

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**Efeitos da dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre o metabolismo
muscular e a função renal em ratos diabéticos**

Tese de Doutorado

MATHEUS PARMEGIANI JAHN

Orientador: Dr. Luiz Carlos Kucharski

Co-Orientadora: Dra. Maria Flavia Marques Ribeiro

Porto Alegre, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**Efeitos da dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre o metabolismo
muscular e a função renal em ratos diabéticos**

MATHEUS PARMEGIANI JAHN

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências Biológicas, área de concentração:
Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências Biológicas - Fisiologia

Orientador: Dr. Luiz Carlos Kucharski

Co-Orientadora: Dra. Maria Flavia Marques Ribeiro

Porto Alegre, 2010

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luiz Carlos Kucharski, pela dedicação, ajuda, conhecimentos, por acreditar em mim e pelo divertido e proveitoso cotidiano do laboratório;

À Professora Maria Flávia Marques Ribeiro, pelos conhecimentos, importantes conselhos e constante incentivo;

À Professora Roselis Silveira Martins da Silva e a todos os colegas e amigos do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada e do Laboratório de Interação Neuro-humoral, especialmente as colegas Maria Helena Jacob e Daiane Janner pela parceria nos experimentos e pelo agradável convívio;

À Professora Adriane Belló-Klein e ao colega Alex Sander Araújo pelos conhecimentos e pelo auxílio na fase final deste trabalho;

À Luana Ferreira Gomes, pela participação em praticamente todas as etapas deste trabalho, além da paciência, da compreensão e do carinho;

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

Aos meus pais, Julio e Neusa, e ao meu irmão Gabriel, por estarem presentes sempre que eu precisei, e serem sempre melhores do que eu esperava;

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 pelo auxílio financeiro;

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

À DEUS por tudo.

OBRIGADO

RESUMO

A diabetes melito é caracterizada por um grupo de distúrbios metabólicos resultantes de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou em ambos. A hiperglicemia crônica da diabetes está associada a danos a longo prazo a diversos órgãos, principalmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos, e estas complicações possuem uma relação direta com um desequilíbrio redox nestes órgãos. Diferentes substâncias tem sido experimentadas como estratégias para a prevenção das complicações da diabetes, especialmente substâncias com potencial antioxidante, como a dehidroepiandrosterona (DHEA). A DHEA é um hormônio esteróide endógeno envolvido em diversas funções biológicas, mas seus efeitos sobre o metabolismo muscular e sobre a função renal na diabetes ainda não estão completamente claros. Este estudo teve como objetivo estudar os efeitos do tratamento crônico com DHEA, em ratos controles e diabéticos, sobre alguns parâmetros metabólicos, funcionais e do estresse oxidativo no músculo esquelético e nos rins, por meio da análise do metabolismo da glicose, da expressão da Akt e do GLUT4, do peróxido de hidrogênio e dos níveis de tioredoxina (Trx) no músculo esquelético; bem como a análise da função renal, do metabolismo da glicose, da expressão do Fator Transformador de Crescimento β 1 (TGF- β 1) urinário e dos níveis de glutathiona no tecido renal. Ratos diabéticos foram tratados com injeções subcutâneas de DHEA na dose de 10 mg/kg diluída em óleo, uma vez por semana, por cinco semanas. Os resultados mostraram que houve uma diminuição na glicose plasmática, provavelmente ligada a um aumento na oxidação da glicose no tecido muscular, ou ao aumento da captação por outros tecidos. Apesar do aumento na expressão do GLUT4 no músculo dos ratos tratados com DHEA, somente os

animais controles apresentaram maior captação de glicose, mostrando que o GLUT4 pode estar presente em maior quantidade, mas não estar ativo nos ratos diabéticos tratados com DHEA. Os baixos níveis da Akt e da Trx nos diabéticos foram reduzidos ainda mais com o tratamento com DHEA, indicando um ambiente favorável ao desequilíbrio redox no músculo. Os ratos diabéticos tratados com DHEA apresentaram níveis de creatinina plasmática mais elevados e o *clearance* de creatinina foi menor. A captação e a oxidação de glicose foram menores na medula renal dos ratos diabéticos tratados com DHEA. O TGF- β 1 urinário e os níveis de glutatona total foram maiores nos ratos diabéticos tratados com DHEA. O tratamento com DHEA parece ser prejudicial para o tecido renal, já que reduziu a taxa de filtração glomerular, diminuiu o metabolismo na medula renal e aumentou a expressão do TGF- β 1 urinário, e a resposta compensatória do sistema da glutatona, provavelmente através de um mecanismo envolvendo um efeito pró-oxidante ou pró-fibrótico deste esteróide ou de algum de seus derivados. Embora tenha ocorrido uma redução na glicemia, e este poderia ser um efeito favorável, foram observados diversos efeitos prejudiciais, como a redução na Akt e na Trx no músculo, a redução no metabolismo e na função renal, o aumento no TGF- β 1 urinário e a geração de um ambiente mais favorável ao desequilíbrio redox nestes tecidos. Desta forma, mais estudos são necessários para se obter uma melhor compreensão dos efeitos deste hormônio na diabetes.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is characterized by a group of metabolic disorders resulting from defects in insulin secretion, insulin action or both. The chronic hyperglycemia of diabetes is associated with long-term damage to various organs, especially eyes, kidneys, nerves, heart and blood vessels, and these complications have a direct relationship with a redox imbalance in these organs. Different substances have been tried as a strategy for preventing complications of diabetes, especially substances with antioxidant potential, such as dehydroepiandrosterone (DHEA). DHEA is an endogenous steroid hormone involved in a number of biological functions, but its effects on muscle metabolism and on renal function in diabetes are not yet fully understood. The aim of this study is to assess the effect of chronic DHEA treatment in diabetic and control rats on some metabolic and functional parameters and on oxidative stress in skeletal muscle and kidneys, through the analysis of glucose metabolism, the expression of Akt and GLUT4, hydrogen peroxide and the levels of thioredoxin (Trx) in skeletal muscle, as well as analysis of renal function, glucose metabolism, the expression of urinary Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1) and the levels of total glutathione in renal tissue. Diabetic rats were treated with subcutaneous injections of a 10 mg/kg dose of DHEA diluted in oil, once a week for five weeks. The results showed a decrease in plasma glucose, probably linked to an increase in glucose oxidation in muscle tissue, or increased uptake by other tissues. Despite the increased expression of GLUT4 in the muscle of DHEA treated rats, only the control animals showed greater glucose uptake, showing that GLUT4 may be present in higher quantity, but not be active in diabetic rats treated with DHEA. Low levels of Akt and Trx in diabetics were reduced further by treatment with DHEA, indicating a favorable environment to redox imbalance in the muscle. Diabetic rats

treated with DHEA had significantly higher plasma creatinine and creatinine clearance was lower. The glucose uptake and oxidation were lower in the renal medulla of diabetic rats treated with DHEA. Urinary TGF- β 1 and levels of total glutathione were higher in diabetic rats treated with DHEA. Treatment with DHEA appears to be detrimental to the renal tissue, since it reduced the glomerular filtration rate, decreased metabolism in the renal medulla and increased the expression of urinary TGF- β 1 and the compensatory response of the glutathione system, probably through a mechanism involving a pro-oxidant or a pro-fibrotic effect of this steroid or any of its derivatives. Although a reduction in blood glucose occurs, and this could be a favorable effect, were observed several harmful effects such as reduction in Akt and Trx in the muscle, the reduction in metabolism and kidney function, increase in urinary TGF- β 1 and generating an environment more conducive to redox imbalance in these tissues. Thus, further studies are needed to gain a better understanding of the effects of this hormone in diabetes.

LISTA DE ABREVIATURAS

2DG: 2-deoxi-D-[1-¹⁴C]-glicose

AGE: produtos finais de glicação avançada

Akt: proteína quinase B

AMPK: proteína cinase ativada por AMP

ARE: elemento responsivo a antioxidantes

CAT: catalase

DHEA: dehidroepiandrosterona

DHEAS: dehidroepiandrosterona sulfatada

DM: diabetes melito

EAO: espécies ativas de oxigênio

G6PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase

GLUT: transportador de glicose

GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

GPx: glutathione peroxidase

GSH: glutathione reduzida

GSSG: dissulfeto de glutathione

HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

IL-1: interleucina 1

IRS: substrato do receptor de insulina

I/R: isquemia-reperfusão

LDL: lipoproteína de baixa densidade

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

Nrf2: fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2

PI3K: fosfatidilinositol 3 quinase

PIP3: fosfatidilinositol trifosfato

PKC- ζ / λ : proteína cinase C *zeta/lambda*

SOD: superóxido dismutase

SNC: sistema nervoso central

STZ: estreptozotocina

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGF- β 1: fator transformador de crescimento β 1

TFG: taxa de filtração glomerular

TNF- α : fator de necrose tumoral

Trx: tiorredoxina

UDP-glicose: uridina difosfato-glicose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Diabetes Melito	1
1.1.1 Fisiologia Renal e a Nefropatia Diabética	5
1.2 Radicais Livres	11
1.3 Diabetes experimental	15
1.4 Metabolismo da Glicose.....	15
1.5 Dehidroepiandrosterona (DHEA)	19
2. OBJETIVO GERAL	28
2.1 Objetivos específicos.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Animais.....	29
3.2 Indução da diabetes	29
3.3 Validação do modelo experimental: rato diabético	30
3.4 Tratamento com DHEA.....	30
3.5 Grupos Experimentais	31
3.6 Gaiolas Metabólicas	31
3.7 Procedimentos Experimentais	31
3.7.1 Glicemia	32
3.7.2 Creatinina Plasmática e Urinária	33
3.7.3 Taxa de Filtração Glomerular (TFG).....	33
3.7.4 Excreção Urinária de TGF- β 1.....	33
3.7.5 Índice Renal	34
3.7.6 Captação e Oxidação de Glicose no Músculo e no Rim	34
3.7.7 Glutathiona.....	36
3.7.8 Peróxido de hidrogênio	36
3.7.9 <i>Western Blot</i>	37
3.8 Análise estatística.....	39

3.9 Biossegurança.....	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Artigo 1	41
4.2 Artigo 2	49
5. DISCUSSÃO CONCLUSIVA	79
6. PERSPECTIVAS	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Melito

O envelhecimento populacional, a urbanização e especialmente o estilo de vida atual, caracterizado por inatividade física e obesidade, têm sido considerados alguns dos fatores relacionados com o aumento na incidência de diversos tipos de enfermidades, sendo que uma das mais prevalentes é a diabetes melito (WILD *et al.*, 2004). A diabetes é um problema de importância crescente em saúde pública, pois sua incidência e prevalência estão aumentando e alcançando proporções epidêmicas (WHO, 1999; SBD, 2003).

A diabetes melito (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. É caracterizado por uma hiperglicemia crônica, com distúrbios no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas, freqüentemente acompanhado de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial (WHO, 1999; SBD, 2003).

Os casos de diabetes podem ser classificados em duas categorias: na diabetes do tipo 1 (DM1), a causa é a absoluta deficiência na secreção de insulina pelas células β das ilhotas pancreáticas, resultado da destruição auto-imune dessas células. Também é conhecida como diabetes dependente de insulina e diabetes juvenil. A diabetes tipo 2 (DM2) é mais comum do que a tipo 1, perfazendo cerca de 90% dos casos de diabetes. Neste tipo, a causa é uma combinação de uma resistência à ação da insulina e uma resposta secretória de insulina compensatória inadequada. Esse aumento da resistência periférica à insulina se dá devido a defeitos na cascata de sinalização ou no próprio receptor de insulina. As causas para o estabelecimento desse tipo de diabetes, também conhecido como não-

dependente de insulina ou diabetes do adulto, ainda não foram completamente esclarecidas, mas acredita-se que obesidade, idade, deposição inadequada de gordura corporal e falta de exercício físico podem causar resistência à ação da insulina nos seus tecidos-alvo levando a esse quadro de diabetes (ADA, 2004). Na DM1, como o pâncreas não produz insulina, o tratamento é necessariamente com reposição de insulina. O tratamento atual da DM2 visa manter o controle glicêmico adequado, seja com dieta hipocalórica, aumento da prática de exercícios físicos ou uso de medicações (SBD, 2007).

A resistência à insulina ou sua ausência no organismo diminui a eficiência de utilização periférica de glicose e aumenta sua produção, elevando a glicemia. Os sintomas dessa hiperglicemia acentuada incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, às vezes com polifagia, e visão turva. Disfunção no crescimento e susceptibilidade a certas infecções também podem acompanhar a hiperglicemia crônica (ADA, 2004).

As complicações a longo prazo do diabetes incluem: retinopatia com perda potencial da visão; nefropatia levando à falência renal; neuropatia periférica com risco de úlceras nos pés; vasculopatia periférica, devido à deposição de lipídeos nos vasos à medida que vão sendo transportados para os tecidos; e neuropatia autonômica, causando sintomas gastrointestinais, genitourinários, cardiovasculares e disfunção sexual (ADA, 2004).

Pacientes com diabetes ainda apresentam incidência aumentada de aterosclerose cardiovascular, doença cerebrovascular e hipertensão arterial sistêmica (ADA, 2004). Sabe-se que a diabetes está associada com um risco de duas a quatro vezes maior de doença coronariana cardíaca. Além disso, a insuficiência cardíaca é comum em pacientes com diabetes não controlada,

indicando que a hiperglicemia pode ser responsável por isso (HAFFNER; CASSELLS, 2003).

A hiperglicemia crônica é o fator desencadeador de uma série de reações que causam o aumento na produção de radicais livres, e evidências indicam que esta toxicidade mediada pelos radicais livres contribui para o desenvolvimento das complicações da diabetes (BAYNES, 1991; ARAGNO *et al.*, 1999). Como consequência da hiperglicemia, a glicose e seus metabólitos, como a frutose-1,6-bifosfato e o gliceraldeído-3-fosfato, são direcionados para rotas metabólicas alternativas (ROBERTSON, 2004). Existe uma forte associação entre a geração de radicais livres e a ativação de rotas metabólicas envolvidas no desenvolvimento das complicações da diabetes. O sorbitol, um produto do metabolismo da glicose pela aldose redutase, se acumula intracelularmente e induz o dano celular, bem como pode influenciar na concentração de moléculas antioxidantes (CHUNG *et al.*, 2003); a proteína cinase C, estimulada através da ativação do diacilglicerol, está envolvida na regulação da permeabilidade vascular, fluxo sanguíneo e neovascularização; os produtos finais de glicação avançada, que modificam proteínas, lipídeos e o DNA, geram radicais livres e ativam diversas citocinas e fatores de crescimento como a interleucina 1 (IL-1) e o Fator Transformador de Crescimento β 1 (TGF- β 1) (FORBES *et al.*, 2003).

Uma das principais bases moleculares das complicações devido à hiperglicemia é a glicação de proteínas. Nesse processo, hexoses reagem de forma não-enzimática com os grupos amino das proteínas, resultando em produtos iniciais da glicação, como por exemplo a hemoglobina glicada (GUGLIUCCI, 2000).

Numa segunda fase da rota de glicação, uma série complexa de rearranjos e reações oxidativas leva esse produto inicial a reagir novamente com proteínas e a

formar os produtos finais da glicação, conhecidos como AGEs (*advanced glycated end-products*). Os AGEs são a forma final e estável dessa reação e são cumulativos no organismo, ou seja, suas concentrações não retornam ao normal mesmo quando a hiperglicemia é corrigida (GUGLIUCCI, 2000; LUCENFORD; GUGLIUCCI, 2005).

Os AGEs podem ser encontrados no plasma, células e tecidos e se acumulam na parede arterial, no mesângio e glomérulo renais e em outras membranas basais. Esse acúmulo de proteínas glicadas pode fornecer sítios catalisadores ativos estáveis da formação de radicais livres. A literatura aponta a glicação de lipoproteínas como uma possível explicação para as complicações vasculares do diabético, porém alguns mecanismos de ativação de células endoteliais têm sido observados somente *in vitro* ou em animais (GUGLIUCCI, 2000).

Os AGEs formados a partir do colágeno da parede arterial podem interceptar partículas de LDL (*low-density lipoprotein* ou lipoproteína de baixa densidade) e imunoglobulinas, que então se acumulam na camada íntima do vaso. Desta forma, as partículas de LDL ficam propensas à oxidação local, que causará uma ativação endotelial e que pode mediar a deposição de ateroma. Além disso, a ativação de receptores de monócitos por AGEs nas proteínas da parede vascular (como o colágeno e elastina) pode ativar citocinas mediadoras de reações inflamatórias (GUGLIUCCI, 2000).

Desta forma, busca-se compostos capazes de inibir o processo de geração de radicais livres e de AGEs e servir como protótipo de futuros medicamentos.

1.1.1 Fisiologia Renal e a Nefropatia Diabética

Os rins são órgãos excretores e reguladores. Pela excreção de água e solutos os rins livram-se do excesso de água e dos produtos residuais do corpo. Eles também regulam o volume e a constituição dos líquidos corpóreos, dentro de uma faixa de variação limitada, apesar da ampla variação da entrada de água e alimentos. Devido ao papel homeostático dos rins, os tecidos e as células do corpo podem realizar suas funções normais em um meio relativamente constante.

Os rins têm várias funções principais, incluindo: Regulação da osmolaridade e do volume de líquidos no corpo, através da regulação da excreção de NaCl e água; regulação do equilíbrio eletrolítico; regulação do equilíbrio ácido-básico; excreção de produtos metabólicos e de substâncias estranhas; produção e secreção de hormônios e gliconeogênese (BERNE; LEVY, 2000; EATON; POOLER, 2006).

Anatomicamente o rim é formado por uma região mais externa, chamada de córtex renal e uma região mais interna chamada de medula renal. A massa de tecido funcional tanto do córtex como da medula é constituída principalmente de túbulos (néfrons e túbulos coletores) e vasos sanguíneos (vasos capilares e semelhantes a capilares). Túbulos e vasos sanguíneos estão entrelaçados ou dispostos em arranjos paralelos e, em ambos os casos, estão sempre perto uns dos outros. Entre os túbulos e os vasos sanguíneos está o interstício, que corresponde a menos de 10% do volume renal total. O interstício contém células intersticiais espalhadas (fibroblastos e outras) que sintetizam uma matriz extracelular de colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas (EATON; POOLER, 2006).

As estruturas funcionais do rim são os néfrons e os túbulos coletores, para onde os néfrons drenam.

O manejo renal de qualquer substância consiste numa combinação de três processos: filtração, reabsorção e secreção.

A formação de urina começa com a filtração glomerular, que é o fluxo de líquido filtrado dos capilares glomerulares para dentro da cápsula de Bowman. O filtrado glomerular (i.e., o fluido dentro da cápsula de Bowman) é muito parecido com o plasma sanguíneo. Entretanto, contém poucas proteínas. As grandes proteínas plasmáticas como a albumina e as células do sangue são excluídas pelo movimento através da barreira de filtração. O filtrado contém principalmente íons inorgânicos e solutos orgânicos de baixo peso molecular praticamente nas mesmas concentrações que o plasma (EATON; POOLER, 2006).

O volume de filtrado formado por unidade de tempo é conhecido como a taxa de filtração glomerular (TFG). A oportunidade de filtrar esse enorme volume de plasma permite aos rins excretar grandes quantidades de produtos residuais e regular os constituintes do meio interno com muita precisão (EATON; POOLER, 2006).

A TFG é a soma das intensidades de filtração de todos os néfrons em funcionamento. Assim, a TFG é o índice da função dos rins. O conhecimento da TFG é essencial na avaliação da gravidade e do desenvolvimento da doença renal. Queda na TFG significa, geralmente, que a doença está progredindo (BERNE; LEVY, 2000).

O volume e o conteúdo de solutos da urina final, que entra na pelve renal, são bem diferentes daqueles do filtrado glomerular. À medida que o filtrado flui da cápsula de Bowman pelas várias porções do túbulo, sua composição é alterada, mais por remoção de substâncias (reabsorção tubular) mas também por adição de substâncias (secreção tubular). O túbulo é, em toda a sua extensão, intimamente

associado com capilares peritubulares, relação essa que permite a transferência de substâncias entre os capilares e a luz do túbulo (EATON; POOLER, 2006).

Para cada substância do plasma, se aplica uma combinação particular de filtração, reabsorção e secreção. As proporções relativas desses processos então determinam a quantidade excretada. É importante salientar que as taxas pelas quais esses processos ocorrem, para a maioria dessas substâncias, estão sujeitas ao controle fisiológico. Produzindo mudanças nas taxas de filtração, reabsorção, ou secreção, quando o conteúdo corporal de um composto está acima ou abaixo do normal, estes mecanismos conseguem regular a sua excreção para manter o corpo em equilíbrio (EATON; POOLER, 2006).

A insuficiência renal crônica resulta da perda irreversível de grande número de néfrons funcionais. Com frequência, os sinais clínicos graves só aparecem quando o número de néfrons funcionais cai para pelo menos 70% abaixo do normal. Em geral, a insuficiência renal crônica, assim como a insuficiência renal aguda, pode ocorrer em consequência de distúrbios dos vasos sanguíneos, glomérulos, túbulos, interstício renal e trato urinário inferior. Apesar da grande variedade de doenças que podem levar ao desenvolvimento de insuficiência renal crônica, o resultado final é essencialmente o mesmo – diminuição no número de néfrons funcionais (GUYTON; HALL, 1998).

A diabetes e a hipertensão são reconhecidas como as principais causas de insuficiência renal de estágio terminal (GUYTON; HALL, 1998).

Ainda não estão totalmente esclarecidas as causas dessa lesão renal progressiva, mas alguns pesquisadores acreditam que possa estar relacionada à pressão aumentada ou estiramento dos glomérulos restantes, o que ocorre em consequência da vasodilatação adaptativa ou de aumento da pressão arterial.

Acredita-se que o aumento crônico da pressão e estiramento de pequenas arteríolas e glomérulos provoque finalmente a esclerose destes vasos (substituição do tecido normal por tecido conjuntivo). Essas lesões escleróticas podem eventualmente obliterar o glomérulo, com a conseqüente redução adicional da função renal, além de produzir alterações adaptativas nos néfrons remanescentes. Este ciclo vicioso lento e progressivo acaba resultando em insuficiência renal terminal (FARIA, 2001).

Os efeitos da insuficiência renal sobre os líquidos corporais incluem: edema generalizado decorrente da retenção de água e sal, acidose resultante da incapacidade de os rins eliminarem do corpo produtos ácidos normais, concentração elevada de nitrogênio não protéico – sobretudo a uréia, o ácido úrico e a creatinina – em decorrência da incapacidade de o organismo excretar os produtos finais das proteínas e altas concentrações plasmáticas de outras substâncias excretadas pelos rins, como sulfatos, fenóis, fosfatos, potássio e bases guanidínicas. Esta condição global é denominada uremia devido à elevada concentração de uréia nos líquidos corporais. As concentrações desses produtos podem aumentar até 10 vezes o normal durante uma a duas semanas de insuficiência renal completa. Na presença de insuficiência renal crônica, as concentrações aumentam aproximadamente em proporção ao grau de redução dos néfrons funcionais. Por essa razão, a determinação das concentrações de tais substâncias, sobretudo a uréia e a creatinina, fornece um importante meio de avaliar o grau de insuficiência renal (GUYTON; HALL, 1998).

Uma das maiores complicações do DM é uma progressiva nefropatia que se desenvolve em aproximadamente 35% dos pacientes a partir de 10 – 20 anos após o início da doença e leva, na maioria dos casos, à insuficiência renal terminal (ADA, 1998).

A nefropatia diabética representa atualmente a principal causa de insuficiência renal terminal nos Estados Unidos, e sua frequência está aumentando, devido à ascensão da diabetes do tipo 2 (FARIA, 2001).

A alteração mais precoce é o espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares. Simultaneamente, verifica-se uma esclerose glomerular progressiva, caracterizada por expansão mesangial acelular. A expansão mesangial progressiva causa colapso dos capilares glomerulares e a área de filtração declina proporcionalmente (GUYTON; HALL, 1998; FARIA, 2001).

Em decorrência da expansão do mesângio e do colapso progressivo dos capilares glomerulares ocorre isquemia túbulo-intersticial, observando-se infiltrado inflamatório e posteriormente atrofia e fibrose. Esta lesão isquêmica favorece a ocorrência de necrose da papila renal. A expansão da matriz extracelular no glomérulo e nos túbulos, isto é, o acúmulo de colágeno, fibronectina e lamininas, característica da nefropatia diabética, está diretamente relacionada aos AGEs, resultando em alterações na forma e na função da matriz (FARIA, 2001; FORBES *et al.*, 2003).

Um dos parâmetros utilizados para se avaliar o início do processo de nefropatia é a medida do TGF β 1, que é uma citocina diretamente envolvida na gênese da glomeruloesclerose nos ratos diabéticos (BERTOLUCI *et al.*, 1996; SCHAAN *et al.*, 2003).

Logo após o aparecimento da DM, praticamente todos os pacientes apresentam aumento no fluxo sanguíneo renal e na taxa de filtração glomerular, ou seja, um estado de hiperfiltração glomerular. Os rins encontram-se aumentados de tamanho e os glomérulos e túbulos tornam-se hipertrofiados. A TFG excede em 20-40% o valor normal (dos não-diabéticos). Mesmo após a evolução para a falência

renal, os rins do diabético permanecem proporcionalmente maiores que os rins terminais em outras patologias (FARIA, 2001).

A hiperfiltração está associada ao espessamento da membrana basal glomerular. Atribui-se ao hiperfluxo renal um papel fundamental no desencadeamento e progressão da nefropatia diabética. Os mecanismos iniciais, dependentes da hiperglicemia, parecem envolver a ativação renal do sistema das cininas-prostaglandinas. Quando a glomeruloesclerose se estabelece, a progressão da doença, provavelmente, deve-se à hiperfiltração compensatória, condição adaptativa em que os néfrons remanescentes tentam manter a TFG (FARIA, 2001).

O aparecimento da proteinúria marca o início da nefropatia diabética propriamente dita. O paciente que apresenta proteinúria já apresenta lesão glomerular visível à microscopia óptica – neste caso, a expansão da matriz mesangial (GUYTON; HALL, 1998; FARIA, 2001).

Simultaneamente, a TFG inicia seu declínio como resultado da glomeruloesclerose. Quando a taxa de filtração glomerular cai abaixo de um determinado limiar, tem início a elevação dos nitrogênios não-protéicos no plasma, marcando o início da insuficiência renal. Neste momento, a evolução para a síndrome urêmica e rins em estado terminal é a regra, mesmo com intervenções atualmente disponíveis que retardam o processo de deterioração renal (GUYTON; HALL, 1998; FARIA, 2001).

Estudos indicam que as espécies ativas de oxigênio possuem um papel chave na fisiopatologia da nefropatia diabética (LARKINS; DUNLOP, 1992; HA; KIM, 1995). A hiperglicemia, que é o principal fator determinante do início da progressão da nefropatia diabética, não apenas gera mais EAO, como também atenua os

mecanismos antioxidantes através da glicação das enzimas antioxidantes (RUIZ *et al.*, 1999).

