estar físico e psicológico (Valenti *et al.*, 2004; Davis, Panjari e Stanczyk, 2011), a força muscular (Kostka *et al.*, 2000), a densidade mineral óssea (Ravaglia *et al.*, 1997) e a libido (Reiter *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2005), bem como redução da gordura corporal e da atrofia da pele relacionada à idade por estímulo da produção de procolágeno (Rutkowski *et al.*, 2014). A DHEA também tem sido utilizada em estados de insuficiência adrenal, onde o tratamento com o hormônio restaura níveis plasmáticos de DHEA e de seu sulfato bem como de androstenediona (Buvat, 2003). A DHEA já foi intensamente utilizada como recurso ergogênico, atualmente aparece na lista de substâncias proibidas no esporte da *World Anti-Doping Agency* (WADA) (Pirnay, 2001; Liao *et al.*, 2013; Collomp *et al.*, 2015; Thevis *et al.*, 2015). Porém nos EUA a comercialização da DHEA é liberada. No Brasil a comercialização da DHEA é proibida, no entanto na internet encontram-se anúncios de venda de DHEA.

Existem diferenças fenotípicas, anatômicas, hormonais e químicas na metabolização de substratos quando avaliamos os mamíferos e diferenças entre as espécies (Smith, Marks e Lieberman, 2007; Nelson e Cox, 2011). Particularmente em

humanos, o metabolismo energético encontra-se em sintonia com as funções fisiológicas específicas de cada sexo e que refletem necessidades exclusivas (por exemplo, nas fêmeas preparo para gestação e lactação, o que não acontece nos machos) (Varlamov, Bethea e Roberts, 2014). Estas diferenças muitas vezes são atribuídas apenas à ação dos hormônios sexuais, incluindo estrogênio e progesterona em fêmeas e androgênios nos machos (Navarro *et al.*, 2015), mas ultimamente os cromossomos sexuais têm sido relacionados diretamente ao metabolismo (Varlamov, Bethea e Roberts, 2014). Estudos realizados por Noonan e Banks (2000) em camundongos com diabetes tipo II induzida pela dieta, revelaram diferenças ligadas ao sexo em relação à concentração plasmática de glicose e insulina, bem como na excreção de eletrólitos pelos rins e inclusive proteínas totais. Além disso, no mesmo estudo foi constatada interação entre dieta e sexo, que levou a diferenças significativas no peso (em gramas) dos rins. Fêmeas apresentaram valores de peso médio dos rins inferiores aos rins de machos em animais controle e em dieta (Noonan e Banks, 2000).

Em laboratório, são realizados estudos de metabolismo onde os modelos utilizados são coelhos (Gordon, Bush e Weisman, 1988; Aragno *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2015; Takeda *et al.*, 2015), ratos (Cleary *et al.*, 1984; Akiyama *et al.*, 1996; Boccuzzi *et al.*, 1997; Afanas'ev *et al.*, 2013; Carmean *et al.*, 2013) e camundongos (Arcari *et al.*, 2009; Heber *et al.*, 2014; Irimia *et al.*, 2015; Mathews *et al.*, 2015) que, na maioria das vezes, são machos. Enquanto o papel do gênero na biologia é indiscutível, sua consideração em pesquisas científicas é assunto relativamente recente. Atualmente, as diferenças sexuais têm tido um papel mais relevante nos estudos de metabolismo (Fuller e Insel, 2014; Shah, McCormack e Bradbury, 2014). Link e cols avaliaram o efeito cromossômico (X e Y) sobre parâmetros metabólicos e verificaram que eles controlam a adiposidade, o comportamento alimentar, a produção de lipídeos

no fígado e a homeostase da glicose de maneira independente dos esteróides gonadais (Link *et al.*, 2013). Até mesmo estudos com células podem sofrer influência do sexo (Clayton e Collins, 2014; Danska, 2014; Fuller e Insel, 2014). Isto porque um fator fundamental que contribui para as diferenças metabólicas entre machos e fêmeas encontra-se no interior do núcleo de cada célula, o cromossomo sexual complementar, X e Y (Link *et al.*, 2013). O complemento carregado pelo cromossomo sexual de células femininas e masculinas impõe várias diferenças genéticas, por exemplo, células que possuem o complemento cromossômico X (sexo feminino) não expressam cerca de 78 genes codificadores de proteínas e, conseqüentemente, não expressam um número desconhecido de RNAs não codificantes que estão presentes no cromossomo Y (Payer e Lee, 2008). Até mesmo o controle da homeostase energética pelo SNC é diferente em machos e fêmeas, tanto em animais saudáveis quanto em doentes (Shi *et al.*, 2008; Lovejoy e Sainsbury, 2009; Shi e Clegg, 2009; Arnetz, Ekberg e Alvarsson, 2014; Henderson, 2014). Mulheres possuem maior percentual de gordura corporal, mais tecido adiposo subcutâneo, tanto abdominal quanto glúteo femoral e menos tecido adiposo visceral (Goodpaster *et al.*, 2005; Yim *et al.*, 2008) do que homens. Mulheres, geralmente, são mais baixas e pesam menos, o tamanho corporal e a massa livre de gordura são determinantes do gasto energético, assim, mulheres têm gasto energético menor do que os homens (Tooze *et al.*, 2007).

Durante muito tempo a DHEA foi considerada apenas como um pró-hormônio, principalmente porque nenhum receptor específico para ela foi encontrado, desta forma, ela poderia exercer tanto um efeito androgênico quanto estrogênico de forma indireta, após a conversão periférica em pequenas quantidades de testosterona, estradiol ou progesterona (Buvat, 2003). Devido a este efeito estrogênico e androgênio fraco, a DHEA tem sido utilizada em estudos de infertilidade (Narkwichean *et al.*, 2014) e

reposição hormonal na insuficiência adrenal (Morales *et al.*, 1994; Allolio e Arlt, 2002; Buvat, 2003; Racaru-Honciuc e Betea, 2014; Rutkowski *et al.*, 2014). Em homens, ao contrário das mulheres, ensaios clínicos têm mostrado pouco efeito benéfico com a reposição de DHEA (Buvat, 2003).

Assim, neste estudo, foi avaliado o metabolismo de carboidratos (glicose) e de proteínas (leucina) no fígado, no tecido adiposo e no músculo de ratos machos e fêmeas ovariectomizadas, submetidos ou não ao tratamento com DHEA em diferentes doses (10, 25 e 50 mg por kg de peso corporal). Como o método de administração de DHEA na forma de *pellets* foi utilizado pela primeira vez em nosso laboratório, a prioridade inicial foi, determinar os níveis séricos de DHEA e validar o método de administração do hormônio. Conforme mostrado na Figura 9A, este método mostrou-se efetivo em aumentar os níveis séricos de DHEA durante 30 dias. Os níveis séricos de DHEA aumentaram em todas as doses testadas, tanto em machos quanto em fêmeas ovariectomizadas. É importante destacar que os níveis basais de DHEA nas fêmeas ovariectomizadas foram 63% maiores do que aqueles encontrados nos machos (0,18 pg/mL *versus* 0,11 pg/mL, respectivamente), mas não houve diferença significativa entre eles. Como a DHEA pode ser convertida em testosterona nas células de mamíferos (Liu *et al.*, 2013), a concentração sérica de testosterona foi avaliada nos machos e nas fêmeas ovariectomizadas (Figura 9B). Observou-se que os ratos machos e fêmeas ovariectomizadas e tratados com DHEA não apresentaram níveis aumentados de testosterona, porém foi detectada diferença entre os sexos, sendo encontrados níveis mais altos de testosterona nos machos, conforme o esperado. Em estudo realizado com ratos Wistar fêmeas não ovariectomizadas, a administração de DHEA por gavagem, uma única dose de 25mg/kg resultou em aumento significativo na testosterona livre plasmática no período logo após a administração (3-6h), retornando ao valor basal após

este período (Zhou *et al.*, 2015). Em humanos, atletas ou não, a administração de DHEA não alterou significativamente os níveis de testosterona total no sangue (Dehennin *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2013).

O passo seguinte foi avaliar alguns parâmetros metabólicos no fígado (Figura 10), no tecido adiposo retroperitoneal (Figura 11) e no músculo esquelético (Figuras 12 e 13), em ratos machos e fêmeas ovariectomizadas, submetidos ao tratamento com diferentes doses de DHEA.

O fígado é um órgão central no metabolismo de substratos em vertebrados e tem papel importante em muitos processos fisiológicos, como na síntese de proteínas plasmáticas, na homeostase da glicose, na síntese de lipídeos, no metabolismo de xenobióticos, bem como na utilização cíclica de vários nutrientes (Ghafoory *et al.*, 2013). Ele também responde às variações metabólicas de acordo com a concentração de hormônios circulantes (Nelson e Cox, 2011).

No presente estudo, os animais controle (sem tratamento com DHEA) apresentaram oxidação de glicose no fígado 53% maior nos machos do que nas fêmeas e não houve efeito do tratamento nos demais grupos (Figura 10A). O fígado desempenha um papel crucial no controle da homeostase da glicose, (Ghafoory *et al.*, 2013), assim, a glicose pode ser completamente oxidada, originando 6 moléculas de CO<sub>2</sub>, entrar para a via das pentoses originando ribose, CO<sub>2</sub> e nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH), ou para a síntese de glicogênio ou ainda na rota da síntese de lipídeos (Nelson e Cox, 2011). Quando a necessidade de ATP está diminuída ou a oferta de substrato está aumentada, o destino preferencial da glicose é gerar intermediários de armazenamento de carboidratos que darão origem ao glicogênio, e também estocar a energia excendente na forma de lipídeos (Ghafoory *et al.*, 2013). O glicogênio, em situações de jejum, pode ser rapidamente mobilizado a fim de manter os níveis de

glicose no sangue dentro de limites homeostáticos (Ghafoory *et al.*, 2013). A oxidação completa da glicose rende seis moléculas de CO<sub>2</sub> ainda no ciclo do ácido tricarbóxico (Nelson e Cox, 2011). Para a rota biossintética de lipídeos, é necessário não apenas o combustível (os carbonos da glicose), mas também moléculas redutoras, neste caso, NADPH (Nelson e Cox, 2011). A via das pentoses (geradora de NADPH) rende menos CO<sub>2</sub> (um por molécula redutora). Quando a glicose é destinada para a síntese de glicogênio, o rendimento em CO<sub>2</sub> é nulo (Nelson e Cox, 2011).

É interessante observar que machos e fêmeas apresentaram diferenças nas vias de utilização hepática da glicose. Nos machos a via preferencial parece ser a rota biossintética de lipídeos (Figura 10B) e também a oxidação completa da glicose (Figura 10A). Estudo realizado com mitocôndrias isoladas de fígado de ratos machos tratados com DHEA resultou na estimulação da atividade respiratória e aumento do potencial energético (Patel e Katyare, 2007). Por outro lado, nas fêmeas, a via preferencial parece ser a síntese de glicogênio (Figura 10C). Os estudos comparando o metabolismo de substratos específicos, como glicose e aminoácidos, entre machos e fêmeas são poucos, o que torna difícil a discussão destes dados. Kokavec (2015) comparando o efeito da administração de sacarose em biomarcadores do metabolismo energético em homens e mulheres com enxaqueca verificou que o nível de insulina no soro era maior nas mulheres e a razão glicose/insulina era maior em homens, concluindo que o efeito da sacarose nos biomarcadores do metabolismo energético em machos e fêmeas não é igual (Kokavec, 2015). Além disso, nas fêmeas houve efeito do tratamento com uma redução na síntese de glicogênio (Figura 10C) nas doses maiores (25 e 50mg/kg).

Em ovários de fêmeas (ratos wistar), o tratamento com DHEA (6 mg/100 mg de peso corporal durante 25 dias) induziu aumento na fosforilação da proteína glicogênio sintase cinase-3 (GSK3β) em serina, a qual fosforila e diminui a atividade da enzima

glicogênio sintase (Chen *et al.*, 2009). Ratos Sprague-Dawley que foram submetidos à injúria de carótida e tratados durante 1 semana com DHEA (3 mg/kg) apresentaram diminuição no remodelamento vascular da carótida que foi correlacionado com resultados encontrados num estudo em células hCASMCs onde o tratamento de DHEA na dose de 100  $\mu\text{mol/L}$  durante 48 horas promoveu um aumento na atividade da GSK3 $\beta$  (Bonnet *et al.*, 2009). Nas fêmeas ovariectomizadas, a DHEA diminuiu a síntese de lipídeos no fígado a partir da glicose nas três doses utilizadas (Figura 10B).

Como observado no fígado (Figura 10A), a captação de glicose no tecido adiposo apresentou diferenças significativas entre os sexos sem efeito do tratamento com DHEA (Figura 11A). Nas fêmeas ovariectomizadas e sem tratamento, a captação de glicose foi 42% maior do que nos machos e o tratamento com DHEA reduziu de forma significativa a captação de glicose apenas nas fêmeas. O tecido adiposo é o maior reservatório de energia corporal (Lafontan e Langin, 2009; Peinado *et al.*, 2010; Nelson e Cox, 2011)e, neste tecido, a glicose captada pode ser oxidada até CO<sub>2</sub> ou pode entrar para a via biossintética de lipídeos (Nelson e Cox, 2011). Já foi referido anteriormente neste texto, que a DHEA possui efeito antiobesidade, neste sentido, uma menor captação pode representar menor síntese de lipídeos, o que é consistente com esse efeito antiobesidade da DHEA (Figura 11A).

É extensamente estudado e reconhecido o papel dos hormônios sexuais no metabolismo (Cuatrecasas *et al.*, 1975; Elbers *et al.*, 1999; Dubrovsky, 2005; Riant *et al.*, 2009; Fukai *et al.*, 2011; Kelly e Jones, 2015). O estrogênio tem um papel importante na regulação metabólica e na deposição de gordura corporal. Os baixos níveis deste hormônio que ocorrem na menopausa são associados com a redução da gordura corporal subcutânea, por outro lado, transexuais (homens) que recebiam terapia com estrogênio aumentaram a massa de gordura corporal (Elbers *et al.*, 1999; Toth *et*



*al.*, 2000a; b). Por outro lado, em homens e mulheres que receberam reposição com DHEA (50mg/dia) durante 6 meses, houve efeito diferente em homens e mulheres; nas mulheres houve aumento de massa muscular magra, efeito androgênico, enquanto que nos homens houve diminuição da massa gorda (Weiss *et al.*, 2011).

