JOÃO PAULO GABRIEL CAMPOREZ

**Efeito *in vitro* do Deidroepiandrosterona (DHEA) sobre
a via IRS/PI3-K/Akt e Secreção de Insulina em Ilhotas
Pancreáticas de Ratos**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências (Fisiologia Humana).**

São Paulo

2008

JOÃO PAULO GABRIEL CAMPOREZ

**Efeito *in vitro* do Deidroepiandrosterona (DHEA) sobre
a via IRS/PI3-K/Akt e Secreção de Insulina em Ilhotas
Pancréáticas de Ratos**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências (Fisiologia Humana).**

Área de concentração: Fisiologia Humana

**Orientador:
Carla Roberta de Oliveira Carvalho**

São Paulo

2008

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, minha esposa, meu irmão e minha madrinha, as pessoas que mais amo, por sempre me apoiarem nessa caminhada. Também dedico aos meus avós Ezelino Camporez (*in memorian*), Maria Fim Camporez, Alfredo Gabriel (*in memorian*) e Deocacina de Araújo Gabriel (*in memorian*), exemplos de vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família primeiramente, pelo amor, carinho e apoio durante todo o tempo.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Carla Roberta de Oliveira Carvalho, pelos conselhos, apoio e paciência nessa caminhada.

Aos amigos do laboratório, Anderson, Teca, Mário, Ricardo, Eliana, Mônica e Bruno, pela amizade e profissionalismo, que permitiu a realização desse trabalho.

A todos do laboratório da Prof^a. Silvana e Prof. Ângelo, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

A todos os professores do departamento de Fisiologia e Biofísica, que de certa forma participaram e contribuíram na minha formação acadêmica.

Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.

“As convicções são inimigas mais
perigosas da verdade do que as mentiras.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

CAMPOREZ, J. P. G. **Efeito *in vitro* do Deidroepiandrosterona (DHEA) sobre a via IRS/PI3-K/Akt e Secreção de Insulina em Ilhotas Pancreáticas de Ratos.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A administração de deidroepiandrosterona (DHEA) tem resultado em redução do acúmulo de gordura visceral e proteção contra a resistência à insulina em animais de experimentação e no homem. O DHEA ainda apresenta outros efeitos como: 1) melhora da secreção de insulina em ilhotas pancreáticas de camundongos db/db e ratos envelhecidos; 2) inibição da apoptose em precursores neurais através da ativação da via da PI3-K/Akt. Tanto a insulina quanto o IGF-1 têm efeitos na manutenção da integridade das ilhotas pancreáticas e uma das vias intracelulares mais importantes destes dois hormônios é a PI3-K/Akt. Assim, **o objetivo do presente projeto é avaliar o efeito do DHEA *in vitro* (1) na expressão protéica do receptor de insulina e receptor de IGF-1, das proteínas IRS-1, IRS-2, PI3-K, Akt, ERK-1/2; (2) na expressão gênica dos fatores de transcrição PDX-1 e PGC-1, da insulina, do transportador de glicose GLUT-2 e da glicocinase; e (3) avaliar a secreção estática de insulina, frente ao estímulo de glicose, de ilhotas pancreáticas de ratos em cultivo.** A presença de 3 concentrações distintas de DHEA (100 pM, 100 nM e 100 µM) no cultivo das ilhotas pancreáticas por 24 horas, não induziu nenhuma alteração tanto na expressão das proteínas IR, IRS-1, IRS-2, PI3-K, Akt-1 e ERK-1/2 quanto na secreção estática de insulina estimulada por glicose. No entanto, ocorreu aumento da fosforilação de ERK-1/2 e na expressão gênica do PGC-1. As células RINm5F, cultivadas por 72 horas com DHEA na concentração de 100 µM, apresentaram aumento da expressão total de IRS-1 e IRS-2. Não ocorreu alteração na expressão gênica da insulina, PDX-1, PGC-1 e GLUT-2 nessas células. Podemos concluir, com os dados obtidos, que 24 horas de cultura com ilhotas pancreáticas não é tempo suficiente para observar alguma alteração induzida pelo DHEA, na secreção de insulina dessas ilhotas, e na expressão das proteínas envolvidas na sinalização da insulina e do IGF-1. No entanto, foi possível observar aumento na expressão do gene do PGC-1 e aumento na fosforilação de ERK-1/2. Células RINm5F podem ser um modelo alternativo para investigar os efeitos diretos do DHEA, num tempo prolongado de cultura.

Palavras-chave: deidroepiandrosterona, secreção de insulina, sinalização da insulina e ilhotas pancreáticas.

ABSTRACT

CAMPOREZ, J. P. G. **Effect in vitro of Dehydroepiandrosterone (DHEA) on IRS/PI3-K/Akt pathway and Insulin Secretion on Rats Pancreatic Islets.** Dissertation (Master in Sciences) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2008.

The dehydroepiandrosterone (DHEA) administration has resulted in reduction of abdominal fat and protection against insulin resistance from experimental animals and humans. DHEA shows other effects as: 1) enhanced insulin secretion from mice and aging rat pancreatic islets; 2) apoptosis inhibition in neural precursor through PI3-K/Akt pathway activation. Insulin and IGF-1 have effects on maintenance of pancreatic islets integrity, and one more important pathway of these hormones is the PI3-K/Akt. So, the purpose of this project is measure the *in vitro* effects from DHEA (1) on protein expression of insulin receptor, the proteins IRS-1, IRS-2, PI 3-K, Akt, and ERK-1/2; (2) on gene expression of transcriptional factors PDX-1 and PGC-1, insulin, glucose transport GLUT-2 and glycolysis; (3) to measure the static insulin secretion, front glucose stimulus, on cultured pancreatic islets of the rat. In the presence of 3 different concentration of the DHEA (100 pM, 100 nM and 100 μ M) in cultured pancreatic islet for 24 hours, did not induce nothing alteration on protein expression of the IR, IRS-1, IRS-2, PI3-K, Akt-1 and ERK-1/2, and on static insulin secretion induced by glucose. However, happened increase ERK-1/2 phosphorylation and PGC-1 gene expression. The RINm5F cells, cultured by 72 hours with DHEA on 100 μ M concentration, showed increase of the IRS-1 and IRS-2 expression. Did not happened alteration on gene expression of the insulin, PDX-1, PGC-1 and GLUT-2 in this cells. We conclude, with the results, that 24 hours of the pancreatic islets culture are not sufficient time to look any alteration induced by DHEA, on insulin secretion, and on protein expression involved on insulin and IGF-1 signalization. However, was possible to look increase on PGC-1 gene expression and ERK-1/2 phosphorylation. RINm5F cells can be an alternative model to research the direct effects from DHEA, on prolonged time of the culture.

Key words: dehydroepiandrosterone, insulin secretion, insulin signaling and pancreatic islets.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP:	Adenosina difosfato
AGL:	Ácidos graxos livres
Akt:	<i>Agammaglobulinaemia tyrosine kinase</i>
ATP:	Adenosina trifosfato
DHEA:	Deidroepiandrosterona
DHEA-S:	Deidroepiandrosterona sulfatado
DM1:	Diabetes melito tipo 1
DM2:	Diabetes melito tipo 2
ERK-1/2:	Extracellular signal-regulated kinase
GLUT-2:	Transportador de glicose 2
Grb2:	<i>Growth factor receptor binding protein</i>
IFN γ :	Interferon γ
IGF-1R:	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1 β :	Interleucina 1 β
IL-6:	Interleucina 6
IMC:	Índice de massa corporal
IR:	Receptor de insulina
IRS-1:	Substrato do receptor de insulina 1
IRS-2:	Substrato do receptor de insulina 2
IRS-3:	Substrato do receptor de insulina 3
IRS-4:	Substrato do receptor de insulina 4
IRS-5:	Substrato do receptor de insulina 5
IRS-6:	Substrato do receptor de insulina 6

HNF:	<i>Hepatic nuclear factor</i>
NO:	Óxido nítrico
P85:	Subunidade regulatória da PI 3-K
PDK:	Proteína cinase dependente de fosfolípídeo
PDX-1:	<i>Pancreatic duodenal homeobox-1</i>
PGC-1:	Coativador do receptor nuclear PPAR γ
PI 3-K:	Fosfatidilinositol 3 cinase
PPAR γ :	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
RT-PCR:	Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase
SFB:	Soro fetal bovino
SH2:	<i>Src homology</i>
SHP-2:	<i>Src homology 2 phosphotyrosyl phosphatase</i>
UCP-2:	Proteína desacopladora mitocondrial 2

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - As vias de sinalização da insulina.

Figura 2 - Esquema representativo de uma célula B pancreática ilustrando os mecanismos relacionados à secreção de insulina.

Figura 3 - Expressão protéica de IR e IRS-1 em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 4 - Expressão protéica de IRS-2 e PI 3-K em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 5 - Expressão protéica de Akt-1 e ERK-1/2 em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 6 - Expressão protéica de IR, PI 3-K, Akt-1 e ERK-1/2 em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA-S.

Figura 7 - Grau de fosforilação das bandas pp95 e pp185, e fosforilação das proteínas Akt e ERK-1/2 em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 8 - Expressão do gene da insulina e do PDX-1 pela técnica de PCR em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 9 - Expressão do gene da glicocinase e do GLUT-2 pela técnica de PCR em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 10 - Expressão do gene do PGC-1 pela técnica de PCR em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 11 - Fragmentação do DNA de ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 12 - Secreção estática de insulina estimulada por glicose em ilhotas cultivadas por 24 horas com ou sem DHEA.

Figura 13 - Secreção estática de insulina estimulada por glicose em ilhotas cultivadas por 24 horas com ou sem DHEA-S.

Figura 14 - Expressão protéica de IR e IRS-1 em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 15 - Expressão protéica de IRS-2 e PI 3-K em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 16 - Expressão protéica de Akt-1 e ERK-1/2 em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 17 - Expressão protéica de IGF-1R e GLUT-2 em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 18 - Expressão protéica de PDX-1 e PGC-1 em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 19 - Grau de fosforilacao das bandas pp95 e pp185 em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 20 - Grau de fosforilacao das proteínas Akt e ERK-1/2 em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 21 - Expressão do gene do PGC-1 e GLUT-2 pela técnica de PCR em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA.

Figura 22 - Expressão do gene da insulina e do PDX-1 pela técnica de PCR em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA.

Anexo 1 - Secreção estática de insulina estimulada por glicose em ilhotas cultivadas por 24 horas com ou sem DHEA. Soro Fetal Bovino tratado com carvão ativado conforme descrito em Material e Métodos.

Anexo 2 - Secreção estática de insulina estimulada por glicose em ilhotas cultivadas por 72 horas com ou sem DHEA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fenótipos do pâncreas endócrino de animais *knockout* para fatores de transcrição (p. 22).

Tabela 2 - Seqüência dos *Primers* e condições das reações de amplificação (p. 34).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Diabetes.....	18
1.2 Sinalização da Insulina.....	19
1.3 Ilhotas Pancreáticas.....	21
1.4 Secreção de Insulina e Função da Célula B.....	23
1.5 Deidroepiandrosterona.....	26
2 OBJETIVO.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Animais.....	29
3.2 Material.....	29
3.3 Cultura de ilhotas pancreáticas de ratos.....	29
3.4 Linhagem celular.....	30
3.5 Extração das proteínas totais das ilhotas pancreáticas e das células RINm5F.....	30
3.6 Análise protéica por <i>Immunoblotting</i>.....	31
3.7 Secreção de insulina.....	31
3.8 Dosagem de insulina.....	32
3.9 Extração de ácido ribonucleico (RNA) total.....	32
3.10 Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	33
3.11 Avaliação da Fragmentação de DNA por Citometria de Fluxo.....	34

3.12 Análise estatística.....	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Cultivo de ilhotas por 24 horas.....	35
4.2 Cultivo de células RINm5F por 72 horas.....	45
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXOS.....	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes

As principais formas de diabetes mellitus são duas: tipo 1 e tipo 2. Diabetes tipo 1 (DM1) é causado primariamente devido à destruição auto-imune das células B das ilhotas pancreáticas, resultando em falta de insulina, que pode ser parcial ou total. Pacientes com essa doença necessitam de insulina exógena para prevenir a acidose decorrente da formação de corpos cetônicos e sobreviverem. Diabetes do tipo 2 (DM2) é resultante da resistência periférica à ação da insulina e uma deficiência em sua secreção. Indivíduos com esse tipo de diabetes não necessitam, na maioria das vezes, de insulina exógena, sendo possível o controle da doença com dieta e exercício físico. Esse tipo de diabetes corresponde a mais de 90% de todos os casos diagnosticados (Zimmet, Alberti, Shaw, 2001; Hamdy et al., 2003).