1.2 Radicais Livres

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, e por isso podem ser extremamente reativos e capazes de atacar inúmeras biomoléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). No processo de respiração celular, o oxigênio recebe quatro elétrons de uma única vez por ação da enzima citocromo oxidase, resultando na redução do oxigênio até água. Porém, devido à sua configuração eletrônica, o oxigênio recebe um elétron de cada vez – redução monoelétrica – formando compostos intermediários, os quais são bastante reativos. Tais compostos são chamados de Espécies Ativas de Oxigênio (EAO ou ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) e alguns deles são radicais livres. As EAO são radicais de oxigênio altamente reativos ou compostos que são prontamente convertidos nesses radicais reativos nas células. As EAO formadas pela redução do oxigênio são o radical superóxido (O_2^-), o não-radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH). O dano causado por radicais livres contribui para a morte e a degeneração celular em um amplo espectro de doenças, como a diabetes, a aterosclerose, insuficiência renal, envelhecimento, doença de Parkinson, danos por isquemia/reperfusão entre outros (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

As EAO podem ser geradas como subprodutos acidentais ou produtos principais de reações enzimáticas ou não-enzimáticas. Os radicais de oxigênio e seus derivados podem ser fatais para as células. Em alguns casos, o dano por radicais livres é a causa direta de um estado patológico (p.ex., dano tecidual iniciado

por exposição à radiação ionizante). Nas doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, ou na lesão de isquemia/reperfusão, as EAO podem perpetuar o dano celular causado por outro processo (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

Os sistemas biológicos estão normalmente aptos a se defender contra o dano causado pelas EAO, regulando seu estado redox (redução/oxidação) através da utilização de diversos sistemas antioxidantes. As células se protegem contra o dano por EAO e outros radicais por meio de processos de reparo, compartimentalização da produção de radicais livres, enzimas de defesa, como a superóxido-dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona-peroxidase (GPX) e antioxidantes endógenos, como a glutatona e a tiorredoxina (Trx) e exógenos como a vitamina E, a vitamina C e os flavonóides. O estresse oxidativo ocorre quando a velocidade de geração de EAO excede a capacidade da célula de removê-las (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

A capacidade intracelular de homeostase redox é substancialmente baseada em algumas moléculas antioxidantes endógenas, como a glutatona e a tiorredoxina (VALKO *et al.*, 2007).

A glutatona é a fonte primária doadora de elétrons para os radicais livres - utilizada por todos os tipos de glutatona peroxidases - evitando assim que danifiquem outras moléculas. A glutatona é o principal e mais abundante tiol envolvido na defesa antioxidante celular e é produzida em todos os órgãos. Presente principalmente na sua forma reduzida (GSH), a glutatona age na detoxificação de xenobióticos e de compostos deletérios naturais, como peróxido de hidrogênio, outros peróxidos e radicais livres. A depleção de glutatona está associada a muitas doenças como câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares em humanos (PASTORE *et al.*, 2003).

A razão entre a glutathiona reduzida e a glutathiona oxidada (GSH/GSSG) em células normais é alta, tendo mais glutathiona reduzida do que glutathiona oxidada no estado de equilíbrio da célula. Além disso, há um mecanismo de regeneração da glutathiona reduzida. A glutathiona oxidada pode ser ressintetizada pela interação com nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) - fonte de elétrons redutores - através da enzima glutathiona redutase.

O NADPH essencial para a reação de ressíntese da glutathiona pode ser fornecido por vários sistemas enzimáticos, e entre os mais conhecidos está a via pentose fosfato. A primeira enzima desta via é a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e a velocidade na qual esta rota funciona é controlada pelo fornecimento de NADP^+ para a G6PDH (Halliwell & Gutteridge, 1999). A dehidroepiandrosterona (DHEA) é um potente inibidor não-competitivo da enzima G6PDH, a qual converte glicose-6-fosfato em 6-fosfogliconato em um processo dependente de NADP^+ produzindo NADPH (LEOPOLD; LOSCALZO, 2000). Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* indicam que a DHEA inibe a atividade da G6PDH através da ligação ao complexo ternário substrato-coenzima-enzima e, como resultado, pode promover o estresse oxidativo (LEOPOLD; LOSCALZO, 2000).

A tioredoxina (Trx), uma proteína redox-sensível, não está envolvida somente nas funções citoprotetoras, mas também na regulação da proliferação celular. O sistema da tioredoxina consiste em duas enzimas antioxidantes oxirredutases: a tioredoxina (Trx-1) e a tioredoxina redutase. Este sistema age como um *scavenger* de peróxido de hidrogênio. Alterações na tioredoxina têm sido encontradas em diversas condições clínicas, como a formação da catarata, doenças isquêmicas cardíacas, cânceres, AIDS, complicações da diabetes, doenças hepáticas e renais entre outras (MAULIK; DAS, 2008).

As possibilidades de resposta dos organismos ao estresse oxidativo são a adaptação, por aumento na atividade antioxidante, ocasionando hiperproteção à célula contra futuros danos; o dano tecidual, por agressão a lipídios, carboidratos ou proteínas; e a morte celular, por necrose ou apoptose (PINCEMAIL, 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Estudos têm demonstrado aumento das EAO e do dano oxidativo induzido pela glicose na diabetes em diversos tecidos (ARAGNO *et al.*, 1999, 2001; HE *et al.*, 2009). Em paralelo ao dano oxidativo, são geradas reações defensivas a estímulos oxidativos para neutralizar as espécies reativas e os danos oxidativos, que incluem o aumento da produção de moléculas antioxidantes e de enzimas/proteínas envolvidas no catabolismo e na desintoxicação química das EAO (HE *et al.*, 2009; MATHERS *et al.*, 2004). Estudos têm mostrado que o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) desempenha um papel crítico na defesa oxidativa. O Nrf2 atua como um receptor ativado por xenobióticos que integra uma vasta gama de sinais químicos, em especial estímulos oxidativos, coordenando e regulando a expressão e indução de uma série de proteínas e enzimas citoprotetoras (HE *et al.*, 2009). Evidências sugerem que o Nrf2 exerce papel fundamental na regulação da homeostase celular da glutathione e da Trx (HO *et al.*, 2005; TANITO; AGBAGA; ANDERSON, 2007; HARVEY *et al.*, 2009). O Nrf2, que se liga ao elemento responsivo a antioxidantes (ARE), tem sido sugerido como um fator de transcrição fundamental na região promotora de vários genes, codificando a síntese de enzimas antioxidantes em vários tipos de células e tecidos (LEE; JOHNSON, 2004; ZHU *et al.*, 2005). Há evidências que mudanças no equilíbrio redox celular em direção ao dano oxidativo leva à oxidação e propicia a translocação do Nrf2 para o núcleo (KWEON *et al.*, 2006).

1.3 Diabetes experimental

O modelo experimental de DM contribui para o entendimento das causas, conseqüências e tratamento desta doença. Para o seu desenvolvimento são utilizadas toxinas químicas (aloxano, estreptozotocina, queladores de zinco), animais transgênicos, entre outros. A estreptozotocina (STZ) é empregada na indução da diabetes experimental devido a sua seletividade de ação sobre as células β das ilhotas pancreáticas. A estreptozotocina é uma nitrosuréia derivada de um fungo – *Streptomyces griseus* – que produz severa insuficiência de insulina em ratos, simulando então a diabetes tipo 1 (PICKUP; WILLIAMS, 1997).

1.4 Metabolismo da Glicose

A glicose desempenha um papel central no metabolismo de todos os tecidos. Ela é o substrato energético universal para as células e a fonte de carbono para a síntese de muitos outros compostos. Todos os tipos de células dos humanos a utilizam para obter energia (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

A distribuição da glicose no corpo todo é controlada pela expressão e regulação de diversas isoformas de transportadores específicos para cada tecido, chamados de GLUTs, cujas propriedades cinéticas distintas desempenham papel prioritário na homeostase da glicose (KAKUDA; MACLEOD, 1994). Como cada tecido tem suas necessidades específicas de glicose (LIENHARD *et al.*, 1992), o respectivo transporte através da membrana celular assume um papel central no metabolismo e na homeostase celular (GOULD; HOLMAN, 1993).

Os transportadores de glicose são amplamente distribuídos nas diferentes células, onde estes ficam expostos na superfície da célula para mediar o transporte

facilitado de glicose através da membrana. Um membro desta família, o transportador de glicose regulado pela insulina, GLUT4, fica reservado dentro das células até o momento que este é recrutado e deslocado até a superfície da célula para aumentar a captação de glicose em resposta à insulina (JAMES; PIPER, 1994; HUANG; CZECH, 2007). O GLUT4 é expresso basicamente em adipócitos e células musculares, onde é freqüentemente recrutado para aumentar a captação de glicose por estes tecidos (SLOT *et al.*, 1991a, 1991b; HUANG; CZECH, 2007). O transportador de glicose GLUT4 é o principal mediador da remoção da glicose da circulação e um regulador chave na homeostase corporal da glicose. O GLUT4 é estimulado a ser transportado, dentro destas células especializadas, principalmente por uma rota regulatória dependente de insulina. A natureza exata desta rota ainda não está totalmente definida (Figura 1), mas sabe-se que a insulina e diversos outros hormônios e condições fisiológicas são capazes de estimular a translocação de GLUT4 até a superfície da célula e a captação de glicose. A principal rota de sinalização para a translocação do GLUT4 para a membrana envolve a ligação da insulina ao seu receptor, gerando uma seqüência de eventos intracelulares que envolvem a ativação de diversos intermediários como a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS), o recrutamento da PI3-cinase, a geração do fosfatidil inositol trifosfato (PIP3) que ativa a proteína cinase B (Akt), e subseqüentes passos de ativação a partir desta proteína que ainda estão sendo estudados (HUANG; CZECH, 2007). O exercício também induz a translocação de GLUT4 no músculo esquelético através de uma rota independente de insulina, que envolve a proteína cinase ativada por AMP (AMPK), e subseqüentes passos ainda desconhecidos. (RYDER; CHIBALIN; ZIERATH, 2001; HUANG; CZECH, 2007; ROGERS *et al.*, 2009).

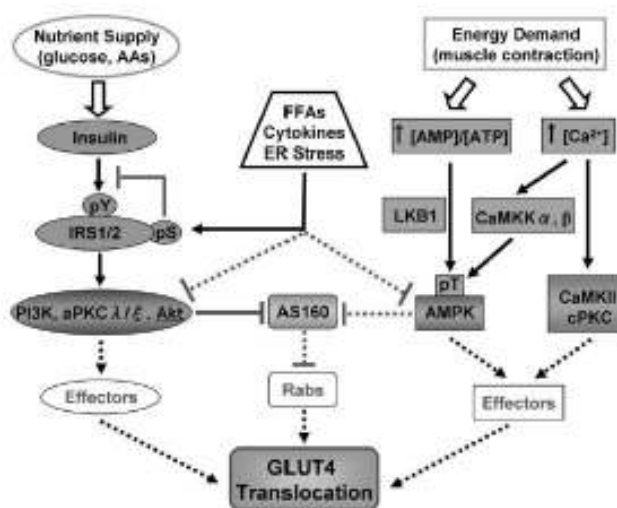


Figura 1: Convergências nas rotas de sinalização iniciadas pela insulina ou pelo exercício levando ao aumento na translocação do GLUT4 (Huang; Czech, 2007).

A proteína cinase B (Akt) é uma serina/treonina cinase citosólica envolvida na regulação do metabolismo, do crescimento, da proliferação e da sobrevivência celular. O envolvimento da Akt na sobrevivência celular é um processo complexo, o qual exige uma extensa cascata de eventos intracelulares (MULLONKAL; TOLEDO-PEREYRA, 2007). A Akt age como uma cinase de sobrevivência fosforilando várias moléculas reguladoras da apoptose (MULLONKAL; TOLEDO-PEREYRA, 2007). Quando a Akt é ativada, dissocia-se da membrana plasmática e fosforila diversos substratos no citoplasma e no núcleo (SALE; SALE, 2008). Araujo e colaboradores (2008) sugerem que o peróxido de hidrogênio pode diretamente alterar a conformação da Akt promovendo maior susceptibilidade para a fosforilação ou, ainda secundariamente, promovendo o desequilíbrio do estado redox. Esta proteína está associada com diversas outras rotas intracelulares, incluindo a rota de sinalização da insulina no músculo e no tecido adiposo, que termina com a

translocação do transportador de glicose GLUT4 até a membrana celular (ISHIZUKA *et al.*, 1999; KANG *et al.*, 2004; HUANG; CZECH, 2007).

Além do músculo e do tecido adiposo, o GLUT4 é expresso em níveis relativamente baixos em vários outros tecidos, incluindo o rim (BELL *et al.*, 1993; ASCHENBACH *et al.*, 2009), onde sua distribuição intracelular e rota de regulação da translocação ainda não são bem conhecidas, e sua distribuição varia com a atividade de transporte de glicose e a necessidade metabólica das células ao longo do néfron (BROSIUS *et al.*, 1992; CHIN; ZHOU; BONDY, 1993).

Após a glicose ser transportada para dentro das células, ela é fosforilada pela enzima hexoquinase para formar glicose-6-fosfato, a qual pode, então, entrar em diversas rotas metabólicas. As três principais rotas que são mais comuns a todos os tipos de células são a glicólise, a rota da pentose-fosfato e a síntese de glicogênio. O principal destino da glicose-6-fosfato é a oxidação via rota da glicólise, que fornece ATP para todos os tipos de células (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

Outro importante destino da glicose-6-fosfato é a oxidação via rota da pentose-fosfato, que produz NADPH. Os equivalentes redutores de NADPH são usados para reações biossintéticas e para a prevenção de danos oxidativos das células (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

A glicose-6-fosfato também é convertida em UDP-glicose, cujo principal destino é a síntese de glicogênio, mas a contribuição relativa da síntese de glicogênio é muito baixa quando comparada com a glicólise (ROSSETTI; GIACCARI, 1990; SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

1.5 Dehidroepiandrosterona (DHEA)

A DHEA (Figura 1) e a DHEAS (DHEA sulfatada) são hormônios esteróides derivados do colesterol e sintetizados principalmente no córtex das adrenais, nas gônadas e na placenta. A síntese dos hormônios esteróides requer várias reações enzimáticas seqüenciais (Figura 3) que convertem o colesterol em glicocorticóides, mineralocorticóides ou hormônios sexuais, iniciando-se com a conversão do colesterol em pregnenolona, reação catalisada pela enzima citocromo P450_{scc} (*side chain cleavage*). A taxa de síntese dos esteróides é controlada pelo transporte do colesterol do citoplasma para a membrana mitocondrial, onde a esteroidogênese começa pela produção de pregnenolona, a partir do colesterol. A síntese de cada esteróide é dependente da expressão de enzimas e/ou da competição entre as enzimas por determinado substrato. Nas gônadas estão expressas principalmente as enzimas que resultam na produção de androgênios (testosterona) e estrogênios (estradiol). Nas adrenais estão expressas as enzimas que resultam na produção de glicocorticóides (cortisol), mineralocorticóides (aldosterona) e androgênios (DHEA) (MOLINA, 2007).

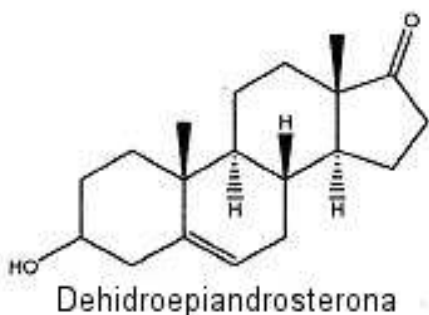


Figura 2: DHEA (adaptado de Molina, 2007).

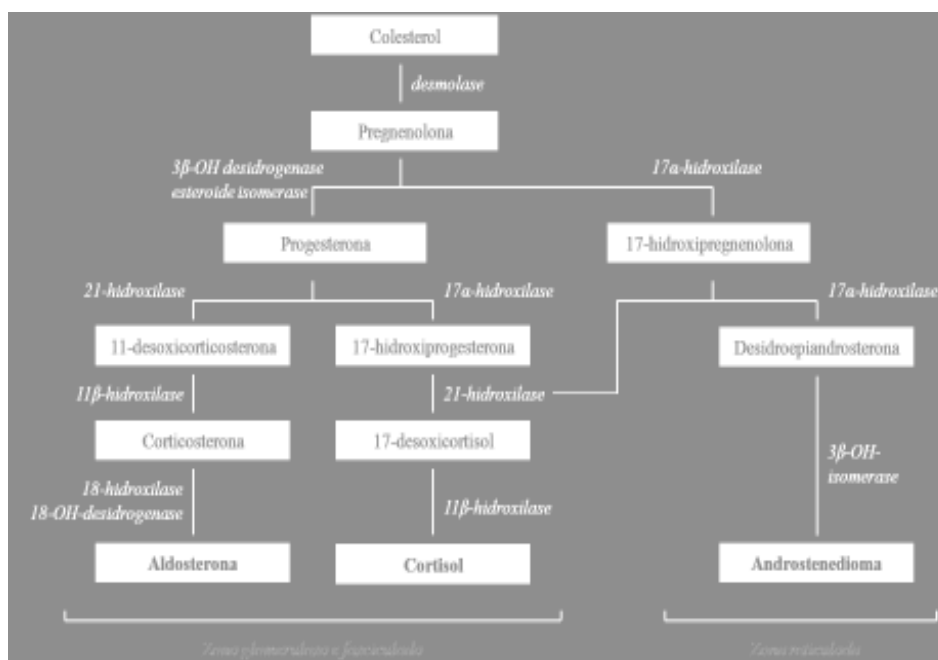


Figura 3: Biossíntese dos hormônios esteróides (adaptado de Reusch, 2005).

No homem, a DHEA é o hormônio esteróide mais abundante presente na circulação (NAKAMURA *et al.*, 2004). A DHEAS circulante serve como reserva de DHEA, sendo esta conversão feita por sulfotransferases encontradas em diversos tecidos (KOMESAROFF, 2008). Este esteróide pode ser convertido em muitos metabólitos, de acordo com o tecido-alvo e o tipo celular. Seus principais metabólitos, incluindo a DHEAS, são 7α -OH-DHEA, 7β -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA, androstenediona e androstenediol.

O córtex adrenal sintetiza e secreta entre 75 a 90% da DHEA presente no organismo humano, com o percentual restante sendo produzido pelos testículos ou ovários (WEBB *et al.*, 2006).

A DHEA também é classificada como hormônio neuroesteróide. O termo “neuroesteróide” foi utilizado pela primeira vez por Baulieu (1996), referindo-se aos esteróides que são sintetizados no sistema nervoso central e periférico, mesmo após

remoção das gônadas e das glândulas adrenais de ratos. Portanto, estes esteróides podem ser sintetizados *de novo* (a partir do colesterol) nestas regiões, pelo menos parcialmente independentemente da secreção periférica (CORPECHÓT *et al.*, 1981; BAULIEU, 1996, 1997). A pregnenolona e a sua forma sulfatada, a progesterona, a alopregnenolona e a DHEAS também são considerados neuroesteróides. Os neuroesteróides exercem muitos efeitos no encéfalo humano e de roedores. Em diferentes regiões do encéfalo, as concentrações de DHEA variam de acordo com as circunstâncias comportamentais e ambientais, como estresse, reconhecimento sexual ou agressividade (BAULIEU; ROBEL; SCHUMACHER, 2001). A DHEA tem vários efeitos no SNC, como melhora da memória e aprendizagem, efeitos neurotróficos e neuroprotetores e redução do risco de ocorrência dos distúrbios neurodegenerativos relacionados à idade (SCHUMACHER *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2001).

Os mecanismos pelos quais a DHEA e a DHEAS agem ainda não foram plenamente estabelecidos. A DHEA pode agir genomicamente e ter efeitos sobre receptores da superfície celular (MO *et al.*, 2006). Sabe-se que a DHEA e seus metabólitos podem ativar receptores de estrogênio (especialmente o receptor de estrogênio tipo α), o receptor α ativado por proliferadores de peroxissomos, o receptor X pregnano, além da existência de outros receptores associados à membrana (WEBB *et al.*, 2006). Foram encontrados sítios de ligação intracelulares específicos para a DHEA em linfócitos T de humanos e de camundongos (MEIKLE *et al.*, 1992; OKABE *et al.*, 1995), no fígado de ratos (KALIMI; REGELSON, 1988) e na musculatura lisa vascular humana (WILLIAMS *et al.*, 2002). Entretanto, ainda não foi convincentemente identificado um receptor nuclear específico para este esteróide (WIDSTROM; DILLON, 2004). Um sítio de ligação específico para a DHEA na

membrana plasmática de células endoteliais de aorta bovina foi caracterizado por Liu & Dillon (2002). O tratamento de células endoteliais com DHEA gerou aumento na produção de óxido nítrico e na formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), além de inibir a apoptose. Tais efeitos foram exercidos por proteínas de membrana acopladas à proteína G (LIU *et al.*, 2007). A DHEA pode agir como modulador de receptores de membrana de neurotransmissores, como GABA_A (XILOURI; PAPAZAFIRI, 2006), NMDA (COMPAGNONE; MELLON, 1998) e receptores sigma 1 (KURATA *et al.*, 2004).

Tem sido relatado por diversos estudos que o mecanismo chave para os efeitos benéficos do tratamento com DHEA é sua ação contra desequilíbrios oxidativos. A suplementação com DHEA em roedores possui efeitos antioxidantes em uma grande variedade de protocolos de estresse oxidativo. Entretanto, também tem sido observado que a DHEA pode exercer efeitos pró-oxidantes. (GALLO *et al.*, 1999; MASTROCOLA *et al.*, 2003; PÉLISSIER *et al.*, 2006).

Este efeito duplo da DHEA, anti ou pró-oxidante, provavelmente é devido à utilização da DHEA em diferentes tecidos e diferentes protocolos experimentais que utilizam modelos e dosagens distintas.

Yorek e colaboradores (2002) demonstraram que a DHEA pode prevenir o estresse oxidativo provavelmente através do aumento da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase no nervo ciático de ratos diabéticos, atenuando a disfunção vascular e neural. Além disto, a DHEA pode diminuir os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado, rins e encéfalo ou restaurar a atividade de enzimas antioxidantes no fígado e rins de ratos diabéticos (ARAGNO *et al.*, 1999).

Alguns trabalhos referem a DHEA como possível protetora contra danos oxidativos causados por isquemia-reperfusão (I/R) em rins. A I/R é uma importante

causa de disfunção do órgão, geralmente levando a uma falência renal e causando alta mortalidade entre os pacientes. Um dos fatores envolvidos nas lesões renais causadas pela I/R é o estresse oxidativo. A DHEA gerou modificações nas defesas antioxidantes neste modelo de I/R apresentando uma ação antioxidante e melhorando diversos fatores analisados, como prevenindo a diminuição na atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase, gerando uma diminuição na expressão do fator de necrose tumoral (TNF- α) e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e um aumento nas defesas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (ARAGNO *et al.*, 2003; AKSOY *et al.*, 2004).

Os antioxidantes exercem um efeito benéfico em modelos experimentais de lesão crônica em animais diabéticos (LOW; NICKANDER; TRITSCHLER, 1997; HO; CHEN; BRAY, 1999). O tratamento com antioxidantes pode reduzir as complicações da diabetes e servem como uma estratégia promissora para a prevenção e tratamento dessas complicações (CAMERON; COTTER; MAXFIELD, 1993; LOW *et al.*, 1997; SIMAN *et al.*, 1997). Estudos mostraram a DHEA como possível agente protetor contra danos oxidativos teciduais causados por hiperglicemia crônica e aguda e restauradora do estado redox (ARAGNO *et al.*, 1997, 1999, 2000; BRIGNARDELLO *et al.*, 2000).

Aragno e colaboradores (2001) avaliaram a ação antioxidante da DHEA em rins de ratos hiperglicêmicos por estreptozotocina, condição esta que causa um desequilíbrio oxidativo no tecido renal, e que possivelmente está envolvido na lesão renal dos diabéticos. O tratamento com DHEA combateu o aumento de ácido hidroperoxi-eicosatetraenoico (HPETE) e de hidroxinonenal (HNE) observado nos ratos hiperglicêmicos, restaurou os valores de glutatona reduzida (GSH) e da atividade da Na^+/K^+ -ATPase, que estavam diminuídos nos hiperglicêmicos e ainda

regulou os distúrbios no metabolismo do ácido araquidônico causados pela hiperglicemia, demonstrando que este tratamento pode retardar o aparecimento de lesão renal decorrente da diabete.

Um estudo realizado por Richards e colaboradores (2001) tratou com DHEA ratos obesos Zucker, um modelo biológico de nefropatia diabética e DM2, a fim de avaliar o efeito deste esteróide sobre a nefropatia diabética. A DHEA retardou o aparecimento da nefropatia neste modelo, mas este retardo está associado com a redução na ingestão calórica nestes animais, devido à ação da DHEA no comportamento alimentar, mais precisamente na diminuição da leptina. Este não é o modelo ideal para estudo de disfunções renais na diabetes, já que os animais apresentam diversas outras complicações devido à obesidade. Além disso, os níveis de leptina e ganho de peso foram reduzidos e o metabolismo lipídico foi alterado em ratos devido à administração de DHEA (RICHARDS *et al.*, 2001; ABADIE *et al.*, 2001). Outros efeitos metabólicos foram observados, tais como a redução dos níveis séricos de triglicerídeos em ratos hiperlipidêmicos (BERDANIER; PARENTE; MCINTOSH, 1993); diminuição da resistência à insulina em ratos diabéticos (COLEMAN; LEITER; SCHWIZER, 1982) e estímulo sobre a captação de glicose em fibroblastos (NAKASHIMA *et al.*, 1995), adipócitos (ISHIZAWA *et al.*, 2001; PERRINI *et al.*, 2004) e hepatócitos (YAMASHITA *et al.*, 2005).

Outra possível ação da DHEA seria diretamente sobre macrófagos. Os macrófagos produzem uma série de citocinas que estão envolvidas no desenvolvimento da nefropatia diabética. A DHEA poderia diminuir a produção de certas citocinas envolvidas nesta doença (DANENBERG *et al.*, 1992; NIKOLIC-PATERSON *et al.*, 1994).

Existem estudos contraditórios sobre os efeitos dos derivados da DHEA, testosterona e estradiol, sobre a nefropatia diabética. Sun e colaboradores (2007) mostraram que o tratamento com testosterona tem efeitos prejudiciais sobre o interstício tubular no rim do diabético. Outros estudos mostram que o tratamento com estradiol pode atenuar complicações renais dos diabéticos (TOMIYOSHI *et al.*, 2002; MANKHEY; BHATTI; MARIC, 2005).

Entretanto, também tem sido observado que a DHEA pode exercer efeitos pró-oxidantes em diversos estudos, sendo relacionada com eventos como aumento na geração de EAO, no nível do citocromo P450 4A, no volume e no número de peroxissomas bem como de enzimas associadas, aumento na lipoperoxidação, geração de distúrbios como colite e síndrome do ovário policístico a partir da hiperandrogenização (PROUGH *et al.*, 1994; SWIERCZYNSKI; BANNASCH; MAYER, 1996, 1997; MASTROCOLA *et al.*, 2003; PÉLISSIER *et al.*, 2006; ELIA *et al.*, 2009).