Músculo e tecido adiposo contribuem muito para a manutenção da glicemia (Defronzo *et al.*, 1981; Defronzo, 2009), e, da mesma forma que no tecido adiposo, a captação de glicose no músculo sóleo (Figura 12) dos animais sem tratamento foi 40% maior nas fêmeas ovariectomizadas e neste parâmetro a DHEA não teve efeito (Figura 12). No levantamento bibliográfico não foram encontrados artigos que relacionem DHEA e captação de glicose em tecido muscular. Entretanto, apesar de se tratar de células de outro tecido, foi encontrado um artigo que avaliou a captação de glicose em tecido de pulmão de fetos de ratos, na ausência de hormônios sexuais, e, nestas condições, a captação de glicose foi 37% maior em tecido pulmonar de fêmeas do que de machos (Hart, Flozak e Simmons, 1998). Também já foi descrito que os efeitos potencialmente prejudiciais da obesidade e do diabetes no metabolismo da glicose em miocárdio, são mais pronunciados nos homens do que em mulheres (Peterson *et al.*, 2015).

Avaliou-se também o efeito do tratamento com DHEA sobre o metabolismo da leucina no músculo sóleo (Figuras 13 A, B e C). Tanto a oxidação quanto a síntese de proteínas e de lipídeos a partir de leucina foram diferentes entre os sexos, mas o tratamento com DHEA não produziu alterações significativas. Nos animais controle, a oxidação de leucina nas fêmeas foi menor do que nos machos (Figuras 13A). A conversão de leucina a lipídeos e proteínas (Figuras 13B e 13C) nos animais controle, foi 49% e 81% significativamente menores nas fêmeas ovariectomizadas do que nos machos, respectivamente, e não houve efeito do tratamento com DHEA neste

parâmetro. Cerca de 80% da leucina é usada para a síntese proteica, enquanto o restante é convertido a  $\alpha$ -cetoisocaproato e  $\beta$ -hidroximetilbutirato no músculo esquelético (Duan *et al.*, 2015).

A DHEA é um hormônio androgênio fraco, que intracelularmente pode ser convertido a outros esteróides mais potentes, como a testosterona (Liu *et al.*, 2013; Kelly e Jones, 2015; Zhou *et al.*, 2015). Alterações no estado funcional do sistema endócrino podem ocorrer ao longo da vida, levando à deficiência androgênica em homens, à diminuição na ativação do eixo-hipófise-adrenal com diminuição da secreção de DHEA, além da diminuição do GH que, finalmente levam à perda de massa muscular (Racaru-Honciuc e Betea, 2014). Em nosso estudo, a menor síntese de proteínas em fêmeas com relação aos machos provavelmente pode estar relacionada à presença da testosterona, que naturalmente é maior em machos, e é bem descrito na literatura a relação da testosterona com o aumento da massa muscular, ou seja, seu efeito androgênico (Traish, Miner, *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos com este trabalho reforçam a importância da realização de estudos com a utilização de machos e fêmeas. A maioria dos resultados obtidos mostrou diferenças significativas entre machos e fêmeas ovariectomizadas submetidos ao tratamento com DHEA e nem sempre foram observados efeito do tratamento com DHEA. Como na maioria dos estudos clínicos utilizando DHEA, as fêmeas mostraram serem mais sensíveis ao tratamento com DHEA.

Outros estudos que avaliaram o metabolismo em machos e fêmeas encontraram diferenças na metabolização dos diferentes substratos entre ambos (Catala-Niell *et al.*, 2008; Gomez-Perez *et al.*, 2008; Kob *et al.*, 2015). Ratos machos e fêmeas que foram submetidos a uma dieta hiperlipídica mostraram diferenças no ganho de massa muscular

e ganho de massa gorda. Ratos machos tiveram maior eficiência energética e aumento de adiposidade (Kob *et al.*, 2015).

Considerando os efeitos metabólicos encontrados, optou-se por estudar o efeito da DHEA em ratos submetidos a uma dieta hipercalórica à longo prazo, mas nesse caso o estudo foi realizado apenas com machos devido à dificuldade operacional de trabalhar com um grande número de animais durante tanto tempo, além dos custos e da questão ética do uso de número elevado de animais no estudo.

Cada vez mais se tem investigado o efeito da DHEA em animais tratados com dietas tipicamente ocidentais, onde encontramos muitas calorias e poucos nutrientes. A dieta ocidental tem como característica principal ser rica em quilocalorias e pobre em nutrientes essenciais e ao mesmo tempo com baixos níveis de atividade física, a chamada transição nutricional, e assim tem levado a um aumento na incidência/prevalência de obesidade (Popkin, 1994; 2003). No presente estudo, os ratos que receberam uma dieta hipercalórica durante 23 semanas mostraram alterações em alguns parâmetros bioquímicos, na ingestão calórica e no peso corporal.

A ingestão da dieta hipercalórica "*ad libitum*" aumentou a ingestão calórica diária (Figura 14A) e a deposição de gordura retroperitoneal (Tabela 2). Vários estudos têm mostrado que existe uma relação entre o aumento da disponibilidade e do consumo de dietas hipercalóricas e palatáveis combinado com um estilo de vida sedentário e um aumento da incidência de obesidade e suas comorbidades (Woods *et al.*, 2004; Koopman *et al.*, 2013; Koopman *et al.*, 2014). O peso corporal é controlado por mecanismos homeostáticos, mas quando humanos ou animais são alimentados com dietas hipercalóricas/hiperlipídicas este equilíbrio é rompido e ambos se tornam obesos (Woods *et al.*, 2003; Stottrup *et al.*, 2006).

Neste estudo, o tratamento com DHEA foi incapaz de reverter o efeito do aumento da ingestão energética total (Figura 14A) e o ganho de peso (Figura 14B), causados pela dieta hipercalórica. Estudos experimentais que utilizaram tratamento com DHEA “*in vivo*” mostraram efeitos na diminuição da ingestão calórica (Cleary e Zisk, 1986; Tagliaferro *et al.*, 1986; Mohan *et al.*, 1990), do peso corporal e da deposição de gordura (Weiss *et al.*, 2011). Ratos magros e obesos tratados com DHEA na dieta (6 g por kg de dieta) durante seis semanas mostraram uma redução de peso corporal e na deposição de gordura (Cleary e Zisk, 1986; Tagliaferro *et al.*, 1986; Mohan *et al.*, 1990).

Avaliação do peso dos tecidos (Tabela 2) mostrou que os pesos do tecido adiposo branco e do fígado aumentaram com a dieta hipercalórica, mas a DHEA não reverteu esse efeito. Villareal e Holloszy (2004) avaliaram o efeito da reposição diária de 50 mg de DHEA sobre quantidade de gordura abdominal em idosos humanos e encontrou uma redução na área da gordura visceral no grupo tratado com DHEA (Villareal e Holloszy, 2004). Sabe-se que dietas hipercalóricas promovem aumento do peso do fígado por acúmulo de lipídios nesse tecido que ao final produz esteatose hepática (Buettner *et al.*, 2004). Em nosso estudo, também foi observado aumento do peso do fígado promovido pela dieta hipercalórica e, o tratamento com DHEA não reduziu o peso do fígado.

No presente estudo, o peso do tecido adiposo marrom (Tabela 2) apresentou efeito significativo da dieta e do tratamento, sendo que os animais com dieta hipercalórica e tratados com DHEA mostraram maior peso do tecido adiposo marrom. Não foi avaliada a quantidade de proteínas UCPs, mas o aumento de peso do tecido adiposo marrom poderia ser um indicativo de uma atividade aumentada neste tecido. Encontramos redução da glicemia (Figura 15 e Tabela 1) com o tratamento com DHEA

em ratos submetidos à dieta hipercalórica, e isto pode estar relacionado com o aumento da oxidação de glicose no tecido adiposo marrom produzindo calor. Yamada e colegas (1991) mostraram que o tratamento de animais com DHEA ativa o fator de proliferação de peroxisoma (PPAR), PPARs estimulam UCPs, proteínas desacopladoras (Kelly *et al.*, 1998). A UCP-1 está presente exclusivamente em tecido adiposo marrom (Jacobsson *et al.*, 1985). O tratamento com DHEA (0,5% peso/peso na dieta), de ratos Long Evans Otsuka obesos, aumentou os níveis de UCP1 (Ryu *et al.*, 2003).

A ingestão de alimentos hipercalóricos por tempo prolongado pode prejudicar a tolerância à glicose (Kretschmer *et al.*, 2005). O músculo e o tecido adiposo são responsáveis por 70-80% da captação de glicose estimulada por insulina e são importantes tecidos-alvo de ação deste hormônio (DeFronzo, 2009). Em estados iniciais de resistência à insulina, a sua sinalização está alterada e não há prejuízo na captação de glicose nestes tecidos (DeFronzo, 2009). Entretanto, em estágios avançados de resistência à insulina pode ocorrer hiperglicemia, como ocorreu nos animais tratados com dieta hipercalórica (Figura 15, Tabela 1).

Estudo realizado com seres humanos (homens e mulheres) que utilizaram o tratamento com DHEA (50 mg/kg/dia) durante 12 meses mostrou que a DHEA produz uma melhora da resposta à sobrecarga de glicose no teste de tolerância à glicose (TTG) e reduz a circunferência da cintura (Weiss *et al.*, 2011). Semelhante ao estudo de Weiss (Weiss *et al.*, 2011), no presente estudo os ratos que receberam DHEA mostraram melhora da resposta à sobrecarga de glicose “*in vivo*” (Figura 15). Os animais que receberam dieta hipercalórica (HV) apresentaram um valor aumentado da área sob a curva (AUC) com um aumento de 59% em comparação com grupo com dieta normocalórica sem DHEA (CV) e quando a DHEA foi administrada a AUC diminuiu (HD com 20% de redução em comparação ao HV). Estes resultados indicam que o

tratamento com DHEA melhorou a tolerância à glicose nos grupos que receberam a dieta hipercalórica.

Como a DHEA melhorou a resposta à estimulação com glicose “*in vivo*”, decidimos avaliar a captação de glicose, “*ex vivo*” e “*in vitro*” no tecido adiposo retroperitoneal e músculo gastrocnêmio (Figura 18A, 20). No tecido adiposo, a dieta hipercalórica diminuiu a captação de glicose (Figura 18A), sugerindo uma resistência à insulina neste local, e o tratamento com DHEA aumentou a captação de glicose para níveis semelhantes ao grupo controle (CV). No músculo gastrocnêmio, encontramos o efeito da dieta diminuindo a captação de glicose (Figura 20). Neste parâmetro a análise estatística mostrou interação entre dieta e tratamento, assim o efeito do tratamento depende da dieta a qual os animais foram submetidos ( $P = 0,008$ ).

Em linhagem celular de pré-adipócitos subcutâneos humanos, McNelis e colaboradores (2013), verificaram um aumento na captação de glicose após tratamento com DHEA, o que é consistente com a melhora da hiperglicemia e da resistência à insulina observada após tratamento com DHEA “*in vivo*” em nossos experimentos e outros (Villareal e Holloszy, 2004). Em adipócitos de ratos, o tratamento com DHEA mimetizou a ação da insulina na via da PI3K e ativou a proteína cinase C (PKC), aumentando a captação de glicose (Kajita *et al.*, 2000). Liu e Dillon (Liu e Dillon, 2002; 2004) identificaram e caracterizaram uma proteína receptora ligada à membrana que interage especificamente e com elevada afinidade com DHEA em vários tecidos. Acredita-se que este efeito ocorra por aumento dos níveis de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) intracelulares (Liu e Dillon, 2002; 2004). A hipótese é que, após a ativação de GMPc e ativação da PI3K, ocorre a ativação da PKB/AKT iniciando o efeito da DHEA (Traish, Kang, *et al.*, 2011). A AKT é responsável por controlar vários

mecanismos intracelulares, incluindo a captação de glicose (Traish, Kang, *et al.*, 2011; Rutkowski *et al.*, 2014).

Os resultados da concentração de glicogênio no coração (Tabela 3) e o aumento na quantidade de proteína pAKT (Figura 21) neste tecido podem reforçar o fato de que a DHEA foi capaz de aumentar a fosforilação da AKT. Estudos de nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que o tratamento com DHEA aumenta a fosforilação da AKT no coração (Jacob *et al.*, 2008; Jacob *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2010), fígado (Jacob *et al.*, 2011) e SNC (Janner *et al.*, 2010). Além disso, em linhagem de adipócitos 3T3-L1 o tratamento com DHEA aumentou a captação de glicose via PI3K de maneira dose dependente, resultando em aumento da translocação de transportadores de glicose GLUT4 para a membrana plasmática das células e este efeito foi independente do receptor de insulina ou da ativação da AKT (Perrini *et al.*, 2004). Além disto, o tratamento com DHEA em ratos (10 mg / kg / peso) aumentou a sensibilidade à insulina através do aumento do nível de fosforilação da PI3K em músculo e fígado (Campbell *et al.*, 2004). Outro experimento que utilizou tratamento com DHEA (10 mg/kg) mostrou um aumento no teor de AKT fosforilada no SNC (Janner *et al.*, 2010) e fígado (Janner *et al.*, 2010; Jacob *et al.*, 2011). No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer o mecanismo de ação da DHEA sobre a captação de glicose.

Em pacientes que apresentam resistência à insulina, observa-se uma incapacidade da insulina em diminuir a produção de glicose hepática, a lipólise o tecido adiposo e em estimular a captação de glicose no músculo e em tecido adiposo (DeFronzo *et al.*, 1981; Unger e Orci, 2001; DeFronzo, 2009). Alguns tecidos, tais como os eritrócitos e o SNC, têm uma demanda contínua de glicose e, em períodos de jejum, o fígado (e os rins, em menor extensão) produz glicose-6-fosfato para a manutenção da glicemia através da gliconeogênese (DeFronzo *et al.*, 1981; Unger e Orci, 2001;

Defronzo, 2009). Durante o jejum, existe uma liberação considerável de alanina pelo músculo esquelético. Esta alanina é formada a partir da conversão do piruvato que, por transaminação, recebe um grupo amino das proteínas que foram catabolizadas. Esta alanina deixa o músculo e é exportada para o fígado, onde pode ser transaminada ou desaminada para formar piruvato que em seguida, segue a via da gliconeogênese. Este é o ciclo de glicose-alanina (Smith, Marks e Lieberman, 2007; Nelson e Cox, 2011). Em pacientes diabéticos e em estados de resistência à insulina ocorre uma dificuldade em reduzir a produção hepática de glicose com um aumento da gliconeogênese e da síntese de glicogênio a partir de alanina (Defronzo, 2009).