Diabetes mellitus é tido hoje como uma das principais ameaças à saúde humana no século 21. Nas últimas duas décadas ocorreu um explosivo aumento no número de pessoas diagnosticadas em todo mundo. Enormes mudanças no ambiente, comportamento e estilo de vida dos seres humanos, que acompanham a globalização, têm resultado em obesidade e diabetes. No ano de 2000 existiam cerca de 151 milhões de pessoas diagnosticadas com diabetes em todo mundo, e a previsão é que até 2010 esse número aumente cerca de 46% (Zimmet, Alberti, Shaw, 2001). Com base nos dados da Organização Mundial de Saúde e das Nações Unidas, o número de pessoas com DM2 pode chegar a 366 milhões até o ano de 2030 (Wild et al., 2004). Hoje, nos países ocidentais, DM2 é a mais comum desordem endócrina, afetando de 5% a 8% da população (Dunstan et al., 2002). No Brasil, na década de 80, a prevalência de diabetes na população entre 30 a 69 anos de idade já alcançava 7,6% em 9 capitais do país, e em São Paulo a prevalência chegava a 9,7% (Malerbi, Franco, 1992).

Embora detalhes dos mecanismos da gênese do DM2 não sejam conhecidos, a associação com a obesidade é alta. Assim, o mais importante fator de risco para o desenvolvimento de DM2 é a obesidade. Dados da literatura mostram que indivíduos com índice de massa corporal (IMC) 31 tem o risco de desenvolver DM2 aumentado em 40 vezes, enquanto o IMC acima de 35 aumenta em 90 vezes esse risco, comparados com o IMC de 22 (Colditz et al., 1995). Além disso, a maioria dos indivíduos com DM2 possuem excesso de peso e cerca de 50% a 80% são obesos (Boden, 1997; Leibson et al., 2001).

Entretanto, a obesidade não é a única causa de DM2. Visto que não existe definido um fator etiológico único que cause DM2. Além da obesidade, outros fatores de risco são o envelhecimento, etnia e histórico familiar (Colditz et al., 1995; Permutt, Wasson, Cox, 2005).

1.2 Sinalização da Insulina

Desde a descoberta da insulina em 1921, muito esforço tem sido dedicado ao entendimento do mecanismo molecular de ação desse hormônio. A importância do estudo da ação da insulina é dada pela prevalência da resistência à insulina e sua associação na patogênese de diversas doenças, incluindo obesidade, diabetes mellitus, hipertensão e da intolerância à glicose associada a diversas enfermidades endócrinas.

O receptor de insulina (IR) é expresso na maioria dos tecidos de mamíferos, havendo maior concentração no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético. O IR é uma glicoproteína heterotetramérica composto por duas subunidades α , cada uma com 135 kDa, e duas subunidades β , cada uma com 95 kDa (Kahn, 1985). A subunidade α é totalmente extracelular, possuindo o sítio de ligação da insulina, enquanto a subunidade β é uma proteína transmembrana com atividade tirosina cinase (Kasuga et al., 1982). Esse receptor age como uma enzima alostérica, em que a subunidade α inibe a atividade tirosina cinase da subunidade β . A insulina, ao se ligar à subunidade α de seu receptor, inibe a sua ação, permitindo a atividade da subunidade β , que possui a capacidade de se autofosforilar e fosforilar outros substratos em resíduos de tirosina, desencadeando a ação biológica da insulina, como pode ser observado na figura 1 (Saltiel, Kahn, 2001).

Até hoje foram descritas várias proteínas a jusante ao receptor de insulina, como os pertencentes à família dos substratos do receptor de insulina (IRS), Gab-1, p60^{dok}, Cbl, APS e isoformas do Shc (Pessin, Saltiel, 2000; Saltiel, Kahn, 2001). Esses substratos são rapidamente fosforilados em tirosina, após a ligação da insulina ao seu receptor. A fosforilação de IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2), tais como a subunidade regulatória p85 da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-K) e fosfatase fosfotirosina (SHP2) (Cheatham, Kahn, 1995; Saltiel, Kahn, 2001). Após a ativação do receptor de insulina, também ocorre o recrutamento da proteína ligante do receptor do fator de crescimento 2 (Grb2), levando à ativação da cinase regulada por sinais extracelulares (ERK), via relacionada com o crescimento, diferenciação e proliferação celular (Saltiel, Kahn, 2001; Saltiel, Pessin, 2002).

Figura 1: As vias de sinalização da insulina. O receptor de insulina é uma tirosina cinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização através de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI 3-K, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário. Saltiel AR, Kahn CR / Nature. 2001;414:799-806.

Seis membros da família dos IRS foram descritos até o momento (White, 1998, Cai et al., 2003), sendo os IRS-1 e 2 os mais extensamente estudados. Esses substratos são assim denominados pela ordem cronológica de identificação. O IRS-1 foi clonado em 1991 (Sun et al., 1991). O IRS-2 foi identificado e clonado em 1995 (Sun, Wang, Zhang, 1995), e apresenta a maior homologia, tanto estrutural quanto na distribuição tecidual, ao IRS-1. O IRS-3 é o menor constituinte da família dos IRS, com 60 kDa. Foi clonado em 1997 e está expresso principalmente no tecido adiposo (Lavan, Lienhard, 1993; Lavan, Lane, Lienhard, 1997). O IRS-4 foi inicialmente identificado em linhagem celular de rim embrionário (Fantin et al., 1998). IRS-5 e IRS-6 foram identificados mais recentemente (Cai et al., 2003; Favre et al., 2003).

O IRS-1 e IRS-2 parecem estar envolvidos principalmente no controle do metabolismo. Suas funções fisiológicas foram estabelecidas com a produção de camundongos sem os genes que codificam o IRS-1 e o IRS-2. Camundongos que não expressam o IRS-1 (*knockout* para o IRS-1) apresentaram retardo no crescimento e intolerância a glicose, mas não apresentaram hiperglicemia (Araki et al., 1994). Os camundongos *knockout* para o IRS-2

apresentaram um fenótipo diferente dos camundongos *knockout* para o IRS-1. Eles exibiram deficiência na secreção de insulina, resistência ao hormônio e desenvolveram diabetes (Withers et al., 1998). Camundongos *knockout* para IRS-3 não exibiram alterações no crescimento e metabolismo da glicose (Liu et al., 1999) e camundongos *knockout* para o IRS-4 exibiram leve redução do peso, glicemia levemente reduzida, insulina plasmática normal e redução da fertilidade em camundongos fêmea (Fantin et al., 2000). No entanto, ainda não está claro o papel fisiológico dos IRS-3 e IRS-4. Inicialmente foi demonstrado que os IRS-5 e IRS-6 podem mediar diferenciação neuronal (Grimm et al., 2001), mas ainda não existem pesquisas suficientes para determinar o papel fisiológico destas duas proteínas.

Outra proteína que pode ser ativada pela ação da insulina é a Akt, que é fosforilada em resposta ao estímulo com esse hormônio. Isso ocorre com a fosforilação do IRS-1 e IRS-2, ativando a PI3-K. Após ativação dessa enzima há aumento dos fosfo-fosfatidilinositois intracelulares, ativando proteínas cinases dependentes dos fosfo-fosfatidilinositois (PDK). A PDK ativada recruta e fosforila a Akt. Essa proteína medeia alguns efeitos biológicos da insulina como captação de glicose, síntese de glicogênio, síntese protéica e inibição de apoptose (Alessi, Downes, 1998; Vanhaesebroeck, Alessi, 2000; Saltiel, Kahn, 2001).

Essa via de sinalização que pode ser ativada pela insulina, IR/IRS/PI3-K/Akt, está reduzida em modelos de resistência como o DM2 (Song et al., 1999) e o envelhecimento (Carvalho et al. 1996).

1.3 Ilhotas Pancreáticas

O pâncreas é constituído por 3 tipos celulares principais. Os ácinos do tecido exócrino, que produzem enzimas digestivas; as células endócrinas, que produzem hormônios responsáveis pela homeostase dos nutrientes, como a insulina e o glucagon; e as células do ducto pancreático (Slack, 1995). A parte endócrina do pâncreas é constituída pelas ilhotas pancreáticas, que também são denominadas de ilhotas de Langerhans, nome do anatomista alemão (Paul Langerhans) que descobriu essa estrutura, e nomeou-a de ilhotas devido à aparência semelhante a ilhas (Kulkarni, 2004). Estima-se que no homem adulto há aproximadamente 2 milhões de ilhotas, que representa cerca de 2% do peso total do pâncreas. Em roedores, as ilhotas têm um diâmetro que varia de 40µm a 400µm, possuem uma estrutura geralmente oval e são constituídas por 2000 a 4000 células. Esse conjunto de células é composto por 4 tipos diferentes (A, B, D e PP). Essas células são distribuídas de maneira similar na maioria dos mamíferos, caracterizando-se por um centro formado com a maior

parte de células B, que é circundado pelos outros tipos de células (Kulkarni, 2000). Essas células secretam 4 hormônios diferentes. As células A secretam glucagon, as células B secretam insulina, as células D secretam somatostatina e as células PP secretam polipeptídeo pancreático (Greenspan, Gardner, 2006). Setenta a oitenta por cento das células das ilhotas são células B, 15-20% são células A ou células PP e cerca de 5% são células D. Dependendo da localização da ilhota no pâncreas há diferença na distribuição das células A e PP. A porção esplênica do pâncreas, cuja origem embriológica é o botão pancreático dorsal, apresenta predomínio das células PP e corresponde às regiões do corpo e cauda no homem (Bonner-Weir, 2000). Por outro lado, na cabeça do pâncreas, formada a partir do botão pancreático ventral, há predomínio das células A em relação às células PP (Orci, 1985).

A diferenciação do pâncreas e da sua parte endócrina inicia-se no período embrionário, e é um processo complexo que está sob o controle de vários fatores de transcrição como a família dos HNFs, Ngn3, NeuroD, Pax4, Pax6, Isl-1, Nkx2.2, Nkx6.1, Hlxb9 e PDX-1 (*Pancreatic duodenal homeobox-1*), como pode ser observado na Tabela 1 (Melloul, 2004; Habener, Kemp, Thomas, 2005).

Tabela 1 – Fenótipos do pâncreas endócrino de animais *knockout* para fatores de transcrição

Fator de Transcrição	Expressão na Ilhota Adulta	Fenótipo em animais <i>Knockout</i>
HNF-1 α	Todas as células	Diabetes / Disfunção renal e hepática
HNF-3 β /Foxa2	Todas as células	Sem formação endodérmica do intestino
Ngn3	Apenas nos precursores endócrinos	Ausência das células endócrinas
NeuroD	Todas as células	Redução das células endócrinas
Pax4	Apenas no pâncreas em desenvolvimento	Ausência das células B e D
Pax6	Todas as células	Ausência das células A
Isl-1	Todas as células	Ausência das células das ilhotas
Nkx2.2	Células A, B e PP	Ausência de células insulino-positivas
Nkx6.1	Células B	Redução de células insulino-positivas
Hlxb9/Hb9	Células B	Agenesia do lobo dorsal do pâncreas
PDX-1	Células B e D	Agenesia pancreática

O mais importante fator de transcrição relacionado com a diferenciação e função da célula B das ilhotas pancreáticas, com implicação na etiologia e tratamento dos diabetes tipo 1 e 2 é o PDX-1. O PDX-1 foi identificado simultaneamente por diferentes laboratórios e por esse motivo aparece na literatura com diferentes nomes, entre eles: Ip1 (Ohlsson, Karlsson, Edlund, 1993), Stf (Leonard et al., 1993) e Id1 (Miller, McGehee, Habener, 1994). Esse fator de transcrição é expresso nas células B e D das ilhotas pancreáticas, em células endócrinas dispersas no duodeno e no cérebro em desenvolvimento (Karlsson et al., 1989). Animais que não expressam o PDX-1 (*knockout* para o PDX-1) apresentaram agenesia pancreática e malformações no duodeno, seguida de morte logo após o nascimento (Jonsson et al., 1994; Offield et al., 1996). Além disso, a alteração específica do gene do PDX-1, por técnicas de RIP-Cre em ratos adultos, induziu redução da massa das células B e o aparecimento de diabetes mellitus (Ahlgren et al., 1998).

1.4 Secreção de Insulina e Função da Célula B

A célula B pancreática possui as funções de sintetizar, armazenar e secretar insulina de acordo com a demanda necessária para o controle da homeostase glicêmica (Berne et al., 2004). A função da célula B está diretamente relacionada com o seu metabolismo, já que a secreção de insulina é estimulada por sinais intracelulares provenientes do metabolismo de diversos nutrientes, sendo o mais importante deles a glicose (Deeney, Prentki, Corkey, 2000). Porém, os efeitos dos nutrientes sobre as células B são diferentes, dependendo se a exposição é aguda ou crônica. Concentração elevada de glicose e ácidos graxos livres (AGL) estimula a secreção de insulina agudamente, enquanto a exposição crônica, como no caso de DM2, pode levar a efeitos deletérios descritos como glicotoxicidade e lipotoxicidade (Gremlich et al., 1997; Harmon et al., 1999).