Os hormônios esteróides sexuais, tais como DHEA e testosterona, podem desempenhar papéis importantes na utilização de glicose nos tecidos periféricos. Estudos demonstraram que estes hormônios influenciam o metabolismo da glicose, induzindo a aceleração da fosforilação da proteína quinase B (Akt) através da ativação da PI3-quinase (ISHIZUKA *et al.*, 1999; KANG *et al.*, 2004). Ratos diabéticos possuem muitas alterações no metabolismo dos substratos, incluindo redução no GLUT4, bem como na fosforilação da Akt e da PI3-quinase no músculo esquelético (COLEMAN; LEITER; SCHWIZER, 1982; MARETTE *et al.*, 1999; SATO *et al.*, 2009). A adição de DHEA a uma cultura de células musculares esqueléticas induziu um aumento na expressão e translocação do transportador de glicose GLUT4, com aumento na fosforilação da Akt e da proteína cinase C *zeta/lambda*

(PKC- ζ / λ) (SATO *et al.*, 2008). Uma única injeção de DHEA em ratos diabéticos evitou o declínio da via de sinalização da Akt, PKC- ζ / λ e GLUT4, bem como das principais enzimas glicolíticas, provando que o DHEA pode auxiliar na melhoria e controle dos níveis de glicose no sangue, e na restauração da deficiência na transdução do sinal da insulina no músculo esquelético na diabetes melito do tipo 1 (SATO *et al.*, 2009). Apesar destes resultados, mais estudos são necessários para determinar se um tratamento a longo prazo com DHEA participaria do controle glicêmico na diabetes do tipo 1.

Enquanto nos humanos a DHEA é o principal hormônio esteróide circulante, os ratos e camundongos possuem baixas concentrações circulantes de DHEA na periferia. Em roedores, os níveis de DHEAS circulante são muito baixos – cerca de três ordens de magnitude menores do que nos humanos (LEGRAIN; GIRARD, 2003). Ao contrário dos humanos que secretam DHEA a partir das adrenais e das gônadas, os roedores só são capazes de sintetizar e secretar DHEA nas gônadas (VAN WEERDE *et al.*, 1992; MANINGER *et al.*, 2009). Apesar disso, assim como os humanos, os roedores apresentam grande concentração de DHEA no encéfalo, sendo esta derivada quase que totalmente da produção local, sendo que nos humanos a DHEA encontrada no encéfalo é derivada tanto da produção local como da produção periférica. Assim, como a DHEA é encontrada em altas concentrações no encéfalo tanto de humanos como de roedores, os roedores podem ser utilizados como bons modelos para se estudar os efeitos da DHEA no sistema nervoso, mas podem não ser os modelos ideais para se estudar os efeitos periféricos deste esteróide (MANINGER *et al.*, 2009). Entretanto, há um interesse significativo neste esteróide baseado em inúmeras observações clínicas, e se faz necessário que os roedores sejam utilizados como modelos para estudos dos efeitos da DHEA.

Dados obtidos em ensaios humanos (NAKAMURA *et al.*, 2004; VON MÜHLEN *et al.*, 2007; YAMADA *et al.*, 2007), modelos animais (ARAGNO *et al.*, 1999; CAMPBELL *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2007) e estudos *in vitro* (GALLO *et al.*, 1999; MO; LU; SIMON, 2006) sugerem o uso potencial de DHEA como intervenção terapêutica.

Nos anos 90, a DHEA chegou a ser considerada o possível candidato para ser o hormônio "fonte da juventude" por Baulieu (BAULIEU, 1996), mas desde então o conceito sobre este hormônio esteróide têm sido controverso. A DHEA é comumente usada como suplemento nutricional e na reposição hormonal de homens e mulheres (LEGRAIN; GIRARD, 2003), também é amplamente utilizada em doses farmacológicas ou supra-fisiológicas por atletas e desportistas com o objetivo de produzir hipertrofia muscular e melhora na performance (LABRIE *et al.*, 2006). Apesar do entusiasmo inicial, muitas questões permanecem sem resposta, e as suas soluções são desafios para futuras pesquisas (CELEC; STARKA, 2003).

Baseados nestas informações, acreditamos que seria importante avaliar os efeitos da DHEA na diabetes, mais especificamente sobre o metabolismo da glicose no músculo e nos rins, sobre algumas medidas da função renal e também o seu efeito sobre o balanço oxidativo nestes tecidos. Este trabalho visou aprofundar os conhecimentos sobre o possível papel da DHEA sobre o tecido renal e o tecido muscular numa situação degenerativa causada pela diabetes.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração sistêmica de DHEA sobre a função renal, sobre o metabolismo da glicose no músculo e nos rins e sobre alguns aspectos do balanço oxidativo nestes tecidos em ratos controles e diabéticos.

2.1 Objetivos específicos

Verificar o efeito da administração de DHEA em ratos controles e diabéticos sobre:

- A) os níveis plasmáticos de glicose;
- B) indicadores da função renal, como a creatinina plasmática, o *clearance* da creatinina (TFG), a hipertrofia renal e a excreção urinária de TGF- β 1;
- C) aspectos metabólicos do tecido renal, como a captação e a oxidação de glicose, no córtex e na medula;
- D) a proteção antioxidante através da análise da glutathione total no rim;
- E) aspectos metabólicos do tecido muscular, como a captação e a oxidação de glicose, e a expressão do transportador de glicose GLUT4;
- G) aspectos do balanço oxidativo e vias de sinalização intracelular no músculo esquelético, como a expressão da Akt e da Trx e a presença de peróxido de hidrogênio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados um total de 70 ratos Wistar machos, com 3 meses de idade (peso médio: $300,5 \pm 32,2$ g) provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os animais foram mantidos em temperatura controlada (22 ± 2 °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, em caixas de plástico de 49 x 34 x 16cm, com assoalho contendo maravalha. Os animais foram separados em grupos de no máximo três animais por caixa. Foram alimentados com ração padrão (Moinhos Purina), com 12 % de proteína e água *ad libitum* e mantidos na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA - UFRGS).

Os procedimentos experimentais a que os animais foram submetidos obedeceram às normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA - <http://www.cobea.org.br>) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA-UFRGS.

3.2 Indução da diabetes

A diabetes foi induzida por uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (STZ, Sigma Chemical Company) 70 mg/kg (TAKEUCHI *et al.*, 1994).

A STZ foi diluída em tampão citrato de sódio (0,01M, pH 4,5) e injetada até 10 minutos após sua diluição. Os animais controles receberam o mesmo volume de tampão citrato de sódio (2 mL/kg).

3.3 Validação do modelo experimental: rato diabético

A injeção de STZ ou tampão foi feita no dia 0 (zero), e no dia 3 (três) foi feita a primeira dosagem glicêmica, com o auxílio de um glicosímetro (ACCU-CHEK). Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentaram uma concentração de glicose plasmática superior a 20 mmol/L (ARAGNO *et al.*, 1999).

3.4 Tratamento com DHEA

Após a avaliação da glicemia, os animais receberam uma injeção subcutânea de DHEA (Calbiochem) diluída em óleo vegetal (Bünge), 1 vez por semana, por 5 semanas, na concentração de 10 mg/kg (CAMPBELL *et al.*, 2004; JACOB *et al.*, 2009). Os grupos controle receberam apenas óleo em um volume de 0,5 mL/kg.

Amostras de sangue foram coletadas da veia caudal durante a primeira semana de tratamento. As concentrações plasmáticas de DHEA livre foram medidas por radioimunoensaio (DHEA RIA kit DSL 9000). O ensaio segue o princípio básico de radioimunoensaio, onde existe uma competição entre um antígeno radioativo e um não radioativo por um número fixo de sítios de ligação. A quantidade de DHEA marcada (¹²⁵I) ligada ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração de DHEA não marcada presente na amostra. Foi realizada a quantificação nos dias 1, 4 e 7 após a primeira injeção (10 mg/kg) e os níveis de DHEA foram mantidos elevados durante a semana, e no sétimo dia após a injeção, os animais recebiam nova dose, justificando assim o tratamento semanal, o veículo utilizado para diluir a DHEA e a quantidade a ser injetada.

Também foi coletado sangue dos animais diabéticos antes e no término do período de tratamento com DHEA (5 semanas), e as concentrações plasmáticas de

DHEA foram medidas, para verificar se os animais que receberam DHEA possuíam concentrações maiores que os que recebiam apenas o veículo.

3.5 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos: animais controles (não diabéticos) que recebiam a injeção do veículo de diluição da DHEA (CTR-ÓLEO), animais controles que recebiam a DHEA (CTR-DHEA), animais diabéticos que recebiam somente o veículo (DBT-ÓLEO) e animais diabéticos que recebiam DHEA (DBT-DHEA). No total, após o descarte dos 6 ratos que não cumpriram o requisito de inclusão (glicemia acima dos 20 mmol/L após a injeção de estreptozotocina), foram utilizados as seguintes quantidades de animais: CTR-ÓLEO: 14 animais; CTR-DHEA: 14 animais; DBT-ÓLEO: 18 animais; DBT-DHEA: 18 animais, totalizando 64 animais.

3.6 Gaiolas Metabólicas

No início e no final do período experimental, os animais foram mantidos por 24 horas em gaiolas metabólicas individuais (Beiramar) para avaliação da ingestão de alimento e de água, e da eliminação de urina e de fezes.

3.7 Procedimentos Experimentais

Após o término do protocolo experimental (após as 5 semanas, 1 injeção por semana), os animais foram mortos por decapitação entre as 10-12 horas. Os rins foram retirados, fatiados com o auxílio de um *slicer*, produzindo fatias de aproximadamente 800-1000 μm , e posteriormente foram separadas as regiões cortical e medular do rim em cada fatia. Juntamente com as amostras de córtex renal

e medula renal, uma amostra do músculo gastrocnêmio de cada animal também foi retirada. Estes tecidos tiveram os seguintes destinos: as amostras de córtex e medula de um dos rins e uma amostra do músculo foram imediatamente congelados em gelo seco para posteriormente serem homogeneizados e preparados para realizar as técnicas de medidas de estresse oxidativo e a técnica de *Western Blot*; as amostras de córtex e medula do outro rim e outra amostra de músculo foram imediatamente destinadas para os procedimentos de captação e oxidação de glicose.

O sangue troncular dos animais foi coletado em tubos contendo heparina sódica (agente anticoagulante) após a decapitação. Após a coleta, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm em centrífuga refrigerada (Sorval RC 5B-rotor SM24, Du Pont Instruments), e o plasma foi retirado e congelado em freezer a -80°C para posteriores análises.

3.7.1 Glicemia

A glicemia foi determinada pela utilização do teste colorimétrico enzimático Glicose PAP Liquiform (Kit Enzicolor, Labtest Diagnóstica). O princípio da técnica consiste na oxidação da glicose catalisada pela glicose oxidase, formando o peróxido de hidrogênio que reage com o 4-aminoantipirina e fenol, formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro (Ultraspec 2000 – Pharmacia Biotech) em comprimento de onda de 505 nm.

3.7.2 Creatinina Plasmática e Urinária

A creatinina plasmática e urinária foram determinadas pelo teste colorimétrico enzimático Creatinina (Kit Enzicolor, Labtest Diagnóstica). O princípio da técnica consiste na reação da creatinina e outros componentes do plasma ou da urina com a solução de picrato em meio alcalino formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente. A adição de um acidificante promove a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor derivada dos cromogênios, que também é medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro (Ultraspec 2000 – Pharmacia Biotech) em comprimento de onda de 510 nm.

3.7.3 Taxa de Filtração Glomerular (TFG)

A partir da dosagem da creatinina plasmática, mais a dosagem da creatinina urinária (pelo Kit Creatinina citado anteriormente) e do volume urinário em 24 horas obtido a partir das gaiolas metabólicas, foi calculado o *clearance* da creatinina, que corresponde a uma aproximação da taxa de filtração glomerular.

Clearance da creatinina = (creatinina urinária (mg/dL) / creatinina plasmática (mg/dL)) x volume minuto (volume de 24h (mL) / 1440).

3.7.4 Excreção Urinária de TGF-β1

No dia do ensaio, a fim de se ativar o TGF-β1 latente, as amostras foram acidificadas até o pH de 2-3 por 30 minutos em temperatura ambiente, e posteriormente re-neutralizadas até o pH de 7-8. A quantificação da excreção urinária de TGF-β1 foi determinada pelo kit de imunoenensaio enzimático para TGF-β1 (TGF-β1 E_{max} ImmunoAssay System, Promega), sendo esta medida um marcador

precoce de lesão renal (SCHAAN *et al.*, 2001). O princípio do ensaio consiste na detecção da proteína de interesse utilizando-se um formato de “sanduíche” de anticorpos. Um primeiro anticorpo monoclonal para TGF- β 1 se liga ao TGF- β 1 da amostra. O complexo TGF- β 1 e seu anticorpo então se liga a um segundo anticorpo policlonal. A quantidade de anticorpo especificamente ligado é determinada utilizando-se a incubação com um substrato cromogênico, onde a intensidade de cor corresponde à quantidade de TGF- β 1 na amostra. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.7.5 Índice Renal

No momento da morte dos animais, os rins foram retirados, secados e pesados para a determinação do índice renal, que é uma relação entre o peso do órgão/tecido e o peso do animal (peso dos rins/peso do animal) x 100). Este parâmetro avalia o tamanho do rim proporcionalmente ao tamanho do animal, assim podemos identificar a hipertrofia renal, decorrente da diabetes.

3.7.6 Captação e Oxidação de Glicose no Músculo e no Rim

Captação de glicose: os rins e o músculo foram retirados, fatiados, e amostras de aproximadamente 100mg de cada tecido foram colocados em tubos plásticos de 5mL, previamente pesados, contendo 1000 μ L de solução fisiológica (Krebs-Ringer Bicarbonato – KRB, pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄ e 24,8 mM NaHCO₃) e 0,15 μ Ci de 2-deoxi-D-[1-¹⁴C]-glicose (2DG) (55 mCi/mmol – Amersham International). Os tubos foram pesados novamente para a determinação do peso dos tecidos. A seguir foi feita a substituição da fase gasosa por carbogênio (O₂:/CO₂, na proporção 95:5% v/v). Os

tubos foram fechados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff sob agitação constante por 30 minutos a 37°C.

As amostras foram removidas do meio de incubação, lavadas duas vezes em solução fisiológica gelada, com o objetivo de retirar o excesso de radioatividade adsorvida ao tecido, secas em papel filtro e colocadas em frascos com tampa rosca contendo 1 mL de água bidestilada. Após, estes frascos foram congelados e fervidos alternadamente, para romper as células e liberar o conteúdo captado pelo tecido renal.

Os resultados da captação de glicose foram expressos pela radioatividade contida no meio interno (2DG captada pelo tecido) e no meio externo (meio de incubação) (T/M: dpm/mL meio interno dividido por dpm/mL de meio externo), conforme descrito por Machado e colaboradores (MACHADO; WASSERMANN; MARQUES, 1991).

Oxidação de glicose: amostras de aproximadamente 100 mg de córtex renal, medula renal e de músculo foram colocadas em solução fisiológica gelada, acrescida de 10mM de HEPES, pH 7,8. Em seguida os tecidos foram secos em papel filtro e colocados em vidros com tampa de borracha contendo 0,15 µCi de [U-¹⁴C]-glicose (glicose uniformemente marcada) (55 mCi/mmol – Amersham International) e 10 mM glicose. Nas tampas de borracha foi acoplado um vidro em formato de “J” com um poço de captação do ¹⁴CO₂ resultante da oxidação da glicose uniformemente marcada. Os tecidos foram aerados com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5% v/v) e as tampas foram fechadas e vedadas com parafilme. A incubação foi de 30 minutos a 37°C com agitação constante.

A reação de oxidação foi interrompida injetando-se 0,25 mL de TCA 50% no meio de incubação, através da tampa de borracha, e nos poços foi injetado 0,25 mL de NaOH.

As tampas de borracha foram novamente vedadas com parafilme e a reação de “captação do $^{14}\text{CO}_2$ ” foi realizada por pelo menos 12 horas. Após este período, foram retirados os vidros em formato de “J” e colocados em vias com 10 mL do líquido de cintilação, os quais foram levados a um contador LKB-Wallac, para determinar a formação do $^{14}\text{CO}_2$. A produção de $^{14}\text{CO}_2$ foi expressa em nmoles de $^{14}\text{CO}_2$ por mg de tecido por minuto (TORRES *et al.*, 2001).

3.7.7 Glutaciona

Para determinar a glutaciona total, amostras de aproximadamente 100 mg de tecido renal foram desproteinizadas com ácido perclórico 2 mol/L e centrifugadas por 10 min a 1000 x G. O sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L e MOPS (2M). O meio de reação continha tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7,2), ácido nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH) 2 mmol/L, glutaciona redutase 0,2 U/mL e 70 $\mu\text{mol/L}$ de 5,5' ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) e foi lido espectrofotometricamente a 340nm. Os resultados foram expressos em nmoles de glutaciona por g de tecido (AKERBOOM; SIES, 1981).

3.7.8 Peróxido de hidrogênio

O método para determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio está baseado na oxidação do vermelho de fenol por este peróxido mediada pela peroxidase de rabanete. Fatias de tecido muscular (cerca de 100 mg) foram incubadas por 30 minutos em tampão (fosfato de potássio 10 mmol/L, NaCl 140

mmol/L e dextrose 5 mmol/L). O sobrenadante foi coletado e adicionado na solução tampão de vermelho de fenol 0,28 mmol/L e peroxidase de rabanete 8,5 U/mL. Após o intervalo de 5 minutos, foi adicionado NaOH 1 mol/L e efetuada a leitura a 610 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de H₂O₂ por mg de tecido (PICK; KEISARI, 1980).

3.7.9 Western Blot

Para a técnica de *Western Blot*, o tecido muscular (200 mg) foi descongelado e homogeneizado por 30 segundos em Ultra-Turrax, na presença do tampão de homogeneização (Tris-HCl 100 mM, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, Aprotinina 5 g/mL). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3.000 x g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B-Rotor SM 24) e o sobrenadante retirado e congelado em freezer a -80°C.

Quantificação de Proteínas: As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 595 nm e os resultados expressos em mg/mL.

Após quantificação de proteínas, foi utilizado o sistema *mini-protean* (Bio-Rad) para a separação das proteínas por eletroforese em gel SDS-PAGE a 10% (gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio). O homogeneizado contendo 90µg de proteína da amostra foi preparado com tampão de carga (Tris 65 mmol/L, SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,1%). Para a identificação do peso molecular das proteínas de interesse, utilizou-se um marcador de peso molecular "*full range*" (Amersham Pharmacia). As amostras foram aquecidas a 100°C durante 2 minutos em banho seco (Modelo 330-3D, Nova Ética), e a eletroforese foi efetuada a 120v

por 3 horas na presença de tampão de corrida, contendo glicina 192 mmol/L, Tris 25 mmol/L e SDS 0,1%, pH 8,3. A separação das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular. A seguir, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e colocado no módulo de eletrotransferência em contato com a membrana de nitrocelulose (Hybond, Amersham) e com tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mmol/L e metanol a 20%, pH 8,3). A transferência foi efetuada a 100v por 60 minutos.

Para o bloqueio das ligações a proteínas inespecíficas, as membranas foram incubadas com leite em pó a 1% em TTBS (Tris 20 mmol/L, NaCl 140 mmol/L e Tween 20 a 0,05%) por 60 minutos. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por, no mínimo, 12 horas em agitação constante a 4°C com os anticorpos primários diluídos em TTBS, todos contendo BSA 2,5 % e azida sódica a 1%. Os anticorpos primários utilizados foram anti-Akt fosforilada (Ser 473) policlonal (coelho), anti-Akt policlonal (cabra), anti-tiorredoxina-1 (coelho), anti-GLUT4 (coelho) (Santa Cruz Biotechnology). A seguir, as membranas foram lavadas com TTBS (três períodos de 10 minutos cada) e incubadas com o segundo anticorpo durante duas horas sob agitação constante em temperatura ambiente na diluição de 1:10.000 em TTBS. Os anticorpos secundários peroxidados utilizados foram anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology) e anti-coelho (Zymed Laboratories). Antes de proceder à revelação por quimiluminescência as membranas foram lavadas com TBS (Tris 20 mmol/L e NaCl 140 mmol/L).

A reação de quimiluminescência ocorreu por meio de sistema de detecção baseado em substratos luminescentes (luminol e ácido p-cumárico), com exposição das membranas ao filme radiográfico Hyperfilm (Amersham) por aproximadamente 1 minuto, seguido das incubações nas soluções de revelação: revelador, ácido acético

(10%) e fixador (1 minuto cada incubação). Todos os procedimentos de revelação foram realizados em uma câmara escura.

A autorradiografia gerada foi analisada por meio de analisador e quantificador de imagem (Image Master VDS, Pharmacia Biotech). A densitometria obtida para as bandas de todos os anticorpos foi corrigida por uma banda inespecífica obtida pela coloração da membrana com Vermelho de *Ponceau* (KLEIN; KERN; SOKOL, 1995). Não foram utilizadas proteínas do citoesqueleto (como a actina e a tubulina) como normalizadores pois tanto a diabetes como a própria DHEA podem interferir na concentração destas proteínas no tecido muscular (LAURINE *et al.*, 2003). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (valor percentual referente ao grupo controle ou referente ao total do gel).

3.8 Análise estatística

Para o cálculo do “n” (número mínimo de animais), foi utilizado o Computer Programs for Epidemiologists (WIN PEPI – versão 9.1), baseando-se nos valores de glicemia e utilizando-se dados de estudos prévios (BARDOUX *et al.*, 1999; ISLAM; CHOI, 2007; RENNO *et al.*, 2008). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 90%, desvio padrão assumido de 20 unidades, erro aceitável de 10 unidades, perda esperada de 8%.

Com base nos resultados das análises, foram calculadas as médias e os erros padrões da média (EPM) para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Para a comparação entre os grupos foi aplicada análise de variância (ANOVA) de uma via, complementado com o teste Student-Newmann-Kleus (SNK). As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou $p < 0,05$.

3.9 Biossegurança

Durante a execução da metodologia proposta, os pesquisadores envolvidos usaram luvas de procedimentos cirúrgicos e aventais para sua própria proteção. Quando necessário, foram utilizados também máscara e óculos de proteção. Além destes cuidados, a preparação das soluções ocorreu dentro de capela de exaustão. O descarte dos resíduos não-tóxicos ocorreu no sistema de esgoto comum. Os demais resíduos foram encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para procedimento correto de sua eliminação. As carcaças dos animais foram congeladas e entregues ao Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da UFRGS para procedimento de eliminação.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo foram descritos sob a forma de artigos para a submissão em revistas internacionais indexadas.

4.1 Artigo 1

The effect of long-term DHEA treatment on glucose metabolism, hydrogen peroxide and thioredoxin levels in the skeletal muscle of diabetic rats

Matheus Parmegiani Jahn, Maria Helena Vianna Metello Jacob, Luana Ferreira Gomes, Roxane Duarte, Alex Sander da Rosa Araújo, Adriane Belló-Klein, Maria Flávia Marques Ribeiro, Luiz Carlos Kucharski

JAHN, M. P. et al. The effect of long-term DHEA treatment on glucose metabolism, hydrogen peroxide and thioredoxin levels in the skeletal muscle of diabetic rats.

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, v. 120, p. 38-44, 2010

doi:10.1016/j.jsbmb.2010.03.015



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb

The effect of long-term DHEA treatment on glucose metabolism, hydrogen peroxide and thioredoxin levels in the skeletal muscle of diabetic rats

Matheus Parmegiani Jahn^{a,*}, Maria Helena Vianna Metello Jacob^{b,c}, Luana Ferreira Gomes^a, Roxane Duarte^a, Alex Sander da Rosa Araújo^c, Adriane Belló-Klein^c, Maria Flávia Marques Ribeiro^b, Luiz Carlos Kucharski^a

^a Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, CEP 90050-170, Brazil

^b Laboratório de Interação Neuro-humoral, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2010

Received in revised form 23 February 2010

Accepted 1 March 2010

Keywords:

DHEA
Diabetes
Glucose metabolism
Oxidative stress
Skeletal muscle

ABSTRACT

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an endogenous steroid hormone involved in a number of biological actions. This study shows the effects of DHEA on glucose metabolism, hydrogen peroxide and thioredoxin levels in the skeletal muscle of control and diabetic rats. Control and diabetic rats were chronically treated with DHEA (10 mg/kg) diluted in oil. Plasma concentration of DHEA and glucose, glucose uptake and oxidation, hydrogen peroxide, GLUT4, Akt and thioredoxin (Trx) was measured in the muscle. Results showed that there was a decrease in blood glucose in diabetic rats, probably linked to an increase in the glucose oxidation by the muscle or glucose uptake by some tissues. Despite the increase in the expression of GLUT4 in DHEA-treated rats, the glucose uptake was only higher in the control rats, showing that the glucose transporter may be present but not functional in the diabetic rats. The low expression of Trx due to diabetes became even lower with DHEA treatment. Although the reduction in blood glucose may be favorable, the decrease in Akt and Trx displays an environment conducive to redox imbalance. Thus, further studies are needed to ascertain the effects of DHEA treatment in diabetic rats.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is characterized by a group of metabolic disturbances resulting from defects in insulin secretion, or insulin action, or both. Chronic diabetes hyperglycemia is associated with long-term damage, and with organ dysfunction and failure, especially in the eyes, kidneys, nerves, heart and blood vessels. Several different substances have been experimented with as promising strategies for the prevention and treatment of diabetes complications, especially substances with antioxidant potential, such as dehydroepiandrosterone (DHEA) [1–4].

DHEA is a steroid produced in the adrenal cortex, and can also be synthesized in the central and peripheral nervous system [5].

It is a multi-functional steroid involved in a wide range of biological effects in humans and rodents. Together with its sulfate ester (DHEA-S), it is the most abundant steroid in humans. It may act both directly or through its metabolites (including androstenediol and androstenedione), which can undergo further conversion to produce primarily testosterone and estradiol [6,7]. DHEA and testosterone are widely used as muscle-building or performance-enhancing drugs by athletes [8], and have been more recently promoted as anti-aging supplements, but the long-term benefits, as compared with the potential damage, are not known. Several beneficial effects have been observed in relation to the administration of DHEA (mainly in animals), including improvement in vascular function [9], cardioprotective action through anti-hypertrophic effects [10], neurotrophic and neuroprotective effects [11,12], and antioxidant effects on various organs, as well as on diabetes [13].

DHEA is often reported as having antidiabetic effects, but the pathophysiological explanation for this is unknown. DHEA treatment was found to be beneficial in obese Zucker rats suffering from diabetic nephropathy, and the effect was similar to the action of angiotensin-converting enzyme inhibitors [14]. Other metabolic effects were observed, such as decreased insulin resistance in dia-

* Corresponding author. Tel.: +55 51 33083505.