Como observamos uma melhora da glicemia e um aumento da captação de glicose no tecido adiposo, decidimos verificar a síntese de glicogênio a partir de glicose (Figura 17A) e de alanina (Figura 17B) no fígado e a partir de glicose no músculo (Figura 19C). Na síntese de glicogênio hepático a partir da glicose, não houve diferença significativa, no entanto, podemos observar que a dieta diminuiu a síntese de glicogênio em 28% e, quando a DHEA foi administrada, os valores voltaram aos níveis do grupo controle (CV). Não foi encontrada diferença na síntese de glicogênio a partir de alanina com a dieta hipercalórica, no entanto, houve interação entre dieta e tratamento. Os animais com dieta hipercalórica tiveram mais síntese de glicogênio a partir de alanina (gliconeogênese indireta) e quando a DHEA foi administrada esta síntese diminuiu aos níveis do grupo controle (CV). O tratamento com DHEA não tem qualquer efeito na captação de glicose no músculo gastrocnêmio e na síntese de glicogênio no músculo sóleo. No entanto, os grupos com dieta hipercalórica mostraram um aumento na síntese de glicogênio no sóleo. (Figura 19C), provavelmente em função da contribuição dos substratos fornecidos pela dieta. Pela avaliação da síntese de glicogênio, nosso estudo



não parece indicar uma melhor utilização da glicose por esta via, mas se não ocorre melhora na glicemia, onde a glicose poderia estar sendo utilizada?

Quando se avaliou os dados da produção de glicose hepática (Figura 17B) em conjunto com a produção de CO<sub>2</sub> no músculo sóleo (Figura 19A) e, na concentração de glicogênio do coração (Tabela 3), observou-se que a gliconeogênese é menor e ao mesmo tempo, a oxidação da glicose a CO<sub>2</sub> no músculo sóleo e a concentração de glicogênio no coração são maiores em animais submetidos à dieta hipercalórica e tratados com DHEA. Provavelmente ajudando a manter os níveis mais baixos de glicose no sangue no grupo dieta hipercalórica com DHEA (HD). Além disso, quando a glicose é convertida através da glicólise em dois fragmentos de três carbonos, estes tanto podem seguir para o ciclo de ácido cítrico (TCA), em que todos os átomos de carbono da glicose podem ser transformados em CO<sub>2</sub> ou não, isto dependerá do estado metabólico ao qual o animal vai estar submetido (Smith, Marks e Lieberman, 2007; Nelson e Cox, 2011).

Usando a glicose como substrato, investigamos a produção de CO<sub>2</sub> e a síntese de lipídios no músculo sóleo e fígado. No fígado (Figura 16B) e no músculo sóleo (Figura 19B), com relação à síntese de lipídeos não se observou diferenças significativas. Entretanto, na produção de CO<sub>2</sub> no fígado (Figura 16A), a análise estatística mostrou efeito da dieta e do tratamento e também a interação entre a dieta e o tratamento (P = 0,045). Os grupos com dieta hipercalórica tinham níveis baixos de produção de CO<sub>2</sub> em comparação com ao grupo com dieta controle. Os grupos tratados com DHEA tinham também redução dos níveis de oxidação, quando comparados com os animais tratados com veículo.

No presente estudo, a conversão de glicose hepática em CO<sub>2</sub> foi menor nos animais com dieta hipercalórica e também em animais submetidos ao tratamento com

DHEA (Figura 16A). Bobyleva e colaboradores (1993) avaliou o metabolismo do fígado de ratos submetidos ao tratamento com DHEA e mostrou que a DHEA diminuiu a utilização de oxigênio por oxidação de substratos em peroxissomos (Bobyleva *et al.*, 1993). De acordo com Lardy e colaboradores (1995) ratos tratados com DHEA aumentaram a atividade de transporte do glicerol-3-fosfato associado com o aumento da transferência de elétrons das mitocôndrias para o citosol, através do malato ou do citrato e também um aumento da produção de NADH/NADPH no citosol, quer pela dependência da enzima málica ou pela desidrogenase isocítrica NADPH, cujas atividades são reforçadas com o tratamento com DHEA (Lardy *et al.*, 1995).

Há uma diferença significativa na produção de CO<sub>2</sub> no tecido adiposo que mostrou um efeito estatisticamente significativo da dieta e do tratamento (Figura 18B). O efeito do tratamento com DHEA é diferente, dependendo da dieta. Em animais com dieta hipercalórica o tratamento com DHEA aumenta a produção de CO<sub>2</sub> e em animais com dieta controle e tratamento com DHEA diminui a produção de CO<sub>2</sub>. No músculo sóleo (Figura 19A), a análise estatística mostrou que na dieta hipercalórica aumentou a produção de CO<sub>2</sub>. No entanto, quando os animais foram submetidos à dieta hipercalórica e tratados com DHEA (HD) foi observado um aumento de 80% na produção de CO<sub>2</sub>, não significativo, em relação ao grupo controle veículo (CV).

As alterações no perfil lipídico estão associadas a doenças cardiovasculares e, também já foi demonstrado que existe uma relação inversa entre a concentração de DHEA e seu sulfato (DHEA-S) no plasma e as doenças cardiovasculares (Feldman *et al.*, 1998). Entretanto, Porsova-Dutoit e colaboradores (2000) fizeram uma revisão crítica do papel protetor da DHEA/DHEA-S sobre a aterosclerose e a doença arterial coronariana e não encontrou nenhuma evidência de proteção de mulheres e homens em relação a concentração plasmática de DHEA / DHEA-S (Porsova-Dutoit, Sulcova e

Starka, 2000). Ratos fêmeas alimentados com dieta rica em lipídios e tratadas com DHEA na dieta (0,5% peso/peso) apresentaram uma diminuição na massa de gordura e melhora no perfil dos lipídios (Perez-De-Heredia *et al.*, 2008). No presente estudo, o colesterol total e o colesterol de alta densidade não apresentaram diferenças entre os grupos (Tabela 1). Nos triglicerídeos só foi observado o efeito da dieta hipercalórica e o tratamento com DHEA não teve efeito sobre este parâmetro. Outro estudo com a suplementação de DHEA encontrou uma diminuição do colesterol no plasma de ratos (Cleary *et al.*, 1984).

A obesidade está associada a muitas doenças tais como a esteatohepatite não alcoólica que se caracteriza pela esteatose hepática, com acúmulo de triglicerídeos de forma anormal nas células do fígado (Buettner *et al.*, 2004; Kotronen *et al.*, 2008; Koopman *et al.*, 2014). Esta doença deve ser reconhecida como componente hepático da síndrome metabólica (Chung *et al.*, 2014). O acúmulo de lipídios nos hepatócitos leva ao estresse oxidativo que pode causar danos no fígado (Chung *et al.*, 2014). No presente estudo, a concentração de TG no fígado foi maior nos animais com dieta hipercalórica e DHEA não teve efeito. Os níveis de ALT são considerados um bom indicador para os danos celulares do fígado (Pratt e Kaplan, 2000). Em nosso estudo, o tratamento com DHEA teve um efeito positivo sobre a atividade da ALT, ou seja, os animais submetidos ao tratamento com DHEA tinham níveis mais baixos de ALT no soro quando comparados aos animais com dieta hipercalórica sem DHEA. Assim, a DHEA parece ter um efeito benéfico sobre este parâmetro. Do mesmo modo, os animais com dieta hipercalórica mostraram níveis mais elevados de ácido úrico e ureia, no entanto, quando a DHEA foi administrada, estes níveis foram reduzidos significativamente. Estes resultados sugerem que a administração de DHEA pode ser benéfica também para a função renal.

A DHEA também reduziu a concentração de colesterol no fígado de animais com dieta hipercalórica. Estudos têm mostrado que os níveis plasmáticos baixos de DHEA estão associados com elevada morbidade cardiovascular (Feldman *et al.*, 2001) e com doenças coronárias (Herrington *et al.*, 1990; Ishihara *et al.*, 1992; Herrington, 1995). Estudo com humanos mostraram que os níveis de DHEA, mais do que o perfil lipídico, é um fator importante para determinar o risco cardiovascular. Os níveis de DHEA mostram uma relação inversa com o tamanho da placa aterosclerótica em carótidas humanas, enquanto o nível de colesterol no plasma não (Liu *et al.*, 2008). Embora não se tenha observado efeito da DHEA em todos os parâmetros metabólicos, parece que em ratos submetidos a uma dieta hipercalórica e tratados concomitantemente com DHEA apresentam efeito na função hepática e no metabolismo dos tecidos adiposo, sóleo e cardíaco influenciando os níveis de glicose no soro.

Entre os resultados obtidos a DHEA foi capaz de alterar o metabolismo cardíaco, onde verificamos interessante efeito deste tratamento sobre o conteúdo de glicogênio e na quantidade de pAKT no coração dos animais submetidos a uma dieta hipercalórica.

Estudos têm mostrado o efeito da DHEA sobre diferentes aspectos relacionados à insuficiência cardíaca (Nakamura *et al.*, 2004; Jacob *et al.*, 2008; Aragno *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2010), ao estresse oxidativo (Nakamura *et al.*, 2004; Jacob *et al.*, 2008; Aragno *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2010), à aterosclerose e a mortalidade por doenças cardiovasculares (Nakamura *et al.*, 2004; Jacob *et al.*, 2008; Aragno *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2010).

Dentre as alterações cardiovasculares, podemos salientar a formação da placa aterosclerótica nas artérias coronárias, o que leva a uma diminuição do fluxo sanguíneo para o músculo cardíaco (Beckstrom *et al.*, 2007), conseqüentemente a diminuição do

fluxo sanguíneo leva à menor oferta de nutrientes e de oxigênio, caracterizando uma situação de hipóxia (Bliss, 2015).

Uma vez que em uma situação de aterosclerose, o fluxo sanguíneo para o músculo cardíaco encontra-se prejudicado, e buscando esclarecer melhor o papel da DHEA em células cardíacas nessas condições, foram realizados experimentos com o objetivo de avaliar o efeito da DHEA em cardiomiócitos submetidos à hipóxia e à reoxigenação. Culturas de cardiomiócitos, geralmente de corações de ratos neonatos, são amplamente utilizadas para investigar alterações celulares da resposta à hipóxia que incluem desde o aumento no tamanho celular até a reorganização de proteínas contráteis com a regulação para cima ou para baixo das enzimas celulares (Watkins, Borthwick e Arthur, 2011). Porém, a grande desvantagem deste tipo de estudo é o grande número de animais necessários para obtenção de resultados e atualmente, existe uma grande preocupação dos pesquisadores em diminuir o número de animais nas pesquisas (Watkins, Borthwick e Arthur, 2011). Assim os experimentos com linhagem de cardiomiócitos provê uma alternativa para o estudo de vias de sinalização intracelular e alterações celulares em diferentes condições experimentais (Watkins, Borthwick e Arthur, 2011).

A diminuição da concentração de oxigênio nas células gera uma situação de hipóxia (Hannah *et al.*, 1995; Zampetaki *et al.*, 2004; Walmsley *et al.*, 2005). Situações que levam a uma hipóxia interminente, como a apnéia do sono ou a anemia, podem representar uma situação de hipóxia (Bliss, 2015). Menos hemoglobina para carrear oxigênio, menor quantidade de oxigênio chegando à célula que, por fim, leva a uma ativação da expressão do fator nuclear kappa-B (NFK-B), iniciando um processo inflamatório (Lacedonia *et al.*, 2015).

Em estágios avançados de obstrução de um vaso, ocorre a interrupção do fluxo sanguíneo local, o que leva a uma diminuição nos níveis de ATP celular e alteração na atividade enzimática da xantina desidrogenase, a qual passa a ter função de oxidase. Se ocorrer reperfusão local, essa reoxigenação provê substrato para a xantina desidrogenase formar espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo se instala (Mccord, 1985; Parks e Granger, 1986; Granger, 1988; Canas, 1999; Droge, 2002; Harrison, 2002).

O processo de formação de EROs gera um processo inflamatório local, piorando o quadro do paciente cardiopata (Kim *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Virzi *et al.*, 2015). A resposta inflamatória induzida pela hipóxia resulta na ativação de células do sistema imune e da ativação de vias de sinalização ‘*downstream*’, com a indução de citocinas proinflamatórias e quimiocinas (Chen e Nunez, 2010; Eltzschig e Eckle, 2011). Além disso, a baixa concentração de oxigênio prolonga a sobrevivência de neutrófilos e aumenta a permeabilidade endotelial (Walmsley *et al.*, 2005).

A avaliação da formação de EROs nos cardiomiócitos submetidos ou não à hipóxia/reoxigenação mostrou que as células submetidas à condição hipóxica mais tratamento com DHEA diminuíram significativamente o conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (Figura 22). Alguns estudos têm sugerido um efeito antioxidante da DHEA (Schauer *et al.*, 1990; Rom e Harkin, 1991; Aragno *et al.*, 2000), enquanto outros relataram efeito pró-oxidante, dependendo das condições experimentais (Mastrocola *et al.*, 2003). Em ratos, a administração aguda de uma única dose de DHEA (100, 50 ou 10mg/kg/peso) promoveu frações de LDL mais resistentes à peroxidação lipídica induzida por cobre (Bocuzzi *et al.*, 1997). Além disso, a DHEA inibiu em aproximadamente 90% a oxidação de LDL humana *in vitro* (Khalil *et al.*, 1998). Uma das consequências patológicas da DM é que ela ocasiona aumento na formação de

espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (Reaven, 1997; Defronzo, 2009). Ratos diabéticos tratados com DHEA e sujeitos à isquemia por oclusão da carótida, apresentaram uma resposta protetora aos danos causados em neurônios pela isquemia seguida de reperfusão (Aragno *et al.*, 2000).

As EROs produzidos durante a isquemia/reperfusão induzem a ativação da enzima nuclear poli(ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1). A PARP promove quebra do DNA, utilizando  $\text{NAD}^+$  como substrato para produzir cadeias não-conjugadas de polímeros de ADP-ribose (Rouleau *et al.*, 2010). Isto resulta num rápido declínio no conteúdo intracelular de  $\text{NAD}^+$ . A ressíntese de  $\text{NAD}^+$  requer ATP e desta forma gera uma demanda pesada de estoques de energia celular e metabolismo energético. A incapacidade das células para suprir esta energia leva à morte celular tanto por necrose quanto por apoptose (Schumer *et al.*, 1992; Lieberthal e Levine, 1996; Padanilam, 2003). O  $\text{NAD}^+$  citosólico serve como aceptor de elétrons na via glicolítica, para posterior oxidação na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons ou para a formação de lactato no citosol, dependendo das condições de oxigênio celular, logo, o consumo de NAD acaba por inibir a glicólise, depletando ATP e, finalmente, leva à morte celular (Cohen e Barankiewicz, 1987).