A secreção de insulina pelas células B estimulada por glicose é única, pois os sinais que estimulam sua secreção são provenientes do metabolismo intracelular da glicose, ao invés de estímulos gerados a partir da interação hormônio-receptor (Malaisse et al., 1979; Meglasson, Matschinsky, 1986) como é observado na maioria dos hormônios. A glicose entra na célula B pelo transportador de glicose 2 (GLUT-2), que possui alta capacidade para o transporte desse nutriente. Em seguida, a glicose é fosforilada pela glicocinase, a primeira enzima da via glicolítica, que funciona como um sensor de glicose (Deeney, Prentki, Corkey, 2000). Uma característica muito importante da glicocinase é sua baixa afinidade pela glicose (enzima com alto K_m) e sua dependência sigmoidal à glicose, o que garante ótima

responsividade em concentrações fisiológicas de glicose. A glicocinase é a enzima limitante para o uso da glicose pelas células B (Matshinsky, 1996), governa tão eficientemente a taxa de glicose que alterações no seu conteúdo celular tem efeito diretamente proporcional na via glicolítica (Matshinsky, Collins, 1997). A inativação específica do gene da glicoquinase promove diminuição da sensibilidade da célula B à glicose e desequilibra a secreção de insulina *in vivo* (Efrat, Tal, Lodish, 1994; Aizawa et al., 1996).

O ATP produzido a partir do metabolismo da glicose e o conseqüente aumento na razão ATP/ADP levam a oscilações no potencial de membrana nas células B, através do fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP. O resultado dessas oscilações no potencial de membrana é a abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem, o que leva a aumento na concentração de cálcio citoplasmático. Esse processo estimula a exocitose dos grânulos de insulina e sua secreção (Figura 2) (Larsson et al., 1996; Deeney, Prentki, Corkey, 2000). A mitocôndria possui papel importante nesse processo, pois 95 % do ATP produzido na célula B é proveniente dessa organela (Erecinska et al., 1992). Assim, proteínas que regulam o funcionamento e gênese da mitocôndria estão relacionadas à secreção de insulina. Uma dessas proteínas pode ser a PGC-1, que foi originalmente identificado como um coativador do receptor nuclear PPAR γ (Puigserver et al., 1998). O padrão de expressão da PGC-1 e o seu aumento pela exposição ao frio têm sugerido um papel na regulação do metabolismo e adaptações termogênicas (Puigserver et al., 1998; Knutti, Kralli, 2001). Foi demonstrado que o aumento da expressão da PGC-1 em mioblastos induz a biogênese mitocondrial (Wu et al., 1999). No entanto, um aumento da PGC-1 em ilhotas pancreáticas, induzida pelo frio, leva à redução da secreção de insulina estimulada por glicose, pois ocorre aumento da expressão de uma proteína desacopladora mitocondrial (UCP-2), o que reduz a produção de ATP e aumenta a produção de calor (De Souza et al., 2003).

Figura 2: Esquema representativo de uma célula B pancreática ilustrando os mecanismos relacionados à secreção de insulina. Interação entre vias da glicose e de sinalização da insulina/IGF-1. As setas na cor azul indicam as vias que estão potencialmente envolvidas na sinalização da insulina/IGF-1. A insulina pode exercer seus efeitos sobre a célula B tanto por um efeito endócrino e/ou um efeito parácrino/autócrino mediado pela própria secreção de insulina. Kulkarni / Int J Biochem Cell Biol. 2004;36:365-371.

A célula B também possui receptores e proteínas envolvidas na via da sinalização intracelular da insulina (Harbeck et al., 1996). O papel da insulina em regular sua própria secreção, de forma parácrina ou autócrina, tem sido tópico de debates. Enquanto alguns estudos mostram que a insulina exerce um feedback negativo em sua própria secreção (Iversen, Miles, 1971; Loreti et al., 1974; Elahi et al., 1982), outros estudos falham em suportar essa hipótese (Malaisse et al., 1967; Marincola et al., 1983; Stagner et al., 1986). Camundongos que não expressam o IR nas células B nascem com a glicemia e a insulinemia normais. No entanto, com cerca de 8 semanas de idade, esses camundongos apresentam redução seletiva da secreção de insulina estimulada por glicose na 1ª fase (Kulkarni et al., 1999), o que pode ser devido a uma expressão alterada da glicocinase (Leibiger et al., 2001). Conseqüentemente, esses camundongos desenvolvem progressiva intolerância a glicose, apresentando redução do tamanho das ilhotas pancreáticas e da massa das células B (Kulkarni et al., 1999), fenótipo característico de humanos com DM2 comparados com indivíduos não diabéticos com o mesmo peso corporal (DeFronzo, Barzilai, Simonson, 1997). Das 6 proteínas que pertencem à família dos IRSs, as 4 primeiras descritas (IRS-1/2/3/4) são expressas nas ilhotas pancreáticas (Kulkarni, 2002). Ilhotas provenientes de camundongos

knockout para o IRS-1 apresentam redução da secreção de insulina estimulada por glicose e arginina, além de apresentarem redução do conteúdo total de insulina (Kulkarni et al., 1999; Kubota et al., 2000). Além disso, ilhotas isoladas de humanos que possuem polimorfismo no gene do IRS-1, apresentam redução da secreção de insulina e aumento da apoptose celular (Porzio et al., 1999; Federeci et al., 2001). No entanto, o bloqueio do IRS-1 em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos aumenta a secreção de insulina estimulada por glicose (Araújo et al., 2002). Os camundongos com deleção do IRS-2 apresentam redução da secreção de insulina, falha no crescimento adequado das ilhotas e desenvolvem um fenótipo de DM2 (Withers et al., 1998). O IRS-2 também é necessário para a hiperplasia compensatória das células B pancreáticas, em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e que desenvolvem resistência à insulina (Terauchi et al., 2007). O papel dos IRS-3 e IRS-4 no pâncreas endócrino ainda não foi totalmente investigado (Kulkarni, 2002).

A via da PI3-K/Akt também pode ser ativada pela insulina, principalmente pela associação das proteínas IRS com a subunidade regulatória p85 da PI3-K (Saltiel, Kahn, 2001). A ativação dessa via está associada à sobrevivência celular (Kulik, Klippel, Weber, 1997). Em ilhotas pancreáticas isoladas de cachorros, a ativação da PI3-K/Akt protegeu-as contra a morte celular mediada por citocinas (Aikin, Rosenberg, Maysinger, 2000). Também é reconhecido que a ativação da via IRS-2/PI3-K/Akt é necessária para o controle da massa das células B em relação a homeostase metabólica (Lingohr, Buettner, Rhodes, 2002). O aumento da expressão de Akt-1 nas células B de camundongos alterou o tamanho e função destas células, ocorrendo aumento do tamanho das células B e massa das ilhotas, melhorando a tolerância à glicose e tornando os camundongos resistentes ao diabetes experimental (Tuttle et al., 2001).

1.5 Deidroepiandrosterona

O córtex adrenal humano produz aldosterona, cortisol e andrógenos como o deidroepiandrosterona (DHEA) e sua forma sulfatada (DHEA-S). DHEA origina-se de um precursor universal na síntese de todos os hormônios esteróides, o colesterol. A síntese desse hormônio é baixa ou quase nula nos mamíferos, exceto nos primatas (Cutler et al., 1978). Em humanos, a produção de DHEA e DHEA-S está elevada durante o desenvolvimento fetal, decrescendo rapidamente após o nascimento, para permanecer em níveis muito baixos nos primeiros cinco anos de vida. Próximo à segunda década da vida os níveis desse hormônio aumentam e chegam a seus valores máximos, apresentando diferenças entre os sexos, com concentrações sanguíneas maiores nos homens (Migeon et al., 1957; Greenspan, Gardner,

2006). A partir da quarta década da vida, os níveis de DHEA começam a declinar novamente, chegando a concentrações mínimas por volta dos 80 anos de idade (Bélanger et al., 1994).

Esse declínio do DHEA e DHEA-S plasmáticos com a idade tem sido relacionado ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas associadas ao envelhecimento, como a resistência à insulina (Schriock et al., 1988), obesidade (Nestler et al., 1988; Macewen, Kurzman, 1991), doenças cardiovasculares (Barrett-Connor, Khaw, Yen, 1986), câncer (Schwartz, Pashko, Whitcomb, 1986), redução da defesa imune (Casson et al., 1993), depressão e redução da sensação de bem estar (Morales et al., 1994). Assim, inúmeros estudos têm focado nos efeitos do DHEA sobre a resistência à insulina, obesidade e doenças cardiovasculares.

Obesidade abdominal está associada ao crescente risco de desenvolver resistência à insulina, DM2 e aterosclerose, uma associação descrita como síndrome metabólica ou síndrome da resistência à insulina (Shimokata et al., 1989; Cefalu et al., 1995; Ferrannini et al., 1997; Kopelman, 2000). Entre vários fatores, mudanças hormonais, particularmente a decrescente secreção de DHEA, é considerada um fator envolvido (Tchernof et al., 1995). Dois estudos realizados em humanos resultaram em redução da resistência à ação da insulina, acompanhada de redução da gordura subcutânea abdominal em mulheres que receberam creme contendo DHEA por 12 meses (Diamond et al., 1996) e a administração diária de 50 mg de DHEA por 6 meses a homens com idade entre 65-78 anos reduziu a gordura subcutânea e visceral abdominal, além de aumentar a resposta de secreção de insulina frente a sobrecarga de glicose e melhora da sensibilidade à insulina (Villareal, Holloszy, 2004).

Em modelos animais (ratos e camundongos), a administração de DHEA reduz o acúmulo de gordura visceral induzida por dieta hiperlipídica (Yen et al., 1977; Cleary, Zisk, 1986; Mohan et al., 1990; Hansen et al., 1997). Outro efeito benéfico do DHEA observado é a redução da resistência à insulina que aparece com o envelhecimento (Han et al., 1998) e a melhora da sinalização da insulina em tecido muscular e hepático (Campbell et al., 2004). Ademais, a alimentação suplementada com DHEA-S induziu preservação da estrutura das ilhotas pancreáticas e função das células B em camundongos diabéticos db/db (Coleman, Leiter, Schwizer, 1982). Ainda, em ratos envelhecidos a administração de dose única de DHEA aumenta a área de células B, a secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas e a expressão da proteína Akt-1 (Medina et al., 2006). No entanto, não é completamente conhecido o mecanismo celular pelo qual o DHEA parece melhorar tanto a estrutura quanto a função das células B pancreáticas.

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito do DHEA *in vitro* em ilhotas pancreáticas cultivadas de ratos e em células de linhagem de insulinoma de ratos RINm5F (1) na expressão e fosforilação do IR e receptor de IGF-1 (IGF-1R), IRS-1, IRS-2, PI3-K, Akt, ERK-1 e ERK-2; (2) avaliar a expressão gênica dos fatores de transcrição PDX-1 e PGC-1, da insulina, do transportador de glicose GLUT-2 e da glicocinase; e (3) na secreção estática de insulina das ilhotas, frente ao estímulo de glicose.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar com 2 a 3 meses de idade fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). Os ratos foram alimentados com ração Nuvital (Nuvelab, Colombo, PR) e água *ad libitum* e permaneceram em sala com ciclo claro-escuro de 12-12 h e temperatura de 23±2°C. A Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP aprovou os procedimentos utilizados (certificado 051/05/CEEA).

3.2 Material

Os reagentes e os aparelhos para eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram da *Bio-Rad* (Richmond, CA, USA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina, ditioneitol (DTT), DHEA, DHEA-S, albumina, colagenase tipo V e poli-lisina foram fornecidos pela *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO, USA) e insulina regular pela Lilly (Brasil). A insulina marcada ($^{125}\text{I}^*$), a membrana de nitrocelulose, e os kits para detecção por quimioluminescência foram fornecidos pela *Amersham* (UK). D-glicose anidra e PEG (polietileno glicol + tampão borato) foram fornecidos pelo *Labsynth* (São Paulo, SP, Brasil). Os anticorpos anti-fosfotirosina, anti-receptor de insulina, anti-receptor de IGF-1, anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-pAkt^{ser473}, anti-PGC-1 foram da *Santa Cruz Biotechnology* (Santa Cruz, CA, USA), anti-GLUT-2 foi da *AbD Serotec* (USA), anti-p85 (PI3-K), anti-Akt-1, anti-PDX-1, anti-MAPK42/44 (anti-ERK-1/2) e anti-pMAPK42/44 (anti-pERK-1/2) foram da *Upstate* (USA).