E-mail addresses: matheusjahn@hotmail.com (M.P. Jahn), mhvmjacob@hotmail.com (M.H.V.M. Jacob), nutri@ymail.com (L.F. Gomes), roxane.duarte@hotmail.com (R. Duarte), alsanderaraujo@hotmail.com (A.S. da Rosa Araújo), belklein@ufrgs.br (A. Belló-Klein), mflavia@ufrgs.br (M.F.M. Ribeiro), kuchars@ufrgs.br (L.C. Kucharski).

betic mice [15] and stimulated glucose uptake in fibroblasts [16], adipocytes [17,18] and hepatocytes [19].

Androgen hormones, such as DHEA and testosterone, may play important roles in glucose utilization in peripheral tissues. Numerous studies have demonstrated that these hormones influence glucose metabolism by inducing the acceleration of protein kinase B (Akt) phosphorylation via the activation of PI3-kinase [20,21]. The addition of DHEA to cultured skeletal muscle induced an elevation of glucose transporter GLUT4 expression and translocation, with increased Akt and protein kinase C ζ/λ (PKC- ζ/λ) phosphorylation [22]. A single injection of DHEA in diabetic rats arrested the decline of the signaling pathway via Akt and PKC ζ/λ -GLUT4, as well as the main glycolytic enzymes, proving that DHEA can assist in improving and controlling blood glucose levels substantially, and in restoring impaired insulin transduction in the skeletal muscle of type 1 diabetes mellitus [23].

One possible mechanism of DHEA action is to modulate the oxidative balance [13,24]. DHEA has been considered as an antioxidant [13,25], but the effects of exogenous DHEA administration can be dual (antioxidant and/or pro-oxidant) depending on the dosage administered and the tissue specificity [26–29]. In addition, DHEA was considered to be a possible “fountain of youth” hormone by Baulieu [30], but despite initial enthusiasm, many questions concerning its efficacy remain unanswered, and their solution is a challenge for future research [31].

The aim of this study is, therefore, to investigate whether chronic DHEA administration in diabetic rats can bring about effects in terms of certain metabolic approaches, oxidative stress parameters, and survival proteins in the gastrocnemius muscle of diabetic rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The experiments were performed on male Wistar rats (90 days old, 300 g). The animals were housed in plastic cages (three animals in each), and received water and pelleted food *ad libitum*. They were maintained under standard laboratory conditions (at a controlled temperature of 21 °C, 12 h light/dark cycle). Special care was taken to limit the number of animals used and their suffering. All animal procedures followed in this study were in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (COBEA—Brazilian College of Animal Experimentation), and the experimental protocol was approved by the UFRGS Animal Care Committee.

2.2. Diabetes induction

Diabetes mellitus was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (Sigma, USA), in a 70 mg/kg dose [32]. After 3 days of streptozotocin injections, glucose concentration was verified, and those animals whose plasma glucose concentration was higher than 20 mmol/L were considered diabetic [13].

2.3. DHEA treatment

DHEA (dehydroepiandrosterone; Calbiochem, Germany) was dissolved in vegetable oil (the vehicle) and administered subcutaneously in a dose of 10 mg/kg once a week for 5 weeks. The control groups received only the vehicle. Four groups were formed: non-diabetic animals which received only oil (CTR-OIL), non-diabetic animals with DHEA (CTR-DHEA), diabetic animals with oil (DBT-OIL), and diabetic animals with DHEA (DBT-DHEA). The DHEA administration protocol was based on previous experiments in our laboratory, and on other studies [29,33].

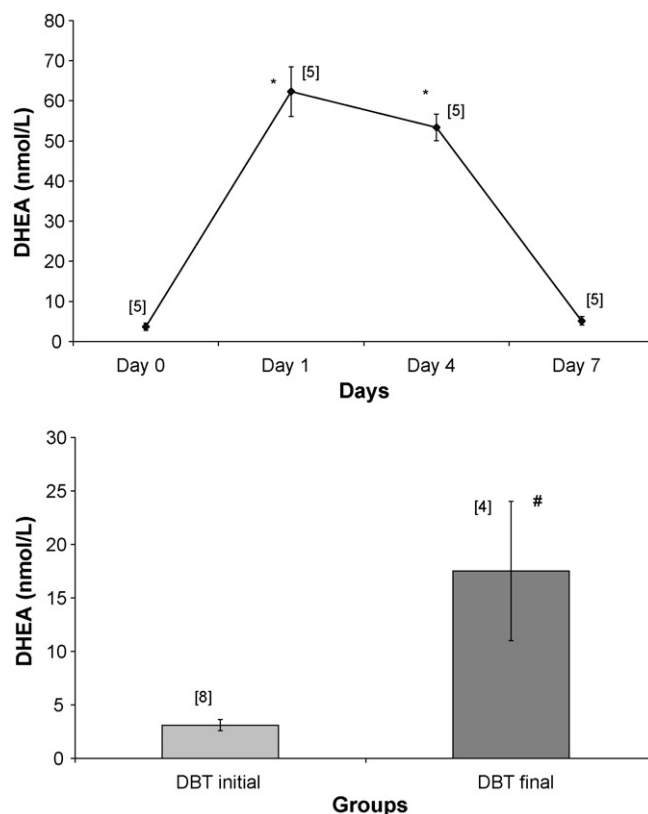


Fig. 1. Plasma DHEA concentration in CTR group before the first DHEA injection (Day 0) and 1, 4 and 7 days after the first DHEA injection (top); and plasma DHEA concentration in DBT group before and after the 5 weeks DHEA treatment (bottom). Data are given as mean \pm SEM. Number of samples is shown in brackets. (*) Statistically different from Day 0 and Day 7 ($p < 0.05$, SNK). (#) Statistically different from DBT initial group ($p < 0.05$, SNK).

2.4. DHEA measurement

Free DHEA concentration in plasma was determined by using a specific Radioimmunoassay (RIA) kit for DHEA (DSL-9000; DSL, USA). Blood samples were collected from the tail vein before the first DHEA injection, and 1, 4 and 7 days after the first injection, to evaluate the efficiency of the treatment (Fig. 1).

The concentration of DHEA was also evaluated in the diabetic rats at the beginning and at the end of the experimental period (7 days after the last injection) in order to compare levels of concentration before and after treatment (Fig. 1).

2.5. Experimental procedure

At the end of the experimental period, the animals were weighed, and then killed by decapitation. Following this, trunk blood samples were collected for later analysis. The gastrocnemius muscles were excised, and a sample was placed in Petri dishes with cold Krebs–Ringer Bicarbonate (KRB) buffer pH 7.4 (118 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 and 24.8 mM NaHCO_3). The muscles were sliced freehand with a slicer apparatus and placed in specific tubes for glucose uptake and oxidation. Another muscle sample was immediately frozen in liquid nitrogen for subsequent Western blot analysis, and for quantification of hydrogen peroxide.

2.6. Plasma glucose

Blood samples collected at the end of the experimental period were placed in heparinized tubes and centrifuged. Plasma glu-

glucose was determined spectrophotometrically using the enzymatic method (Labtest, Brazil).

2.7. Glucose uptake

The gastrocnemius muscle samples (about 100 mg) were incubated in tubes containing 1 mL of KRB with 0.2 μ Ci [2-deoxyglucose- 14 C] glucose (Amersham, USA). The gaseous phase was equilibrated using 5% CO₂:95% O₂. The tubes were placed in a Dubnoff incubator, and were constantly shaken for 30 min at 37 °C.

The tissue was disrupted to determine glucose uptake [34]. The uptake results are expressed as tissue/medium (T/M) ratio, which is the dpm/mL tissue fluid per dpm/mL incubation medium.

2.8. Glucose oxidation (14 CO₂ production)

Glucose oxidation was determined in accordance with Torres et al. [35]. Gastrocnemius muscle samples were incubated in flasks sealed with rubber caps at 37 °C in 1 mL of KRB, with 0.2 μ Ci [U- 14 C] glucose (Amersham, USA), plus 5 mM glucose, for 60 min, and the gaseous phase was equilibrated by using 5% CO₂:95% O₂.

In these flasks, small glass wells were placed above the level of the incubation medium containing small strips of Whatman 3MM paper. Next, 1 M hyamine hydroxide (0.2 mL) was injected into the central wells to trap 14 CO₂. Incubation was arrested by adding 0.2 mL of 50% trichloroacetic acid through the rubber caps. The flasks were maintained overnight at room temperature in order to capture 14 CO₂. The contents of the center well were transferred to vials containing scintillation liquid, and radioactivity was measured using an LKB counter with an automatic curve quench correction. Values of 14 CO₂ production are expressed as nmol of 14 C glucose incorporated into CO₂ per mg of tissue per min.

2.9. Determination of hydrogen peroxide steady-state

Hydrogen peroxide was measured via its horseradish peroxidase (HRPO)-mediated oxidation of phenol red, leading to the formation of a compound measurable at 610 nm. Slices of fresh tissue from the muscle were incubated for 30 min at 37 °C in phosphate buffer 10 mmol/L (NaCl 140 mmol/L and dextrose 5 mmol/L). The supernatants were transferred to tubes with 0.28 mmol/L phenol red and 8.5 U/mL HRPO. After 5 min incubation, 1 mol/L NaOH was added and the solution's absorbance values were measured at 610 nm. The results were expressed in nmoles H₂O₂/g tissue [36].

2.10. Western blotting

Skeletal muscle samples were homogenized (Ultra-Turrax) with lysis buffer, pH 7.4. After protein measurement [37], sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (10%) was carried out using a miniprotean system (Bio-Rad, Hercules, USA) with broad range molecular weight standard (rainbow full range, Amersham, USA). Protein (90 μ g) was loaded into each lane with loading buffer containing 0.375 mol/L Tris (pH 6.8), 50% glycerol, 10% SDS, 0.5 mol/L mercaptoethanol, and 0.002% bromophenol blue. Samples were heated at 90 °C for 2 min before gel loading. After electrophoresis, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Hybond; Amersham, USA) using an electrophoretic transfer system. The membranes were then incubated with 8% non-fat dry milk in TTBS (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 150 mmol/L NaCl; 0.05% Tween-20, pH 7.4) for 60 min. The membranes were incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies diluted in TTBS plus 2.5% bovine serum albumin (BSA). Rabbit polyclonal antibodies for GLUT4 (45Kda), p-Akt (60 kDa), Akt (60 kDa) and thioredoxin (55 kDa) (Santa Cruz, USA) were used. After washing with TTBS, the membranes were incubated for 2 h at

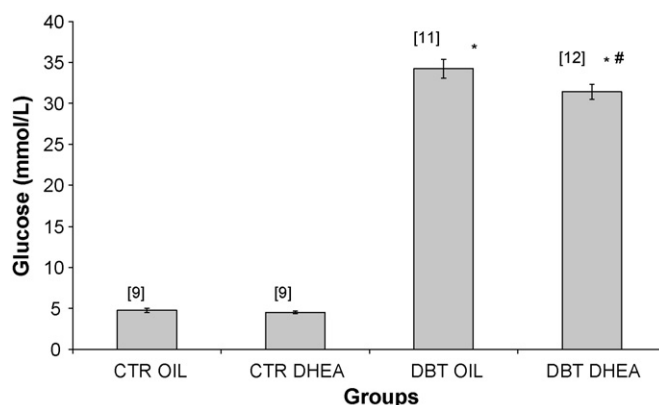


Fig. 2. Plasma glucose concentration in control and diabetic rats, treated with oil or DHEA. Control rats treated with oil (CTR-OIL); control rats treated with DHEA (CTR-DHEA); diabetic rats treated with oil (DBT-OIL); diabetic rats treated with DHEA (DBT-DHEA). Data are given as mean \pm SEM. Number of samples is shown in brackets. (*) Statistically different from respective control groups ($p < 0.05$, SNK). (#) Statistically different from DBT-OIL ($p < 0.05$, SNK).

room temperature with secondary antibody (goat anti-rabbit horse peroxidase-conjugate), and washed with TBS (20 mmol/L Tris-HCl; 150 mmol/L NaCl, pH 7.5). Following chemiluminescence ECL apposition of the membranes to autoradiographic films (Hyperfilm ECL; Amersham, USA), they were analyzed using an Image Master VDS Software version. The results for each membrane were normalized to total protein values from Ponceau stained (5% in acetic acid), instead of using tubulin as a control, since DHEA and diabetes could alter the cytoskeleton proteins [38]. Samples from all the experimental groups were processed in parallel ($n = 4$ in each group).

2.11. Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) was used, followed by the Student–Newman–Keuls (SNK) test in order to compare parameters. $p < 0.05$ was taken as the level of significance. All the tests were performed with Jandel Sigma Stat for Windows, version 3.5.

3. Results

3.1. Effect of DHEA treatment on plasma DHEA concentration

In the middle of the first week of the experimental period, it was found that the values of plasma DHEA concentration were higher than before the first injection (Day 1) and the second injection (Day 7) ($p < 0.05$; Fig. 1). At the end of the experimental period (5 weeks, one injection per week) the DBT-DHEA group displayed higher values of DHEA than at the beginning of the experimental period ($p < 0.05$; Fig. 1).

3.2. The effect of DHEA treatment on plasma glucose

Diabetic animals displayed increased plasma glucose, while DHEA treatment decreased levels of glucose concentration ($p < 0.05$; Fig. 2).

3.3. The effect of DHEA treatment on glucose uptake, oxidation and GLUT4

To understand the effect of DHEA treatment on glucose metabolism, quantification of glucose uptake and oxidation (formation of CO₂ from [14 C] glucose) was performed. In the control animals DHEA treatment increased glucose uptake ($p < 0.05$), and

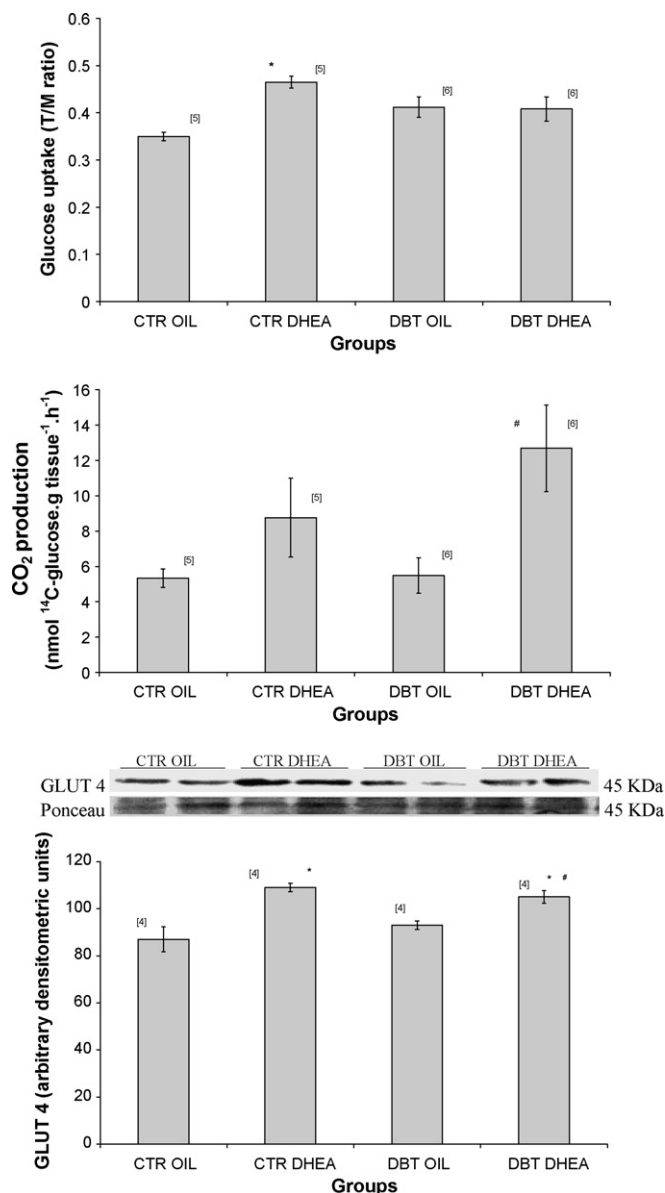


Fig. 3. Glucose metabolism in the gastrocnemius muscle in control and diabetic rats, treated with OIL or DHEA. Control rats treated with oil (CTR-OIL); control rats treated with DHEA (CTR-DHEA); diabetic rats treated with oil (DBT-OIL); diabetic rats treated with DHEA (DBT-DHEA). The [¹⁴C] glucose uptake (top), the [¹⁴C] glucose oxidation (middle) and Western blot analysis using GLUT 4 antibodies (bottom). The uptake is expressed in tissue/medium (T/M) ratio. The oxidation is expressed in CO₂ formation from [¹⁴C] glucose. Data are given as mean ± SEM. Number of samples is shown in brackets. (*) Statistically different from CTR-OIL ($p < 0.05$, SNK). (#) Statistically different from DBT-OIL ($p < 0.05$, SNK).

in the diabetic animals no differences between the groups were observed (Fig. 3). Only in the DBT-DHEA group were higher oxidation values observed ($p < 0.05$; Fig. 3). Since changes were observed in the glucose uptake and oxidation, the level of expression of GLUT4 was ascertained. Both of the groups treated with DHEA increased their GLUT 4 expression as compared to the OIL groups ($p < 0.05$; Fig. 3).

3.4. The effect of DHEA treatment on hydrogen peroxide

Hydrogen peroxide was analyzed as a reactive oxygen species (ROS) which is stable and moderately representative in oxidative processes. DHEA treatment did not alter the amount of hydrogen

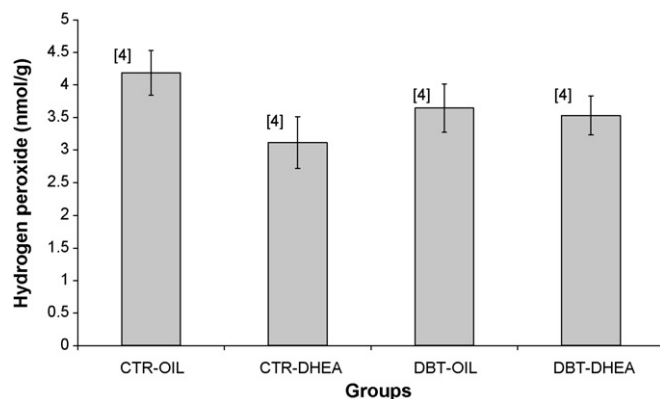


Fig. 4. Hydrogen peroxide quantification in gastrocnemius muscle slices in control and diabetic rats, treated with OIL or DHEA. Control rats treated with oil (CTR-OIL); control rats treated with DHEA (CTR-DHEA); diabetic rats treated with oil (DBT-OIL); diabetic rats treated with DHEA (DBT-DHEA). Data are given as mean ± SEM from 4 animals in each group. There is no statistical difference between the groups.

peroxide in the gastrocnemius muscle. There were no significant differences between the four experimental groups (Fig. 4).

3.5. The effect of DHEA treatment on Akt ratio and Trx expression

Akt is central to the signaling pathway of GLUT4 and signaling events of cell survival, and our results show that the Akt ratio (p-Akt/total Akt) was significantly lower in the CTR-DHEA, DBT-OIL and DBT-DHEA groups as compared to the CTR-OIL group ($p < 0.05$; Fig. 5). The Trx levels are associated with susceptibility to oxidative stress, and in the CTR-DHEA, DBT-OIL and DBT-DHEA groups Trx expression is lower as compared to the CTR-OIL group, together with a further reduction in the DBT-DHEA group when compared to the DBT-OIL group ($p < 0.05$; Fig. 5).

4. Discussion

A number of studies have shown the effects of DHEA and its derivatives on both animal models and on humans in different scenarios, such as diabetes and obesity, and with a range of functions and tissues [4,13,14,39,40]. This paper has described the effects of chronic treatment with DHEA on diabetic animals, especially its effects on skeletal muscle glucose metabolism.

To confirm our experimental model, the supply of DHEA to tissues (plasma DHEA) during the first week of treatment is shown (Fig. 1), and demonstrates that DHEA levels increased during the week. When they fell (on Day 7) another injection was administered, thus ensuring the presence of chronic DHEA during the 5 weeks of treatment. As further validation of the model, the animals which had received 5 injections of DHEA by the end of the experiment displayed higher concentrations of DHEA than the animals which had received only oil (Fig. 1). Although we know that rats are not ideal models for studying the peripheral effects of DHEA, they are widely used in studies of diabetes and possible treatments [7,13,41].

DHEA acts as an antidiabetic agent by causing a significant decline of about 10% in the blood glucose of diabetic animals. Although statistically significant, this reduction does probably not represent a clinical improvement in these animals, since levels of glycemia remain very high. This decline may be due to a possible effect of DHEA stimulating glucose uptake by certain tissues, as has been observed in other tissues such as fibroblasts [16], adipocytes [17,18] and hepatocytes [19], or by stimulating oxidation [42]. Our results show an increase in glucose uptake in the muscle only in the control rats treated with DHEA, but not in the diabetic animals,

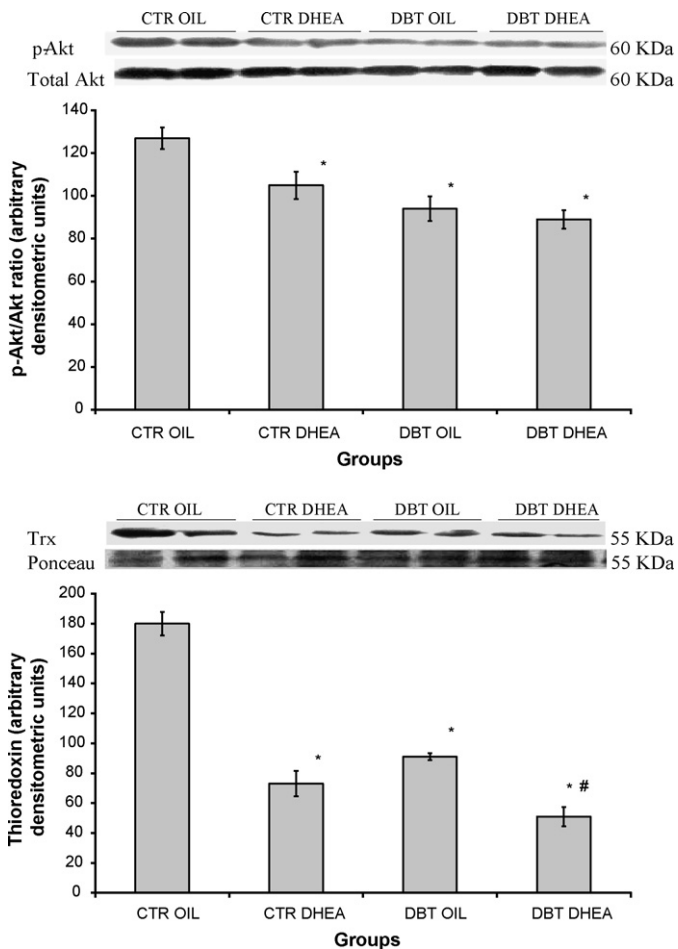


Fig. 5. Western blot analysis in gastrocnemius muscle homogenates in control and diabetic rats, treated with OIL or DHEA, using p-Akt and total Akt antibodies (top) and thioredoxin antibodies (bottom). Control rats treated with oil (CTR-OIL); control rats treated with DHEA (CTR-DHEA); diabetic rats treated with oil (DBT-OIL); diabetic rats treated with DHEA (DBT-DHEA). Data are given as mean \pm SEM from 4 samples in each group. (*) Statistically different from CTR-OIL ($p < 0.05$, SNK). (#) Statistically different from DBT-OIL ($p < 0.05$, SNK).

despite the fact that the DHEA treatment increased the expression of the glucose transporter GLUT4 in both DHEA-treated groups, as was also observed in the studies already mentioned, where isolated cells or animals were treated acutely with DHEA [22,23]. DHEA or one of its metabolites generated an increase in the quantity of GLUT4 in the cells, probably by the route that involves the stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) [43]. This route is also stimulated during increased energy demands (such as exercise) which are independent of the Akt/PI3-kinase. This is indicated by our results, since there was a decrease in Akt in both groups treated with DHEA [44,45]. The increased expression of GLUT4 does not necessarily mean that the carrier is active in the membrane. Its expression increased in both groups treated with DHEA, but its function may remain impaired in diabetics due to a defect in its translocation or activation [46–48].

We observed an increase in glucose oxidation in the muscle of about 40% in the CTR, and of 120% in the diabetic rats treated with DHEA. This corroborates the classic role of DHEA as a hormone that stimulates the use of energy by the cells, increasing the basal metabolism of the tissue [42]. Surprisingly, treatment with DHEA increased the oxidation of glucose in diabetics, even though it did not increase its uptake, as the DHEA may be stimulating glucose utilization via a metabolic pathway that does not do this directly. Once glucose is transported into the cells, it is phosphorylated to

glucose-6-phosphate (G-6-P) and enters one of three major pathways: glycogen synthesis, glycolysis, or the pentose-phosphate pathway [49]. The relative contribution of muscle glycogen synthesis from the glucose taken up is very low when compared to glycolysis [50]. Furthermore, experimental *in vivo* and *in vitro* studies indicate that DHEA inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity in mammalian cells (the first enzyme of the pentose-phosphate pathway [19,51]), and diverts more G-6-P to glycolysis, as was demonstrated in our study by the increase in oxidation, which resulted in an increased generation of ROS [52]. NADPH may prevent oxidative damage, and the inhibition of the pentose-phosphate pathway generates less NADPH, which may cause a redox imbalance.

Although our results demonstrated similar hydrogen peroxide levels in the groups studied, both the DHEA-treated rats and the diabetic rats showed diminished thioredoxin (Trx) protein expression. The Trx system is one of the most important mechanisms for the regulation of the redox balance [53], and its low levels may be associated with an environment which is more susceptible to oxidative stress. In addition, Trx regulates various intracellular signaling pathways for cellular growth, thus suppressing apoptosis [54]. Diabetes alone could result in decreased activation of Akt, resulting from defects in insulin signaling [33], as demonstrated by our results. The DHEA-treated groups also showed decreased Akt activation. This decrease was observed earlier, and it was also observed that DHEA may influence the activity of protein phosphatase 2A (PP2A), which consequently influences the phosphorylation of Akt [55,56]. Akt pathway induction is central to cell survival, and its decreased level of phosphorylation has been related to apoptotic events [57]. It has also been observed that Akt pathway activation increases the levels of antioxidant molecules (such as Trx) through the nuclear transcription factor (for example Nrf2) phosphorylation [58]. Thus the overall data suggest that the diabetic state and its association with DHEA treatment may provide an intracellular environment which is more susceptible to the redox imbalance. DHEA may generate in Akt and Trx almost the same effect as diabetes by reducing both of these. This means that in diabetics the decrease in Akt and Trx continues, and that Trx is reduced further in the DBT-DHEA group; the decrease caused by DHEA appears to be independent of the disease, since there was also a decrease in Akt and Trx in the animals treated with oil.