Durante a apoptose, várias proteínas sofrem degradação pelas caspases, incluindo a própria PARP-1, que é convertida de um polímero de 116 kDa para fragmentos de 89 e 24 kDa (Kaufmann *et al.*, 1993; Cohen, 1997). Como apresentado na Figura 23, a condição à qual as células são submetidas (normóxia ou hipóxia/reoxigenação) produziu diferença, ou seja, as células submetidas à hipóxia/reoxigenação (com ou sem DHEA) mostraram aumento na expressão da enzima PARP-1, e não houve efeito do tratamento. No entanto, avaliando as médias da densidade das bandas que representam a expressão protéica da PARP-1, verificamos

que, quando as células eram submetidas à condição de hipóxia/reoxigenação mais tratamento com DHEA a expressão da PARP-1 era 24,35% menor do que nas células submetidas à hipóxia/reoxigenação sem o tratamento com DHEA. Em estudos de neurônios submetidos à hipóxia houve um aumento da expressão da PARP-1, o que causou abertura de poros de transição mitocondriais (MTP - *mitochondrial transition pores*) levando à morte neuronal (Yu *et al.*, 2002; Culmsee *et al.*, 2005). O aumento da formação de EROs, a radiação UV e outros agressores celulares são capazes de ativar PARP-1 (Virag *et al.*, 2013).

O processo apoptótico é executado por cisteína proteases intracelulares denominadas caspases (Adams, 2003). As caspases têm um papel fundamental na apoptose, especialmente as caspases 3, 6, e 7 que têm sido implicadas na fase de execução de apoptose; sua ativação, e subsequente clivagem, são de fundamental importância na fisiologia apoptótica (Salvesen e Dixit, 1997; Pop e Salvesen, 2009). A apoptose é um processo biológico que remove as células não-viáveis e potencialmente perigosas e é implementada por meio da ativação de uma cascata de sinalização conservadas durante a evolução (Juraver-Geslin e Durand, 2015). Em camundongos, a deleção do gene que expressa a caspase 3 foi incompatível com a sobrevivência da prole (Adams, 2003). A expressão da caspase 3 (32 kDa) foi menor nas células submetidas à condição de hipóxia mais tratamento com DHEA em relação às células sem DHEA (Figura 29).

Em células saudáveis, a caspase 3 está presente na forma de zimogênio e isto mantém a proteína denominada BH3 junto à membrana mitocondrial, longe da proteína Bcl2 (Adams, 2003). A Bcl2 é considerada uma proteína antiapoptótica e comanda eventos celulares de sobrevivência (Adams, 2003). Quando ocorre estímulo apoptótico, a BH3 desliga-se da membrana e liga-se à Bcl2 na mitocôndria, que recruta Bax e Bak



em oligômeros na membrana externa da mitocôndria, levando a sua permeabilização (Adams, 2003). A subsequente liberação do citocromo C induz a formação de ‘*apoptossomas*’ a partir da proteína Apaf e pro-caspase 9, que, finalmente, ativam a caspase 3, e estes eventos em cadeia levam à apoptose (Adams, 2003).

A análise estatística mostrou que a condição à qual as células foram expostas (hipóxia/reoxigenação) e o tratamento com DHEA, não provocaram diferença na expressão das proteínas pró e antiapoptóticas, Bax (Figura 24) e Bcl2 (Figura 25), respectivamente. No entanto, quando foi calculada a razão Bcl2/Bax (Figura 26), observa-se que os grupos na condição de hipóxia/reoxigenação tiveram redução média de 23% nessa razão. Um estudo realizado com células ovarianas humanas submetidas ao tratamento com DHEA, mostrou um aumento significativo na razão Bcl2/Bax, indicando um efeito anti-apoptótico neste tipo de célula (Tsui *et al.*, 2014). Em nosso estudo, o tratamento com DHEA não alterou a expressão de ambas, Bcl2 e Bax, mas foi observada uma redução significativa da razão Bcl2/Bax nas células submetidas à hipóxia/reoxigenação, e não houve efeito da DHEA (P=0,03). Estes resultados mostram que existe um quadro celular favorável à morte após a submissão à condição de hipóxia/reoxigenação. Em um experimento em que foi utilizada a linhagem celular H9C2, observou-se que estas células apresentaram um aumento significativo na morte celular e nas vias pró-apoptóticas quando submetidas a 48 horas de hipóxia (sem reoxigenação) e meio de incubação sem DMEM (apenas com soro fetal bovino) (Bonavita *et al.*, 2003). No levantamento bibliográfico realizado utilizando os indexadores Bcl, Bax e DHEA foram encontrados 4 artigos não relacionados diretamente com a função cardíaca. Os artigos encontrados avaliaram o efeito da DHEA e restrição calórica em camundongos transgênicos com deficiência na via apoptótica p53 em timo (Wang *et al.*, 1997). Outro artigo avaliou a expressão alterada de Bcl2 e

Bax em folículos ovarianos de ratos com síndrome de ovário policísticos tratados com DHEA (Bas *et al.*, 2011).

Apesar dos menores níveis intracelulares de radicais livres identificados pelos níveis de DCFH, quando foi avaliada a expressão proteica das enzimas SOD (Figura 27) e CAT (Figura 28) não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Em cardiomiócitos H9C2, com seis horas de tratamento hipóxico, foi observado um aumento da atividade da enzima SOD (Zhang *et al.*, 2015). Entretanto, em neurônios, a condição hipóxica diminuiu a expressão da SOD (Rani e Prasad, 2014). A maioria dos estudos que avaliaram condições hipóxicas em células H9C2, em diferentes tempos de exposição, verificaram a atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) e encontraram um aumento na atividade de ambas (Bryan *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2014). Na pesquisa bibliográfica realizada nas principais bases, não foram encontrados artigos que tivessem avaliado a expressão de SOD e CAT em cardiomiócitos expostos à hipóxia/reoxigenação tanto em experimentos *in vivo* quanto *in vitro*.

O sistema antioxidante endógeno é constituído por diferentes enzimas, como a SOD, CAT, glutatona e tioredoxina (Droge, 2002; Halliwell, 2011). Mas, além dos antioxidantes endógenos diversos componentes exógenos têm a função de neutralizar radicais livres e que já estão bem estabelecidos na literatura, tais como vitaminas C e E, ácido lipóico, coenzima Q<sub>10</sub>, flavonoides e outros polifenóis (Droge, 2002; Halliwell, 2011) e mesmo a DHEA (Rom e Harkin, 1991; Khalil *et al.*, 1998; Aragno *et al.*, 2000; Aragno *et al.*, 2009). Em células aeróbicas, os radicais livres são constantemente produzidos e, uma vez produzidos eles são removidos por defesas antioxidantes incluindo SOD, CAT, glutatona-peroxidase e superóxido-dismutase (Droge, 2002; Djordjevic, 2004; Halliwell, 2011).

Apesar de não termos encontrado diferença estatística entre os grupos experimentais, é importante ressaltar que, do ponto de vista biológico, uma diminuição de 37% e 50% na expressão de SOD e CAT, respectivamente, pode ser fisiologicamente relevante. Além disso, a diminuição de EROs avaliada pelos níveis de DCFH pode indicar que a própria DHEA, estaria neutralizando os radicais livres e assim possivelmente determinando menor expressão de SOD e CAT nos grupos tratados com DHEA. Foi observado que a DHEA protege as funções mitocondriais após anóxia-reoxigenação em um mecanismo possivelmente envolvendo uma ação direta da DHEA nas membranas mitocondriais (Morin *et al.*, 2002). Adicionalmente, em alvéolos, *in vitro*, a DHEA inibiu a liberação espontânea do radical superóxido (Rom e Harkin, 1991).

Cabe salientar que estes resultados são preliminares e mais estudos precisam ser realizados a fim de avaliar o mecanismo de ação da DHEA sobre a formação de EROs, de mecanismos de proteção antioxidante, bem como a ação da DHEA sobre o metabolismo de cardiomiócitos.

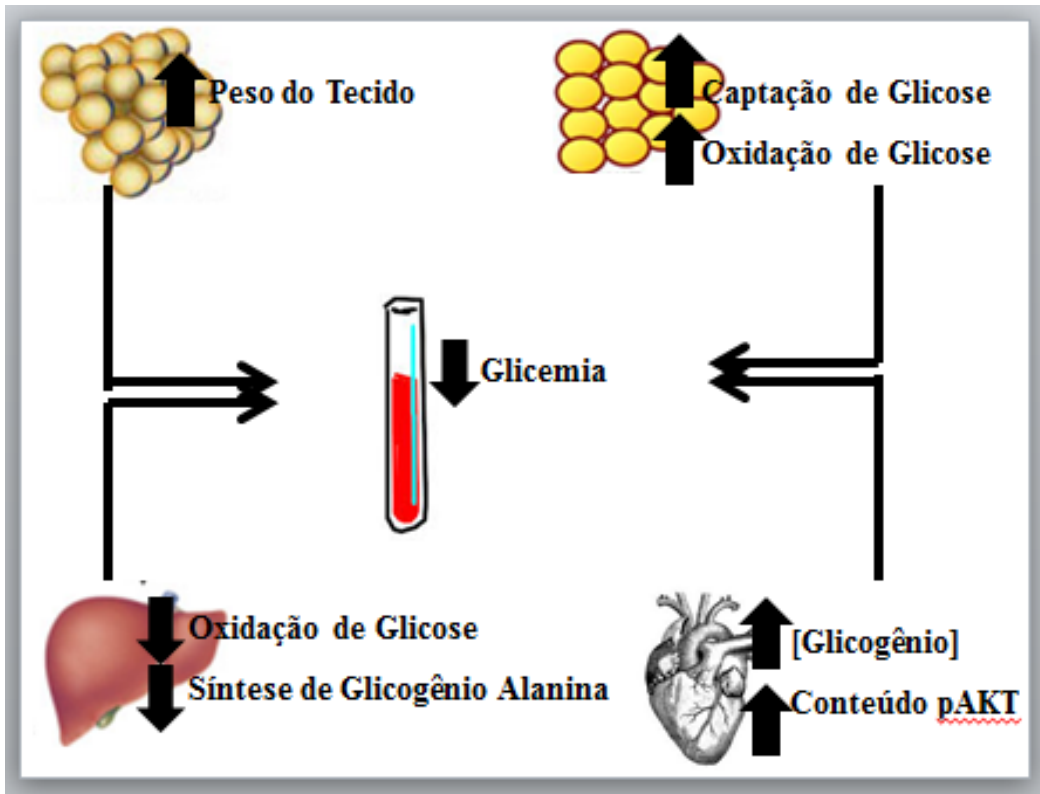
## **6. CONCLUSÕES**

A utilização da metodologia para a implantação dos pellets com DHEA mostrou-se efetiva em manter as concentrações séricas de DHEA altas durante 30 dias sem alterar a testosterona. Isto foi verificado tanto em machos quanto em fêmeas. Para as três doses utilizadas as fêmeas se mostraram mais sensíveis ao efeito do tratamento com DHEA do que os machos. Nos animais sem tratamento, foi observado que existe uma diferença metabólica inerente ao sexo, ou seja, a metabolização de substratos foi diferente entre machos e fêmeas.

A administração de dieta hipercalórica durante vinte e três semanas para ratos machos foi capaz de induzir obesidade. O tratamento com DHEA foi efetivo em melhorar parâmetros séricos, como glicemia, concentração de alanina-amino-transferase, ácido úrico e ureia. Com relação ao metabolismo tecidual, após a dieta hipercalórica e o tratamento com DHEA observaram-se alterações significativas na oxidação de glicose e na síntese de glicogênio a partir de alanina no fígado. No tecido adiposo foi observado efeito na captação de 2-deoxiglicose e oxidação de glicose. No coração verificou-se alteração no conteúdo de pAKT e de glicogênio. No músculo esquelético não foi observado efeito da DHEA.

A incubação de cardiomiócitos H9C2 com 0,1 uM de DHEA promoveu uma redução significativa na produção de espécies reativas de oxigênio após submissão a um protocolo de hipóxia e reoxigenação. As enzimas antioxidantes SOD e CAT não apresentaram efeitos significativos apesar de seu conteúdo mostrar-se reduzido após tratamento com DHEA. O tratamento com DHEA foi capaz de reduzir o conteúdo de caspase 3.

O tratamento com DHEA parece ter um efeito positivo como protetor celular, uma vez que diminui o estresse oxidativo e a expressão de enzimas pro-apoptóticas em cardiomiócitos submetidos a um protocolo de hipóxia e reoxigenação. Ao mesmo tempo, no modelo in vivo, foi observado que o tratamento com DHEA pode aumentar a fosforilação da proteína AKT no coração de ratos submetidos a uma dieta hipercalórica.



**Figura 30.** Proposta da ação metabólica da DHEA no metabolismo de carboidratos em animais submetidos a uma dieta hipercalórica.

## 7. PERSPECTIVAS:

Diante dos resultados encontrados a partir deste trabalho, novas perguntas foram geradas e, com isto, algumas perspectivas:

- a) Em ratos machos e fêmeas, submetidos ou não à dieta hipercalórica e tratados com DHEA na dose de 25 mg/kg:

Verificar parâmetros metabólicos (captação, oxidação e síntese de lipídeos) em músculo (esquelético e cardíaco), fígado e tecido adiposo (branco e marrom) utilizando como substratos: glicose, alanina e leucina;

Verificar concentrações de substratos frios em fígado (glicogênio, triglicerídeos e colesterol total), coração e músculo esquelético (glicogênio);

Verificar a concentração de DHEA nos próprios tecidos como: coração, músculo esquelético, fígado e tecido adiposo;

- b) Em linhagem celular de cardiomiócitos, utilizando a dose de 0,1 uM de DHEA verificar parâmetros metabólicos, inflamatórios e de estresse oxidativo:

Captação de glicose, oxidação e síntese de lipídeos a partir de glicose

Metabolismo da leucina;

Investigar o mecanismo intracelular de ação da DHEA em melhorar glicemia utilizando bloqueador da via da PI3K utilizando Wortmannin;

Avaliar, no meio de incubação das células fatores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , ILs e caspases clivadas);

Avaliar o efeito da DHEA sobre o conteúdo e atividade de enzimas antioxidantes SOD, CAT, GSH

Avaliar o conteúdo de marcadores de dano oxidativo celular como F-8-isoprostanos e malondialdeído;

Avaliar a resposta celular ao estresse oxidativo verificando a expressão do fator nuclear eritróide (nrf2) e o elemento responsivo antioxidante (ARE);

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOZGUIA, K. et al. The heart metabolism: pathophysiological aspects in ischaemia and heart failure. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 8, p. 827-35, 2009. ISSN 1873-4286 (Electronic)

1381-6128 (Linking).