3.3 Cultura de ilhotas pancreáticas de ratos

Os animais foram sacrificados por decapitação. Após a laparotomia e exposição do ducto biliar comum, esse foi clampeado na sua extremidade distal, junto ao duodeno, e dissecado próximo ao pedículo hepático, por onde foi introduzida uma cânula de polietileno e injetada retrogradamente cerca de 20 ml de solução de Hanks contendo colagenase tipo V (50 ml de Hanks/34 mg de colagenase). Após divulsão do tecido acinar, o pâncreas foi retirado e colocado em uma placa de Petri para dissecação de gânglios linfáticos, gorduras e vasos sanguíneos. O tecido foi colocado em tubo cônico tipo Falcon® em banho maria a 37 °C durante 25 minutos, seguido de agitação manual no mesmo banho-maria por mais 1 minuto, para a digestão da parte exócrina do pâncreas. Posteriormente foram feitas sucessivas

lavagens do conteúdo do tubo, para ressuspensão do material isolado com solução de Hanks. A solução final foi depositada em placa de Petri para coleta das ilhotas com o emprego de micropipeta e lupa. De 400 a 500 ilhotas isoladas foram coletadas e lavadas com solução de Krebs. Em seguida, essas ilhotas foram ressuspensas em 10 ml de meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (com ou sem tratamento prévio com carvão ativado, para retirada dos hormônios esteróides), 11 mM de glicose, antibióticos Penicilina G (100IU/ml) e Estreptomicina (100µg/ml), acrescido com solução de 10 µl DMSO com ou sem DHEA ou DHEA-S. Essas ilhotas pancreáticas isoladas foram mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera 5% CO₂. As ilhotas isoladas foram utilizadas para estudo após 24 e 72 horas de cultura. Quando necessário, a troca do meio foi realizada com intervalos de 24h.

Foi também realizada uma curva dose-resposta com DHEA nas concentrações de 100 pM, 100 nM e 100 µM, para avaliar a secreção estática de insulina estimulada por glicose e expressão das proteínas.

3.4 Linhagem celular

Células de insulinoma de rato RINm5F foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 com glicose (11,1mM), SFB 10%, penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (0,1 mg/ml) em atmosfera 5% CO₂ a 37°C até atingirem confluência de aproximadamente 70%.

Após atingirem a confluência necessária, o meio foi trocado por meio contendo ou não DHEA, nas concentrações de 100 pM, 100 nM e 100 µM, essas condições foram mantidas por 72 horas, para posterior extração das proteínas totais dessas células.

3.5 Extração das proteínas totais das ilhotas pancreáticas e das células RINm5F

As ilhotas e as células RINm5F dos grupos controle e DHEA foram homogeneizadas com sonificador em 150 µl de tampão de extração constituído de Triton-X 100 1%, Tris (pH 7,4) 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml. Os extratos foram centrifugados a 12000 rpm a 4 °C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, os sobrenadantes das amostras tiveram seu conteúdo protéico quantificado utilizando o reagente de Bradford (*BioRad*), foram tratados com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970), acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 5:1 (V:V) e entre 50 e 100µg de proteína total foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8% e

6,5%) no aparelho para minigel (*Mini-Protean, BioRad*). Em cada gel foi adicionado como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos.

3.6 Análise protéica por *Immunoblotting*

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da *Bio-Rad* por 2 horas a 120 V, como descrito por Towbin, et al., 1979. Porém, no tampão foi acrescido SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação dessas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico® 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) a 4 °C por 2 horas. Essas membranas foram então incubadas com anticorpos anti-fosfotirosina, anti-IR, anti-IGF1-R, anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-p85, anti-MAPK42/44, anti-Akt-1, anti-pAkt^{ser473}, ou anti-pMAPK42/44 em solução bloqueadora (com 3% de BSA ao invés de leite) por 4 horas a temperatura ambiente e em seguida lavada com essa mesma solução sem leite ou BSA, por 30 minutos. Em seguida, essas membranas foram incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente e solução para detecção por quimioluminescência como descrito no protocolo do kit. A intensidade das bandas nas autoradiografias reveladas foi determinada através da leitura por densitometria óptica das imagens escaneadas utilizando um *scanner* (HP 3400) e o programa *Scion Image-Release Beta 3b*, (NIH, USA).

3.7 Secreção de insulina

Após o cultivo, as ilhotas foram transferidas para placas de cultura com 24 poços. Em todos os experimentos 5 ilhotas foram colocadas em cada poço. Inicialmente as ilhotas foram pré-incubadas por 30 minutos em 500 µl de solução Krebs-Henseleit contendo 2,8 mM de glicose. As placas foram acondicionadas em banho-maria a 37°C e mantidas em ambiente controlado (umidificado e gaseado com mistura carbogênica – O₂/CO₂ 95:5 V/V). O pH da solução foi ajustado em 7,4 pela injeção desse gás. Após esse período a solução foi rapidamente removida e substituída por nova solução de incubação contendo glicose (2,8 mM ou 11,1 mM). Após 60 minutos de incubação, as placas foram resfriadas em banho de gelo, o sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio e armazenado a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio (RIE).

3.8 Dosagem de insulina

A insulina secretada durante os diferentes experimentos foi determinada por RIE. Para isso transferiu-se 0,1 ml das amostras (em duplicata) para tubos de ensaio, adicionando-se 0,2 ml de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:300,000) e insulina marcada com ^{125}I (1800 à 2000 cpm) (traçador) em tampão fosfato pH 7,4, acrescido de NaCl 0,9 % e albumina 0,5 %. Em seguida, foram preparados os seguintes controles:

- a) 3 tubos (totais) que receberam somente 0,2 ml do tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I para averiguação da radiação máxima.
- b) 3 tubos (ligação não específica) contendo 0,2 ml do tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I e 0,1 ml de tampão fosfato, para determinar possíveis interferências no ensaio pelos componentes do tampão.
- c) 3 tubos (referência) contendo 0,2 ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada com ^{125}I e anticorpo anti-insulina e 0,1 ml de tampão fosfato, constituindo assim zero de insulina da curva padrão.

Em seguida preparou-se, também em triplicata, uma série de tubos (curva padrão), contendo 0,1 ml de insulina conhecida nas seguintes concentrações: 0,02; 0,039; 0,078; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5 e 5,0 ng/ml. Cada tubo dessa série recebeu também 0,2 ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I e anticorpo anti-insulina. No final da preparação dos tubos, eles foram agitados em vórtex e estocados a 4°C, durante 48 horas.

Após esse período de incubação, com exceção dos totais para análise da radiação máxima, todos os outros tubos receberam 0,2 ml de uma solução contendo 2,5 % de carvão (Norit A), 0,5 % de albumina e 0,25 % de dextran T 70. Os tubos foram deixados em repouso durante 20 minutos e a seguir centrifugados durante 20 minutos (2800 rpm) a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade contida em cada tubo avaliada em contador de radiação gama. Os 3 tubos elaborados para análise da radiação máxima não tiveram o sobrenadante descartado, sendo a radiação dos mesmos avaliada diretamente. Com bases nos valores obtidos nos tubos contendo insulina conhecida elaborou-se uma curva padrão que foi utilizada para a avaliação dos valores das amostras. Os resultados foram expressos em ng/ml de insulina secretada durante os experimentos.

3.9 Extração de ácido ribonucléico (RNA) total

Para a extração dos RNAs totais das ilhotas e células RINm5F foi utilizado o reagente Trizol® (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O tecido foi inicialmente rompido e homogeneizado com o reagente Trizol® até completa solubilização.

Em seguida, a mistura foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, acrescida de 0,2 ml de clorofórmio por ml de Trizol® para desproteinização. O sobrenadante foi separado por centrifugação (14.000 rpm, 15 min, 4°C), e o RNA contido na fase aquosa precipitado com isopropanol, lavado com etanol 70% e dissolvido com H₂O desionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). Os RNAs obtidos foram quantificados por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,2%, para análise da integridade do RNA.

3.10 Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Uma amostra de 1 µg de cada RNA foi submetida a reação de transcrição reversa com primers randômicos. Para isto, foi adicionado em cada amostra tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂), DTT (10 mM), mistura de dNTPs (0,5mM cada), primers randômicos (150ng), inibidor de RNase (40U) e a enzima SuperScript II (200U; Invitrogen, EUA), em volume final de 20 µl. As reações foram incubadas por 50 min à 42°C, seguida de aquecimento à 70°C por 15 minutos para desnaturação da enzima. A partir dos cDNAs obtidos foram realizadas as curvas de ciclos de amplificação para cada primer, com o mínimo de 5 pontos para cada curva. Após obtenção das curvas, os experimentos foram realizados com um número de ciclos equivalente a no mínimo, 20% abaixo do ponto de saturação da reação (platô). Para cada gene estudado foi realizada em paralelo a amplificação de pelo menos 1 gene constitutivo (p.e., RPL37a). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose-EtBr e visualizados com iluminação UV. As imagens foram adquiridas em equipamento de fotovideodocumentação (*UVP Biolumin System*), para análise densitométrica das bandas obtidas com software apropriado para este fim (*Scion Image*). A expressão do RNA para cada gene foi normalizada pela expressão do RPL37a, calculada pela razão entre os valores da densitometria do gene de interesse e do gene constitutivo. Os primers para amplificação do PDX-1, PGC-1, insulina, GLUT-2 e glicocinase foram desenhados a partir das sequências descritas na Tabela 1 abaixo, que são de uso rotineiro no laboratório da prof^a. Dra. Silvana Bordin, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, USP.

Tabela 2 – Sequência dos *Primers* e condições das reações de amplificação

Gene	Primer (sense/anti-sense)	bp	Temp (°C)
PDX-1	5'CCGAATGGAACCGAGACTGG 3' 5'AGGTGGTGGCTTTGGCAATG 3'	460	58,4
PGC-1	5'CCCATACACAACCGCAGTCG 3' 5'CTTCCTTTCCTCGTGTCTCCTCG 3'	392	57,5
Insulina	5'CACCTTTGTGGTCCTCACCTGG 3' 5'TGGTAGAGGGAGCAGATGCTGG 3'	227	58,4
GLUT-2	5'CATTGCTGGAAGAAGCGTATCAG 3' 5'GAGACCTTCTGCTCAGTCGACG 3'	408	55
Glicocinase	5'GCAGATGCTGGATGACAGAGCC 3' 5'TAGGTCTTCGTGCCTCACAGGG 3'	413	58,4
RPL37a	5'CAAGAAGGTCGGGATCGTCG3' 5'ACCAGGCAAGTCTCAGGAGGTG3'	290	57,5

3.11 Avaliação da Fragmentação de DNA por Citometria de Fluxo

O método utilizado foi o descrito por Nicoletti et al. (1991). Grupos de 20 ilhotas foram colocados em uma solução com Triton-X-100 0.1% para permeabilizar as células. A sonda usada foi iodeto de propídeo, que se intercala entre o DNA. Antes da incubação, as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a 4°C. O *pellet* foi então ressuspenso em 200 µL de solução hipotônica, com 20 µg/mL de iodeto de propídeo, 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de triton-X-100. Os tubos foram cobertos por papel alumínio e incubados a temperatura ambiente por 2h. A fluorescência foi medida em um citômetro de fluxo FACScalibur (*Becton Dickinson*, San Juan, CA, USA), com o canal FL2 (fluorescência laranja-vermelhada - 585/42 nm). Os histogramas foram analisados utilizando-se o programa *Cell Quest*.

3.12 Análise estatística

Os dados representam a média $\pm$ EPM o qual foram sistematizados no Graph Pad Prism® utilizando-se o teste t para duas condições, e também foram utilizados o teste de uma via (*One Way*) ANOVA com pós-teste de Tukey para avaliar mais de duas condições, considerando valor significativo quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Cultivo de ilhotas por 24 horas

Foi realizado cultivo das ilhotas pancreáticas por 24 horas, com ou sem DHEA ou DHEA-S em 3 concentrações (100 pM, 100 nM, 100 µM). Após 24 horas de cultivo das ilhotas, com ou sem DHEA (100 pM, 100 nM, 100 µM), também foi realizado a extração das proteínas totais das ilhotas pancreáticas, como descrito em material e métodos. Foi analisada a expressão total do IR, IRS-1, IRS-2, PI3-K, Akt-1 e ERK-1/2. Como demonstrado nas figuras 3 a 5, não foi observada diferença na expressão total de nenhuma das proteínas analisadas nas ilhotas cultivadas na presença de DHEA em relação ao controle. Também foi realizado o cultivo de 24 horas na presença ou não de DHEA-S, na concentração única de 100 µM, e analisado a expressão total das proteínas IR, PI3-K, Akt-1 e ERK-1/2. Como observado na figura 6, não houve nenhuma diferença na expressão dessas proteínas na presença de DHEA-S.