To sum up, these results showed that treatment with DHEA should be viewed with caution, although it is beneficial in certain respects, such as the partial reduction of blood glucose and increased glucose oxidation in diabetic rats. However, its effect can be harmful, since it reduces the levels of proteins essential for survival and also contributes to a redox imbalance in muscle tissue. That having been said, it is not appropriate here to conclude whether its overall effects are beneficial or harmful, as further studies are required to ascertain the efficacy of DHEA treatment.

Acknowledgment

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq, Brazil.

References

- [1] N.E. Cameron, M.A. Cotter, E.K. Maxfield, Anti-oxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats, *Diabetologia* 36 (1993) 299–304.
- [2] P.A. Low, K.K. Nicklander, H.L. Tritschler, The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy, *Diabetes* 46 (1997) 38–42.
- [3] C.M. Siman, U.J. Eriksson, Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats, *Diabetes* 46 (1997) 1054–1061.
- [4] M. Aragno, S. Parola, E. Brignardello, R. Manti, S. Betteto, E. Tamagno, O. Danni, G. Boccuzzi, Oxidative stress and eicosanoids in the kidneys of hyperglycemic

- rats treated with dehydroepiandrosterone, *Free Rad. Biol. Med.* 31 (8) (2001) 935–942.
- [5] E.E. Baulieu, P. Robel, M. Schumacher, Neurosteroids: beginning of the story, *Int. Rev. Neurobiol.* 46 (2001) 1–32.
 - [6] Q. Mo, S. Lu, N.G. Simon, Dehydroepiandrosterone and its metabolites: differential effects on androgen receptor trafficking and transcriptional activity, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 99 (1) (2006) 50–58.
 - [7] N. Maninger, O.M. Wolkowitz, V.I. Reus, E.S. Epell, S.H. Mellon, Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS), *front. Neuroendocrinology* 30 (1) (2009) 65–91.
 - [8] F. Labrie, V. Luu-The, C. Martel, A. Chernomoretz, E. Calvo, J. Morissette, C. Labrie, Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an anabolic steroid like dihydrotestosterone (DHT), the most potent natural androgen, and tetrahydrogestrinone (THG), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 100 (2006) 52–58.
 - [9] D. Liu, J.S. Dillon, Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor, *Steroids* 69 (4) (2004) 279–289.
 - [10] S. Nakamura, M. Yoshimura, M. Nakayama, T. Ito, Y. Mizuno, E. Harada, T. Sakamoto, Y. Saito, K. Nakao, H. Yasue, H. Ogawa, Possible association of heart failure state with synthetic balance between aldosterone and dehydroepiandrosterone in human heart, *Circulation* 110 (13) (2004) 1787–1793.
 - [11] M. Schumacher, Y. Akwa, R. Guennoun, F. Robert, F. Labombarda, F. Desarnaud, P. Robel, A.F. De Nicola, E.E. Baulieu, Steroids synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects, *J. Neurocytol.* 29 (2000) 307–326.
 - [12] M.J. Wang, H.M. Huang, H.L. Chen, J.S. Kuo, K.C. Jeng, Dehydroepiandrosterone inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV-2 microglia, *J. Neurochem.* 77 (3) (2001) 830–838.
 - [13] M. Aragno, E. Tamagno, V. Gatto, E. Brignardello, S. Parola, O. Danni, G. Boccuzzi, Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress, *Free Rad. Biol. Med.* 26 (11–12) (1999) 467–474.
 - [14] R.J. Richards, J.R. Porter, F. Insera, Effects of dehydroepiandrosterone and quinapril on nephropathy in obese Zucker rats, *Kidney Int.* 59 (2001) 37–43.
 - [15] D.L. Coleman, E.H. Leiter, R.W. Schwizer, Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetic mice, *Diabetes* 31 (9) (1982) 830–833.
 - [16] N. Nakashima, M. Haji, Y. Sakai, Y. Ono, F. Umeda, H. Nawata, Effect of dehydroepiandrosterone on glucose uptake in cultured human fibroblasts, *Metabolism* 44 (1995) 543–548.
 - [17] M. Ishizawa, T. Ishizuka, K. Kajita, A. Miura, Y. Kanoh, M. Kimura, K. Yasuda, Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates glucose uptake in rat adipocytes: activation of phospholipase D, *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 130 (3) (2001) 359–364.
 - [18] S. Perrini, A. Natalicchio, L. Laviola, G. Belsanti, C. Montrone, A. Cignarelli, V. Minielli, M. Grano, G. De Pergola, R. Giorgino, F. Giorgino, Dehydroepiandrosterone stimulates glucose uptake in human and murine adipocytes by inducing GLUT1 and GLUT4 translocation to the plasma membrane, *Diabetes* 53 (1) (2004) 41–52.
 - [19] R. Yamashita, T. Saito, S. Satoh, K. Aoki, Y. Kaburagi, H. Sekihara, Effects of dehydroepiandrosterone on gluconeogenic enzymes and glucose uptake in human hepatoma cell line, HepG2, *Endocr. J.* 52 (6) (2005) 727–733.
 - [20] T. Ishizuka, K. Kajita, A. Miura, M. Ishizawa, Y. Kanoh, S. Itaya, M. Kimura, N. Muto, T. Mune, H. Morita, K. Yasuda, DHEA improves glucose uptake via activations of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase, *Am. J. Physiol.* 276 (1999) E196–204.
 - [21] H.Y. Kang, C.L. Cho, K.L. Huang, J.C. Wang, Y.C. Hu, H.K. Lin, C. Chang, K.E. Huang, Nongenomic androgen activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signalling pathway in MC3T3-E1 osteoblasts, *J. Bone Miner. Res.* 19 (2004) 1181–1190.
 - [22] K. Sato, M. Iemitsu, K. Aizawa, R. Ajisaka, Testosterone and DHEA activate the glucose metabolism-related signaling pathway in skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294 (5) (2008) E961–968.
 - [23] K. Sato, M. Iemitsu, K. Aizawa, R. Ajisaka, DHEA improves impaired activation of Akt and PKC zeta/lambd-Glut4 pathway in skeletal muscle and improves hyperglycaemia in streptozotocin-induced diabetes rats, *Acta Physiol. (Oxf.)* 197 (3) (2009) 217–225.
 - [24] M.H.V.M. Jacob, D.R. Janner, A. Belló-Klein, S.R. Liesuy, M.F.M. Ribeiro, Dehydroepiandrosterone modulates antioxidant enzymes and Akt signaling in healthy Wistar rat hearts, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 112 (1–3) (2008) 138–144.
 - [25] A. Yildirim, M. Gumus, S. Dalga, Y.N. Sahin, F. Akcay, Dehydroepiandrosterone improves hepatic antioxidant systems after renal ischemia-reperfusion injury in rabbits, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 33 (4) (2003) 459–464.
 - [26] M. Gallo, M. Aragno, V. Gatto, E. Tamagno, E. Brignardello, R. Manti, O. Danni, G. Boccuzzi, Protective effect of dehydroepiandrosterone against lipid peroxidation in a human liver cell line, *Eur. J. Endocrinol.* 141 (1) (1999) 35–39.
 - [27] R. Mastrocola, M. Aragno, S. Betteto, E. Brignardello, M.G. Catalano, O. Danni, G. Boccuzzi, Pro-oxidant effect of dehydroepiandrosterone in rats is mediated by PPAR activation, *Life Sci.* 73 (2003) 289–299.
 - [28] M.A. Pélissier, C. Muller, M. Hill, R. Morfin, Protection against dextran sodium sulfate-induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7 alpha-hydroxydehydroepiandrosterone in the rat, *Steroids* 71 (3) (2006) 240–248.
 - [29] M.H. Jacob, D. da Rocha Janner, M.P. Jahn, L.C. Kucharski, A. Belló-Klein, M.F. Ribeiro, DHEA effects on myocardial Akt signaling modulation and oxidative stress changes in aged rats, *Steroids* 74 (13–14) (2009) 1045–1050.
 - [30] E.E. Baulieu, Dehydroepiandrosterone: a fountain of youth? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (9) (1996) 3147–3151.
 - [31] P. Celec, L. Starka, Dehydroepiandrosterone—Is the fountain of youth drying out? *Physiol. Res.* 52 (4) (2003) 397–407.
 - [32] K. Takeuchi, Induction of gastric lesions and hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats, *Digest. Dis. Sci.* 39 (3) (1994) 626–634.
 - [33] C.S. Campbell, L.C. Caperuto, A.E. Hirata, E.P. Araujo, L.A. Velloso, M.J. Saad, C.R. Carvalho, The phosphatidylinositol/AKT/atypical PKC pathway is involved in the improved insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo, *Life Sci.* 76 (1) (2004) 57–70.
 - [34] V.L.A. Machado, G.F. Wassermann, M. Marques, In vitro effect of insulin on the uptake of glucose and alpha-aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle (*Chrysemys dorsignii*), *Gen. Comp. Endocrinol.* 82 (1991) 8–13.
 - [35] I.L. Torres, G.D. Gamaro, S.N. Silveira-Cucco, M.B. Michalowski, J.B. Corrêa, M.L. Perry, C. Dalmaz, Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34 (1) (2001) 111–116.
 - [36] E. Pick, Y. Keisari, A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture, *J. Immunol. Methods* 38 (1980) 161–170.
 - [37] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
 - [38] E. Laurine, D. Lafitte, C. Grégoire, E. Séré, E. Loret, S. Douillard, B. Michel, C. Briand, J.M. Verdier, Specific binding of dehydroepiandrosterone to the N terminus of the microtubule-associated protein MAP2, *J. Biol. Chem.* 278 (32) (2003) 29979–29986.
 - [39] M.A. Yorek, L.J. Coppey, J.S. Gellert, E.P. Davidson, X. Bing, D.D. Lund, J.S. Dillon, Effect of treatment of diabetic rats with dehydroepiandrosterone on vascular and neural function, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283 (5) (2002) E1067–1075.
 - [40] K.S. Nair, R.A. Rizza, P. O'Brien, K. Dhatariya, K.R. Short, A. Nehra, J.L. Vitton, G.G. Klee, A. Basu, R. Basu, C. Cobelli, G. Toffolo, C. Dalla Man, D.J. Tindall, L.J. Melton, G.E. Smith, S. Khosla, M.D. Jensen, DHEA in elderly women and DHEA or testosterone in elderly men, *N. Engl. J. Med.* 355 (16) (2006) 1647–1659.
 - [41] P. Ordóñez, M. Moreno, A. Alonso, P. Llana, F. Díaz, C. González, 17β-Estradiol and/or progesterone protect from insulin resistance in STZ-induced diabetic rats, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 111 (2008) 287–294.
 - [42] M.K. McIntosh, C.D. Berdanier, Antiobesity effects of dehydroepiandrosterone are mediated by futile substrate cycling in hepatocytes of BHE/cdb rats, *J. Nutr.* 12 (12) (1991) 2037–2043.
 - [43] N.H. Rogers, C.A. Witczak, M.F. Hirshman, L.J. Goodyear, A.S. Greenberg, Estradiol stimulates Akt, AMP-activated protein kinase (AMPK) and TBC1D1/4, but not glucose uptake in rat soleus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382 (4) (2009) 646–650.
 - [44] H.F. Kramer, C.A. Witczak, N. Fujii, N. Jessen, E.B. Taylor, D.E. Arnolds, K. Sakamoto, M.F. Hirshman, L.J. Goodyear, Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle, *Diabetes* 55 (2006) 2067–2076.
 - [45] J.T. Treebak, S. Glund, A. Deshmukh, D.K. Klein, Y.C. Long, T.E. Jensen, S.B. Jorgensen, B. Viollet, L. Andersson, D. Neumann, T. Wallimann, E.A. Richter, A.V. Chibalin, J.R. Zierath, J.F. Wojtaszewski, AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits, *Diabetes* 55 (2006) 2051–2058.
 - [46] B.B. Kahn, L. Rossetti, H.F. Lodish, M.J. Charron, Decreased in vivo glucose uptake but normal expression of GLUT1 and GLUT4 in skeletal muscle of diabetic rats, *J. Clin. Invest.* 87 (1991) 2197–2206.
 - [47] M. Funaki, P. Randhawa, P.A. Janmey, Separation of insulin signaling into distinct GLUT4 translocation and activation steps, *Mol. Cell Biol.* 24 (17) (2004) 7567–7577.
 - [48] S. Huang, M.P. Czech, The GLUT4 glucose transporter, *Cell Metab.* 5 (4) (2007) 237–252.
 - [49] C. Smith, A.D. Marks, M. Lieberman, *Bioquímica Médica de Marks: Uma Abordagem Clínica*, 2nd ed., Artmed, Porto Alegre, 2007, pp. 473–476.
 - [50] L. Rossetti, A. Giacari, Relative contribution of glycogen synthesis and Glycolysis to insulin-mediated glucose uptake, *J. Clin. Invest.* 85 (1990) 1785–1792.
 - [51] A.G. Schwartz, L.L. Pashko, Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and longevity, *Ageing Res. Rev.* 3 (2) (2004) 171–187.
 - [52] A.H. Goldfarb, M.K. McIntosh, B.T. Boyer, Vitamin E attenuates myocardial oxidative stress induced by DHEA in rested and exercised rats, *J. Appl. Physiol.* 80 (2) (1996) 486–490.
 - [53] M. Kobayashi-Miura, K. Shioji, Y. Hoshino, H. Masutani, H. Nakamura, J. Yodoi, Oxygen sensing and redox signaling: the role of thioredoxin in embryonic development and cardiac diseases, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292 (2007) H2040–2050.
 - [54] Y. Liu, W. Min, Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner, *Circ. Res.* 90 (2002) 1259–1266.
 - [55] T. Hirao, Y. Urata, K. Kageyama, M. Ikezaki, M. Kawakatsu, M. Matsuse, T. Matsuo, M. Akishita, I. Nagata, T. Kondo, Dehydroepiandrosterone augments sensitivity to γ-ray irradiation in human H4 neuroglioma cells through down-regulation of Akt signaling, *Free Rad. Res.* 42 (11–12) (2008) 957–965.
 - [56] Y. Jiang, T. Miyazaki, A. Honda, T. Hirayama, S. Yoshida, N. Tanaka, Y. Matsuzaki, Apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in the anti-proliferative actions of dehydroepiandrosterone, *J. Gastroenterol.* 40 (5) (2005) 490–497.

- [57] C.L. Antos, T.A. McKinsey, N. Frey, W. Kutschke, J. McAnally, J.M. Shelton, J.A. Richardson, J.A. Hill, E.N. Olson, Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 907–912.
- [58] H.K. Na, E.H. Kim, J.H. Jung, H.H. Lee, J.W. Hyun, Y.J. Surh, (–)-Epigallocatechin gallate induces Nrf2-mediated antioxidant enzyme expression via activation of PI3K and ERK in human mammary epithelial cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 476 (2008) 171–177.

4.2 Artigo 2

The effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on renal function and metabolism in diabetic rats

Matheus Parmegiani Jahn, Luana Ferreira Gomes, Maria Helena Vianna Metello Jacob, Daiane da Rocha Janner, Alex Sander da Rosa Araújo, Adriane Belló-Klein, Maria Flávia Marques Ribeiro, Luiz Carlos Kucharski

Steroids (Submetido)

Manuscript Number:

Title: THE EFFECT OF DEHYDROEPIANDROSTERONE (DHEA) ON RENAL FUNCTION AND METABOLISM IN DIABETIC RATS

Article Type: Regular Article

Keywords: DHEA; diabetes; glomerulosclerosis; kidney; TGF- β 1; glutathione

Corresponding Author: Dr. Matheus Parmegiani Jahn,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Matheus Parmegiani Jahn

Order of Authors: Matheus Parmegiani Jahn; Luana F Gomes; Maria Helena V Metello Jacob; Daiane R Janner; Alex Sander R Araújo; Adriane Belló-Klein; Maria Flávia M Ribeiro; Luiz Carlos Kucharski

Abstract: Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an endogenous steroid hormone involved in a number of biological actions in humans and rodents, but its effects on renal tissue are not yet fully understood. The aim of this study is to assess the effect of DHEA treatment on diabetic rats, mainly in relation to renal function and metabolism. Diabetic rats were treated with subcutaneous injections of a 10 mg/kg dose of DHEA diluted in oil. Plasma glucose and creatinine, in addition to urine creatinine, were quantified spectrophotometrically. Glucose uptake and oxidation were quantified using radioactive glucose, the urinary Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1) was assessed by enzyme immunoassay, and the total glutathione in the renal tissue was also measured. The diabetic rats displayed higher levels of glycemia, and DHEA treatment reduced hyperglycemia. Plasmatic creatinine levels were higher in the diabetic rats treated with DHEA, while creatinine clearance was lower. Glucose uptake and oxidation were lower in the renal medulla of the diabetic rats treated with DHEA, and urinary TGF- β 1, as well as total glutathione levels, were higher in the diabetic rats treated with DHEA. DHEA treatment was detrimental to renal tissue, since it reduces the glomerular filtration rate and renal medulla metabolism, whilst increasing the urinary excretion of TGF- β 1 and the compensatory response by the glutathione system, probably through a mechanism involving a pro-oxidant action or a pro-fibrotic effect of this androgen or its derivatives. In conclusion, this study reports that DHEA treatment may be harmful to renal tissue, but the mechanisms of this action are not yet fully understood.

Suggested Reviewers: John A Cidlowski
National Institutes of Health, Research Triangle Park
cidlowski@niehs.nih.gov
Studies with endocrinology of steroid hormones.

Beatriz Schaan
Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
beatrizschaan@gmail.com
Studies with diabetic nephropathy.

Qiang Ma

National Institute for Occupational Safety and Health, Centers for Disease Control and Prevention
qam1@cdc.gov
Studies with Nrf2 and high glucose-induced oxidative damage.

Fernand Labrie
Laval University Hospital Research Center, Laval University
fernand.labrie@crchul.ulava.ca
Studies with DHEA and other anabolic steroids.

Peter Celec
Faculty of Natural Sciences, Comenius University
petercelec@hotmail.com
Studies with DHEA in health and disease.

1
2
3
4 **THE EFFECT OF DEHYDROEPIANDROSTERONE (DHEA) ON RENAL**
5
6 **FUNCTION AND METABOLISM IN DIABETIC RATS**
7

8
9 *¹ Matheus Parmegiani Jahn (matheusjahn@hotmail.com)

10
11 ¹ Luana Ferreira Gomes (nutri@ymail.com)

12
13 ^{2,3} Maria Helena Vianna Metello Jacob (mhvmjacob@hotmail.com)

14
15 ² Daiane da Rocha Janner (daia.janner@yahoo.com.br)

16
17 ³ Alex Sander da Rosa Araújo (alsanderaraujo@hotmail.com)

18
19 ³ Adriane Belló-Klein (belklein@ufrgs.br)

20
21 ² Maria Flávia Marques Ribeiro (mflavia@ufrgs.br)

22
23 ¹ Luiz Carlos Kucharski (kuchars@ufrgs.br)

24
25 1 Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada

26
27 2 Laboratório de Interação Neuro-humoral

28
29 3 Laboratório de Fisiologia Cardiovascular

30
31 Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal
32 do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, Rio Grande do
33 Sul, Brazil, CEP 90050-170
34
35

36
37
38 *Corresponding autor:

39
40 Matheus Parmegiani Jahn (matheusjahn@hotmail.com)

41
42 Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada

43
44 Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal
45 do Rio Grande do Sul, Av. Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil,
46 CEP 90050-170
47

48
49 Telephone 55.51.33083505
50
51

52
53 **Short title:** DHEA and renal function in diabetic rats
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an endogenous steroid hormone involved in a number of biological actions in humans and rodents, but its effects on renal tissue are not yet fully understood. The aim of this study is to assess the effect of DHEA treatment on diabetic rats, mainly in relation to renal function and metabolism. Diabetic rats were treated with subcutaneous injections of a 10 mg/kg dose of DHEA diluted in oil. Plasma glucose and creatinine, in addition to urine creatinine, were quantified espectophotometrically. Glucose uptake and oxidation were quantified using radioactive glucose, the urinary Transforming Growth Factor β_1 (TGF- β_1) was assessed by enzyme immunoassay, and the total glutathione in the renal tissue was also measured. The diabetic rats displayed higher levels of glycemia, and DHEA treatment reduced hyperglycemia. Plasmatic creatinine levels were higher in the diabetic rats treated with DHEA, while creatinine clearance was lower. Glucose uptake and oxidation were lower in the renal medulla of the diabetic rats treated with DHEA, and urinary TGF- β_1 , as well as total glutathione levels, were higher in the diabetic rats treated with DHEA. DHEA treatment was detrimental to renal tissue, since it reduces the glomerular filtration rate and renal medulla metabolism, whilst increasing the urinary excretion of TGF- β_1 and the compensatory response by the glutathione system, probably through a mechanism involving a pro-oxidant action or a pro-fibrotic effect of this androgen or its derivatives. In conclusion, this study reports that DHEA treatment may be harmful to renal tissue, but the mechanisms of this action are not yet fully understood.

Keywords:

DHEA, diabetes, glomerulosclerosis , kidney, TFG- β_1 , glutathione

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a syndrome of multiple etiologies, characterized by a group of metabolic disturbances resulting from defects in insulin secretion or insulin action, or both. It is characterized by chronic hyperglycemia, with disturbances in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins, often accompanied by dyslipidemia, hypertension, and the dysfunction of a number of organs.

One of the major complications of DM is a progressive nephropathy that develops in about one third of patients within 10-20 years after the onset of the disease, and leads in most cases to end-stage renal failure [1]. Although a number of studies have already addressed this problem, the factors contributing to diabetic nephropathy have not yet been fully identified.

At the beginning of the process of diabetic nephropathy, an excessive deposition of the extracellular matrix (and subsequent mesangial expansion) occurs, with compensatory hyperfiltration and consequent increase in the size of the kidneys. The compensatory hyperfiltration leads to a loss of functional nephrons and, over time, to a decrease in the glomerular filtration rate (GFR), which causes the onset of renal failure. This process is directly related to increased oxidative stress in renal tissue [2-5]. Studies indicate that reactive oxygen species (ROS) play a key intermediary role in the pathophysiology of diabetic nephropathy [6, 7]. Hyperglycemia, the main determinant of the onset and progression of diabetic nephropathy, not only generates more ROS, but also attenuates anti-oxidative mechanisms through nonenzymatic glycosylation of the antioxidant enzymes [8]. One of the parameters used to evaluate the beginning of the process of nephropathy is the measurement of urinary Transforming Growth Factor β_1 (TGF- β_1), which is a cytokine directly involved in the genesis of glomerulosclerosis in diabetic rats [9, 10]. When the

1
2
3
4 redox equilibrium of the cell is upset by pro-oxidant environmental stimuli, adaptive
5
6 responses to the oxidative stress take place, which can result in up-regulation of
7
8 detoxification enzymes and antioxidant proteins (such as glutathione and thioredoxin) [11].
9

10
11 Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a multi-functional steroid produced in the
12
13 adrenal cortex. It can also be synthesized in the central and peripheral nervous system [12],
14
15 and is involved in a wide range of biological effects in humans and rodents. Together with
16
17 its sulphate ester (DHEA-S), it is the most abundant steroid in humans. It can act both
18
19 directly or through its metabolites (including androstenediol and androstenedione), which
20
21 can undergo further conversion to produce primarily testosterone and estradiol [13].
22
23

24
25
26 Several beneficial effects have been observed in relation to the administration of
27
28 DHEA (mainly in animals), including improvement of vascular function [14],
29
30 cardioprotective effects [15], neuroprotective effects [16, 17], reduction of triglycerides
31
32 levels [18], enhancement of glucose uptake in adipocytes and hepatocytes [19-21],
33
34 prevention of oxidative tissue damage, and action as an antioxidant agent, all of which
35
36 provides a promising strategy for the prevention and treatment of diabetic complications,
37
38 including diabetic nephropathy [22-27]. DHEA supplementation in rodents has produced
39
40 antioxidant effects in a wide variety of protocols for oxidative stress [24, 28, 29]. However,
41
42 it has also been observed that DHEA may produce pro-oxidant effects, depending on the
43
44 dosage and tissue specificity [29-33].
45
46
47
48
49

50
51 Very little is known about the role of male and female sex hormones in diabetic
52
53 nephropathy. There are contradictory studies regarding the effect of DHEA derivatives,
54
55 testosterone and estradiol, on diabetic nephropathy. Studies by Sun *et al.* [34] showed that
56
57 treatment with testosterone has detrimental effects on the tubulointerstitium in the diabetic
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 kidney. Other studies showed that estradiol treatment may be beneficial in attenuating
5
6 diabetic renal complications [35, 36].
7

8
9 Beaulieu considered DHEA a possible "fountain of youth" hormone [37], and ever
10 since that time the use of this steroid hormone has been controversial. DHEA is commonly
11 used as a nutritional supplement and as a means of hormonal replacement for both men and
12 women [38, 39]. It is also widely used in pharmacological or supra-physiological doses
13 with the aim of inducing muscle hypertrophy and improving physical performance [40].
14 Despite the initial enthusiasm for DHEA, many questions concerning its efficacy remain
15 unanswered, and the solutions to these are a major challenge for future research [41].
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25
26 The main aim of this study is therefore to investigate the effect of chronic DHEA
27 administration on renal function and metabolism in normal and diabetic rats.
28
29
30
31

32 33 **2. Experimental**

34 35 *2.1 Animals*

36
37
38 The experiments were performed on male Wistar rats, with initial weight between
39 250 and 300 grams. The animals were housed in plastic cages (three animals in each), and
40 received water and pelleted food *ad libitum*. They were maintained under standard
41 laboratory conditions (controlled temperature of 21°C, 12 h light/dark cycle). Special care
42 was taken to minimize the number of animals used and their suffering. All animal
43 procedures used in this study were in accordance with the Principles of Laboratory Animal
44 Care (COBEA – Brazilian College of Animal Experimentation), and the experimental
45 protocol was approved by the UFRGS Animal Care Committee.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2.2 Diabetes induction

Diabetes mellitus was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (Sigma Chemical Company), in a 70 mg/kg dose [42]. After three days of streptozotocin injections, glucose concentration was verified, and animals whose serum glucose concentration was higher than 20 mmol/L were considered diabetic [24].

2.3 DHEA treatment

DHEA (dehydroepiandrosterone; Calbiochem) was dissolved in vegetable oil (the vehicle) and was administered subcutaneously in a dose of 10 mg/kg once a week for 5 weeks [43-45]. Control groups received only the vehicle. Four groups were formed: non-diabetic animals which received only oil (CTR-OIL), non-diabetic animals with DHEA (CTR-DHEA), diabetic animals with oil (DBT-OIL), and diabetic animals with DHEA (DBT-DHEA).