ADAMS, J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. **Genes Dev**, v. 17, n. 20, p. 2481-95, Oct 15 2003. ISSN 0890-9369 (Print)

0890-9369.

AFANAS'EV, S. A. et al. Comparative study of changes in energy metabolism in rat cardiomyocytes in postinfarction cardiosclerosis and diabetes mellitus. **Bull Exp Biol Med**, v. 156, n. 2, p. 185-7, Dec 2013. ISSN 1573-8221 (Electronic)

0007-4888 (Linking).

AKIYAMA, T. et al. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 31, n. 1-3, p. 27-35, Mar 1996. ISSN 0168-8227 (Print)

0168-8227 (Linking).

ALBERTI, K. G. et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 120, n. 16, p. 1640-5, Oct 20 2009. ISSN 0009-7322.

ALLISON, D. B. et al. Annual deaths attributable to obesity in the United States. In: (Ed.). **JAMA**. United States, v.282, 1999. p.1530-8. ISBN 0098-7484 (Print)

0098-7484 (Linking).

ALLOLIO, B.; ARLT, W. DHEA treatment: myth or reality? In: (Ed.). **Trends Endocrinol Metab.** United States, v.13, 2002. p.288-94. ISBN 1043-2760 (Print)

1043-2760 (Linking).

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 17, p. 7915-22, Sep 1 1993. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424.

ANAGNOSTIS, P. et al. Cardiovascular risk in women with type 2 diabetes mellitus and prediabetes: is it indeed higher than men? **Eur J Endocrinol**, v. 171, n. 6, p. R245-55, Dec 2014. ISSN 0804-4643.

ARAGNO, M. et al. Cardiac impairment in rabbits fed a high-fat diet is counteracted by dehydroepiandrosterone supplementation. In: (Ed.). **Life Sci.** Netherlands, v.85, 2009. p.77-84. ISBN 1879-0631 (Electronic)

0024-3205 (Linking).

\_\_\_\_\_. Dehydroepiandrosterone prevents oxidative injury induced by transient ischemia/reperfusion in the brain of diabetic rats. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1924-31, Nov 2000. ISSN 0012-1797 (Print)

0012-1797.

ARCARI, D. P. et al. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, n. 12, p. 2127-33, Dec 2009. ISSN 1930-7381.

ARNETZ, L.; EKBERG, N. R.; ALVARSSON, M. Sex differences in type 2 diabetes: focus on disease course and outcomes. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 7, p. 409-20, 2014. ISSN 1178-7007.

ASHRAFIAN, H.; FRENNEAUX, M. P.; OPIE, L. H. Metabolic mechanisms in heart failure. In: (Ed.). **Circulation.** United States, v.116, 2007. p.434-48. ISBN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking).

BARRETT, K. E. et al. **Fisiologia Médica de Ganong (Lange)**. 24. Porto Alegre: 2014. 735.

BARRETT-CONNOR, E.; GOODMAN-GRUEN, D. Dehydroepiandrosterone sulfate does not predict cardiovascular death in postmenopausal women. The Rancho Bernardo Study. **Circulation**, v. 91, n. 6, p. 1757-60, Mar 15 1995a. ISSN 0009-7322 (Print)



0009-7322.

\_\_\_\_\_. The epidemiology of DHEAS and cardiovascular disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 774, p. 259-70, Dec 29 1995b. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking).

BAS, D. et al. Altered expression of Bcl-2 and Bax in follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats. **Cell Biol Int**, v. 35, n. 5, p. 423-9, May 2011. ISSN 1065-6995.

BAULIEU, E. E. Dehydroepiandrosterone (DHEA): a fountain of youth? **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 9, p. 3147-51, Sep 1996. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking).

\_\_\_\_\_. Neurosteroids: a novel function of the brain. In: (Ed.). **Psychoneuroendocrinology**. England, v.23, 1998. p.963-87. ISBN 0306-4530 (Print)

0306-4530 (Linking).

BAULIEU, E. E. et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. In: (Ed.). **Proc Natl Acad Sci U S A**. United States, v.97, 2000. p.4279-84. ISBN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking).

BECKSTROM, B. W. et al. Correlation between carotid area calcifications and periodontitis: a retrospective study of digital panoramic radiographic findings in pretreatment cancer patients. In: (Ed.). **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. United States, v.103, 2007. p.359-66. ISBN 1528-395X (Electronic)

1079-2104 (Linking).

BENOIT, S. C. et al. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. **J Clin Invest**, v. 119, n. 9, p. 2577-89, Sep 2009. ISSN 0021-9738.

BIALA, A. K.; KIRSHENBAUM, L. A. The interplay between cell death signaling pathways in the heart. **Trends Cardiovasc Med**, v. 24, n. 8, p. 325-31, Nov 2014. ISSN 1050-1738.

BIRD, C. E.; MASTERS, V.; CLARK, A. F. Dehydroepiandrosterone sulfate: kinetics of metabolism in normal young men and women. **Clin Invest Med**, v. 7, n. 2, p. 119-22, 1984. ISSN 0147-958X (Print)

0147-958x.

BLISS, S. Anemia and Oxygen Delivery. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, May 29 2015. ISSN 0195-5616.

BOBYLEVA, V. et al. Comparative studies of effects of dehydroepiandrosterone on rat and chicken liver. **Comp Biochem Physiol B**, v. 105, n. 3-4, p. 643-7, Jul-Aug 1993. ISSN 0305-0491 (Print)

0305-0491 (Linking).

BOCCUZZI, G. et al. Protective effect of dehydroepiandrosterone against copper-induced lipid peroxidation in the rat. **Free Radic Biol Med**, v. 22, n. 7, p. 1289-94, 1997. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849.

BONAVITA, F. et al. H9c2 cardiac myoblasts undergo apoptosis in a model of ischemia consisting of serum deprivation and hypoxia: inhibition by PMA. **FEBS Lett**, v. 536, n. 1-3, p. 85-91, Feb 11 2003. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793.

BONNET, S. et al. Dehydroepiandrosterone reverses systemic vascular remodeling through the inhibition of the Akt/GSK3- $\beta$ /NFAT axis. **Circulation**, v. 120, n. 13, p. 1231-40, Sep 29 2009. ISSN 0009-7322.

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**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697.

BRASIL. **DATASUS** 2015.

BRASIL, M. D. S. <http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares-causam-quase-30-das-mortes-no-pais>. 2014. Acesso em: 24/02.

BRYAN, S. et al. Cystathionine gamma-lyase-deficient smooth muscle cells exhibit redox imbalance and apoptosis under hypoxic stress conditions. **Exp Clin Cardiol**, v. 16, n. 4, p. e36-41, Winter 2011. ISSN 1205-6626.

BUETTNER, R. et al. Preserved direct hepatic insulin action in rats with diet-induced hepatic steatosis. In: (Ed.). **Am J Physiol Endocrinol Metab**. United States, v.286, 2004. p.E828-33. ISBN 0193-1849 (Print)

0193-1849 (Linking).

BURKLE, A.; VIRAG, L. Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 6, p. 1046-65, Dec 2013. ISSN 0098-2997.

BUVAT, J. Androgen therapy with dehydroepiandrosterone. **World J Urol**, v. 21, n. 5, p. 346-55, Nov 2003. ISSN 0724-4983 (Print)

0724-4983.

CAMPBELL, C. S. et al. The phosphatidylinositol/AKT/atypical PKC pathway is involved in the improved insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo. In: (Ed.). **Life Sci. England**, v.76, 2004. p.57-70. ISBN 0024-3205 (Print)

0024-3205 (Linking).

CAMPOS, C. et al. Efficacy of a low dose of estrogen on antioxidant defenses and heart rate variability. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014, p. 218749, 2014.

CANAS, P. E. The role of xanthine oxidase and the effects of antioxidants in ischemia reperfusion cell injury. **Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam**, v. 49, n. 1, p. 13-20, 1999. ISSN 0327-6309 (Print)

0327-6309.

CARMEAN, C. M. et al. Refeeding-induced brown adipose tissue glycogen hyper-accumulation in mice is mediated by insulin and catecholamines. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e67807, 2013. ISSN 1932-6203.

CATALA-NIELL, A. et al. Skeletal muscle and liver oxidative metabolism in response to a voluntary isocaloric intake of a high fat diet in male and female rats. **Cell Physiol Biochem**, v. 22, n. 1-4, p. 327-36, 2008. ISSN 1015-8987.

CHEN, G. Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 12, p. 826-37, Dec 2010. ISSN 1474-1733.

CHEN, R. C. et al. Naringin protects against anoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cells via the Nrf2 signaling pathway. **Food Funct**, v. 6, n. 4, p. 1331-44, Apr 2015. ISSN 2042-6496.

CHEN, Y. et al. Selective impairment in glycogen synthase kinase-3 and mitogen-activated protein kinase phosphorylation: comparisons with the hyperandrogenic and the hyperinsulinemic rats. **Fertil Steril**, v. 92, n. 4, p. 1447-55, Oct 2009. ISSN 0015-0282.

CHENG, D. et al. Atorvastatin delays the glucose clearance rate in hypercholesterolemic rabbits. **Biomed Pharmacother**, v. 72, p. 24-9, May 2015. ISSN 0753-3322.

CHIN, P. C.; MAJZADEH, N.; D'MELLO, S. R. Inhibition of GSK3beta is a common event in neuroprotection by different survival factors. In: (Ed.). **Brain Res Mol Brain Res**. Netherlands, v.137, 2005. p.193-201. ISBN 0169-328X (Print)

0169-328X (Linking).

CHUNG, M. et al. Fructose, high-fructose corn syrup, sucrose, and nonalcoholic fatty liver disease or indexes of liver health: a systematic review and meta-analysis. In: (Ed.). **Am J Clin Nutr**. United States: 2014 American Society for Nutrition., v.100, 2014. p.833-49. ISBN 1938-3207 (Electronic)

0002-9165 (Linking).

CLAYTON, J. A.; COLLINS, F. S. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 282-3, May 15 2014. ISSN 0028-0836.

CLEARY, M. P. et al. Metabolic consequences of dehydroepiandrosterone in lean and obese adult Zucker rats. **Horm Metab Res**, v. 16 Suppl 1, p. 43-6, Dec 1984. ISSN 0018-5043 (Print)

0018-5043.

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

COHEN, A.; BARANKIEWICZ, J. Metabolic consequences of DNA damage: alteration in purine metabolism following poly(ADP ribosyl)ation in human T-lymphoblasts. **Arch Biochem Biophys**, v. 258, n. 2, p. 498-503, Nov 1 1987. ISSN 0003-9861 (Print)

0003-9861.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem J**, v. 326 ( Pt 1), p. 1-16, Aug 15 1997. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021.

COLLOMP, K. et al. DHEA, physical exercise and doping. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 145, p. 206-12, Jan 2015. ISSN 0960-0760.

CORPECHOT, C. et al. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 8, p. 4704-7, Aug 1981. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking).

CORREIA, C. et al. Emerging understanding of Bcl-2 biology: Implications for neoplastic progression and treatment. **Biochim Biophys Acta**, v. 1853, n. 7, p. 1658-71, Jul 2015. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002.

CUATRECASAS, P. et al. Hormone receptor complexes and their modulation of membrane function. **Recent Prog Horm Res**, v. 31, p. 37-94, 1975. ISSN 0079-9963 (Print)

0079-9963 (Linking).

CULMSEE, C. et al. Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. **J Neurosci**, v. 25, n. 44, p. 10262-72, Nov 2 2005. ISSN 0270-6474.

DALI-YOUCCEF, N. et al. Metabolic inflammation: connecting obesity and insulin resistance. **Ann Med**, v. 45, n. 3, p. 242-53, May 2013. ISSN 0785-3890.

DANSKA, J. S. Sex matters for mechanism. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 258, p. 258fs40, Oct 15 2014. ISSN 1946-6234.

DAVIS, S. R.; PANJARI, M.; STANCZYK, F. Z. Clinical review: DHEA replacement for postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 6, p. 1642-53, Jun 2011. ISSN 0021-972x.

DE HEREDIA, F. P. et al. Effect of dehydroepiandrosterone on protein and fat digestibility, body protein and muscular composition in high-fat-diet-fed old rats. **Br J Nutr**, v. 97, n. 3, p. 464-70, Mar 2007. ISSN 0007-1145 (Print)

0007-1145.

DEEDWANIA, P. C.; GUPTA, R. Management issues in the metabolic syndrome. **J Assoc Physicians India**, v. 54, p. 797-810, Oct 2006. ISSN 0004-5772 (Print)

0004-5772.

DEER, J. et al. Dietary models of insulin resistance. **Metabolism**, v. 64, n. 2, p. 163-71, Feb 2015. ISSN 0026-0495.

DEFRONZO, R. A. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. In: (Ed.). **Diabetes**. United States, v.58, 2009. p.773-95. ISBN 1939-327X (Electronic)

0012-1797 (Linking).

DEFRONZO, R. A. et al. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. **Diabetes**, v. 30, n. 12, p. 1000-7, Dec 1981. ISSN 0012-1797 (Print)

0012-1797.

DEHENNIN, L. et al. Oral administration of dehydroepiandrosterone to healthy men: alteration of the urinary androgen profile and consequences for the detection of abuse in sport by gas chromatography-mass spectrometry. **Steroids**, v. 63, n. 2, p. 80-7, Feb 1998. ISSN 0039-128X (Print)

0039-128x.

DILLON, J. S. Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate and related steroids: their role in inflammatory, allergic and immunological disorders. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, n. 3, p. 377-85, Jun 2005. ISSN 1568-010X (Print)

1568-010X (Linking).

DJORDJEVIC, V. B. Free radicals in cell biology. **Int Rev Cytol**, v. 237, p. 57-89, 2004. ISSN 0074-7696 (Print)

0074-7696.

DO, T. D. et al. Antioxidant capacity and vitamin E in barley: Effect of genotype and storage. **Food Chem**, v. 187, p. 65-74, Nov 15 2015. ISSN 0308-8146 (Print)

0308-8146.

DOERFLINGER, M.; GLAB, J. A.; PUTHALAKATH, H. BH3-only proteins: a 20-year stock-take. **Febs j**, v. 282, n. 6, p. 1006-16, Mar 2015. ISSN 1742-464x.

DOLNIKOFF, M. et al. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 25, n. 3, p. 426-33, Mar 2001.