Figura 3 – Expressão protéica de IR e IRS-1 em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA. As proteínas foram solubilizadas em tampão de extração em banho-maria, após a centrifugação alíquotas do sobrenadante contendo 60μg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a transferência para membrana de nitrocelulose, foi realizado imunoblotting típico com anticorpo específico conforme a descrição em Materiais e Métodos. Resultados apresentados como média ± EPM de 2 experimentos distintos.

Figura 4 – Expressão protéica de IRS-2 e PI3-K em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA. As proteínas foram solubilizadas em tampão de extração em banho-maria, após a centrifugação alíquotas do sobrenadante contendo 60μg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a transferência para membrana de nitrocelulose, foi realizado imunoblotting típico com anticorpo específico conforme a descrição em Materiais e Métodos. Resultados apresentados como média ± EPM de 2 experimentos distintos.

Figura 5 – Expressão protéica de Akt-1 e ERK-1/2 em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA. As proteínas foram solubilizadas em tampão de extração em banho-maria, após a centrifugação alíquotas do sobrenadante contendo 60 μ g de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a transferência para membrana de nitrocelulose, foi realizado imunoblotting típico com anticorpo específico conforme a descrição em Materiais e Métodos. Resultados apresentados como média $\pm$ EPM de 2 experimentos distintos.

Figura 6 – Expressão protéica de IR, PI 3-K, Akt-1 e ERK-1/2 em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA-S. As proteínas foram solubilizadas em tampão de extração em banho-maria, após a centrifugação alíquotas do sobrenadante contendo 60 μ g de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a transferência para membrana de nitrocelulose, foi realizado imunoblotting típico com anticorpo específico conforme a descrição em Materiais e Métodos. Resultados apresentados como média $\pm$ EPM de 2 experimentos distintos.

Na figura 7 está ilustrado o grau de fosforilação das bandas pp95 e pp185 em tirosina, e fosforilação das proteínas Akt e ERK-1/2. Pode ser observado nessa figura, que há um aumento no grau de fosforilação nas proteínas ERK-1/2 após o cultivo de ilhotas tratadas com DHEA.

Figura 7 – Grau de fosforilação das bandas pp95 e pp185, e fosforilação das proteínas Akt e ERK-1/2 em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA. As proteínas foram solubilizadas em tampão de extração em banho-maria, após a centrifugação aliquotas do sobrenadante contendo 60μg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a transferência para membrana de nitrocelulose, foi realizado imunoblotting típico com anticorpo específico conforme a descrição em Materiais e Métodos. Resultados apresentados como média ± EPM de 2 experimentos distintos.

A expressão dos genes da insulina, PDX-1, glicocinase e GLUT-2 está ilustrada nas figuras 8 e 9. O cultivo das ilhotas na presença de DHEA não alterou a expressão de nenhum desses genes. Enquanto, a expressão de PGC-1 nas ilhotas tratadas com DHEA está aumentada em relação às ilhotas controle, como demonstrado na figura 10.

Figura 8 – Expressão do gene da insulina e do PDX-1 pela técnica de PCR em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA. O gráfico representa as médias das razões das densidades ópticas entre o gene da insulina ou do PDX-1 e o gene constitutivo RPL137a. Os valores foram expressos em média $\pm$ SEM (* $p < 0,05$ em relação ao controle) de 3 experimentos diferentes.

Figura 9 – Expressão do gene da glicocinase e do GLUT-2 pela técnica de PCR em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA. O gráfico representa as médias das razões das densidades ópticas entre o gene da insulina ou do PDX-1 e o gene constitutivo RPLI37a. Os valores foram expressos em média $\pm$ SEM (* $p < 0,05$ em relação ao controle) de 3 experimentos diferentes.

Figura 10 – Expressão do gene do PGC-1 pela técnica de PCR em ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA. O gráfico representa as médias das razões das densidades ópticas entre o gene da insulina ou do PDX-1 e o gene constitutivo RPLI37a. Os valores foram expressos em média $\pm$ SEM (* $p < 0,05$ em relação ao controle) de 3 experimentos diferentes. * $p < 0,01$ em relação ao controle.

A apoptose celular foi verificada através da análise da fragmentação do DNA das células das ilhotas pancreáticas após o cultivo. Esse resultado está demonstrado na figura 11. Não observada nenhuma alteração na fragmentação do DNA das ilhotas tratadas com DHEA em relação ao controle.

Figura 11 – Fragmentação do DNA de ilhotas pancreáticas cultivadas por 24 horas, na presença ou não de DHEA. As ilhotas após o cultivo foram incubadas em solução hipotônica, com 20 µg/mL de iodeto de propídio, 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de triton-X-100. Depois de 2 horas, a fluorescência foi medida em um citômetro de fluxo conforme a descrição em Materiais e Métodos. Resultados apresentados como média ± EPM de 3 experimentos distintos.

Após o cultivo, também foi analisada a secreção estática de insulina estimulada por glicose (basal 2,8 mM, estimulada 11,1 mM). Observa-se na figura 12, que houve aumento da secreção de insulina em relação ao basal, em todas as condições experimentais. No entanto, não houve diferença em nenhuma das condições do tratamento com DHEA, em relação ao controle. A figura 13 demonstra o experimento realizado com DHEA-S. De modo semelhante ao observado anteriormente, a incubação com DHEA na sua forma sulfatada, DHEA-S, foi semelhante ao controle. Para descartar a possibilidade de outros hormônios esteróides interferirem com o resultado do cultivo com DHEA, o soro fetal bovino foi tratado com carvão ativado antes do preparo do meio de cultura. Esse tratamento prévio não modificou os resultados obtidos inicialmente (anexo 1).

Figura 12 – Secreção estática de insulina estimulada por glicose em ilhotas cultivadas por 24 horas com ou sem DHEA. Grupos de 5 ilhotas foram incubados por 60 minutos com meio de Krebs-bicarbonato contendo glicose nas concentrações de 2.8 e 11.1 mM, em quintuplicatas. As ilhotas foram lavadas com Krebs-bicarbonato após o cultivo, antes da realização do experimento de secreção. Aliquotas do sobrenadante foram submetidas à técnica de radioimunoensaio para quantificação dos níveis de insulina conforme descrito em Material e Métodos. Resultados apresentados como média $\pm$ EPM de 3 experimentos distintos. * $p < 0,05$ em relação a 2.8 mM de glicose.

Figura 13 – Secreção estática de insulina estimulada por glicose em ilhotas cultivadas por 24 horas com ou sem DHEA-S. Grupos de 5 ilhotas foram incubados por 60 minutos com meio de Krebs-bicarbonato contendo glicose nas concentrações de 2.8 e 11.1 mM, em quintuplicatas. As ilhotas foram lavadas com Krebs-bicarbonato após o cultivo, antes da realização do experimento de secreção. Aliquotas do sobrenadante foram submetidas a técnica de radioimunoensaio para quantificação dos níveis de insulina conforme descrito em Material e Métodos. Resultados apresentados como média $\pm$ EPM de 3 experimentos distintos. * $p < 0,05$ em relação a 2.8 mM de glicose.

4.2 Cultivo de células RINm5F por 72 horas

Devido à dificuldade de manutenção de uma quantidade de ilhotas pancreáticas suficiente para extração de proteínas para análise por *immunoblotting* após 72 horas de cultivo, foi utilizada uma linhagem de células B pancreáticas, células RINm5F. Após o cultivo dessas células por 72 horas, com ou sem DHEA (100 pM, 100 nM, 100 μ M), foi realizada a quantificação da expressão do IR, IRS-1 (figura 16), IRS-2, PI3-K (figura 17), Akt-1 e ERK-1/2 (figura 18), como anteriormente descrito para as ilhotas pancreáticas no cultivo de 24 horas. Além dessas proteínas, também foi realizada a quantificação da expressão total das proteínas IGF-1R, PDX-1 (figura 19), GLUT-2 e PGC-1 (figura 20). A incubação com 100 μ M de DHEA induziu aumento da expressão dos IRS-1 e IRS-2, de $206 \pm 59,7\%$ e $63 \pm 1,7\%$, respectivamente ($p < 0,01$), e não alterou a expressão de todas as outras proteínas analisadas. Após análise da expressão total dessas proteínas foi verificado o grau de fosforilação das bandas pp95 e pp185 em tirosina (figura 21) e das proteínas Akt e ERK-1/2 (figura 22). Não foi observada nenhuma alteração no grau de fosforilação dessas proteínas nas células cultivadas na presença de DHEA. Também foi analisada a expressão dos genes do PGC-1, GLUT-2, insulina e PDX-1 nas células RINm5F após a cultura. As figuras 23 e 24 exibem os resultados obtidos. Não foi observada nenhuma diferença nas células mantidas em cultura na presença de DHEA.

Figura 16 – Expressão protéica de IR e IRS-1 em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA. As proteínas foram solubilizadas em tampão de extração em banho-maria, após a centrifugação alíquotas do sobrenadante contendo 80μg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a transferência para membrana de nitrocelulose, foi realizado imunoblotting típico com anticorpo específico conforme a descrição em Materiais e Métodos. Resultados apresentados como média ± EPM de 2 experimentos distintos. * p<0,01 em relação ao controle.

Figura 17 – Expressão protéica de IRS-2 e PI3-K em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA. As proteínas foram solubilizadas em tampão de extração em banho-maria, após a centrifugação alíquotas do sobrenadante contendo 80μg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a transferência para membrana de nitrocelulose, foi realizado imunoblotting típico com anticorpo específico conforme a descrição em Materiais e Métodos. Resultados apresentados como média ± EPM de 2 experimentos distintos. * $p < 0,01$ em relação ao controle.

Figura 18 – Expressão protéica de Akt-1 e ERK-1/2 em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA. As proteínas foram solubilizadas em tampão de extração em banho-maria, após a centrifugação alíquotas do sobrenadante contendo 80μg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a transferência para membrana de nitrocelulose, foi realizado imunoblotting típico com anticorpo específico conforme a descrição em Materiais e Métodos. Resultados apresentados como média ± EPM de 2 experimentos distintos.

Figura 19 – Expressão protéica de IGF-1R e GLUT-2 em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA. As proteínas foram solubilizadas em tampão de extração em banho-maria, após a centrifugação alíquotas do sobrenadante contendo 80μg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a transferência para membrana de nitrocelulose, foi realizado imunoblotting típico com anticorpo específico conforme a descrição em Materiais e Métodos. Resultados apresentados como média ± EPM de 2 experimentos distintos.

Figura 20 – Expressão protéica de PDX-1 e PGC-1 em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA. As proteínas foram solubilizadas em tampão de extração em banho-maria, após a centrifugação alíquotas do sobrenadante contendo 80μg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a transferência para membrana de nitrocelulose, foi realizado imunoblotting típico com anticorpo específico conforme a descrição em Materiais e Métodos. Resultados apresentados como média ± EPM de 2 experimentos distintos.

Figura 21 – Grau de fosforilacao das bandas pp95 e pp185 em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA. As proteínas foram solubilizadas em tampão de extração em banho-maria, após a centrifugação alíquotas do sobrenadante contendo 80μg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a transferência para membrana de nitrocelulose, foi realizado imunoblotting típico com anticorpo específico conforme a descrição em Materiais e Métodos. Resultados apresentados como média ± EPM de 2 experimentos distintos.

Figura 22 – Grau de fosforilacao das proteínas Akt e ERK-1/2 em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA. As proteínas foram solubilizadas em tampão de extração em banho-maria, após a centrifugação aliquotas do sobrenadante contendo 80μg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a transferência para membrana de nitrocelulose, foi realizado imunoblotting típico com anticorpo específico conforme a descrição em Materiais e Métodos. Resultados apresentados como média ± EPM de 2 experimentos distintos.

Figura 23 – Expressão do gene do PGC-1 e GLUT-2 pela técnica de PCR em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA. O gráfico representa as médias das razões das densidades ópticas entre o gene do PGC-1 ou do GLUT-2 e o gene constitutivo RPL137a. Os valores foram expressos em média $\pm$ SEM (* $p < 0,05$ em relação ao controle) de 3 experimentos diferentes.

Figura 24 – Expressão do gene da insulina e do PDX-1 pela técnica de PCR em células RINm5F cultivadas por 72 horas, na presença ou não de DHEA. O gráfico representa as médias das razões das densidades ópticas entre o gene da insulina ou do PDX-1 e o gene constitutivo RPLI37a. Os valores foram expressos em média $\pm$ SEM (* $p < 0,05$ em relação ao controle) de 3 experimentos diferentes.

5 DISCUSSÃO

Nas últimas duas décadas foram publicados vários trabalhos sobre as ações do DHEA e de sua forma sulfatada, DHEA-S. Há uma associação entre a redução dos valores circulantes de DHEA e o aumento da gordura visceral, da concentração de insulina plasmática e redução da ação insulínica. Esses esteróides adrenais possuem tanto efeitos pleiotrópicos em linhagens celulares quanto metabólicos em modelos animais e humanos.