2.4 Experimental procedure

At the end of the experimental period, the rats were kept individually in metabolic cages for 24 hours, in order to collect the urine for TGF- β_1 quantification and to measure the urine production for calculating the creatinine clearance. The animals were weighed, and then killed by decapitation. Following this, trunk blood samples were collected for later analysis. The kidneys were excised, weighed, then placed in Petri dishes with cold Krebs-Ringer Bicarbonate (KRB) buffer, pH 7.4 (118 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄ and 24.8 mM NaHCO₃). One kidney was immediately frozen for later analysis of total glutathione, the other kidney was sliced freehand with a slicer apparatus, and the renal cortex (CX) and medulla (MD) were separated. Three slices

of about 800-1000 μm of thickness were obtained from each kidney. These tissues were then placed in specific tubes for glucose uptake and glucose oxidation.

2.5 Glucose uptake

The renal cortex and medulla samples were incubated in tubes containing 1 mL of KRB buffer with 0.2 μCi [2DG- ^{14}C] glucose (Amersham International). The gaseous phase was equilibrated by using 5% CO_2 : 95% O_2 . The tubes were placed in a Dubnoff incubator, and were constantly shaken for 30 minutes at 37°C.

The tissue was then disrupted to determine glucose uptake [45, 46]. The uptake results are expressed as tissue/medium (T/M) ratio, which is the dpm/mL tissue fluid per dpm/mL of incubation medium (LKB-Wallac, Turku, Finland).

2.6 Glucose oxidation ($^{14}\text{CO}_2$ production)

Glucose oxidation was determined in accordance with Torres *et al.* [47]. Renal cortex and medulla samples were incubated in flasks sealed with rubber caps at 37°C in 1 mL of KRB buffer, with 0.2 μCi [U- ^{14}C] glucose (Amersham International), plus 5 mM glucose, for 60 min, and the gaseous phase was equilibrated by using 5% CO_2 : 95% O_2 . Saturating glucose concentrations were used for CO_2 production.

In these flasks, small glass wells placed above the level of the incubation medium contained small strips of Whatman 3MM paper. Next, 1 M hyamine hydroxide (0.2 mL) was injected into the central wells to trap $^{14}\text{CO}_2$. Incubation was arrested by adding 0.2 mL of 50% TCA through the rubber caps. The flasks were maintained overnight at room temperature in order to capture $^{14}\text{CO}_2$. The contents of the center well were transferred to vials containing scintillation liquid, and radioactivity was measured using an LKB counter with an automatic quench curve correction. Values of $^{14}\text{CO}_2$ production are expressed as

1
2
3
4 nmol of ^{14}C glucose incorporated into CO_2 per mg of tissue per min (LKB-Wallac, Turku,
5
6
7 Finland).

8 9 *2.7 Plasma glucose and creatinine, and urine creatinine*

10
11
12 Blood samples collected at the end of the experimental period were placed in
13
14 heparinized tubes and centrifuged. The plasma glucose and creatinine, and the urinary
15
16 creatinine were determined spectrophotometrically (Biorad, California, USA) using
17
18 enzymatic methods (Kit Bio-Diagnostica LTDA).
19
20

21
22 Creatinine clearance was obtained by measuring the plasma creatinine, urine
23
24 creatinine and urine volume over 24 hours, using metabolic cages. This measurement is an
25
26 approximation of the glomerular filtration rate (GFR).
27
28

29 30 *2.8 Determination of the urinary excretion of TGF- β_1*

31
32
33 The urine samples collected were stored at -20° until the day of the assay. On the
34
35 day of the assay, in order to activate latent TGF- β_1 , the samples were acidified to a pH of 2-
36
37 3 for 30 minutes at room temperature, and then re-neutralised to pH 7-8. TGF- β_1 was
38
39 measured by using an enzyme-linked immunosorbent assay kit (TGF- β_1 E_{max}
40
41 ImmunoAssay Systems – Promega, USA). Values are expressed as pg of TGF- β_1 per mL of
42
43 urine sample [48].
44
45
46

47 48 *2.9 Determination of total glutathione*

49
50
51 To determine total glutathione, the renal tissue was deproteinized with perchloric
52
53 acid 2 mol/L and centrifuged for 10 min at 1000 x G. The supernatant was neutralized with
54
55 potassium hydroxide 2 mol/L and MOPS (2M). The reaction medium contained phosphate
56
57 buffer 100 mmol/L (pH 7.2), nicotinamide acid dinucleotide phosphate (NADPH) 2
58
59 mmol/L, glutathione reductase 0.2 U/mL and 70 $\mu\text{mol/L}$ of 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic
60
61
62
63
64
65

acid) and was read spectrophotometrically at 340 nm. Values are expressed as nmol of glutathione per g of tissue [49].

2.10 Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) was used, followed by the Student-Newman-Keuls test (SNK). Pearson correlation was used with TGF- β_1 and glutathione. $p < 0.05$ was taken as the level of significance. All tests were performed with the Jandel Sigma Stat for Windows, version 3.5.

3. Results

The animals were initially distributed randomly, and weighed 290g each on average. The control animals were heavier, while the diabetic animals were lighter, and DHEA treatment did not alter this parameter (Table 1). All the animals displays similar kidney weight. The diabetic rats displayed characteristic kidney hypertrophy ($p < 0.05$) when compared to the control animals, and this phenomenon was not modified by DHEA treatment (Table 1).

As expected, plasma glucose was higher in the diabetic groups ($p < 0.05$), while in the diabetic rats treated with DHEA plasma glucose was significantly lower ($p < 0.05$) when compared with those animals treated only with oil (Table 2). Plasma creatinine was significantly higher ($p < 0.05$) in the DBT-DHEA group compared with the DBT-OIL group (Table 2). Creatinine clearance, a measurement of GFR, was higher in the DBT-OIL group when compared with the control groups, and was significantly lower ($p < 0.05$) in the DBT-DHEA group as compared to with the DBT-OIL group (Table 2).

1
2
3
4 In all the groups, the renal medulla displays a higher glucose uptake than the renal
5 cortex ($p < 0.05$) (Fig.1). The renal medulla of the DBT groups displays lower values of
6 glucose uptake when compared with the CTR groups. DHEA treatment decreases the
7 glucose uptake when compared with the respective OIL group (CTR-OIL and DBT-OIL)
8 (Fig. 1). In the CTR-OIL, CTR-DHEA and DBT-OIL groups, the renal medulla displays
9 higher values of glucose oxidation when compared with the renal cortex ($p < 0.05$), and only
10 in the DBT-DHEA group was this difference not observed (Fig. 2).
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

21 The DBT-OIL group displays a 6-fold increase in the urinary content of TGF- β_1
22 when compared with the CTR-OIL group (Fig. 3). The DBT-DHEA group displays
23 significantly higher values of urinary TGF- β_1 when compared with all the other groups
24 ($p < 0.05$) (Fig. 3).
25
26
27
28
29
30

31 The CTR-DHEA, DBT-OIL and DBT-DHEA groups display higher values of total
32 glutathione than the CTR-OIL group ($p < 0.05$), while the DBT-DHEA group displays even
33 higher values than the DBT-OIL group ($p < 0.05$) (Fig. 4). A Pearson Correlation was
34 performed to compare the variation of TGF- β_1 and total glutathione, and a $r = 0.510$ was
35 obtained, thus showing a statistically significant correlation between the two variables
36 ($p < 0.05$).
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 **4. Discussion**

49

50 A number of studies have demonstrated the effects of DHEA and its derivatives on
51 both animal models and on humans in different scenarios, such as diabetes and obesity, and
52 with a range of functions and tissues [23, 24, 27, 50-53]. This paper describes the effects of
53 chronic treatment with DHEA in diabetic animals, with emphasis on its effects on renal
54 function and metabolism.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 DHEA acts as an antidiabetic agent by causing a significant decline of about 10% in
5
6 the blood glucose of diabetic animals. Although it is statistically significant, this reduction
7
8 probably does not represent a major clinical improvement in these animals, since glycemia
9
10 levels remain very high. The reduction may be due to the process of DHEA stimulating the
11
12 glucose uptake by other tissues such as fibroblasts [54], adipocytes [19, 20], hepatocytes
13
14 [21], whilst in the renal tissue an increase in glucose uptake was not observed, and uptake
15
16 actually decreased. It was expected that the reduction of the glycemia would be favorable to
17
18 renal function, since hyperglycemia may be the cause of renal lesions that occur during the
19
20 course of diabetes. However, this was not the case, since renal function was impaired and
21
22 glomerulosclerosis was probably accelerated, as discussed below.
23
24
25
26
27

28
29 The impairment of glucose uptake in diabetic animals is directly related to the lack
30
31 of insulin, as one of the glucose transporters present in the renal tissue is dependent on this
32
33 hormone. Treatment with DHEA reduced the uptake of glucose in the kidney medulla of
34
35 these animals (both in the controls and in the diabetic animals), indicating that DHEA may
36
37 decrease metabolism or may influence the expression of glucose transporters (GLUTs) in
38
39 this tissue. It cannot be claimed that DHEA decreases the expression of GLUTs, since the
40
41 expression of GLUT4 in the kidney is very low [55] and there are no reports of a
42
43 relationship between DHEA and GLUTs in the kidney, unlike that reported in other tissues
44
45 [19-21, 45, 54], where DHEA increases the expression of GLUTs. The results suggest that
46
47 the glucose is used for normal tissue metabolism, since less of it is taken up, the tissue
48
49 displays lower metabolism. The oxidation of glucose was not influenced by the treatment in
50
51 the control groups, so DHEA may not change the intracellular routes of glucose utilization,
52
53 as was observed in other studies [19, 21]. In the DBT-DHEA group, the medulla oxidizes
54
55 less glucose, since there is no difference between the cortex and the medulla similar to that
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 observed in the other groups, which reinforces the thesis that DHEA decreases metabolism
5 in this tissue in diabetic animals. Thus, as the renal medulla of diabetic rats receives and
6 oxidizes less glucose, the tissue uses less energy, probably because it is in the process of
7 ceasing to function, which is in accordance with a higher plasma concentration of
8 creatinine, a decline in GFR, and an increase in TGF- β_1 .
9

10
11
12
13
14
15
16 In this study, there was no significant change in body weight or in the ratio of body
17 weight/kidney weight between the groups treated. The DBT-OIL animals displayed renal
18 hypertrophy and an increase in GFR, as was expected. Both diabetic groups displayed renal
19 hypertrophy, indicating that they must have undergone an initial increase in GFR, which
20 can lead to renal hypertrophy. The diabetic animals treated with DHEA displayed a
21 reduction in GFR at the end of the experimental period. The DBT-DHEA animals may
22 display an initial increase in GFR, leading to hypertrophy and a subsequent decline in renal
23 function leading to renal failure. This may be related to an acceleration of the
24 glomerulosclerosis process. An inverse association between androgens and renal function
25 in healthy young males was observed by other authors [56].
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 Increase in the plasma creatinine is also a feature of diabetes, due to increased
42 proteolysis and the incipient inability of the kidneys to eliminate excess creatinine. DHEA
43 treatment caused a further increase in these levels, probably because the DBT-DHEA
44 animals experienced a reduction in GFR, and the kidneys were not able to eliminate the
45 excess creatinine, which remained in the animals' bloodstream.
46
47
48
49
50
51
52

53 TGF- β_1 is an early marker of renal injury which is used in many studies to
54 demonstrate the beginning of glomerulosclerosis [10, 48, 57, 58], and is directly linked to
55 increased oxidative stress in the tissue [59]. Treatment with DHEA in diabetic rats
56 increases the expression of TGF- β_1 , which indicates that the treatment may raise levels of
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 oxidative stress in the tissue, and speed up the process of glomerulosclerosis, as was
5
6 already observed in relation to GFR. DHEA may act as a pro-oxidant agent and be
7
8 detrimental to the renal tissue. Studies by Gallo *et al.* [60] demonstrated that slightly higher
9
10 concentrations of DHEA than those found in human tissues protected cells against
11
12 oxidative stress. However, in pharmacological doses, DHEA displayed a pro-oxidant effect.
13
14 Since DHEA plasmatic concentration in rats is very low, the dose utilized in this
15
16 experiment is considered to be pharmacological. The assumption that DHEA acts as a pro-
17
18 oxidant (as proposed in other studies [29-33, 43]) may explain the decline in GFR and the
19
20 increase in urinary TGF- β_1 in DBT-DHEA animals in response to an acceleration of
21
22 glomeruloesclerosis.
23
24
25
26
27

28
29 Other studies have produced inconsistent results concerning concentrations of total
30
31 glutathione in the kidneys of diabetic animals. While some have shown that these
32
33 concentrations decrease [24], others have shown that they actually increase [61, 62], as was
34
35 observed in this study. Other studies have also shown that there may be a compensatory
36
37 increase in the antioxidant mechanisms of cells in an attempt to cope with the oxidative
38
39 stress induced by hyperglycemia [63]. The coordination of this response is achieved, at
40
41 least in part, through the Nrf2 and the antioxidant responsive element (ARE), which is
42
43 found in the promoters of many of the genes that are inducible by oxidative and chemical
44
45 stress [64-66]. Assuming that the oxidative imbalance in diabetics can lead to an increase in
46
47 the amount of total glutathione as a compensatory response, results indicate that the
48
49 increase of total glutathione in animals treated with DHEA is also compensatory, due to the
50
51 oxidative imbalance generated by the pharmacological dose of DHEA given to the animals.
52
53 This is in line with the TGF- β_1 result, which demonstrated the positive correlation between
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 TGF- β_1 and glutathione, and indicated deterioration in renal function, which is probably
5
6 linked to oxidative imbalance.
7

8
9 Since DHEA can be converted into testosterone, the increase in this hormone may
10 cause profibrotic events in the diabetic kidneys, thus accelerating the process of diabetic
11 nephropathy, though the exact mechanism for this is not yet fully understood. This effect
12 may also not be directly linked to testosterone levels, but may be related to other
13 mechanisms of the action of DHEA, such as the influence of the insulin-like growth factor I
14 (IGF-I), a growth hormone, or other androgens [34, 56, 67]. Recent data on the subject
15 strongly support the presence of a plasma membrane receptor for DHEA, but this potential
16 receptor still has to be isolated. The activation of intracellular G-proteins [68] and change
17 in insulin secretion in the beta-cells [69] are examples of DHEA acting on specific cell-
18 surface receptors.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 To sum up, despite the fact that treatment with DHEA brought about a decrease in
34 blood glucose (a favourable outcome for the control of hyperglycemia, which is directly
35 related to long-term damage caused by diabetes), the treatment increased plasma creatinine
36 and urinary TGF- β_1 , decreased GFR, and increased total glutathione content, so we are led
37 to the conclusion that the treatment may be detrimental to the renal tissue. The mechanisms
38 of this are not yet fully understood, and further studies must be conducted in order to better
39 comprehend the action of DHEA on renal function in diabetic rats.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

- [1] Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2004;27 Suppl 1:S5-S10.
- [2] Vora JP, Anderson S, Brenner BM. Pathogenesis of diabetic glomerulopathy: the role of glomerular hemodynamic factors. In: Mogensen CE, editor. *The kidney and hypertension in diabetes mellitus*. 2 ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1994.
- [3] Bardoux P, Martin H, Ahloulay M, Schmitt F, Bouby N, Trinh-Trang-Tan MM, et al. Vasopressin contributes to hyperfiltration, albuminuria, and renal hypertrophy in diabetes mellitus: study in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:10397-402.
- [4] Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int*. 1999;56:393-405.
- [5] Murali B, Goyal RK. Effect of chronic treatment with losartan on streptozotocin induced diabetic nephropathy. *Clin Exp Hypertens*. 2001;23:513-20.
- [6] Larkins RG, Dunlop ME. The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 1992;35:499-504.
- [7] Ha H, Kim KH. Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*. 1995;51:S18-21.
- [8] Ruiz C, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999;59:99-105.

- 1
2
3
4 [9] Bertoluci MC, Schmid H, Lachat JJ, Coimbra TM. Transforming growth factor-beta in
5 the development of rat diabetic nephropathy. A 10-month study with insulin-treated rats.
6
7 Nephron. 1996;74:189-96.
8
9
10
11 [10] D'Agord Schaan B, Lacchini S, Bertoluci MC, Irigoyen MC, Machado UF, Schmid H.
12 Impact of renal denervation on renal content of GLUT1, albuminuria and urinary TGF-
13
14 beta1 in streptozotocin-induced diabetic rats. Auton Neurosci. 2003;104:88-94.
15
16
17
18 [11] Mathers J, Fraser JA, McMahon M, Saunders RD, Hayes JD, McLellan LI.
19 Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. Biochem Soc Symp. 2004:157-
20
21 76.
22
23
24
25 [12] Baulieu EE, Robel P, Schumacher M. Neurosteroids: beginning of the story. Int Rev
26
27 Neurobiol. 2001;46:1-32.
28
29
30
31 [13] Mo Q, Lu SF, Simon NG. Dehydroepiandrosterone and its metabolites: differential
32
33 effects on androgen receptor trafficking and transcriptional activity. J Steroid Biochem Mol
34
35 Biol. 2006;99:50-8.
36
37
38 [14] Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular
39
40 endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. Steroids. 2004;69:279-89.
41
42
43 [15] Nakamura S, Yoshimura M, Nakayama M, Ito T, Mizuno Y, Harada E, et al. Possible
44
45 association of heart failure status with synthetic balance between aldosterone and
46
47 dehydroepiandrosterone in human heart. Circulation. 2004;110:1787-93.
48
49
50 [16] Schumacher M, Akwa Y, Guennoun R, Robert F, Labombarda F, Desarnaud F, et al.
51
52 Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. J
53
54 Neurocytol. 2000;29:307-26.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 [17] Wang MJ, Huang HM, Chen HL, Kuo JS, Jeng KC. Dehydroepiandrosterone inhibits
5 lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV-2 microglia. *J Neurochem.*
6 2001;77:830-8.
7
8
9
10
11 [18] Berdanier CD, Parente JA, Jr., McIntosh MK. Is dehydroepiandrosterone an
12 antiobesity agent? *FASEB J.* 1993;7:414-9.
13
14
15 [19] Ishizawa M, Ishizuka T, Kajita K, Miura A, Kanoh Y, Kimura M, et al.
16 Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates glucose uptake in rat adipocytes: activation of
17 phospholipase D. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2001;130:359-64.
18
19
20
21 [20] Perrini S, Natalicchio A, Laviola L, Belsanti G, Montrone C, Cignarelli A, et al.
22 Dehydroepiandrosterone stimulates glucose uptake in human and murine adipocytes by
23 inducing GLUT1 and GLUT4 translocation to the plasma membrane. *Diabetes.*
24 2004;53:41-52.
25
26
27 [21] Yamashita R, Saito T, Satoh S, Aoki K, Kaburagi Y, Sekihara H. Effects of
28 dehydroepiandrosterone on gluconeogenic enzymes and glucose uptake in human hepatoma
29 cell line, HepG2. *Endocr J.* 2005;52:727-33.
30
31
32 [22] Aragno M, Brignardello E, Tamagno E, Gatto V, Danni O, Boccuzzi G.
33 Dehydroepiandrosterone administration prevents the oxidative damage induced by acute
34 hyperglycemia in rats. *J Endocrinol.* 1997;155:233-40.
35
36
37 [23] Aragno M, Parola S, Brignardello E, Manti R, Betteto S, Tamagno E, et al. Oxidative
38 stress and eicosanoids in the kidneys of hyperglycemic rats treated with
39 dehydroepiandrosterone. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:935-42.
40
41
42 [24] Aragno M, Tamagno E, Gatto V, Brignardello E, Parola S, Danni O, et al.
43 Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative
44 stress. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:1467-74.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 [25] Low PA, Nickander KK, Tritschler HJ. The roles of oxidative stress and antioxidant
5 treatment in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 1997;46 Suppl 2:S38-42.
6

7
8
9 [26] Cameron NE, Cotter MA, Maxfield EK. Anti-oxidant treatment prevents the
10 development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*.
11 1993;36:299-304.
12
13
14

15
16 [27] Richards RJ, Porter JR, Inserra F, Ferder LF, Stella I, Reisin E, et al. Effects of
17 dehydroepiandrosterone and quinapril on nephropathy in obese Zucker rats. *Kidney Int*.
18 2001;59:37-43.
19
20
21

22
23 [28] Yildirim A, Gumus M, Dalga S, Sahin YN, Akcay F. Dehydroepiandrosterone
24 improves hepatic antioxidant systems after renal ischemia-reperfusion injury in rabbits.
25 *Ann Clin Lab Sci*. 2003;33:459-64.
26
27
28

29
30 [29] Swierczynski J, Bannasch P, Mayer D. Increase of lipid peroxidation in rat liver
31 microsomes by dehydroepiandrosterone feeding. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1315:193-8.
32
33
34

35 [30] Swierczynski J, Kochan Z, Mayer D. Dietary alpha-tocopherol prevents
36 dehydroepiandrosterone-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes and
37 mitochondria. *Toxicol Lett*. 1997;91:129-36.
38
39
40

41
42 [31] Mastrocola R, Aragno M, Betteto S, Brignardello E, Catalano MG, Danni O, et al.
43 Pro-oxidant effect of dehydroepiandrosterone in rats is mediated by PPAR activation. *Life*
44 *Sci*. 2003;73:289-99.
45
46
47

48
49 [32] Pelissier MA, Muller C, Hill M, Morfin R. Protection against dextran sodium sulfate-
50 induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7alpha-hydroxy-dehydroepiandrosterone in
51 the rat. *Steroids*. 2006;71:240-8.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 [33] Elia EM, Belgorosky D, Faut M, Vighi S, Pustovrh C, Luigi D, et al. The effects of
5 metformin on uterine tissue of hyperandrogenized BALB/c mice. *Mol Hum Reprod.*
6
7
8
9 2009;15:421-32.
- 10
11 [34] Sun J, Devish K, Langer WJ, Carmines PK, Lane PH. Testosterone treatment
12 promotes tubular damage in experimental diabetes in prepubertal rats. *Am J Physiol Renal*
13
14
15
16
17 *Physiol.* 2007;292:F1681-90.
- 18
19 [35] Tomiyoshi Y, Sakemi T, Aoki S, Miyazono M. Different effects of castration and
20 estrogen administration on glomerular injury in spontaneously hyperglycemic Otsuka
21
22
23
24
25 Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Nephron.* 2002;92:860-7.
- 26 [36] Mankhey RW, Bhatti F, Maric C. 17beta-Estradiol replacement improves renal
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- [37] Baulieu EE. Dehydroepiandrosterone (DHEA): a fountain of youth? *J Clin Endocrinol*
Metab. 1996;81:3147-51.
- [38] Legrain S, Girard L. Pharmacology and therapeutic effects of dehydroepiandrosterone
in older subjects. *Drugs Aging.* 2003;20:949-67.
- [39] Panjari M, Davis SR. DHEA for postmenopausal women: A review of the evidence.
Maturitas. 2010.
- [40] Labrie F, Luu-The V, Martel C, Chernomoretz A, Calvo E, Morissette J, et al.
Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an anabolic steroid like dihydrotestosterone (DHT),
the most potent natural androgen, and tetrahydrogestrinone (THG). *J Steroid Biochem Mol*
Biol. 2006;100:52-8.
- [41] Celec P, Starka L. Dehydroepiandrosterone - is the fountain of youth drying out?
Physiol Res. 2003;52:397-407.

1
2
3
4 [42] Takeuchi K, Ueshima K, Ohuchi T, Okabe S. Induction of gastric lesions and
5 hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats. *Dig Dis Sci.*
6
7 1994;39:626-34.
8

9
10
11 [43] Jacob MH, Janner Dda R, Jahn MP, Kucharski LC, Bello-Klein A, Ribeiro MF.
12 DHEA effects on myocardial Akt signaling modulation and oxidative stress changes in
13 aged rats. *Steroids.* 2009;74:1045-50.
14
15

16
17 [44] Campbell CS, Caperuto LC, Hirata AE, Araujo EP, Velloso LA, Saad MJ, et al. The
18 phosphatidylinositol/AKT/atypical PKC pathway is involved in the improved insulin
19 sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo. *Life Sci.* 2004;76:57-70.
20
21

22
23 [45] Jahn MP, Jacob MH, Gomes LF, Duarte R, da Rosa Araujo AS, Bello-Klein A, et al.
24 The effect of long-term DHEA treatment on glucose metabolism, hydrogen peroxide and
25 thioredoxin levels in the skeletal muscle of diabetic rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010,
26 doi:10.1016/j.jsbmb.2010.03.015
27
28

29
30 [46] Machado VL, Wassermann GF, Marques M. In vitro effect of insulin on the uptake of
31 glucose and alpha-aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle (*Chrysemys*
32 *dorbigni*). *Gen Comp Endocrinol.* 1991;82:8-13.
33
34

35
36 [47] Torres IL, Gamaro GD, Silveira-Cucco SN, Michalowski MB, Correa JB, Perry ML,
37 et al. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in
38 hippocampal and cerebral cortex slices. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34:111-6.
39
40

41
42 [48] D'Agord Schaan B, Lacchini S, Bertoluci MC, Irigoyen MC, Machado UF, Schmid H.
43 Increased renal GLUT1 abundance and urinary TGF-beta 1 in streptozotocin-induced
44 diabetic rats: implications for the development of nephropathy complicating diabetes. *Horm*
45 *Metab Res.* 2001;33:664-9.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 [49] Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione
5 mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 1981;77:373-82.
6
7
8
9 [50] Aksoy Y, Yapanoglu T, Aksou H, Yildirim AK. The effect of dehydroepiandrosterone
10 on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative stress in rabbits. *Urol Res.* 2004;32:93-6.
11
12
13 [51] Yorek MA, Coppey LJ, Gellett JS, Davidson EP, Bing X, Lund DD, et al. Effect of
14 treatment of diabetic rats with dehydroepiandrosterone on vascular and neural function. *Am*
15 *J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;283:E1067-75.
16
17
18
19 [52] Aragno M, Cutrin JC, Mastrocola R, Perrelli MG, Restivo F, Poli G, et al. Oxidative
20 stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: attenuation by
21 dehydroepiandrosterone. *Kidney Int.* 2003;64:836-43.
22
23
24
25 [53] Nair KS, Rizza RA, O'Brien P, Dhatariya K, Short KR, Nehra A, et al. DHEA in
26 elderly women and DHEA or testosterone in elderly men. *N Engl J Med.* 2006;355:1647-
27 59.
28
29
30
31 [54] Nakashima N, Haji M, Sakai Y, Ono Y, Umeda F, Nawata H. Effect of
32 dehydroepiandrosterone on glucose uptake in cultured human fibroblasts. *Metabolism.*
33 1995;44:543-8.
34
35
36 [55] Aschenbach JR, Steglich K, Gabel G, Honscha KU. Expression of mRNA for glucose
37 transport proteins in jejunum, liver, kidney and skeletal muscle of pigs. *J Physiol Biochem.*
38 2009;65:251-66.
39
40
41
42 [56] Tomaszewski M, Charchar FJ, Maric C, Kuzniewicz R, Gola M, Grzeszczak W, et al.
43 Inverse associations between androgens and renal function: the Young Men Cardiovascular
44 Association (YMCA) study. *Am J Hypertens.* 2009;22:100-5.
45
46
47
48 [57] Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC. Structural-
49 functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest.* 1984;74:1143-55.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 [58] Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, et
5 al. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and
6 glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming
7 growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. Proc Natl Acad Sci U S A.
8
9 2000;97:8015-20.