DONG, Y.; ZHENG, P. Dehydroepiandrosterone sulphate: action and mechanism in the brain. **J Neuroendocrinol**, v. 24, n. 1, p. 215-24, Jan 2012. ISSN 1365-2826 (Electronic)

0953-8194 (Linking).

DOS SANTOS FAGUNDES, I. et al. Glycine, serine, and leucine metabolism in different regions of rat central nervous system. **Neurochem Res**, v. 26, n. 3, p. 245-9, Mar 2001. ISSN 0364-3190 (Print)

0364-3190.

DOURMASHKIN, J. T. et al. Different forms of obesity as a function of diet composition. In: (Ed.). **Int J Obes (Lond)**. England, v.29, 2005. p.1368-78. ISBN 0307-0565 (Print)

0307-0565 (Linking).

DREWNOWSKI, A.; POPKIN, B. M. The nutrition transition: new trends in the global diet. **Nutr Rev**, v. 55, n. 2, p. 31-43, Feb 1997. ISSN 0029-6643 (Print)

0029-6643.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333.

DUAN, Y. et al. The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism. **Amino Acids**, Aug 9 2015. ISSN 0939-4451.

DUBROVSKY, B. O. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. In: (Ed.). **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. England, v.29, 2005. p.169-92. ISBN 0278-5846 (Print)

0278-5846 (Linking).

DUNLOP, D. S.; VAN ELDEN, W.; LAJTHA, A. Optimal conditions for protein synthesis in incubated slices of rat brain. **Brain Res**, v. 99, n. 2, p. 303-18, Dec 5 1975. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993.

EBELING, P.; KOIVISTO, V. A. Physiological importance of dehydroepiandrosterone. **Lancet**, v. 343, n. 8911, p. 1479-81, Jun 11 1994. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking).

ECKEL, R. H.; KRAUSS, R. M. American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. AHA Nutrition Committee. **Circulation**, v. 97, n. 21, p. 2099-100, Jun 2 1998. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322.

ELBERS, J. M. et al. Effects of sex steroid hormones on regional fat depots as assessed by magnetic resonance imaging in transsexuals. **Am J Physiol**, v. 276, n. 2 Pt 1, p. E317-25, Feb 1999. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513.

ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1391-401, 2011. ISSN 1078-8956.

FELDMAN, H. A. et al. Low dehydroepiandrosterone and ischemic heart disease in middle-aged men: prospective results from the Massachusetts Male Aging Study. **Am J Epidemiol**, v. 153, n. 1, p. 79-89, Jan 1 2001. ISSN 0002-9262 (Print)

0002-9262.

\_\_\_\_\_. Low dehydroepiandrosterone sulfate and heart disease in middle-aged men: cross-sectional results from the Massachusetts Male Aging Study. In: (Ed.). **Ann Epidemiol**. United States, v.8, 1998. p.217-28. ISBN 1047-2797 (Print)

1047-2797 (Linking).

FINUCANE, M. M. et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. **Lancet**, v. 377, n. 9765, p. 557-67, Feb 12 2011. ISSN 0140-6736.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, May 1957. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

FRANCESCHI, C. et al. Do men and women follow different trajectories to reach extreme longevity? Italian Multicenter Study on Centenarians (IMUSCE). **Aging (Milano)**, v. 12, n. 2, p. 77-84, Apr 2000. ISSN 0394-9532 (Print)

0394-9532.

FRUHBECK, G. et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, n. 6, p. E827-47, Jun 2001. ISSN 0193-1849 (Print)

0193-1849.



FUKAI, S. et al. Plasma sex hormone levels and mortality in disabled older men and women. **Geriatr Gerontol Int**, v. 11, n. 2, p. 196-203, Apr 2011. ISSN 1447-0594.

FULLER, C. M.; INSEL, P. A. I don't know the question, but sex is definitely the answer! Focus on "In pursuit of scientific excellence: sex matters" and "Do you know the sex of your cells?". In: (Ed.). **Am J Physiol Cell Physiol**. United States, v.306, 2014. p.C1-2. ISBN 1522-1563 (Electronic)

0363-6143 (Linking).

GHAFOORY, S. et al. Zonation of nitrogen and glucose metabolism gene expression upon acute liver damage in mouse. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e78262, 2013. ISSN 1932-6203.

GO, A. S. et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. In: (Ed.). **Circulation**. United States, v.127, 2013. p.143-52. ISBN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking).

GOMEZ-PEREZ, Y. et al. Gender dimorphism in high-fat-diet-induced insulin resistance in skeletal muscle of aged rats. **Cell Physiol Biochem**, v. 22, n. 5-6, p. 539-48, 2008. ISSN 1015-8987.

GONCHAROV, N. P.; KATSIA, G. V. [Neurosteroid dehydroepiandrosterone and brain function]. **Fiziol Cheloveka**, v. 39, n. 6, p. 120-8, Nov-Dec 2013. ISSN 0131-1646 (Print)

0131-1646.

GOODPASTER, B. H. et al. Obesity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women. **Arch Intern Med**, v. 165, n. 7, p. 777-83, Apr 11 2005. ISSN 0003-9926 (Print)

0003-9926.

GORDON, G. B.; BUSH, D. E.; WEISMAN, H. F. Reduction of atherosclerosis by administration of dehydroepiandrosterone. A study in the hypercholesterolemic New Zealand white rabbit with aortic intimal injury. **J Clin Invest**, v. 82, n. 2, p. 712-20, Aug 1988. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738.

GRANGER, D. N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol**, v. 255, n. 6 Pt 2, p. H1269-75, Dec 1988. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513.

GRUNDY, S. M. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary. **Crit Pathw Cardiol**, v. 4, n. 4, p. 198-203, Dec 2005. ISSN 1535-2811.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? **Trends Pharmacol Sci**, v. 32, n. 3, p. 125-30, Mar 2011. ISSN 0165-6147.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals In Biology And Medicine**. 4a. New York: 2007.

HANCOCK, J. T.; DESIKAN, R.; NEILL, S. J. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. **Biochem Soc Trans**, v. 29, n. Pt 2, p. 345-50, May 2001. ISSN 0300-5127 (Print)  
0300-5127.

HANDELSMAN, D. J. Androgen Physiology, Pharmacology and Abuse. In: DE GROOT, L. J.; BECK-PECCOZ, P., et al (Ed.). **Endotext**. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000.

HANNAH, S. et al. Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro. **FEBS Lett**, v. 372, n. 2-3, p. 233-7, Sep 25 1995. ISSN 0014-5793 (Print)  
0014-5793.

HANSEN, J. C.; GILMAN, A. P.; ODLAND, J. O. Is thermogenesis a significant causal factor in preventing the "globesity" epidemic? **Med Hypotheses**, v. 75, n. 2, p. 250-6, Aug 2010. ISSN 0306-9877.

HARRISON, R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 6, p. 774-97, Sep 15 2002. ISSN 0891-5849 (Print)  
0891-5849.

HART, C. D.; FLOZAK, A. S.; SIMMONS, R. A. Modulation of glucose transport in fetal rat lung: a sexual dimorphism. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 19, n. 1, p. 63-70, Jul 1998. ISSN 1044-1549 (Print)  
1044-1549.

HEBER, D. et al. Green tea, black tea, and oolong tea polyphenols reduce visceral fat and inflammation in mice fed high-fat, high-sucrose obesogenic diets. **J Nutr**, v. 144, n. 9, p. 1385-93, Sep 2014. ISSN 0022-3166.

HEGARTY, B. D. et al. The role of intramuscular lipid in insulin resistance. **Acta Physiol Scand**, v. 178, n. 4, p. 373-83, Aug 2003. ISSN 0001-6772 (Print)

0001-6772.

HENDERSON, G. C. Sexual dimorphism in the effects of exercise on metabolism of lipids to support resting metabolism. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 5, p. 162, 2014. ISSN 1664-2392.

HERRINGTON, D. M. Dehydroepiandrosterone and coronary atherosclerosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 774, p. 271-80, Dec 29 1995. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923.

HERRINGTON, D. M. et al. Plasma dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in patients undergoing diagnostic coronary angiography. **J Am Coll Cardiol**, v. 16, n. 6, p. 862-70, Nov 1990. ISSN 0735-1097 (Print)

0735-1097.

HOEFEL, A. L. et al. The effects of hypercaloric diets on glucose homeostasis in the rat: influence of saturated and monounsaturated dietary lipids. **Cell Biochem Funct**, v. 29, n. 7, p. 569-76, Oct 2011. ISSN 0263-6484.

HU, L. et al. Hypoxic preconditioning protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury through AMPK/eNOS/PGC-1alpha signaling pathway. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, n. 11, p. 7378-88, 2014. ISSN 1936-2625.

HUNTER, J. E.; ZHANG, J.; KRIS-ETHERTON, P. M. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. In: (Ed.). **Am J Clin Nutr**. United States, v.91, 2010. p.46-63. ISBN 1938-3207 (Electronic)

0002-9165 (Linking).

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**. IBGE. Rio de Janeiro, p.54. 2010

IRIMIA, J. M. et al. Muscle glycogen remodeling and glycogen phosphate metabolism following exhaustive exercise of wild type and laforin knockout mice. **J Biol Chem**, Jul 27 2015. ISSN 0021-9258.

ISHIHARA, F. et al. Role of adrenal androgens in the development of arteriosclerosis as judged by pulse wave velocity and calcification of the aorta. **Cardiology**, v. 80, n. 5-6, p. 332-8, 1992. ISSN 0008-6312 (Print)

0008-6312.

JACOB, M. H. et al. Redox imbalance influence in the myocardial Akt activation in aged rats treated with DHEA. **Exp Gerontol**, v. 45, n. 12, p. 957-63, Dec 2010. ISSN 0531-5565.

\_\_\_\_\_. Dehydroepiandrosterone improves hepatic antioxidant reserve and stimulates Akt signaling in young and old rats. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 127, n. 3-5, p. 331-6, Nov 2011. ISSN 0960-0760.

\_\_\_\_\_. Dehydroepiandrosterone modulates antioxidant enzymes and Akt signaling in healthy Wistar rat hearts. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 112, n. 1-3, p. 138-44, Nov 2008. ISSN 0960-0760 (Print)

0960-0760.

\_\_\_\_\_. DHEA effects on myocardial Akt signaling modulation and oxidative stress changes in aged rats. **Steroids**, v. 74, n. 13-14, p. 1045-50, Nov-Dec 2009. ISSN 0039-128x.

JACOBSSON, A. et al. Mitochondrial uncoupling protein from mouse brown fat. Molecular cloning, genetic mapping, and mRNA expression. **J Biol Chem**, v. 260, n. 30, p. 16250-4, Dec 25 1985. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

JANG, I. et al. Physiological difference between dietary obesity-susceptible and obesity-resistant Sprague Dawley rats in response to moderate high fat diet. **Exp Anim**, v. 52, n. 2, p. 99-107, Apr 2003. ISSN 1341-1357 (Print)

0007-5124 (Linking).

JANNER DDA, R. et al. Dehydroepiandrosterone effects on Akt signaling modulation in central nervous system of young and aged healthy rats. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 122, n. 4, p. 142-8, Oct 2010. ISSN 0960-0760.

JANNER, R. et al. Dehydroepiandrosterone effects on Akt signaling modulation in central nervous system of young and aged healthy rats. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 122, n. 4, p. 142-8, Oct 2010. ISSN 0960-0760.

JONES, T. H.; SAAD, F. The effects of testosterone on risk factors for, and the mediators of, the atherosclerotic process. **Atherosclerosis**, v. 207, n. 2, p. 318-27, Dec 2009. ISSN 0021-9150.

JURAVER-GESLIN, H. A.; DURAND, B. C. Early development of the neural plate: new roles for apoptosis and for one of its main effectors caspase-3. **Genesis**, v. 53, n. 2, p. 203-24, Feb 2015. ISSN 1526-954x.

KAJITA, K. et al. The role of atypical and conventional PKC in dehydroepiandrosterone-induced glucose uptake and dexamethasone-induced insulin resistance. In: (Ed.). **Biochem Biophys Res Commun**. United States: 2000 Academic Press., v.277, 2000. p.361-7. ISBN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking).

KAUFMANN, S. H. et al. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. **Cancer Res**, v. 53, n. 17, p. 3976-85, Sep 1 1993. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472.

KAWANO, H. et al. Dehydroepiandrosterone supplementation improves endothelial function and insulin sensitivity in men. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 7, p. 3190-5, Jul 2003. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972x.

KELLY, D. M.; JONES, T. H. Testosterone and obesity. **Obes Rev**, May 15 2015. ISSN 1467-7881.

KELLY, L. J. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. **Endocrinology**, v. 139, n. 12, p. 4920-7, Dec 1998. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227.

KHALIL, A. et al. Dehydroepiandrosterone protects low density lipoproteins against peroxidation by free radicals produced by gamma-radiolysis of ethanol-water mixtures. In: (Ed.). **Atherosclerosis**. Ireland, v.136, 1998. p.99-107. ISBN 0021-9150 (Print)

0021-9150 (Linking).

KIM, W. et al. Inflammation-induced radioresistance is mediated by ROS-dependent inactivation of protein phosphatase 1 in non-small cell lung cancer cells. **Apoptosis**, Jun 2 2015. ISSN 1360-8185.

KOB, R. et al. Gender-specific differences in the development of sarcopenia in the rodent model of the ageing high-fat rat. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 6, n. 2, p. 181-91, Jun 2015. ISSN 2190-5991 (Print)

2190-5991.

KOKAVEC, A. Effect of sucrose consumption on serum insulin, serum cortisol and insulin sensitivity in migraine: evidence of sex differences. **Physiol Behav**, v. 142, p. 170-8, Apr 1 2015. ISSN 0031-9384.

KOMESAROFF, P. A. Unravelling the enigma of dehydroepiandrosterone: moving forward step by step. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 886-8, Mar 2008. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227.

KOOPMAN, K. E. et al. Diet-induced changes in the Lean Brain: Hypercaloric high-fat-high-sugar snacking decreases serotonin transporters in the human hypothalamic region. **Mol Metab**, v. 2, n. 4, p. 417-22, 2013. ISSN 2212-8778.

\_\_\_\_\_. Hypercaloric diets with increased meal frequency, but not meal size, increase intrahepatic triglycerides: a randomized controlled trial. **Hepatology**, v. 60, n. 2, p. 545-53, Aug 2014. ISSN 0270-9139.