Dentre os efeitos descritos há aqueles anti-diabetogênicos em camundongos ob/ob (Coleman, Leiter, Schwizer, 1982), indução de melhora da resistência periférica à insulina em ratos Wistar (Mukasa et al., 1998; Campbell et al., 2004), ação anti-oxidante (Aragno et al., 2006) e efeitos anti-obesidade com redução do tecido adiposo em ratos fa/fa (Gansler, Mueller, Clearly, 1985; Cleary e Zisk, 1986; Cleary, Zabel, Sartin, 1988; Nakashima et al., 1995; Nakashima et al., 1995b; Ishizuka et al., 1999). Por outro lado, em humanos há dados menos concordantes. A reposição com DHEA induz melhora da ação insulínica com redução da adiposidade (Lasco et al., 2001; Kawano et al., 2003; Villareal, Holloszy, 2004), não tem efeito (Nair et al., 2006; Basu et al., 2007), ou reduz a ação insulínica (Mortola, Yen, 1990).

Em células isoladas há várias evidências demonstrando tanto efeito pró- quanto anti-apoptóticos. Os efeitos ativadores de apoptose estão relacionados à ação anti-tumoral (Shilkaitis et al., 2005; Taguchi et al., 2006, para revisão Charalampopoulos et al., 2006) e efeitos anti-apoptóticos tem sido descritos como protetor, em graus variados, a estímulos diferentes e que atuam através da via PI3-K/Akt e MAPK (Yapanoglu et al., 2008; Leskiewicz et al., 2008; Liu et al., 2007; Xilouri et al., 2007).

Nosso laboratório demonstrou que a aplicação de dose única de DHEA em ratos obesos com 1 ano de idade melhorou a função das células B pancreáticas (Medina et al., 2006), com aumento na secreção de insulina de ilhotas isoladas em resposta à glicose. Esta resposta funcional foi acompanhada de aumento na área correspondente às células B detectado por imunohistoquímica e aumento da expressão da proteína Akt. No entanto, nossos resultados nos experimentos *in vitro* com 24 horas de incubação, o DHEA não induziu nenhuma mudança na secreção de insulina estimulada pela glicose, mas aumentou a expressão gênica da PGC-1 e o grau de fosforilação das proteínas ERK-1 e ERK-2.

As proteínas cinases reguladas por sinais extracelulares, ERK-1 e ERK-2, participam da superfamília das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK). A ativação dessa via está relacionada ao aumento da mitogênese, proliferação, diferenciação e sobrevivência

celular (Boulton et al., 1991; Lewis, Shapiro, Ahn, 1998; Meloche, Pouyssegur, 2007). O bloqueio farmacológico dessa via inibe os efeitos da insulina sobre o crescimento celular, mas não altera as ações desse hormônio sobre o metabolismo (Lazar et al., 1995).

As ERK-1 e ERK-2 estão expressas nas células B pancreáticas e tem papel na modulação da transcrição gênica e diferenciação (Lingohr et al., 2002). Fatores de crescimento como a prolactina estão envolvidos com o crescimento das ilhotas pancreáticas e sobrevivência das células B, e em parte, esses efeitos são mediados pela ativação das ERK-1/2 (Heinrich et al., 2003; Amaral et al., 2004). Ademais, essas mesmas proteínas tem papel na regulação da morte das células B pancreáticas induzida por citocinas, em particular participando da completa ativação do fator de transcrição NFkB induzido pela interleucina 1 β (IL-1 β) e subsequente aumento da expressão da iNOS (Wesh, 1995; Larsen et al., 1998; Matsuda et al., 2005). Há várias evidências demonstrando que o aumento da produção de NO pode mediar a morte celular em ilhotas pancreáticas e célula B (Cnop et al., 2005; McCabe, O'Brien, 2007; Chambers et al., 2008; Eizirik, Cardoso, Cnop, 2008).

Kim e colaboradores (2007) demonstraram que um inibidor de tirosina quinase, genisteína, é capaz de proteger células RIN e ilhotas pancreáticas isoladas de ratos dos efeitos deletérios da IL-1 β e IFN γ . Esse efeito protetor envolveu a redução do grau de fosforilação das proteínas ERK-1/2 e da via JAK/STAT.

Há várias evidências demonstrando que o PGC-1 está envolvido na regulação do metabolismo energético participando da biogênese mitocondrial, de adaptações termogênicas, da regulação de enzimas do metabolismo oxidativo e do transporte de glicose no músculo esquelético (Puigserver, Spiegelman, 2003; Lin, Handschin, Spiegelman, 2005). Puigserver e colaboradores (1998) demonstraram uma relação direta entre a expressão da PGC-1 e da proteína mitocondrial UCP-1. Em particular, demonstraram que a exposição ao frio regula a expressão da PGC-1 e da UCP-1 em tecidos adiposo marrom e músculo esquelético. Essa regulação estaria relacionada com o subsequente aumento da termogênese induzida pelo frio. Em 2003, De Souza e colaboradores demonstraram aumento da expressão da PGC-1 e da isoforma UCP-2 em ilhotas pancreáticas de ratos submetidos ao frio. Ademais, a expressão da UCP-2 em ilhotas pancreáticas está relacionada a redução da secreção de insulina associada a menor produção de ATP a partir do metabolismo da glicose (Krauss, Zhang, Lowell, 2005).

O aumento de fosforilação das ERK-1/2 e da expressão do RNAm induzido pela incubação por 24 horas com DHEA não esteve relacionado com alteração da função nessas ilhotas pancreáticas isoladas, uma vez que tanto a secreção estática de insulina quanto a análise de apoptose que foram semelhantes ao controle.

Por outro lado, há dados demonstrando efeitos contraditórios da forma sulfatada do DHEA, o DHEA-S, em distintas linhagens celulares. Dillon e colaboradores (2000) demonstraram em células INS-1 e HIT-T15 aumento da secreção de insulina, enquanto que Liu e colaboradores (2006a) demonstraram redução da secreção em células BRIN-BD11.

No trabalho de Dillon e colaboradores (2000) foi realizada cultura de 6 dias na presença de DHEA-S com células INS-1 e células HIT-T15. A administração diária de DHEA-S promoveu aumento na secreção de insulina induzida pela glicose e pelo piruvato. Esse aumento foi observado a partir de 3 dias de cultivo e apresentou concomitante aumento da expressão gênica das enzimas acil-CoA sintetase 1 e da acil-CoA oxidase. Por outro lado, no trabalho de Liu e colaboradores (2006a) foi observada redução na secreção de insulina estimulada por glicose nas células cultivadas com DHEA-S. Nesse trabalho foi realizada cultura por 3 dias com DHEA-S em células BRIN-BD11.

Após a cultura de 24 horas das ilhotas pancreáticas, também foi analisada a expressão tecidual dos receptores de insulina, IR, e do IGF-1, da PI3-K e da Akt. Há evidências indicando possível papel mediador dessas proteínas na secreção de insulina (Velloso et al., 1995; Araújo et al., 2002), no crescimento e na sobrevivência das ilhotas pancreáticas (Kulkarni, 2002; Delghingaro-Augusto et al., 2004).

Alguns trabalhos demonstram um efeito de *feedback* negativo da insulina em sua própria secreção (Iversen, Miles, 1971; Loreti et al., 1974; Elahi et al., 1982), enquanto modelos semelhantes utilizados por outros pesquisadores não dão suporte a esse conceito (Malaisse et al., 1967; Shima et al., 1977; Stagner et al., 1986). Há estudos demonstrando que o IGF-1 pode agir como um regulador negativo da secreção de insulina (Porksen et al., 1997; Leahy, Vandekerkhove, 1990).

Camundongos *knockout* para o IR, especificamente nas células B, nascem com glicemia, insulina plasmática e ilhotas semelhantes aos controles. No entanto, com 8 semanas de idade, esses camundongos demonstram perda seletiva da secreção de insulina estimulada por glicose, provavelmente por uma expressão alterada da glicocinase nas células B. Consequentemente, esses animais desenvolvem progressiva intolerância à glicose, redução no

tamanho das ilhotas e massa das células B, e alguns deles tornam-se diabéticos com 7 – 10 meses de idade (Kulkarni et al., 1999a; Leibiger et al., 2001). Esses camundongos apresentam um defeito na fase aguda (1º fase) de secreção de insulina estimulada por glicose comumente encontrado em pacientes DM2. De forma semelhante, camundongos *knockout* para IGF-1R, nas células B, apresentam tamanho das ilhotas, massa das células B, conteúdo pancreático de insulina e glicemia comparadas aos animais controles. Esses últimos camundongos apresentam apenas leve hiperinsulinemia com 2 meses de idade. Além disso, esses animais apresentam progressivamente intolerância a glicose e defeito na secreção de insulina semelhante ao observado nos camundongos *knockout* para o IR (Kulkarni, 2002; Kulkarni et al., 2002). Esses dados sugerem que a insulina e o IGF-1 não são necessários para o desenvolvimento embrionário das células B e ilhotas pancreáticas, no entanto, parecem ter papel importante para a adaptação das células B à resistência à insulina.

Estudos modificando a expressão do IRS-1 tanto no animal como um todo, quanto em células isoladas mostraram modificação na secreção de insulina. Em camundongos *knockout* para o IRS-1 foi demonstrada redução na secreção de insulina (Kulkarni et al., 1999b). Ainda nesse mesmo estudo foi utilizada uma linhagem de células B pancreáticas. A redução do IRS-1 nessas células também reduziu a secreção de insulina estimulada por glicose e arginina. Além disso, outro estudo demonstrou que em células B expressando 2 vezes mais IRS-1 ocorreu aumento na secreção de insulina e do cálcio citoplasmático, apesar de ter ocorrido redução no conteúdo e biossíntese da insulina (Xu et al., 1999). Esse resultado parece em parte ser devido uma interação entre o IRS-1 e a SERCA, proteína que estimula a captação de cálcio pelo retículo citoplasmático, nas células B (Borge et al., 2002; Borge, Wolf, 2003). No entanto, o papel do IRS-1 na fisiologia das células B não está totalmente esclarecido, pois, Araújo e colaboradores (2002) demonstraram que a redução da expressão do IRS-1 através da utilização de RNAi, em ilhotas pancreáticas isoladas, induziu aumento na secreção estática e dinâmica de insulina estimulada por glicose.

Já para a proteína Akt, Tuttle e colaboradores (2001) demonstraram em camundongos que superexpressavam essa proteína especificamente em células B pancreáticas um aumento da área dessas células na ilhota pancreática e na secreção de insulina estimulada pela glicose. Aqueles camundongos também apresentaram aumento no conteúdo total de insulina no pâncreas, hiperinsulinemia e redução da glicemia no jejum e aumento da tolerância à glicose. Contudo, não tiveram alteração na sensibilidade periférica à insulina e na secreção de insulina estimulada por arginina. Ademais, o aumento da Akt-1 nas células B daqueles camundongos

preveniu o diabetes experimental induzido por estreptozotocina. Além disso, demonstramos em trabalho anterior que o tratamento com DHEA em ratos com 1 ano de idade induziu aumento da área correspondente às células B das ilhotas pancreáticas com concomitante aumento da expressão da proteína Akt-1 (Medina et al., 2006). No entanto, nossos resultados com as 24 horas de incubação *in vitro* com DHEA não induziu modificação na expressão dessa proteína.

Há aqui pelo menos 3 pontos a serem considerados. Um ponto envolve o tempo de exposição ao esteróide, que pode ter sido insuficiente para induzir modificações funcionais, uma vez que muitos dos dados obtidos em vários outros estudos envolveram tempo maior de exposição (Dillon et al., 2000; Liu et al., 2006a). Outro ponto é a limitação metodológica no cultivo das ilhotas pancreáticas, como por exemplo o meio ter sido inadequado e resultado em indução de perda celular, que não foi avaliada. Ademais, há o conceito comum de que o DHEA é mero precursor de esteróides sexuais. Assim, muitos dos efeitos detectados em outros trabalhos pode ter sido, pelo menos em parte, por conversão intratecidual do DHEA a androstenediona ou testosterona ou estrógeno (Labrie et al., 2005; Aizawa et al., 2007).

Para driblar o insucesso na manutenção da atividade de secreção de insulina das ilhotas pancreáticas isoladas de ratos adultos jovens após o cultivo por 3 dias, foram realizados experimentos com linhagem celular derivada de células B, RINm5F por 72 horas. Após 3 dias de cultura com DHEA foram detectados aumentos na expressão dos IRS-1 e IRS-2 nessa linhagem celular.