10
11
12 [59] Forbes JM, Cooper ME, Oldfield MD, Thomas MC. Role of advanced glycation end
13 products in diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2003;14:S254-8.

14
15
16 [60] Gallo M, Aragno M, Gatto V, Tamagno E, Brignardello E, Manti R, et al. Protective
17 effect of dehydroepiandrosterone against lipid peroxidation in a human liver cell line. Eur J
18 Endocrinol. 1999;141:35-9.

19
20
21 [61] Mekinova D, Chorvathova V, Volkovova K, Staruchova M, Grancicova E, Klvanova
22 J, et al. Effect of intake of exogenous vitamins C, E and beta-carotene on the antioxidative
23 status in kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes. Nahrung. 1995;39:257-61.

24
25
26 [62] Borenshtein D, Ofri R, Werman M, Stark A, Tritschler HJ, Moeller W, et al. Cataract
27 development in diabetic sand rats treated with alpha-lipoic acid and its gamma-linolenic
28 acid conjugate. Diabetes Metab Res Rev. 2001;17:44-50.

29
30
31 [63] Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Koneru S, Juhasz B, Zhan L, Otani H, et al.
32 Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric
33 oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. Free Radic Biol Med. 2007;43:720-9.

34
35
36 [64] Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a
37 co-ordinately regulated defence against oxidative stress. Free Radic Res. 1999;31:273-300.

38
39
40 [65] He X, Kan H, Cai L, Ma Q. Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced
41 oxidative damage in cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol. 2009;46:47-58.

42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 [66] Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, et al.
5
6 Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival
7
8 during oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2009;46:443-53.
9
10
11 [67] Lane PH. Diabetic kidney disease: impact of puberty. *Am J Physiol Renal Physiol.*
12
13 2002;283:F589-600.
14
15
16 [68] Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide
17
18 synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). *J Biol Chem.*
19
20 2002;277:21379-88.
21
22
23 [69] Liu D, Ren M, Bing X, Stotts C, Deorah S, Love-Homan L, et al.
24
25 Dehydroepiandrosterone inhibits intracellular calcium release in beta-cells by a plasma
26
27 membrane-dependent mechanism. *Steroids.* 2006;71:691-9.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Tables

Table 1. The effect of DHEA treatment on body weight and kidney weight on the four experimental groups.

	CTR OIL n=4	CTR DHEA n=5	DBT OIL n=7	DBT DHEA n=8
Final body weight (g)	368±21.6	343.8±18.7	261.57±11.9*	224.3±4.2*
Total kidney weight (g)	2.37±0.2	2.08±0.1	2.88±0.1	2.38±0.1
Kidney Index (% of body weight)	0.643±0.03	0.605±0.01	1.103±0.03*	1.065±0.03*

Values are mean ± S.E.M.;

n = number of animals;

* - statistically different from respective control groups (p<0.05, SNK).

Table 2. The effect of DHEA treatment on plasma glucose and creatinine, and the creatinine clearance.

	CTR OIL	CTR DHEA	DBT OIL	DBT DHEA
Plasma glucose (mmol/L)	5.45±0.1 (5)	4.82±0.2 (5)	36.8±1.7* (6)	33.75±0.9* [#] (6)
Plasma creatinine (µmol/L)	34.49±2.4 (5)	24.05±3.7 (4)	41.23±7.19 (5)	78.4±8.86 [#] (4)
Creatinine Clearance (mL/min)	0.686±0.19 (4)	0.909±0.13 (4)	1.610±0.22* (5)	0.765±0.24 [#] (4)

Values are mean ± S.E.M.;

Number of samples are shown in brackets;

* - significantly different from respective control groups (p<0.05, SNK);

[#] - significantly different from DBT-OIL group (p<0.05, SNK);

Figure Legends

Fig.1. The [^{14}C] glucose uptake by the renal tissue in control and diabetic rats, treated with OIL or DHEA. Control rats treated with oil (CTR-OIL); control rats treated with DHEA (CTR-DHEA); diabetic rats treated with oil (DBT-OIL); diabetic rats treated with DHEA (DBT-DHEA). Data are given as mean \pm SEM. Number of samples is shown in brackets. The uptake is expressed in the tissue/medium (T/M) ratio. Data are given as mean \pm SEM. Number of samples is shown in brackets.

* significantly different between CX and MD in the same group ($p < 0.001$, SNK).

significantly different from respective CTR group ($p < 0.05$, SNK).

Fig.2. The [^{14}C] glucose oxidation by the renal tissue in control and diabetic rats, treated with OIL or DHEA. Control rats treated with oil (CTR-OIL); control rats treated with DHEA (CTR-DHEA); diabetic rats treated with oil (DBT-OIL); diabetic rats treated with DHEA (DBT-DHEA). The oxidation is expressed in CO_2 formation from [^{14}C]Glucose. Data are given as mean \pm SEM. Number of samples is shown in brackets.

* significantly different between CX and MD in the same group ($p < 0.05$, SNK).

Fig.3. Urinary excretion of $\text{TGF-}\beta_1$ in control and diabetic rats, treated with OIL or DHEA. Control rats treated with oil (CTR-OIL); control rats treated with DHEA (CTR-DHEA); diabetic rats treated with oil (DBT-OIL); diabetic rats treated with DHEA (DBT-DHEA). Data are given as mean \pm SEM. Number of samples is shown in brackets.

* significantly different compared with all other groups ($p < 0.05$, SNK).

Fig.4. Total glutathione in the kidney of control and diabetic rats, treated with OIL or DHEA. Control rats treated with oil (CTR-OIL); control rats treated with DHEA (CTR-DHEA); diabetic rats treated with oil (DBT-OIL); diabetic rats treated with DHEA (DBT-DHEA). Data are given as mean \pm SEM. Number of samples is shown in brackets.

significantly different of CTR-OIL group ($p < 0.05$)

* significantly different compared with all other groups ($p < 0.05$, SNK).

Figures

Figure 1

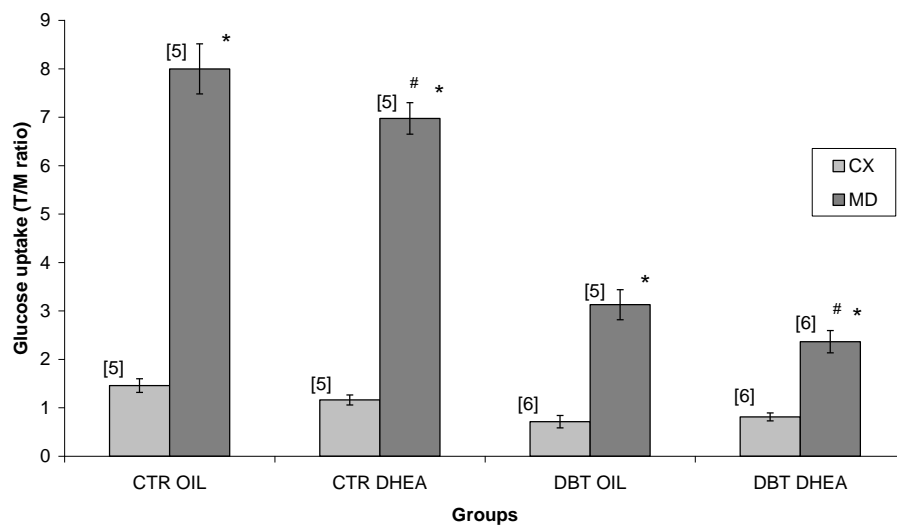


Figure 2

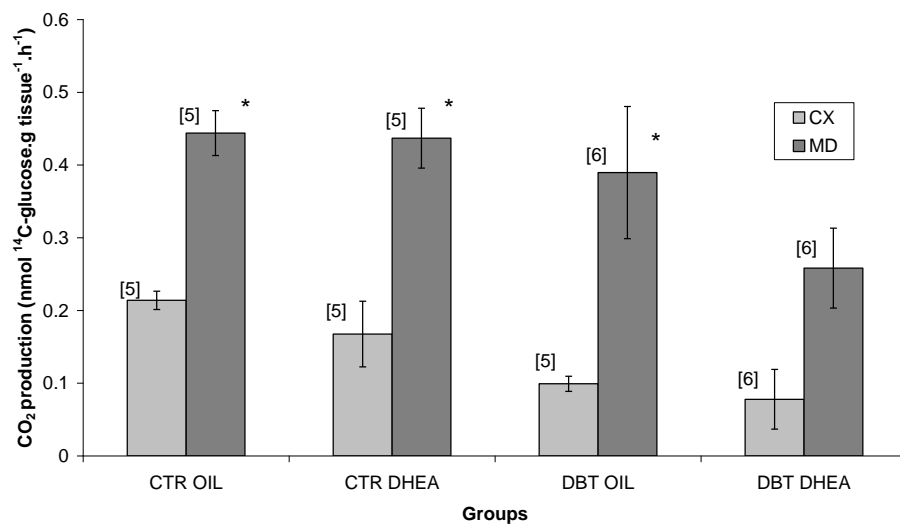
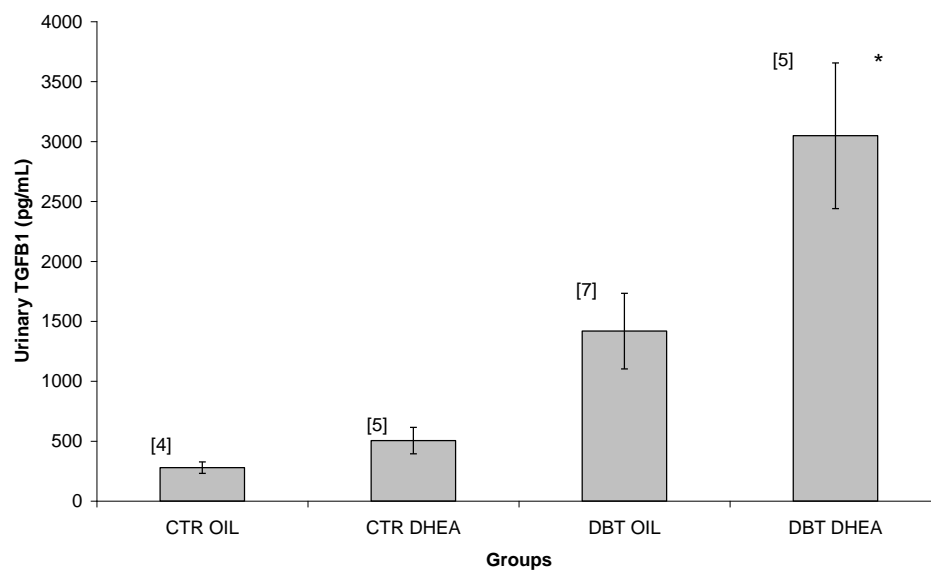
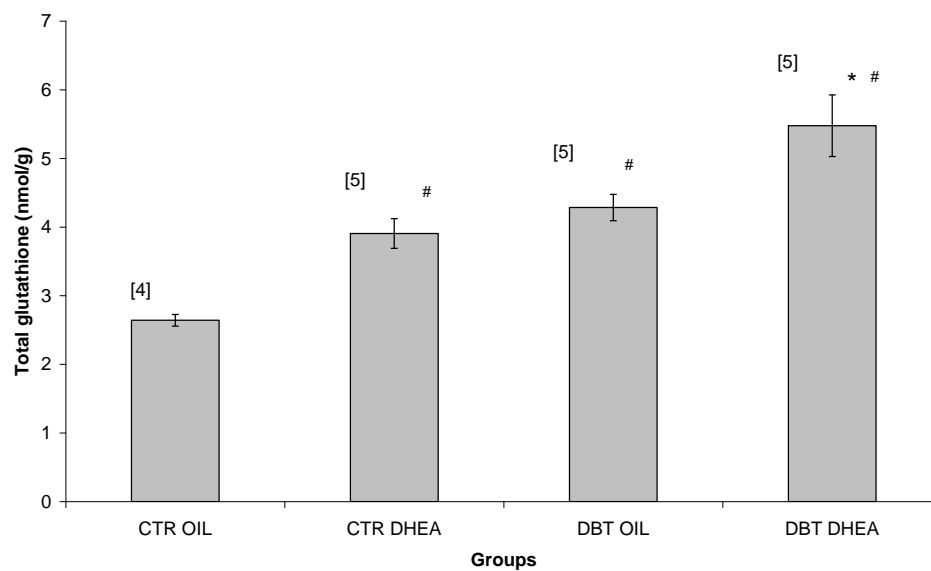


Figure 3**Figure 4**

5. DISCUSSÃO CONCLUSIVA

Numerosos estudos têm mostrado os efeitos da DHEA e seus derivados, tanto em modelos animais como em humanos e em diferentes condições, como a diabetes e a obesidade, e sobre diversas funções e tecidos (ARAGNO *et al.*, 1999, 2001, 2003; YOREK *et al.*, 2002; AKSOY *et al.*, 2004; NAIR *et al.*, 2006). A DHEA também vem sendo utilizada na terapêutica de reposição hormonal em mulheres e homens (PANJARI; DAVIS, 2010), como um possível fármaco “anti-envelhecimento” (BAULIEU *et al.*, 2000; KIBALY *et al.*, 2008), e em doses farmacológicas ou supra-fisiológicas por atletas para fins de hipertrofia muscular (LABRIE *et al.*, 2006). Apesar desta diversificada forma de utilização da DHEA, muitas questões sobre seus efeitos ainda são desconhecidas.

No primeiro momento, foi avaliada a efetividade do tratamento crônico com DHEA, demonstrando que os níveis de DHEA se mantêm elevados durante os dias entre as injeções, e no momento que os níveis reduzem, uma nova injeção é aplicada aos animais, mantendo assim um nível crônico elevado. Da mesma forma, o modelo de tratamento por 5 semanas foi validado, sendo demonstrado que os animais que receberam o tratamento com DHEA apresentaram valores superiores aos valores iniciais. Embora estejamos cientes que os roedores não são os modelos ideais para o estudo dos efeitos periféricos da DHEA, devido aos seus baixos níveis circulantes se comparados aos humanos e outros primatas, esses animais foram usados devido a seu mais fácil acesso e à possibilidade de realizar manipulações características de estudos pré-clínicos. Além disso, os ratos são amplamente utilizados em estudos que visam possíveis tratamentos para doenças de alta prevalência na população, como a diabetes melito (ARAGNO *et al.*, 1999;

ORDÓÑEZ *et al.*, 2008; MANINGER *et al.*, 2009). A diabetes está ligada a uma série de complicações no organismo, e entre estas está uma grande alteração no metabolismo, devido à incapacidade de alguns tecidos de utilizarem a glicose como fonte energética. O fato de a glicose não estar sendo utilizada de forma adequada, resulta no acúmulo desta molécula na circulação, e esta hiperglicemia está diretamente ligada às complicações funcionais de diversos órgãos e tecidos, e um dos possíveis mecanismos responsáveis por essas complicações é a geração de EAO. Para avaliar os efeitos da DHEA sobre a diabetes foram desenvolvidos estudos que resultaram em dois artigos que discutiremos a seguir.

Os efeitos da DHEA diretamente sobre a glicemia foram avaliados em ambos os artigos, e os resultados se mantiveram semelhantes, com a DHEA exercendo um efeito hipoglicemiante. Entre os tecidos prejudicados durante o desenvolvimento e progressão da diabetes está o músculo esquelético, que sofre uma intensa degradação com o objetivo de liberar mais substrato (aminoácidos) para a geração de energia, já que a glicose não está sendo corretamente utilizada. Desta forma, avaliamos o papel da DHEA sobre o metabolismo muscular, observando a captação e oxidação de glicose, bem como a expressão do transportador de glicose GLUT4, uma das vias desta sinalização (via da Akt) e um dos mecanismos de defesa antioxidante no tecido muscular. Outro órgão influenciado pela progressão da diabetes é o rim. No decorrer da diabetes, o rim apresenta uma patologia característica, chamada de nefropatia diabética, que envolve uma série de complicações que vão desde alterações na forma do tecido renal, até problemas na filtração glomerular e nos mecanismos tubulares de transporte, que finalmente acabam levando à falência renal. Estas alterações estão diretamente ligadas à geração de EAO principalmente devido à hiperglicemia. Desta forma, foi avaliado o papel da DHEA sobre o

metabolismo do tecido renal e sobre a função renal, bem como sobre um dos mecanismos de defesa anti-oxidante neste tecido.

A DHEA teve um efeito anti-diabético gerando uma diminuição de cerca de 10% na glicemia dos animais diabéticos. Embora esta redução seja significativa, provavelmente isto não represente uma melhora clínica, já que a glicemia permanece muito alta nestes animais. Este efeito de redução de glicemia já foi observado em outros trabalhos, e provavelmente esteja ligado ao aumento na utilização de glicose por alguns tecidos, como fibroblastos, adipócitos e hepatócitos (NAKASHIMA *et al.*, 1995; ISHIZAWA *et al.*, 2001; PERRINI *et al.*, 2004), ou ao aumento na oxidação desta (MCINTOSH; BERDANIER, 1991). Nossos resultados mostraram um aumento na captação de glicose no músculo apenas nos animais controles tratados com DHEA, apesar do fato de em ambos os grupos tratados com DHEA (controles e diabéticos) a expressão do GLUT4 estar aumentada. Provavelmente este sistema de translocação e posteriormente ativação do GLUT4 esteja prejudicado nos animais diabéticos (KAHN *et al.*, 1991; FUNAKI; RANDHAWA; JANMEY, 2004). Não foi observada uma alteração na Akt no mesmo sentido, pelo contrário, ocorreu uma redução na expressão desta proteína, indicando que a rota de sinalização para a translocação do GLUT4 provavelmente esteja envolvendo outros intermediários, como a AMPK, ativada durante o aumento na demanda energética no tecido muscular (ROGERS *et al.*, 2009). No rim, não houve um aumento na captação de glicose, contudo, houve uma redução na captação na medula renal nos grupos diabéticos (óleo e DHEA) e uma diminuição ainda maior nos tratados com DHEA. Esta redução pode estar ligada à diminuição no metabolismo renal devido à alteração funcional apresentada por este tecido durante a hiperglicemia crônica, característica dos pacientes diabéticos.

Estamos presenciando diferenças marcantes entre a resposta dos dois tecidos analisados ao tratamento com DHEA: enquanto no músculo houve um aumento na captação de glicose e na expressão do GLUT4, no rim houve uma redução na captação de glicose. No músculo, podemos concluir que a DHEA pode estar influenciando diretamente a expressão do GLUT4, demonstrado pelos resultados. No rim, não podemos afirmar que o efeito da DHEA seja sobre estes transportadores, visto que a expressão de GLUT4 no rim é muito reduzida e o seu funcionamento é pouco conhecido neste tecido (ASCHENBACH *et al.*, 2009). É mais provável que haja uma redução do metabolismo, e a conseqüente redução na captação de glicose.

Uma vez que a glicose é transportada para dentro das células, ela é fosforilada para formar a glicose-6-fosfato e entra em uma das três principais rotas: síntese de glicogênio, glicólise ou a rota da pentose-fosfato (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007). A contribuição relativa para a síntese de glicogênio no músculo e no rim é relativamente baixa quando comparada com a glicólise (ROSSETTI; GIACCARI, 1990). Estudos também indicam que a DHEA pode agir inibindo a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), a primeira enzima da rota da pentose-fosfato, o que desviaria mais glicose para a oxidação (GOLDFARB; MCINTOSH; BOYER, 1996; SCHWARTZ; PASHKO, 2004; YAMASHITA *et al.*, 2005). A oxidação de glicose, que representa a utilização deste substrato energético nestes tecidos, estava aumentada no músculo dos animais diabéticos tratados com DHEA, demonstrando o efeito clássico deste hormônio esteróide, que é o de aumentar o metabolismo do tecido muscular. A DHEA poderia estar influenciando rotas de sinalização intracelulares, que levam ao aumento do metabolismo no tecido muscular, isto é, aumento na utilização da glicose como substrato energético, ou

simplesmente desviando mais glicose para a oxidação. Este aumento na utilização de glicose pode, em parte, explicar a redução na glicemia observada nestes animais. No rim, estas alterações não foram encontradas, provavelmente porque a DHEA não está alterando as rotas de sinalização que coordenam a utilização da glicose no tecido renal.

O simples aumento na oxidação de glicose no músculo esquelético pode resultar em um aumento na geração de EAO mas, além disso, o fato da DHEA poder inibir a G6PDH também gera menos NADPH, que é utilizado na prevenção ao dano oxidativo, o que poderia levar a um desequilíbrio redox. Embora os resultados mostrem valores semelhantes para o peróxido de hidrogênio no tecido muscular, tanto os animais diabéticos como os controles apresentaram uma menor expressão da tiorredoxina (Trx). O sistema da Trx é um dos mais importantes mecanismos para a regulação do equilíbrio redox (KOBAYASHI-MIURA *et al.*, 2007), e seus baixos níveis podem estar associados com um ambiente mais favorável ao estresse oxidativo.

A diabetes isoladamente já poderia resultar em uma diminuição na ativação da Akt, resultante de defeitos na sinalização da insulina (CAMPBELL *et al.*, 2004), como demonstrado pelos nossos resultados. Os grupos tratados com DHEA (controle e diabético) apresentaram diminuição na ativação da Akt. Esta redução já foi observada em outros trabalhos, que inclusive mostram que a DHEA pode influenciar a proteína fosfatase 2A (PP2A), que conseqüentemente influencia a fosforilação da Akt (HIRAO *et al.*, 2008; BONNET *et al.*, 2009). A via da Akt é importante para a sobrevivência celular, e níveis diminuídos desta proteína estão relacionados a eventos apoptóticos (ANTOS *et al.*, 2002). Também se sabe que a ativação da via da Akt aumenta os níveis de moléculas antioxidantes, como a Trx,

através da fosforilação do fator de transcrição nuclear Nrf2 (NA *et al.*, 2008). Desta forma, é provável que a diabetes e a associação com a DHEA possam estar proporcionando ao tecido muscular um ambiente mais suscetível ao desequilíbrio redox. Assim, a DHEA pode estar influenciando a Akt e a Trx da mesma forma que a diabetes, reduzindo ambas. E esta redução parece independente da doença, pois foi também observada no grupo controle tratado com DHEA.

Era esperado que a diminuição na glicemia nos animais diabéticos tratados com DHEA fosse favorável ao tecido renal, já que grande parte das alterações funcionais estão diretamente ligadas à hiperglicemia. Entretanto, observamos que a função renal estava prejudicada, e provavelmente o processo de glomeruloesclerose foi acelerado.

Os animais diabéticos tratados com óleo apresentaram uma maior taxa de filtração glomerular (TFG) e também hipertrofia renal, como esperado (BARDOUX *et al.*, 1999). Os dois grupos de animais diabéticos, tratados com óleo ou com DHEA, apresentaram hipertrofia renal, o que representa que ambos passaram por aumento inicial na TFG, que pode levar à hipertrofia do tecido. No final do período experimental, os animais diabéticos tratados com DHEA apresentaram uma TFG reduzida em relação aos tratados com óleo. Estes animais podem ter apresentado o aumento inicial na TFG, que levou à hipertrofia, e posteriormente houve uma diminuição na TFG, provavelmente na direção da insuficiência renal. Este tipo de relação inversa já foi observada para androgênios em relação à função renal em homens (TOMASZEWSKI *et al.*, 2009).

O aumento da creatinina plasmática também é característica da diabetes, devido ao aumento na degradação da proteína muscular e da incapacidade dos rins de eliminar a creatinina. O tratamento com DHEA gerou um aumento ainda maior

nestes níveis. Como diabéticos tratados com DHEA apresentaram uma redução na TFG, os rins destes animais não estão sendo capazes de eliminar o excesso de creatinina, que permanece na circulação.

O TGF- β 1 é um marcador precoce de lesão renal, utilizado em muitos estudos para identificar o início da glomeruloesclerose (MAUER *et al.*, 1984; ZIYADEH *et al.*, 2000; BAULIEU; ROBEL; SCHUMACHER, 2001; SCHAAN *et al.*, 2001), e está diretamente relacionado ao aumento do estresse oxidativo tecidual (FORBES *et al.*, 2003). O tratamento com DHEA nos ratos diabéticos gerou um aumento na expressão do TGF- β 1 no rim, o que indica que a DHEA pode estar aumentando o estresse oxidativo neste tecido, e acelerando o processo de glomeruloesclerose, como já foi observado em relação à TFG. Nesta dose, a DHEA pode estar agindo como um pró-oxidante e desta forma ser prejudicial ao tecido renal. Como a concentração plasmática de DHEA é muito baixa em roedores, a dose utilizada neste experimento é considerada uma dose farmacológica. O fato da DHEA estar agindo como um pró-oxidante (SWIERCZYNSKI; BANNASCH; MAYER, 1996, 1997; GALLO *et al.*, 1999; MASTROCOLA *et al.*, 2003; PÉLISSIER *et al.*, 2006; ELIA *et al.*, 2009), poderia explicar a diminuição na TFG e o aumento no TGF- β 1, o que representaria uma aceleração no processo de glomeruloesclerose.

Outros estudos apresentam resultados contraditórios sobre a concentração de glutathiona total no rim de ratos diabéticos, enquanto alguns mostram que a concentração está diminuída (ARAGNO *et al.*, 1999), outros demonstram que ela está aumentada (MEKINOVÁ *et al.*, 1995; BORENSHTEIN *et al.*, 2001), semelhante ao que foi observado neste estudo. Estudos recentes mostraram que pode haver um aumento compensatório nos mecanismos antioxidantes das células na tentativa de enfrentar o aumento no estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia

(THIRUNAVUKKARASU *et al.*, 2007). A coordenação desta resposta é realizada, ao menos parcialmente, pelo Nrf2 e o elemento responsivo antioxidante (ARE) que é encontrado na região promotora de diversos genes que são induzidos por estresse oxidativo e químico (HAYES; MCLELLAN, 1999; HARVEY *et al.*, 2009; HE *et al.*, 2009). Dessa forma, partindo-se do pressuposto que o desequilíbrio redox nos diabéticos pode causar um aumento na quantidade de glutathiona total, como uma resposta compensatória ou adaptativa, os resultados indicam que o aumento na glutathiona total nos animais tratados com DHEA também seja uma resposta compensatória sobre o desequilíbrio redox causado pela dose farmacológica de DHEA. Este fato está de acordo com o restante dos resultados, inclusive demonstrando uma correlação positiva entre a glutathiona total e o TGF- β 1, o que poderia indicar uma deterioração da função renal provavelmente ligada ao desequilíbrio redox.

Em resumo, apesar do fato de o tratamento com DHEA ter sido benéfico sobre alguns parâmetros analisados, ela acabou sendo prejudicial sobre outras funções ou até facilitadora na geração de um ambiente mais susceptível ao desequilíbrio redox.