KOSTKA, T. et al. Leg extensor power and dehydroepiandrosterone sulfate, insulin-like growth factor-I and testosterone in healthy active elderly people. **Eur J Appl Physiol**, v. 82, n. 1-2, p. 83-90, May 2000. ISSN 1439-6319 (Print)

1439-6319.

KOTRONEN, A. et al. Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. In: (Ed.). **Diabetes Care**. United States, v.31, 2008. p.165-9. ISBN 1935-5548 (Electronic)

0149-5992 (Linking).

KRETSCHMER, B. D. et al. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. **Life Sci**, v. 76, n. 14, p. 1553-73, Feb 18 2005. ISSN 0024-3205 (Print)

0024-3205.

LACEDONIA, D. et al. Mitochondrial DNA alteration in obstructive sleep apnea. **Respir Res**, v. 16, p. 47, 2015. ISSN 1465-9921.

LAFONTAN, M.; LANGIN, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. In: (Ed.). **Prog Lipid Res**. England, v.48, 2009. p.275-97. ISBN 1873-2194 (Electronic)

0163-7827 (Linking).

LARDY, H. et al. Induction of thermogenic enzymes by DHEA and its metabolites. **Ann N Y Acad Sci**, v. 774, p. 171-9, Dec 29 1995. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking).

LI, J. et al. Astaxanthin Pretreatment Attenuates Hepatic Ischemia Reperfusion-Induced Apoptosis and Autophagy via the ROS/MAPK Pathway in Mice. **Mar Drugs**, v. 13, n. 6, p. 3368-87, 2015. ISSN 1660-3397.

LIAO, Y. H. et al. Effect of dehydroepiandrosterone administration on recovery from mix-type exercise training-induced muscle damage. **Eur J Appl Physiol**, v. 113, n. 1, p. 99-107, Jan 2013. ISSN 1439-6319.

LIEBERTHAL, W.; LEVINE, J. S. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. **Am J Physiol**, v. 271, n. 3 Pt 2, p. F477-88, Sep 1996. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513.

LIFSHITZ, F.; LIFSHITZ, J. Z. Globesity: the root causes of the obesity epidemic in the USA and now worldwide. **Pediatr Endocrinol Rev**, v. 12, n. 1, p. 17-34, Sep 2014. ISSN 1565-4753 (Print) 1565-4753 (Linking).

LIM, S. S. et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2224-60, Dec 15 2012. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking).

LINK, J. C. et al. Metabolic impact of sex chromosomes. **Adipocyte**, v. 2, n. 2, p. 74-9, Apr 1 2013. ISSN 2162-3945 (Print)

2162-3945.

LIU, D.; DILLON, J. S. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). In: (Ed.). **J Biol Chem**. United States, v.277, 2002. p.21379-88. ISBN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking).

\_\_\_\_\_. Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. **Steroids**, v. 69, n. 4, p. 279-89, Apr 2004. ISSN 0039-128X (Print)

0039-128x.

LIU, D. et al. Dehydroepiandrosterone stimulates endothelial proliferation and angiogenesis through extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated mechanisms. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 889-98, Mar 2008. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227.

LIU, T. C. et al. Effect of acute DHEA administration on free testosterone in middle-aged and young men following high-intensity interval training. **Eur J Appl Physiol**, v. 113, n. 7, p. 1783-92, Jul 2013. ISSN 1439-6319.

LOPEZ-MARURE, R. et al. Dehydroepiandrosterone delays LDL oxidation in vitro and attenuates several oxLDL-induced inflammatory responses in endothelial cells. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 6, n. 3, p. 174-82, Sep 2007. ISSN 1871-5281 (Print)

1871-5281.

LOVEJOY, J. C.; SAINSBURY, A. Sex differences in obesity and the regulation of energy homeostasis. **Obes Rev**, v. 10, n. 2, p. 154-67, Mar 2009. ISSN 1467-7881.

LU, K. et al. Protective effects of extendin4 on hypoxia/reoxygenation-induced injury in H9c2 cells. **Mol Med Rep**, v. 12, n. 2, p. 3007-16, Aug 2015. ISSN 1791-2997.

LUPTAK, I. et al. Long-term effects of increased glucose entry on mouse hearts during normal aging and ischemic stress. In: (Ed.). **Circulation**. United States, v.116, 2007. p.901-9. ISBN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking).

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 233-41, Sep 14 2000. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836.

MACHADO, V. L.; WASSERMANN, G. F.; MARQUES, M. In vitro effect of insulin on the uptake of glucose and alpha-aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle (*Chrysemys dorbigni*). **Gen Comp Endocrinol**, v. 82, n. 1, p. 8-13, Apr 1991. ISSN 0016-6480 (Print)

0016-6480.

MADRAZO, J. A.; KELLY, D. P. The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. In: (Ed.). **J Mol Cell Cardiol**. England, v.44, 2008. p.968-75. ISBN 1095-8584 (Electronic)

0022-2828 (Linking).

MARIEB, E. N.; HOEHN, K. **Anatomia e Fisiologia**. 3a. Porto Alegre: Artmed, 2009. 1072.

MASTROCOLA, R. et al. Pro-oxidant effect of dehydroepiandrosterone in rats is mediated by PPAR activation. **Life Sci**, v. 73, n. 3, p. 289-99, Jun 6 2003. ISSN 0024-3205 (Print)

0024-3205.



MATHEWS, C. E. et al. Acute Versus Progressive Onset of Diabetes in NOD Mice - Potential Implications for Therapeutic Interventions in Type 1 Diabetes. **Diabetes**, Jul 27 2015. ISSN 0012-1797.

MCCORD, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **N Engl J Med**, v. 312, n. 3, p. 159-63, Jan 17 1985. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793.

MELLON, S. H.; GRIFFIN, L. D.; COMPAGNONE, N. A. Biosynthesis and action of neurosteroids. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 37, n. 1-3, p. 3-12, Nov 2001.

MOHAN, P. F. et al. Effects of dehydroepiandrosterone treatment in rats with diet-induced obesity. **J Nutr**, v. 120, n. 9, p. 1103-14, Sep 1990. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166 (Linking).

MONTEIRO, C. A.; CANNON, G. The impact of transnational "big food" companies on the South: a view from Brazil. **PLoS Med**, v. 9, n. 7, p. e1001252, 2012. ISSN 1549-1277.

MORALES, A. J. et al. Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 78, n. 6, p. 1360-7, Jun 1994. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972x.

MORIN, C. et al. Dehydroepiandrosterone and alpha-estradiol limit the functional alterations of rat brain mitochondria submitted to different experimental stresses. **Neuroscience**, v. 115, n. 2, p. 415-24, 2002. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522.

MURAI, Y. et al. Flavonoids and their qualitative variation in *Calystegia soldanella* and related species (Convolvulaceae). **Nat Prod Commun**, v. 10, n. 3, p. 429-32, Mar 2015. ISSN 1934-578X (Print)

1555-9475.

NAKAMURA, S. et al. Possible association of heart failure status with synthetic balance between aldosterone and dehydroepiandrosterone in human heart. In: (Ed.). **Circulation**. United States, v.110, 2004. p.1787-93. ISBN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking).

NARKWICHEAN, A. et al. Effects of dehydroepiandrosterone on in vivo ovine follicular development. **Hum Reprod**, v. 29, n. 1, p. 146-54, Jan 2014. ISSN 0268-1161.

NAVARRO, G. et al. The role of androgens in metabolism, obesity, and diabetes in males and females. **Obesity (Silver Spring)**, v. 23, n. 4, p. 713-9, Apr 2015. ISSN 1930-7381.

NCEP. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). **Jama**, v. 285, n. 19, p. 2486-97, May 16 2001. ISSN 0098-7484 (Print)

0098-7484.

NEHRA, S. et al. Nanocurcumin protects cardiomyoblasts H9c2 from hypoxia-induced hypertrophy and apoptosis by improving oxidative balance. **J Physiol Biochem**, v. 71, n. 2, p. 239-51, Jun 2015. ISSN 1138-7548.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. Porto Alegre: ARTMED, 2011. 1273.

NEWSON, R. B. et al. The association of asthma, nasal allergies, and positive skin prick tests with obesity, leptin, and adiponectin. **Clin Exp Allergy**, v. 44, n. 2, p. 250-60, Feb 2014. ISSN 0954-7894.

NIETO-GARCIA, F. J.; BUSH, T. L.; KEYL, P. M. Body mass definitions of obesity: sensitivity and specificity using self-reported weight and height. **Epidemiology**, v. 1, n. 2, p. 146-52, Mar 1990. ISSN 1044-3983 (Print)

1044-3983.

NOONAN, W. T.; BANKS, R. O. Renal function and glucose transport in male and female mice with diet-induced type II diabetes mellitus. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 225, n. 3, p. 221-30, Dec 2000. ISSN 0037-9727 (Print)

0037-9727.

OGDEN, C. L. et al. Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. **Jama**, v. 311, n. 8, p. 806-14, Feb 26 2014. ISSN 0098-7484.

OPIE, L. H. The metabolic vicious cycle in heart failure. In: (Ed.). **Lancet**. England, v.364, 2004. p.1733-4. ISBN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking).

ORENTREICH, N. et al. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 59, n. 3, p. 551-5, Sep 1984. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking).

PADANILAM, B. J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 284, n. 4, p. F608-27, Apr 2003. ISSN 1931-857X (Print)

1522-1466.

PARKS, D. A.; GRANGER, D. N. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. **Acta Physiol Scand Suppl**, v. 548, p. 87-99, 1986. ISSN 0302-2994 (Print)

0302-2994.

PATEL, M. A.; KATYARE, S. S. Effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment on oxidative energy metabolism in rat liver and brain mitochondria. A dose-response study. **Clin Biochem**, v. 40, n. 1-2, p. 57-65, Jan 2007. ISSN 0009-9120 (Print)

0009-9120.

PAYER, B.; LEE, J. T. X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. **Annu Rev Genet**, v. 42, p. 733-72, 2008. ISSN 0066-4197 (Print)

0066-4197.

PEINADO, J. R. et al. The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots. **Proteomics**, v. 10, n. 18, p. 3356-66, Sep 2010. ISSN 1615-9853.

PEREZ-DE-HEREDIA, F. et al. Adiponectin is involved in the protective effect of DHEA against metabolic risk in aged rats. **Steroids**, v. 73, n. 11, p. 1128-36, Oct 2008. ISSN 0039-128X (Print)

0039-128x.

PERICHART-PERERA, O. et al. Correlates of dietary energy sources with cardiovascular disease risk markers in Mexican school-age children. In: (Ed.). **J Am Diet Assoc**. United States: 2010 American Dietetic Association. Published by Elsevier Inc, v.110, 2010. p.253-60. ISBN 1878-3570 (Electronic)

0002-8223 (Linking).

PERRINI, S. et al. Dehydroepiandrosterone stimulates glucose uptake in human and murine adipocytes by inducing GLUT1 and GLUT4 translocation to the plasma membrane. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. 41-52, Jan 2004. ISSN 0012-1797 (Print)

0012-1797 (Linking).

PETERSON, L. R. et al. Type 2 diabetes, obesity, and sex difference affect the fate of glucose in the human heart. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 308, n. 12, p. H1510-H1516, Jun 2015. ISSN 0363-6135.

PICKUP, J. C.; CROOK, M. A. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? **Diabetologia**, v. 41, n. 10, p. 1241-8, Oct 1998. ISSN 0012-186X (Print)

0012-186x.

PIRNAY, F. [Doping in sports]. **Rev Med Liege**, v. 56, n. 4, p. 265-8, Apr 2001. ISSN 0370-629X (Print)

0370-629x.

POP, C.; SALVESEN, G. S. Human caspases: activation, specificity, and regulation. **J Biol Chem**, v. 284, n. 33, p. 21777-81, Aug 14 2009. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

POPKIN, B. M. The nutrition transition in low-income countries: an emerging crisis. **Nutr Rev**, v. 52, n. 9, p. 285-98, Sep 1994. ISSN 0029-6643 (Print)

0029-6643.

\_\_\_\_\_. Dynamics of the nutrition transition and its implications for the developing world. **Forum Nutr**, v. 56, p. 262-4, 2003. ISSN 1660-0347 (Print)

0067-8198.

PORSOVA-DUTOIT, I.; SULCOVA, J.; STARKA, L. Do DHEA/DHEAS play a protective role in coronary heart disease? **Physiol Res**, v. 49 Suppl 1, p. S43-56, 2000. ISSN 0862-8408 (Print)

0862-8408.

PRATT, D. S.; KAPLAN, M. M. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. **N Engl J Med**, v. 342, n. 17, p. 1266-71, Apr 27 2000. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793.

PRIEUR, X.; ROSZER, T.; RICOTE, M. Lipotoxicity in macrophages: evidence from diseases associated with the metabolic syndrome. In: (Ed.). **Biochim Biophys Acta**. Netherlands: 2009 Elsevier B.V, v.1801, 2010. p.327-37. ISBN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking).

RACARU-HONCIUC, V.; BETEA, D. [Endocrine changes with aging: physiological rather than pathological]. **Rev Med Liege**, v. 69, n. 5-6, p. 329-36, May-Jun 2014. ISSN 0370-629X (Print)

0370-629x.

RADER, D. J.; DAUGHERTY, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 904-13, Feb 21 2008. ISSN 0028-0836.

RANI, A.; PRASAD, S. CoCl<sub>2</sub>-induced biochemical hypoxia down regulates activities and expression of super oxide dismutase and catalase in cerebral cortex of mice. **Neurochem Res**, v. 39, n. 9, p. 1787-96, Sep 2014. ISSN 0364-3190.

RAVAGLIA, G. et al. Determinants of functional status in healthy Italian nonagenarians and centenarians: a comprehensive functional assessment by the instruments of geriatric practice. **J Am Geriatr Soc**, v. 45, n. 10, p. 1196-202, Oct 1997. ISSN 0002-8614 (Print)

0002-8614.

REAVEN, G. M. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988. **Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 65; discussion 64, 66, Jan 1997. ISSN 0899-9007 (Print)

0899-9007.

REITER, W. J. et al. Dehydroepiandrosterone in the treatment of erectile dysfunction: a prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Urology**, v. 53, n. 3, p. 590-4; discussion 594-5, Mar 1999. ISSN 0090-4295 (Print)

0090-4295.

RIANT, E. et al. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2109-17, May 2009. ISSN 0013-7227.

ROM, W. N.; HARKIN, T. Dehydroepiandrosterone inhibits the spontaneous release of superoxide radical by alveolar macrophages in vitro in asbestosis. **Environ Res**, v. 55, n. 2, p. 145-56, Aug 1991. ISSN 0013-9351 (Print)

0013-9351.