Há estudos associando a presença de polimorfismo do gene do IRS-1 com maior prevalência de diabetes mellitus em humanos. A maior frequência é a variante do IRS-1 que envolve a troca da arginina 972 por glicina (Imai et al., 1994). Indivíduos com essa variante apresentam aumento na apoptose celular das ilhotas pancreáticas (Federeci et al., 2001) e maior incidência de DM (Imai et al., 1994). Porzio e colaboradores (1999) ao expressarem essa variante em células RIN demonstraram redução tanto na secreção de insulina estimulada por glicose quanto da ativação na via IRS-1/PI3-K/Akt, com aumento na atividade das proteínas pró-apoptóticas, caspase-9 e caspase-3. Ademais, camundongos *knockout* para o IRS-2 apresentam redução da secreção de insulina, falha no crescimento adequado das ilhotas e desenvolvem um fenótipo de DM2 (Withers et al., 1998). Hennige e colaboradores (2003) observaram que aumento da expressão do IRS-2 especificamente em células B pancreáticas, promoveu crescimento e sobrevivência das células B e secreção de insulina em graus que preveniu o desenvolvimento de diabetes em diversos modelos como camundongos *knockout*

para o IRS-2, obesos e tratados com streptozotocina. Ainda, Terauchi e colaboradores (2007) demonstraram que o IRS-2 juntamente com a glicocinase são necessários para a hiperplasia compensatória das células B pancreáticas, induzida por dieta hiperlipídica e resistência à insulina em camundongos.

Outras proteínas analisadas após a cultura de 72 horas nas células RINm5F, foram IGF-1R, PDX-1, PGC-1 e GLUT-2, além da expressão dos genes da insulina, PDX-1, PGC-1 e GLUT-2. O PDX-1 é muito importante para o desenvolvimento do pâncreas. Animais *knockout* para o PDX-1 apresentaram agenesia do pâncreas, seguida de morte logo após o nascimento (Jonsson et al., 1994; Offield et al., 1996). Além disso, a diferenciação e a manutenção do fenótipo da célula B depende desse fator transcricional, pois, a alteração específica do gene do PDX-1, em camundongos adultos, induziu redução da massa das células B pancreáticas e o desenvolvimento de diabetes mellitus (Ahlgren et al., 1998). Camundongos heterozigotos para o PDX-1 são intolerantes à glicose e possuem aumento na apoptose celular das ilhotas, redução do número de ilhotas e alteração na arquitetura das ilhotas pancreáticas (Ahlgren et al., 1998; Johnson et al., 2003). Este fator de transcrição também regula vários genes envolvidos na função da célula B, entre eles o gene da insulina (Olson et al., 1995), do GLUT-2 (Waeber et al., 1996) e da glicocinase (Watada et al., 1996).

Apesar dessas proteínas estarem envolvidas com mecanismos que modulam a secreção de insulina, não foi observada nenhuma alteração na quantidade total de IGF-1R, PDX-1, PGC-1 e GLUT-2, assim como, a expressão dos genes da insulina, PDX-1, PGC-1 e GLUT-2 não foi alterada nas células RINm5F, mantidas em cultura por 72 horas na presença de DHEA.

Apesar de o DHEA ser derivado do colesterol, portanto ser um hormônio esteróide, ainda não foi definido o mecanismo exato de sua ação. Em estudos *in vitro*, Liu et al. (2006b) demonstraram que o DHEA, mesmo sendo um hormônio esteróide, ativa receptor de membrana ligado à proteína G_i em ilhotas pancreáticas e células B, reduzindo a secreção de insulina agudamente frente ao estímulo com glicose e carbacol, um agonista muscarínico, por meio da redução do cálcio intracelular. Além de células B e ilhotas pancreáticas, o DHEA também ativa receptor de membrana em células endoteliais, estimulando a produção de óxido nítrico pela via da PI3-K/Akt (Liu, Dillon, 2004; Formoso et al., 2006).

6 CONCLUSÃO

A incubação *in vitro* com DHEA induziu aumento no grau de fosforilação das proteínas ERK-1 e ERK-2 e na expressão do RNAm da PGC-1 em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos adultos. Ademais, induziu aumento na expressão protéica dos IRS-1 e IRS-2 em células RINm5F. Assim, é possível que alguns dos efeitos sobre as ilhotas pancreáticas descritos para este esteróide podem estar relacionados à modulação dessas proteínas.

O DHEA é um hormônio que sofre a ação de aromatase. Assim, se os efeitos observados são resultados da ação direta do DHEA ou de seus metabólitos não foi esclarecido, já que, os efeitos observados *in vitro* diferem dos observados *in vivo*. Ainda, é possível que os efeitos do DHEA, como observado nos trabalhos discutidos e dados do nosso laboratório, se tornem mais evidentes em condições com estímulos deletérios, como envelhecimento, diabetes, obesidade, exposição a citocinas e estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. b-Cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/Pdx1* gene results in loss of the b-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes & Development*. 1998;12(12):1763-1768.
- Aikin R, Rosenberg L, Maysinger D. Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling to Akt Mediates Survival in Isolated Canine Islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;277(2):455-461.
- Aizawa T, Asanuma N, Terauchi Y, Suzuki N, Komatsu M, Itoh N, et al. Analysis of the pancreatic beta cell in the mouse with targeted disruption of the pancreatic beta cell-specific glucokinase gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;229(2):460-5.
- Aizawa K, Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S, Otsuki T, Mow CN et al. Expression of steroidogenic enzymes and synthesis of sex steroid hormones from DHEA in skeletal muscle of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(2):E577-E584.
- Alessi DR, Downes CP. The role of PI 3-Kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1436(1-2):151-164.
- Amaral ME, Cunha DA, Anhê GF, Ueno M, Carneiro EM, Velloso LA, Bordin S, Boschero AC. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. *J Endocrinol*. 2004;183(3):469-76.
- Aragno M, Mastrocola R, Medana C, Graziella M, Vercellinatto I, Danni O et al. Oxidative stress-dependent impairment of cardiac-specific transcription factors in experimental diabetes. *Endocrinology*. 2006;147(12):5967-5974.
- Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, Johnson RS et al. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of *IRS-1* gene. *Nature*. 1994;372(6502):186-190.
- Araújo EP, Amaral MEC, Souza CT, Bordin S, Ferreira F, Saad MJA et al. Blockade of *IRS1* in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. *FEBS Letters*. 2002;531(3):437-442.
- Araújo EP, Amaral MEC, Filiputti E, De Souza CT, Laurito TL, Augusto VD et al. Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (*IRS*)-1 and *IRS-2*. *J Endocrinol*. 2004;181(1):25-38.
- Barrett-Connor E, Khaw KT, Yen S. A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate, mortality, and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1986;315(24):1519-1524.

Basu R, Man CD, Campioni M, Basu A, Nair KS, Jensen MD et al. Two years of treatment with dehydroepiandrosterone does not improve insulin secretion, insulin action, or postprandial glucose turnover in elderly men or women. *Diabetes*. 2007;56(3):753-766.

Bélanger A, Candas B, Dupont A, Cusan L, Diamond P, Gomez JL et al. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(4):1086-1090.

Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Fisiologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p. 981-1042.

Boden, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*. 1997;46(1):3-10.

Bonner-Weir S. Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology*. 2000;141(6):1926-1929.

Borge PD, Moibi J, Greene SR, Trucco M, Young RA, Gao Z et al. Insulin receptor signaling and sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase in beta-cells. *Diabetes*. 2002;51(Suppl 3):S427-433.

Borge PD Jr, Wolf BA. Insulin receptor substrate 1 regulation of sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase 3 in insulin-secreting beta-cells. *J Biol Chem*. 2003;278(13):11359-11368.

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 1991;65(4):663-675.

Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE. Two New Substrates in Insulin Signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem*. 2003;278(28):25323-25330.

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

Carvalho CRO, Brenelli SL, Silva AC, Nunes ALB, Velloso LA, Saad MJA. Effect of Aging on Insulin Receptor, Insulin Receptor Substrate-1, and Phosphatidylinositol 3 kinase in Liver and Muscle of Rats. *Endocrinology*. 1996;137(1):151-159.

Casson PR, Andersen RN, Herrod HG, Stentz FB, Straughn AB, Abraham GE et al. Oral dehydroepiandrosterone in physiologic doses modulates immune function in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol*. 1993;169(6):1536-1539.

Cefalu WT, Wang ZQ, Werbel S, Bell-Farrow A, Crouse JR, Hinson WH et al. Contribution of visceral fat mass to the insulin resistance of aging. *Metabolism*. 1995;44(7):954-959.

- Chambers KT, Unverferth JA, Weber SM, Wek RC, Urano F, Corbett JA. The role of nitric oxide and the unfolded protein response in cytokine-induced beta-cell death. *Diabetes*. 2008;57(1):124-132.
- Charalampopoulos I, Alexaki VI, Tsatsanis C, Minas V, Dermitzaki E, Lasaridis I et al. Neurosteroids as endogenous inhibitors of neuronal cell apoptosis in aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1088:139-52.
- Cheatham B, Kahn CR. Insulin Action and the Insulin Signaling Network. *Endocrine Reviews*. 1995;16(2):117-142.
- Cleary MP, Zisk J. Anti-obesity effect of two different levels of dehydroepiandrosterone in lean and obese middle-aged female Zucker rats. *Int J Obes*. 1986;10(3):193-204.
- Cleary MP, Zabel T, Sartin JL. Effects of short-term dehydroepiandrosterone treatment on serum and pancreatic insulin in Zucker rats. *J Nutr*. 1988;118(3):382-7.
- Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörens A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*. 2005;54(Suppl 2):S97-S107.
- Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med*. 1995;122(7):481-486.
- Coleman DL, Leiter EH, Schwizer RW. Therapeutic Effects of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in Diabetic Mice. *Diabetes*. 1982(9);31:830-833.
- Cutler GB, Glenn M, Bush M, Hodgen GD, Graham CE, Loriaux DL. Adrenarche: a survey of rodents, domestic animals, and primates. *Endocrinology*. 1978;103(6):2112-2118.
- Deeney JT, Prentki M, Corkey BE. Metabolic control of β -cell function. *Semin Cell Dev Biol*. 2000;11(4):267-275.
- DeFronzo RA, Barzilai N, Simonson DC. Mechanism of metformin action in obese and lean noninsulin-dependent diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;73(6):1294-1301.
- Delghingaro-Augusto V, Ferreira F, Bordin S, Amaral ME, Toyama MH, Boschero AC et al. A Low Protein Diet Alters Gene Expression in Rat Pancreatic Islets. *J Nutr*. 2004;134(2):321-327.
- De Souza CT, Gasparetti AL, Pereira-da-Silva M, Araújo EP, Carvalheira JB, Saad MJA et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1-dependent uncoupling protein-2 expression in pancreatic islets of rats: a novel pathway for neural control of insulin secretion. *Diabetologia*. 2003;46(11):1522-1531.

Diamond P, Cusan L, Gomez JL, Bélanger A, Labrie F. Metabolic effects of 12-month percutaneous dehydroepiandrosterone replacement therapy in postmenopausal women. *J Endocrinol.* 1996;150(Suppl):S43-S50.

Dillon JS, Yaney GC, Zhou Y, Voilley N, Bowen S, Chipkin S et al. Dehydroepiandrosterone Sulfate and β -Cell Function: Enhanced Glucose-Induced Insulin Secretion and Altered Gene Expression in Rodent Pancreatic β -Cells. *Diabetes.* 2000;49(12):2012-2020.

Dunstan DW, Zimmet P, Welborn TA et al. The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Diabetes Care.* 2002;25(5):829-834.

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

Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetes Mellitus. *Endocr Rev.* 2008;*in press*.

Elahi D, Nagulesparan M, Hersheoff RJ, Muller DC, Tobin JD, Blix PM et al. Feedback inhibition of insulin secretion by insulin: relation to the hyperinsulinemia of obesity. *N Engl J Med.* 1982;306(20):1196-1202.

Erecinska M, Bryla J, Michalik M, Meglasson MD, Nelson D. Energy metabolism in islets of Langerhans. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1101(3):273-295.

Fantini VR, Sparling JD, Slot JW, Keller SR, Lienhard GE, Lavan BE. Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem.* 1998;273(17):10726-10732.

Fantini VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol.* 2000;278(1):E125-E133.

Fatrai S, Elghazi L, Balcazar N, Cras-Méneur C, Krits I, Kiyokawa H et al. Akt Induces β -Cell Proliferation by Regulating Cyclin D1, Cyclin D2, and p21 Levels and Cyclin-Dependent Kinase-4 Activity. *Diabetes.* 2006;55(2):318-325.

Favre C, Gérard A, Clauzier E, Pontarotti P, Olive D, Nunès JA. DOK4 and DOK5: new Dok-related genes expressed in human T cells. *Genes Immun.* 2003;4(1):40-45.

Federici M, Hribal ML, Ranalli M, Marselli L, Porzio O, Lauro D et al. The common Arg972 polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes apoptosis of human pancreatic islets. *Faseb J.* 2001;15(1):22-24.