A diminuição na glicose sanguínea e aumento na oxidação da glicose no tecido muscular se configuram como possíveis efeitos benéficos em animais diabéticos, pois a diminuição na hiperglicemia pode estar relacionada com a redução no risco de complicações geradas por este excesso de glicose na circulação, e o aumento no metabolismo do tecido muscular poderia ser visto como uma forma de manutenção deste tecido que tende a ser degradado durante a progressão da diabetes.

Por outro lado, diversos dos parâmetros analisados não apresentaram alterações ou apresentaram prejuízo após o tratamento com DHEA. A redução na TFG nos animais diabéticos tratados com DHEA, comprovada pelo aumento da creatinina plasmática, o aumento do TGF- β 1 urinário, e a redução no metabolismo renal mostraram que a DHEA está de alguma forma alterando a função renal, provavelmente no sentido de aceleração do processo de insuficiência renal. Tanto nos rins como no músculo esquelético observamos um provável efeito facilitador para o desequilíbrio redox, comprovado pelas análises de alguns marcadores de estresse oxidativo e de sinalização celular.

Os mecanismos pelos quais a DHEA pode estar agindo ainda não estão completamente claros, inclusive a resposta dos tecidos foi muito diferente em relação aos parâmetros analisados. Ainda não é adequado concluirmos se os efeitos foram benéficos ou prejudiciais de forma geral. O uso deste hormônio de forma concomitante com a diabetes, como um tratamento “anti-diabético”, como possível tratamento “anti-envelhecimento”, como terapia de reposição hormonal em homens ou mulheres ou até como anabolizante pelos praticantes de fisiculturismo deve ser visto com muito cuidado. Diversos outros estudos ainda devem ser realizados no sentido de obter uma melhor compreensão sobre as possíveis ações deste hormônio e/ou sobre os esquemas de tratamento adequados para a obtenção dos efeitos benéficos atribuídos a este hormônio.

6. PERSPECTIVAS

Embora os resultados indiquem uma influência da DHEA sobre o metabolismo muscular e sobre a função renal, e também sobre o balanço oxidativo nestes tecidos, são necessários outros estudos para definir de forma mais específica os papéis e os mecanismos de ação deste hormônio. Diversos outros experimentos poderiam ser realizados, complementando o conhecimento gerado por este trabalho, que avaliassem o efeito da DHEA sobre:

- outras doses e/ou formas de tratamento;
- animais diabéticos tratados com insulina;
- outros efeitos metabólicos, como o efeito sobre o metabolismo lipídico;
- a morfologia renal, através de análise histológica;
- a concentração dos derivados da DHEA, para se entender se o efeito observado é exclusivo da DHEA ou via algum de seus metabólitos;
- outras vias intracelulares;
- o balanço oxidativo no tecido muscular e renal, analisando-se outras moléculas e/ou enzimas;
- outras condições, como o envelhecimento;
- os parâmetros observados neste trabalho em outros tecidos, como o sistema nervoso, fígado, coração.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADA – American Diabetes Association. Diabetic nephropathy (position statement). **Diabetes Care**, v. 21 Suppl 1, p. S50-S53, 1998.
- _____. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 27 Suppl 1, p. S5-S10, 2004.
- ABADIE, J. M. *et al.* Dehydroepiandrosterone alters Zucker rat soleus and cardiac muscle lipid profiles. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 226, n. 8, p. 782-789, 2001.
- AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 373-382, 1981.
- AKSOY, Y. *et al.* The effect of dehydroepiandrosterone on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative stress in rabbits. **Urol Res**, v. 32, n. 2, p. 93-96, 2004.
- ANTOS, C. L. *et al.* Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 2, p. 907-912, 2002.
- ARAGNO, M. *et al.* Dehydroepiandrosterone administration prevents the oxidative damage induced by acute hyperglycemia in rats. **J Endocrinol**, v. 155, n. 2, p. 233-240, 1997.
- _____. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 26, n. 11-12, p. 1467-1474, 1999.
- _____. Oxidative derangement in rat synaptosomes induced by hyperglycaemia: restorative effect of dehydroepiandrosterone treatment. **Biochem Pharmacol**, v. 60, n. 3, p. 389-395, 2000.
- _____. Oxidative stress and eicosanoids in the kidneys of hyperglycemic rats treated with dehydroepiandrosterone. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 8, p. 935-942, 2001.
- _____. Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: attenuation by dehydroepiandrosterone. **Kidney Int**, v. 64, n. 3, p. 836-843, 2003.
- ARAUJO, A. S. *et al.* The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. **J Mol Endocrinol**, v. 41, n. 6, p. 423-430, 2008.
- ASCHENBACH, J. R. *et al.* Expression of mRNA for glucose transport proteins in jejunum, liver, kidney and skeletal muscle of pigs. **J Physiol Biochem**, v. 65, n. 3, p. 251-266, 2009.

BARDOUX, P. *et al.* Vasopressin contributes to hyperfiltration, albuminuria, and renal hypertrophy in diabetes mellitus: study in vasopressin-deficient Brattleboro rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 18, p. 10397-10402, 1999.

BAULIEU, E. E. Dehydroepiandrosterone (DHEA): a fountain of youth? **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 9, p. 3147-3151, 1996.

_____. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. **Recent Prog Horm Res**, v. 52, p. 1-32, 1997.

BAULIEU, E. E. *et al.* Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 8, p. 4279-4284, 2000.

BAULIEU, E. E.; ROBEL, P.; SCHUMACHER, M. Neurosteroids: beginning of the story. **Int Rev Neurobiol**, v. 46, p. 1-32, 2001.

BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 405-412, 1991.

BELL, G. I. *et al.* Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. **J Biol Chem**, v. 268, n. 26, p. 19161-19164, 1993.

BERDANIER, C. D.; PARENTE, J. A., JR.; MCINTOSH, M. K. Is dehydroepiandrosterone an antiobesity agent? **FASEB J**, v. 7, n. 5, p. 414-419, 1993.

BERNE, R. M.; LEVI, M. N. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BERTOLUCI, M. C. *et al.* Transforming growth factor-beta in the development of rat diabetic nephropathy. A 10-month study with insulin-treated rats. **Nephron**, v. 74, n. 1, p. 189-196, 1996.

BONNET, S. *et al.* Dehydroepiandrosterone reverses systemic vascular remodeling through the inhibition of the Akt/GSK3- β /NFAT axis. **Circulation**, v. 120, n. 13, p. 1231-1240, 2009.

BORENSHTEIN, D. *et al.* Cataract development in diabetic sand rats treated with alpha-lipoic acid and its gamma-linolenic acid conjugate. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 17, n. 1, p. 44-50, 2001.

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. 248-254, 1976.

BRIGNARDELLO, E. *et al.* Dehydroepiandrosterone prevents lipid peroxidation and cell growth inhibition induced by high glucose concentration in cultured rat mesangial cells. **J Endocrinol**, v. 166, n. 2, p. 401-406, 2000.

BROSIUS, F. C., 3RD *et al.* Insulin-responsive glucose transporter expression in renal microvessels and glomeruli. **Kidney Int**, v. 42, n. 5, p. 1086-1092, 1992.

CAMERON, N. E.; COTTER, M. A.; MAXFIELD, E. K. Anti-oxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia**, v. 36, n. 4, p. 299-304, 1993.

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. **Life Sci**, v. 76, n. 1, p. 57-70, 2004.

CELEC, P.; STARKA, L. Dehydroepiandrosterone - is the fountain of youth drying out? **Physiol Res**, v. 52, n. 4, p. 397-407, 2003.

CHIN, E.; ZHOU, J.; BONDY, C. Anatomical and developmental patterns of facilitative glucose transporter gene expression in the rat kidney. **J Clin Invest**, v. 91, n. 4, p. 1810-1815, 1993.

CHUNG, S. S. *et al.* Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 8 Suppl 3, p. S233-236, 2003.

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

COMPAGNONE, N. A.; MELLON, S. H. Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 8, p. 4678-4683, 1998.

CORPECHÓT, C. *et al.* Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 8, p. 4704-4707, 1981.

DANENBERG, H. D. *et al.* Dehydroepiandrosterone protects mice from endotoxin toxicity and reduces tumor necrosis factor production. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, n. 10, p. 2275-2279, 1992.

EATON, D. C.; POOLER, J. P. **Fisiologia renal de Vander**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ELIA, E. M. *et al.* The effects of metformin on uterine tissue of hyperandrogenized BALB/c mice. **Mol Hum Reprod**, v. 15, n. 7, p. 421-432, 2009.

FARIA, J. B. L. Atualização em fisiologia e fisiopatologia: patogênese da nefropatia diabética. **J Bras Nefrol**, v. 23, n. 2, p. 121-129, 2001.

FORBES, J. M. *et al.* Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 8 Suppl 3, p. S254-258, 2003.

FUNAKI, M.; RANDHAWA, P.; JANMEY, P. A. Separation of insulin signaling into distinct GLUT4 translocation and activation steps. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 17, p. 7567-7577, 2004.

GALLO, M. *et al.* Protective effect of dehydroepiandrosterone against lipid peroxidation in a human liver cell line. **Eur J Endocrinol**, v. 141, n. 1, p. 35-39, 1999.

GOLDFARB, A. H.; MCINTOSH, M. K.; BOYER, B. T. Vitamin E attenuates myocardial oxidative stress induced by DHEA in rested and exercised rats. **J Appl Physiol**, v. 80, n. 2, p. 486-490, 1996.

GOULD, G. W.; HOLMAN, G. D. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. **Biochem J**, v. 295 (Pt 2), p. 329-341, 1993.

GUGLIUCCI, A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. **J Am Osteopath Assoc**, v. 100, n. 10, p. 621-634, 2000.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

HA, H.; KIM, K. H. Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. **Kidney Int Suppl**, v. 51, p. S18-21, 1995.

HAFFNER, S. J.; CASSELLS, H. Hyperglycemia as a cardiovascular risk factor. **Am J Med**, v. 115 Suppl 8A, p. 6S-11S, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, G. C. M. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HARVEY, C. J. *et al.* Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 4, p. 443-453, 2009.

HAYES, J. D.; MCLELLAN, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. **Free Radic Res**, v. 31, n. 4, p. 273-300, 1999.

HE, X. *et al.* Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v. 46, n. 1, p. 47-58, 2009.

HIRAO, T. *et al.* Dehydroepiandrosterone augments sensitivity to gamma-ray irradiation in human H4 neuroglioma cells through down-regulation of Akt signaling. **Free Radic Res**, v. 42, n. 11-12, p. 957-965, 2008.

HO, E.; CHEN, G.; BRAY, T. M. Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NFkappaB activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice. **FASEB J**, v. 13, n. 13, p. 1845-1854, 1999.

HO, H. K. *et al.* Nrf2 activation involves an oxidative-stress independent pathway in tetrafluoroethylcysteine-induced cytotoxicity. **Toxicol Sci**, v. 86, n. 2, p. 354-364, 2005.

HUANG, S.; CZECH, M. P. The GLUT4 glucose transporter. **Cell Metab**, v. 5, n. 4, p. 237-252, 2007.

ISHIZAWA, M. *et al.* Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates glucose uptake in rat adipocytes: activation of phospholipase D. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 130, n. 3, p. 359-364, 2001.

ISHIZUKA, T. *et al.* DHEA improves glucose uptake via activations of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase. **Am J Physiol**, v. 276, n. 1 Pt 1, p. E196-204, 1999.

ISLAM, M. S.; CHOI, H. Green tea, anti-diabetic or diabetogenic: a dose response study. **Biofactors**, v. 29, n. 1, p. 45-53, 2007.

JACOB, M. H. *et al.* DHEA effects on myocardial Akt signaling modulation and oxidative stress changes in aged rats. **Steroids**, v. 74, n. 13-14, p. 1045-1050, 2009.

JAMES, D. E.; PIPER, R. C. Insulin resistance, diabetes, and the insulin-regulated trafficking of GLUT-4. **J Cell Biol**, v. 126, n. 5, p. 1123-1126, 1994.

KAHN, B. B. *et al.* Decreased in vivo glucose uptake but normal expression of GLUT1 and GLUT4 in skeletal muscle of diabetic rats. **J Clin Invest**, v. 87, n. 6, p. 2197-2206, 1991.

KAKUDA, D. K.; MACLEOD, C. L. Na(+)-independent transport (uniport) of amino acids and glucose in mammalian cells. **J Exp Biol**, v. 196, p. 93-108, 1994.

KALIMI, M.; REGELSON, W. Physicochemical characterization of [3H] DHEA binding in rat liver. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 156, n. 1, p. 22-29, 1988.

KANG, H. Y. *et al.* Nongenomic androgen activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in MC3T3-E1 osteoblasts. **J Bone Miner Res**, v. 19, n. 7, p. 1181-1190, 2004.

KIBALY, C. *et al.* Biochemical and functional evidence for the control of pain mechanisms by dehydroepiandrosterone endogenously synthesized in the spinal cord. **FASEB J**, v. 22, n. 1, p. 93-104, 2008.

KLEIN, D.; KERN, R. M.; SOKOL, R. Z. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. **Biochem Mol Biol Int**, v. 36, n. 1, p. 59-66, 1995.

KOBAYASHI-MIURA, M. *et al.* Oxygen sensing and redox signaling: the role of thioredoxin in embryonic development and cardiac diseases. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 5, p. H2040-2050, 2007.

KOMESAROFF, P. A. Unravelling the enigma of dehydroepiandrosterone: moving forward step by step. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 886-888, 2008.

KURATA, K. *et al.* b-Estradiol, DHEA, DHEAS protect against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by different mechanisms. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 311, p. 237-245, 2004.

KWEON, M. H. *et al.* The novel antioxidant 3-O-caffeoyl-1-methylquinic acid induces Nrf2-dependent phase II detoxifying genes and alters intracellular glutathione redox. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 8, p. 1349-1361, 2006.

LABRIE, F. *et al.* Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an anabolic steroid like dihydrotestosterone (DHT), the most potent natural androgen, and tetrahydrogestrinone (THG). **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 100, n. 1-3, p. 52-58, 2006.

LARKINS, R. G.; DUNLOP, M. E. The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy. **Diabetologia**, v. 35, n. 6, p. 499-504, 1992.

LAURINE, E. *et al.* Specific binding of dehydroepiandrosterone to the N terminus of the microtubule-associated protein MAP2. **J Biol Chem**, v. 278, n. 32, p. 29979-29986, 2003.

LEE, J. M.; JOHNSON, J. A. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. **J Biochem Mol Biol**, v. 37, n. 2, p. 139-143, 2004.

LEGRAIN, S.; GIRARD, L. Pharmacology and therapeutic effects of dehydroepiandrosterone in older subjects. **Drugs Aging**, v. 20, n. 13, p. 949-967, 2003.

LEOPOLD, J. A.; LOSCALZO, J. Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 279, n. 5, p. H2477-2485, 2000.

LIENHARD, G. E. *et al.* How cells absorb glucose. **Sci Am**, v. 266, n. 1, p. 86-91, 1992.

LIU, D.; DILLON, J. S. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). **J Biol Chem**, v. 277, n. 24, p. 21379-21388, 2002.

LIU, D. *et al.* Dehydroepiandrosterone protects vascular endothelial cells against apoptosis through a Galphai protein-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and regulation of antiapoptotic Bcl-2 expression. **Endocrinology**, v. 148, n. 7, p. 3068-3076, 2007.

LOW, P. A.; NICKANDER, K. K.; TRITSCHLER, H. J. The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. **Diabetes**, v. 46 Suppl 2, p. S38-42, 1997.

LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 419-427, 2005.

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, 1991.

MANINGER, N. *et al.* Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). **Front Neuroendocrinol**, v. 30, n. 1, p. 65-91, 2009.

MANKHEY, R. W.; BHATTI, F.; MARIC, C. 17beta-Estradiol replacement improves renal function and pathology associated with diabetic nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 288, n. 2, p. F399-405, 2005.

MARETTE, A. *et al.* Glucose rapidly decreases plasma membrane GLUT4 content in rat skeletal muscle. **Endocrine**, v. 10, n. 1, p. 13-18, 1999.

MASTROCOLA, R. *et al.* Pro-oxidant effect of dehydroepiandrosterone in rats is mediated by PPAR activation. **Life Sci**, v. 73, n. 3, p. 289-299, 2003.

MATHERS, J. *et al.* Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. **Biochem Soc Symp**, n. 71, p. 157-176, 2004.

MAUER, S. M. *et al.* Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. **J Clin Invest**, v. 74, n. 4, p. 1143-1155, 1984.

MAULIK, N.; DAS, D. K. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, n. 11, p. 1368-1382, 2008.

MCINTOSH, M. K.; BERDANIER, C. D. Antiobesity effects of dehydroepiandrosterone are mediated by futile substrate cycling in hepatocytes of BHE/cdb rats. **J Nutr**, v. 121, n. 12, p. 2037-2043, 1991.

MEIKLE, A. W. *et al.* The presence of a dehydroepiandrosterone-specific receptor binding complex in murine T cells. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 42, n. 3-4, p. 293-304, 1992.

MEKINOVÁ, D. *et al.* Effect of intake of exogenous vitamins C, E and beta-carotene on the antioxidative status in kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Nahrung**, v. 39, n. 4, p. 257-261, 1995.

MO, Q.; LU, S. F.; SIMON, N. G. Dehydroepiandrosterone and its metabolites: differential effects on androgen receptor trafficking and transcriptional activity. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 99, n. 1, p. 50-58, 2006.

MOLINA, P.E. **Fisiologia Endócrina**. 2. ed. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007.

MULLONKAL, C. J.; TOLEDO-PEREYRA, L. H. Akt in ischemia and reperfusion. **J Invest Surg**, v. 20, n. 3, p. 195-203, 2007.

NA, H. K. *et al.* (-)-Epigallocatechin gallate induces Nrf2-mediated antioxidant enzyme expression via activation of PI3K and ERK in human mammary epithelial cells. **Arch Biochem Biophys**, v. 476, n. 2, p. 171-177, 2008.

NAIR, K. S. *et al.* DHEA in elderly women and DHEA or testosterone in elderly men. **N Engl J Med**, v. 355, n. 16, p. 1647-1659, 2006.

NAKAMURA, S. *et al.* Possible association of heart failure status with synthetic balance between aldosterone and dehydroepiandrosterone in human heart. **Circulation**, v. 110, n. 13, p. 1787-1793, 2004.

NAKASHIMA, N. *et al.* Effect of dehydroepiandrosterone on glucose uptake in cultured human fibroblasts. **Metabolism**, v. 44, n. 4, p. 543-548, 1995.

NIKOLIC-PATERSON, D. J. *et al.* Macrophages in renal injury. **Kidney Int Suppl**, v. 45, p. S79-82, 1994.

OKABE, T. *et al.* Up-regulation of high-affinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 80, n. 10, p. 2993-2996, 1995.

ORDÓÑEZ, P. *et al.* 17beta-Estradiol and/or progesterone protect from insulin resistance in STZ-induced diabetic rats. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 111, n. 3-5, p. 287-294, 2008.

PANJARI, M.; DAVIS, S. R. DHEA for postmenopausal women: A review of the evidence. **Maturitas**, 2010.

PASTORE, A. *et al.* Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clin Chim Acta**, v. 333, n. 1, p. 19-39, 2003.

PÉLISSIER, M. A. *et al.* Protection against dextran sodium sulfate-induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7alpha-hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat. **Steroids**, v. 71, n. 3, p. 240-248, 2006.

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, 2004.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J Immunol Methods**, v. 38, n. 1-2, p. 161-170, 1980.

PICKUP, J.; WILLIAMS, G. **Textbook of diabetes**. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 1997.

PINCEMAIL, J. Free radicals and antioxidants in human diseases. In: FAVIER, A. E. E. A. (Ed.). **Analysis of free radicals in biological systems**. Basel: Birkhauser Verlag, 1995.

PROUGH, R. A. *et al.* Induction of microsomal and peroxisomal enzymes by dehydroepiandrosterone and its reduced metabolite in rats. **Cancer Res**, v. 54, n. 11, p. 2878-2886, 1994.

RENNO, W. M. *et al.* Effect of green tea on kidney tubules of diabetic rats. **Br J Nutr**, v. 100, n. 3, p. 652-659, 2008.

REUSCH, C. E. Hypoadrenocorticism. In: FELDMAN, S. J.; ETTINGER, E. (Ed.). **Textbook of veterinary internal medicine**. St. Louis: Elsevier, 2005.

RICHARDS, R. J. *et al.* Effects of dehydroepiandrosterone and quinapril on nephropathy in obese Zucker rats. **Kidney Int**, v. 59, n. 1, p. 37-43, 2001.

ROBERTSON, R. P. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. **J Biol Chem**, v. 279, n. 41, p. 42351-42354, 2004.

ROGERS, N. H. *et al.* Estradiol stimulates Akt, AMP-activated protein kinase (AMPK) and TBC1D1/4, but not glucose uptake in rat soleus. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 382, n. 4, p. 646-650, 2009.

ROSSETTI, L.; GIACCARI, A. Relative contribution of glycogen synthesis and glycolysis to insulin-mediated glucose uptake. A dose-response euglycemic clamp study in normal and diabetic rats. **J Clin Invest**, v. 85, n. 6, p. 1785-1792, 1990.

RUIZ, C. *et al.* Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type 1 diabetes mellitus. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 59, n. 2, p. 99-105, 1999.

RYDER, J. W.; CHIBALIN, A. V.; ZIERATH, J. R. Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle. **Acta Physiol Scand**, v. 171, n. 3, p. 249-257, 2001.

SALE, E. M.; SALE, G. J. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 1, p. 113-127, 2008.

SATO, K. *et al.* Testosterone and DHEA activate the glucose metabolism-related signaling pathway in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, n. 5, p. E961-968, 2008.

_____. DHEA improves impaired activation of Akt and PKC zeta/lambda-GLUT4 pathway in skeletal muscle and improves hyperglycaemia in streptozotocin-induced diabetes rats. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 197, n. 3, p. 217-225, 2009.

SBD - SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Consenso brasileiro sobre diabetes. **Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2**. Rio de Janeiro: Diagraphic Editora, 2003.

SBD - SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. **Tratamento e acompanhamento do diabetes *mellitus***. Rio de Janeiro: Diagraphic Editora, 2007.

SCHAAN, B. D. *et al.* Increased renal GLUT1 abundance and urinary TGF-beta 1 in streptozotocin-induced diabetic rats: implications for the development of nephropathy complicating diabetes. **Horm Metab Res**, v. 33, n. 11, p. 664-669, 2001.

_____. Impact of renal denervation on renal content of GLUT1, albuminuria and urinary TGF-beta1 in streptozotocin-induced diabetic rats. **Auton Neurosci**, v. 104, n. 2, p. 88-94, 2003.

SCHUMACHER, M. *et al.* Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. **J Neurocytol**, v. 29, n. 5-6, p. 307-326, 2000.

SCHWARTZ, A. G.; PASHKO, L. L. Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and longevity. **Ageing Res Rev**, v. 3, n. 2, p. 171-187, 2004.

SIMAN, C. M.; ERIKSSON, U. J. Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. **Diabetes**, v. 46, n. 6, p. 1054-1061, 1997.

SLOT, J. W. *et al.* Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 17, p. 7815-7819, 1991.

_____. Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. **J Cell Biol**, v. 113, n. 1, p. 123-135, 1991.

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

SUN, J. *et al.* Testosterone treatment promotes tubular damage in experimental diabetes in prepubertal rats. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 292, n. 6, p. F1681-1690, 2007.

SWIERCZYNSKI, J.; BANNASCH, P.; MAYER, D. Increase of lipid peroxidation in rat liver microsomes by dehydroepiandrosterone feeding. **Biochim Biophys Acta**, v. 1315, n. 3, p. 193-198, 1996.

SWIERCZYNSKI, J.; KOCHAN, Z.; MAYER, D. Dietary alpha-tocopherol prevents dehydroepiandrosterone-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes and mitochondria. **Toxicol Lett**, v. 91, n. 2, p. 129-136, 1997.

TAKEUCHI, K. *et al.* Induction of gastric lesions and hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats. **Dig Dis Sci**, v. 39, n. 3, p. 626-634, 1994.

TANITO, M.; AGBAGA, M. P.; ANDERSON, R. E. Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection in vivo and in vitro. **Free Radic Biol Med**, v. 42, n. 12, p. 1838-1850, 2007.

THIRUNAVUKKARASU, M. *et al.* Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. **Free Radic Biol Med**, v. 43, n. 5, p. 720-729, 2007.

TOMASZEWSKI, M. *et al.* Inverse associations between androgens and renal function: the Young Men Cardiovascular Association (YMCA) study. **Am J Hypertens**, v. 22, n. 1, p. 100-105, 2009.

TOMIYOSHI, Y. *et al.* Different effects of castration and estrogen administration on glomerular injury in spontaneously hyperglycemic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. **Nephron**, v. 92, n. 4, p. 860-867, 2002.

TORRES, I. L. *et al.* Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 1, p. 111-116, 2001.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN WEERDEN, W. M. *et al.* Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. **Life Sci**, v. 50, n. 12, p. 857-861, 1992.

VON MUHLEN, D. *et al.* The Dehydroepiandrosterone And WellNess (DAWN) study: research design and methods. **Contemp Clin Trials**, v. 28, n. 2, p. 153-168, 2007.

WANG, M. J. *et al.* Dehydroepiandrosterone inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV-2 microglia. **J Neurochem**, v. 77, n. 3, p. 830-838, 2001.

WEBB, S. J. *et al.* The biological actions of dehydroepiandrosterone involves multiple receptors. **Drug Metab Rev**, v. 38, n. 1-2, p. 89-116, 2006.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications**: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: Department of Noncommunicable Disease Surveillance, 1999.

WIDSTROM, R. L.; DILLON, J. S. Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulfate? **Semin Reprod Med**, v. 22, n. 4, p. 289-298, 2004.

WILD, S. *et al.* Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WILLIAMS, M. R. *et al.* Dehydroepiandrosterone inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation independent of ARs and ERs. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 1, p. 176-181, 2002.

WU, S. *et al.* Research on the age-related changes in the nitric oxide pathway in the arteries of rats and the intervention effect of dehydroepiandrosterone. **Gerontology**, v. 53, n. 4, p. 234-237, 2007.

XILOURI, M.; PAPAZAFIRI, P. Anti-apoptotic effects of allopregnanolone on P19 neurons. **Eur J Neurosci**, v. 23, n. 1, p. 43-54, 2006.

YAMADA, Y. *et al.* Changes in serum sex hormone profiles after short-term low-dose administration of dehydroepiandrosterone (DHEA) to young and elderly persons. **Endocr J**, v. 54, n. 1, p. 153-162, 2007.

YAMASHITA, R. *et al.* Effects of dehydroepiandrosterone on gluconeogenic enzymes and glucose uptake in human hepatoma cell line, HepG2. **Endocr J**, v. 52, n. 6, p. 727-733, 2005.

YOREK, M. A. *et al.* Effect of treatment of diabetic rats with dehydroepiandrosterone on vascular and neural function. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, n. 5, p. E1067-1075, 2002.

ZHU, H. *et al.* Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. **FEBS Lett**, v. 579, n. 14, p. 3029-3036, 2005.

ZIYADEH, F. N. *et al.* Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 14, p. 8015-8020, 2000.