ROSS, R. Cell biology of atherosclerosis. **Annu Rev Physiol**, v. 57, p. 791-804, 1995. ISSN 0066-4278 (Print)

0066-4278.

\_\_\_\_\_. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N Engl J Med**, v. 340, n. 2, p. 115-26, Jan 14 1999. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793.

ROULEAU, M. et al. PARP inhibition: PARP1 and beyond. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 4, p. 293-301, Apr 2010. ISSN 1474-175x.

RUTKOWSKI, K. et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA): hypes and hopes. **Drugs**, v. 74, n. 11, p. 1195-207, Jul 2014. ISSN 0012-6667 (Print)

0012-6667 (Linking).

RYU, J. W. et al. DHEA administration increases brown fat uncoupling protein 1 levels in obese OLETF rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 303, n. 2, p. 726-31, Apr 4 2003. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291x.

SALVESEN, G. S.; DIXIT, V. M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 443-6, Nov 14 1997. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674.

SCHAUER, J. E. et al. Dehydroepiandrosterone and a beta-agonist, energy transducers, alter antioxidant enzyme systems: influence of chronic training and acute exercise in rats. **Arch Biochem Biophys**, v. 283, n. 2, p. 503-11, Dec 1990. ISSN 0003-9861 (Print)

0003-9861.

SCHMIDT, F. M. et al. Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0121971, 2015. ISSN 1932-6203.

SCHMIDT, P. J. et al. Dehydroepiandrosterone monotherapy in midlife-onset major and minor depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, n. 2, p. 154-62, Feb 2005. ISSN 0003-990X (Print)

0003-990x.

SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1302, n. 2, p. 93-109, Jul 26 1996. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking).

SCHUMER, M. et al. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. **Am J Pathol**, v. 140, n. 4, p. 831-8, Apr 1992. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440.

SCLAFANI, A.; SPRINGER, D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. **Physiol Behav**, v. 17, n. 3, p. 461-71, Sep 1976. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking).

SHAH, K.; MCCORMACK, C. E.; BRADBURY, N. A. Do you know the sex of your cells? **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 306, n. 1, p. C3-18, Jan 1 2014. ISSN 0363-6143.

SHI, H.; CLEGG, D. J. Sex differences in the regulation of body weight. **Physiol Behav**, v. 97, n. 2, p. 199-204, May 25 2009. ISSN 0031-9384.

SHI, H. et al. Sexually different actions of leptin in proopiomelanocortin neurons to regulate glucose homeostasis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, n. 3, p. E630-9, Mar 2008. ISSN 0193-1849 (Print)

0193-1849.

SIMONCINI, T. et al. Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms. **Endocrinology**, v. 144, n. 8, p. 3449-55, Aug 2003. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227 (Linking).

SIRI-TARINO, P. W. et al. Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease. In: (Ed.). **Am J Clin Nutr**. United States, v.91, 2010. p.535-46. ISBN 1938-3207 (Electronic)

0002-9165 (Linking).

SIVITZ, W. I.; YOREK, M. A. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v. 12, n. 4, p. 537-77, Apr 2010. ISSN 1557-7716 (Electronic)

1523-0864 (Linking).

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica**. 2a. Porto Alegre: 2007.

SMYTH, S.; HERON, A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. **Nat Med**, v. 12, n. 1, p. 75-80, Jan 2006. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956.

STANLEY, W. C.; RECCHIA, F. A.; LOPASCHUK, G. D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. In: (Ed.). **Physiol Rev**. United States, v.85, 2005. p.1093-129. ISBN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking).

STEIN, C. J.; COLDITZ, G. A. The epidemic of obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 6, p. 2522-5, Jun 2004. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972x.

STOTTRUP, N. B. et al. L-glutamate and glutamine improve haemodynamic function and restore myocardial glycogen content during postischaemic reperfusion: A radioactive tracer study in the rat isolated heart. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 11, p. 1099-103, Nov 2006. ISSN 0305-1870 (Print)

0305-1870.

SUGIOKA, K.; SHIMOSEGAWA, Y.; NAKANO, M. Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. **FEBS Lett**, v. 210, n. 1, p. 37-9, Jan 1 1987. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793.

TAEGTMEYER, H.; MCNULTY, P.; YOUNG, M. E. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I: general concepts. **Circulation**, v. 105, n. 14, p. 1727-33, Apr 9 2002. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking).

TAGLIAFERRO, A. R. et al. Effects of dehydroepiandrosterone acetate on metabolism, body weight and composition of male and female rats. **J Nutr**, v. 116, n. 10, p. 1977-83, Oct 1986. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166.

TAKEDA, H. et al. Lipidomic analysis of plasma lipoprotein fractions in myocardial infarction-prone rabbits. **J Biosci Bioeng**, Jul 7 2015. ISSN 1347-4421.



THEVIS, M. et al. Annual banned-substance review: analytical approaches in human sports drug testing. **Drug Test Anal**, v. 7, n. 1, p. 1-20, Jan 2015.

TOOZE, J. A. et al. Total daily energy expenditure among middle-aged men and women: the OPEN Study. **Am J Clin Nutr**, v. 86, n. 2, p. 382-7, Aug 2007. ISSN 0002-9165 (Print)

0002-9165.

TOTH, M. J. et al. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 24, n. 2, p. 226-31, Feb 2000a.

\_\_\_\_\_. Menopause-related changes in body fat distribution. **Ann N Y Acad Sci**, v. 904, p. 502-6, May 2000b. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923.

TRASH, A. M. et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA)--a precursor steroid or an active hormone in human physiology. **J Sex Med**, v. 8, n. 11, p. 2960-82; quiz 2983, Nov 2011. ISSN 1743-6095.

TRASH, A. M.; KYPREOS, K. E. Testosterone and cardiovascular disease: an old idea with modern clinical implications. **Atherosclerosis**, v. 214, n. 2, p. 244-8, Feb 2011. ISSN 0021-9150.

TRASH, A. M. et al. Testosterone deficiency. **Am J Med**, v. 124, n. 7, p. 578-87, Jul 2011. ISSN 0002-9343.

\_\_\_\_\_. The dark side of testosterone deficiency: III. Cardiovascular disease. **J Androl**, v. 30, n. 5, p. 477-94, Sep-Oct 2009. ISSN 0196-3635.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br J Nutr**, v. 92, n. 3, p. 347-55, Sep 2004. ISSN 0007-1145 (Print)

0007-1145.

TROIANO, R. P.; FLEGAL, K. M. Overweight children and adolescents: description, epidemiology, and demographics. **Pediatrics**, v. 101, n. 3 Pt 2, p. 497-504, Mar 1998. ISSN 0031-4005 (Print)

0031-4005 (Linking).

TSUI, K. H. et al. Gene expression of cumulus cells in women with poor ovarian response after dehydroepiandrosterone supplementation. **Taiwan J Obstet Gynecol**, v. 53, n. 4, p. 559-65, Dec 2014. ISSN 1028-4559.

UNGER, R. H.; ORCI, L. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. In: (Ed.). **FASEB J.** United States, v.15, 2001. p.312-21. ISBN 0892-6638 (Print)

0892-6638 (Linking).

VALENTI, G. et al. Effect of DHEAS on skeletal muscle over the life span: the InCHIANTI study. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 59, n. 5, p. 466-72, May 2004. ISSN 1079-5006 (Print)

1079-5006.

VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. **Anal Biochem**, v. 11, n. 2, p. 256-65, May 1965. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697.

VARLAMOV, O.; BETHEA, C. L.; ROBERTS, C. T., JR. Sex-specific differences in lipid and glucose metabolism. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 5, p. 241, 2014. ISSN 1664-2392.

VILLAREAL, D. T.; HOLLOSZY, J. O. Effect of DHEA on abdominal fat and insulin action in elderly women and men: a randomized controlled trial. In: (Ed.). **JAMA.** United States, v.292, 2004. p.2243-8. ISBN 1538-3598 (Electronic)

0098-7484 (Linking).

VIRAG, L. et al. Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 6, p. 1153-67, Dec 2013. ISSN 0098-2997.

VIRZI, G. M. et al. Oxidative stress: dual pathway induction in cardiorenal syndrome type 1 pathogenesis. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 391790, 2015.

WALKER, M. Obesity, insulin resistance, and its link to non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism**, v. 44, n. 9 Suppl 3, p. 18-20, Sep 1995. ISSN 0026-0495 (Print)

0026-0495.

WALMSLEY, S. R. et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. **J Exp Med**, v. 201, n. 1, p. 105-15, Jan 3 2005. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007.

WANG, M. J. et al. Dehydroepiandrosterone inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV-2 microglia. **J Neurochem**, v. 77, n. 3, p. 830-8, May 2001. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042.

WANG, T. T. et al. Effects of dehydroepiandrosterone and calorie restriction on the Bcl-2/Bax-mediated apoptotic pathway in p53-deficient mice. **Cancer Lett**, v. 116, n. 1, p. 61-9, Jun 3 1997. ISSN 0304-3835 (Print)

0304-3835.

WATKINS, S. J.; BORTHWICK, G. M.; ARTHUR, H. M. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 47, n. 2, p. 125-31, Feb 2011. ISSN 1071-2690.

WEBB, S. J. et al. The biological actions of dehydroepiandrosterone involves multiple receptors. In: (Ed.). **Drug Metab Rev**. United States, v.38, 2006. p.89-116. ISBN 0360-2532 (Print)

0360-2532 (Linking).

WEISS, E. P. et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) replacement decreases insulin resistance and lowers inflammatory cytokines in aging humans. **Aging (Albany NY)**, v. 3, n. 5, p. 533-42, May 2011. ISSN 1945-4589.

WENSVEEN, F. M. et al. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. **Nat Immunol**, v. 16, n. 4, p. 376-85, Apr 2015. ISSN 1529-2908.

WHO. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. World Health Organization. Geneva. 2003

WHO, W. H. O.-. Global Health Observatory (GHO) data. 2015. Disponível em: <[http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/overweight\\_text/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/)>. Acesso em: 06/20/2015.

WILLIAMS, M. R. et al. Dehydroepiandrosterone increases endothelial cell proliferation in vitro and improves endothelial function in vivo by mechanisms independent of androgen and estrogen receptors. In: (Ed.). **J Clin Endocrinol Metab**. United States, v.89, 2004. p.4708-15. ISBN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking).

\_\_\_\_\_. Dehydroepiandrosterone inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation independent of ARs and ERs. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 1, p. 176-81, Jan 2002. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking).

WOODS, S. C. et al. Consumption of a high-fat diet alters the homeostatic regulation of energy balance. **Physiol Behav**, v. 83, n. 4, p. 573-8, Dec 30 2004. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384.

\_\_\_\_\_. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **J Nutr**, v. 133, n. 4, p. 1081-7, Apr 2003. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166 (Linking).

YAMADA, J. et al. Characteristics of dehydroepiandrosterone as a peroxisome proliferator. **Biochim Biophys Acta**, v. 1092, n. 2, p. 233-43, Apr 17 1991. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking).

YAMADA, S. et al. Effects of dehydroepiandrosterone supplementation on cognitive function and activities of daily living in older women with mild to moderate cognitive impairment. **Geriatr Gerontol Int**, v. 10, n. 4, p. 280-7, Oct 2010. ISSN 1447-0594.

YANG, G. et al. Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulfhydration of Keap1 and activation of Nrf2. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 15, p. 1906-19, May 20 2013. ISSN 1523-0864.

YANG, J. et al. [Estimation on the indirect economic burden of disease-related premature deaths in China, 2012]. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 35, n. 11, p. 1256-62, Nov 2014. ISSN 0254-6450 (Print)

0254-6450 (Linking).

YIM, J. E. et al. Femoral-gluteal subcutaneous and intermuscular adipose tissues have independent and opposing relationships with CVD risk. **J Appl Physiol (1985)**, v. 104, n. 3, p. 700-7, Mar 2008. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567.

YU, S. W. et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. **Science**, v. 297, n. 5579, p. 259-63, Jul 12 2002. ISSN 0036-8075.

ZAMPETAKI, A. et al. Hypoxia induces macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) gene expression in murine macrophages via NF-kappaB: the prominent role of p42/ p44 and PI3 kinase pathways. **Faseb j**, v. 18, n. 10, p. 1090-2, Jul 2004. ISSN 0892-6638.

ZHANG, S. M. et al. Cardioprotective effects of fucoidan against hypoxia-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells. **Pharm Biol**, v. 53, n. 9, p. 1352-7, Sep 2015. ISSN 1388-0209.

ZHAO, H. et al. Up-regulation of iNOS by hypoxic postconditioning inhibits H9c2 cardiomyocyte apoptosis induced by hypoxia/re-oxygenation. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 47, n. 7, p. 516-21, Jul 2015. ISSN 1672-9145.

ZHOU, Y. et al. Ample Evidence: Dehydroepiandrosterone (DHEA) Conversion into Activated Steroid Hormones Occurs in Adrenal and Ovary in Female Rat. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0124511, 2015. ISSN 1932-6203.

## ANEXO

Ms. Ref. No.: SBMB-D-15-00364

Title: DHEA effects on metabolic parameters in rats treated with hypercaloric diet  
The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

Dear Dr. Luiz Carlos Carlos Kucharski,

Your submission "DHEA effects on metabolic parameters in rats treated with hypercaloric diet" has been assigned manuscript number SBMB-D-15-00364.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/sbmb/>
2. Enter your login details
3. Click [Author Login]  
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.

Kind regards,  
The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

\*\*\*\*\*

For guidelines on how to track your manuscript in EES please go the following address:  
[http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a\\_id/89](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a_id/89)

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:  
[http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample\\_editorial\\_process.pdf](http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf)

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

*Editors-in-Chief*

**J.Adamski,**

German Res. Cntr. for Environmental Health (GmbH),  
Inst. of Developmental Genetics, Helmholtz Zentrum München,  
Ingolstädter Landstr. 1, 85764, Oberschleissheim, Germany

August 21, 2015

Dear Editor Dr. Adamski

Enclosed please find the original of the manuscript entitled “DHEA effects on metabolic parameters in rats treated with hypercaloric diet” which we made the revision and are submitting for publication in the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. All authors have made contributions to all parts of paper and gave to final approval of the version to be submitted.

Sincerely,

Dr. Luiz Carlos Kucharski

Dr. Luiz Carlos Kucharski  
Depto. de Fisiologia, ICBS, UFRGS  
Rua Sarmiento Leite, n° 500  
90.050-170 Porto Alegre, RS, Brazil  
Fax +55 51 33 08 36 56  
E-mail: [kuchars@ufrgs.br](mailto:kuchars@ufrgs.br)