Ferrannini E, Natali A, Capaldo B, Lehtovirta M, Jacob S, Yki-Jarvinen H. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: role of age and obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Hypertension.* 1997;30(5):1144-1149.

Formoso G, Chen H, Kim J, Montagnani M, Consoli A, Quon MJ. Dehydroepiandrosterone mimics acute actions of insulin to stimulate production of both nitric oxide and endothelin 1 via distinct phosphatidylinositol 3-kinase-and mitogen-activated protein kinase-dependent pathways in vascular endothelium. *Mol Endocrinol*. 2006;20(5):1153-1163.

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

Greenspan FS, Gardner DG. *Endocrinologia Básica e Clínica*. 7. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2006. p. 357-460.

Gremlich S, Bonny C, Waeber G, Thorens B. Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce glut2, glucokinase, insulin and somatostatin levels. *J Biol Chem*. 1997;272(48):30261-30269.

Grimm J, Sachs M, Britsch S, Di Cesare S, Schwarz-Romond T, Alitalo K et al. Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J Cell Biol*. 2001;154(2):345-354.

Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Transcriptional Regulation in Pancreatic Development. *Endocrinology*. 2005;146(3):1025-1034.

Hamdy O, Ledbury S, Mullooly C, Jarema C, Porter S, Ovalle K et al. Lifestyle Modification Improves Endothelial Function in Obese Subjects With the Insulin Resistance Syndrome. *Diabetes Care*. 2003;26(7):2119-2125.

Han DH, Hansen PA, Chen MM, Holloszy JO. DHEA treatment reduces fat accumulation and protects against insulin resistance in male rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1998;53(1):B19-B24.

Hansen PA, Han DH, Nolte LA, Chen M, Holloszy JO. DHEA protects against visceral obesity and muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol*. 1997;273(5):R1704-R1708.

Harbeck MC, Louie DC, Howland J, Wolf BA, Rothenberg PL. Expression of insulin receptor mRNA and insulin receptor substrate 1 in pancreatic islet beta-cells. *Diabetes*. 1996;45(6):711-717.

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

- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003;374(Pt 1):1-20.
- Hennige AM, Burks DJ, Ozcan U, Kulkarni RN, Ye J, Park S et al. Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic β cells prevents diabetes. *J Clin Invest*. 2003;112(10):1521-1532.
- Ishizuka T, Kajita K, Miura A, Ishizawa M, Kanoh Y, Itaya S et al. DHEA improves glucose uptake via activations of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol*. 1999;276(1 Pt 1):E196-204.
- Iversen J, Miles DW. Evidence for a feedback inhibition of insulin on insulin secretion in the isolated, perfused canine pancreas. *Diabetes*. 1971;20(1):1-9.
- Johnson JD, Ahmed NT, Luciani DS, Han Z, Tran H, Fujita J et al. Increased islet apoptosis in Pdx1^{+/-} mice. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1147-1160.
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*. 1994;371(6498):606-609.
- Kahn CR. The molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med*. 1985;36:429-451.
- Karlsson O, Walker MD, Rutter WJ, Edlund T. Individual protein-binding domains of the insulin gene enhancer positively activate beta-cell-specific transcription. *Mol Cell Biol*. 1989;9(2):823-827.
- Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science*. 1982;215(4529):185-187.
- Kawano H, Yasue H, Kitagawa A, Hirai N, Yoshida T, Soejima H et al. Dehydroepiandrosterone supplementation improves endothelial function and insulin sensitivity in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(7):3190-3195.
- Kim EK, Kwon KB, Song MY, Seo SW, Park SJ, Ka SO et al. Genistein protects pancreatic beta cells against cytokine-mediated toxicity. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;278(1-2):18-28.
- Knutti D, Kralli A. PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol Metab*. 2001;12(8):360-365.
- Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404(6778):635-643.
- Krauss S, Zhang CY, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(3):248-261.

Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R et al. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes*. 2000;49(11):1880-1889.

Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signaling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol*. 1997;17(3):1595-1606.

Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*. 1999a;96(3):329-339.

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

Kulkarni RN. Receptors for insulin and insulin-like growth factor-1 and insulin receptor substrate-1 mediate pathways that regulate islet function. *Biochem Soc Trans*. 2002;30(2):317-322.

Kulkarni RN, Holzenberger M, Shih DQ, Ozcan U, Stoffel M, Magnuson MA et al. Beta-cell-specific deletion of the Igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nat Genet*. 2002;31(1):111-115.

Kulkarni RN. The islet β -cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(3):365-371.

Labrie F, Luu-The V, Bélanger A, Lin SX, Simard J, Pelletier G, Labrie C. Is dehydroepiandrosterone a hormone? *Journal of Endocrinology*. 2005;187(1):169-196.

Larsen CM, Wadt KA, Juhl LF, Andersen HU, Karlsen AE, Su MS et al. Interleukin-1 β -induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*. 1998;273(24):15294-15300.

Larsson O, Kindmark H, Bränström R, Fredholm B, Berggren PO. Oscillations in KATP channel activity promote oscillations in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in the pancreatic β -cell. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(10):5161-5165.

Lasco A, Frisina N, Morabito N, Gaudio A, Morini E, Trifiletti A et al. Metabolic effects of dehydroepiandrosterone replacement therapy in postmenopausal women. *Eur J Endocrinol*. 2001;145(4):457-461.

Lavan B, Lienhard GE. The insulin-elicited 60-kDa phosphotyrosine protein in rat adipocytes is associated with phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 1993;268(8):5921-5928.

Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE. The 60-kDa Phosphotyrosine Protein in Insulin-treated Adipocytes Is a New Member of the Insulin Receptor Substrate Family. *J Biol Chem.* 1997;272(17):11439–11443.

Laychock SG, Bauer AL. Epiandrosterone and dehydroepiandrosterone affect glucose oxidation and interleukin-1 β effects in pancreatic islet. *Endocrinology.* 1996;137(8):3375-3385.

Laychock SG. Rat pancreatic islet and RINm5F cell responses to epiandrosterone, dehydroepiandrosterone and interleukin-1 β . *Biochem Pharmacol.* 1998;55(9):1453-1464.

Lazar DF, Wiese RJ, Brady MJ, Mastick CC, Waters SB, Yamauchi K et al. Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. *J Biol Chem.* 1995;270(35):20801-20807.

Leahy JL, Vandekerckhove KM. Insulin-like growth factor-I at physiological concentrations is a potent inhibitor of insulin secretion. *Endocrinology.* 1990;126(3):1593-1598.

Leibiger B, Leibiger IB, Moede T, Kemper S, Kulkarni RN, Kahn CR et al. Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. *Mol Cell.* 2001;7(3):559-570.

Leibson CL, Williamson DF, Melton LJ et al. Temporal trends in BMI among adults with diabetes. *Diabetes Care.* 2001;24(9):1584-1589.

Leonard J, Peers B, Johnson T, Ferreri K, Lee S, Montminy MR. Characterization of Somatostatin Transactivating Factor-1, a Novel Homeobox Factor That Stimulates Somatostatin Expression in Pancreatic Islet Cells. *Mol Endocrinol.* 1993;7(10):1275-1283.

Leskiewicz M, Regulska M, Budziszewska B, Jantas D, Jaworska-Feil L, Basta-Kaim A et al. Effects of neurosteroids on hydrogen peroxide- and staurosporine-induced damage of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res.* 2008;*in press*.

Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 1998;74:49-139.

Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 2005;1(6):361-370.

Lingohr MK, Buettner R, Rhodes CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival - a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends Mol Med.* 2002;8(8):375-384.

Lingohr MK, Dickson LM, McCuaig JF, Hugl SR, Twardzik DR, Rhodes CJ. Activation of IRS-2-mediated signal transduction by IGF-1, but not TGF- α or EGF, augments pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes.* 2002;51(4):966-976.

- Liu SCH, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Insulin receptor substrate-3 is not essential for growth or glucose homeostasis. *J Biol Chem*. 1999;274(25):18093-18099.
- Liu HK, Green BD, McClenaghan NH, McCluskey JT, Flatt PR. Deleterious Effects of Supplementation with Dehydroepiandrosterone Sulphate or Dexamethasone on Rat Insulin-Secreting Cells Under In Vitro Culture Condition. *Biosci Rep*. 2006a;26(1):31-38.
- Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. *Steroids*. 2004;69(4):279-289.
- Liu D, Ren M, Bing X, Stotts C, Deorah S, Love-Homan L et al. Dehydroepiandrosterone inhibits intracellular calcium release in β -cells by a plasma membrane-dependent mechanism. *Steroids*. 2006b;71(8):691-699.
- Liu D, Si H, Reynolds KA, Zhen W, Jia Z, Dillon JS. 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*. 2007;148(7):3068-3076.
- Loreti L, Dunbar JC, Chen S, Foà PP. The autoregulation of insulin secretion in the isolated pancreatic islets of lean (obOb) and obese-hyperglycemic (obob) mice. *Diabetologia*. 1974;10(4):309-315.
- McCabe C, O'Brien T. The rational design of beta cell cytoprotective gene transfer strategies: targeting deleterious iNOS expression. *Mol Biotechnol*. 2007;37(1):38-47.
- Macewen EG, Kurzman ID. Obesity in the dog: role of the adrenal steroid dehydroepiandrosterone (DHEA). *J Nutr*. 1991;121(11 Suppl):S51-S55.
- Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Lacy PE, Wright PH. Insulin secretion by isolated islets in presence of glucose, insulin and anti-insulin serum. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1967;124(2):497-500.
- Malaisse WJ, Sener A, Herchuelz A, Hutton JC. Insulin release: the fuel hypothesis. *Metabolism*. 1979;28(4):373-386.
- Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. *Diabetes Care*. 1992;15(11):1509-16.
- Marincola F, Frank W, Clark W, Douglas M, Merrell R. The independence of insulin release and ambient insulin in vitro. *Diabetes*. 1983;32(12):1162-1167.
- Matschinsky FM. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes*. 1996;45(2):223-41.

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

Matsuda T, Ferreri K, Todorov I, Kuroda Y, Smith CV, Kandeel F et al. Silymarin protects pancreatic beta-cells against cytokine-mediated toxicity: implication of c-Jun NH2-terminal kinase and janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathways. *Endocrinology*. 2005;146(1):175-185.

Medina MC, Souza LC, Caperuto LC, Anhê GF, Amanso AM, Teixeira VP et al. Dehydroepiandrosterone increases beta-cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. *FEBS letters*. 2006;580(1):285-290.

Meglasson MD, Matschinsky FM. Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev*. 1986;2(3-4):163-214.

Melloul D. Transcription Factors in Islet Development and Physiology Role of PDX-1 in Beta-Cell Function. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1014(1):28-37.

Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*. 2007;26(22):3227-3239.

Migeon CJ, Keller AR, Lawrence B, Shepart TH. Dehydroepiandrosterone and androsterone levels in human plasma: effect of age and sex; day-to-day and diurnal variations. *J Clin Endocrinol Metab*. 1957;17(9):1051-1062.

Miller CP, McGehee RE, Habener JF. IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *The EMBO journal*. 1994;13(5):1145-56.

Mohan PF, Ihnen JS, Levin BE, Cleary MP. Effects of dehydroepiandrosterone treatment in rats with diet-induced obesity. *J Nutr*. 1990;120(9):1103-1114.

Morales AJ, Nolan JJ, Nelson JC, Yen SSC. Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78(6):1360-1367.

Mortola JF, Yen SS. The effects of oral dehydroepiandrosterone on endocrine-metabolic parameters in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;71(3):696-704.

Mukasa K, Kanetsiro M, Aoki K, Okamura J, Saito T, Satoh S et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) Ameliorates the Insulin Sensitivity in Older Rats. *J Steroid Biochem Molec Biol*. 1998;67(4):355-358.

Nair KS, Rizza RA, O'Brien P, Dhatriya K, Short KR, Nehra A et al. DHEA in Elderly Women and DHEA or Testosterone in Elderly Men. *N Engl J Med*. 2006;355(16):1647-1659.

- Nakashima N, Haji M, Umeda F, Nawata H. Effect of dehydroepiandrosterone on glucose uptake in cultured rat myoblasts. *Horm Metab Res.* 1995;27(11):491-494.
- Nakashima N, Haji M, Sakai Y, Ono Y, Umeda F, Nawata H. Effect of dehydroepiandrosterone on glucose uptake in cultured human fibroblasts. *Metabolism.* 1995b;44(4):543-8.
- Nestler JE, Barlascini CO, Clore JN, Blackard WG. Dehydroepiandrosterone reduces serum low density lipoprotein levels and body fat but does not alter insulin sensitivity in normal men. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1988;66(1):57-61.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A Rapid and Simple Method for Measuring Thymocyte Apoptosis by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry. *J Immunol Meth.* 1991;139(2):271-279.
- Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA et al. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development.* 1996;122(3):983-995.
- Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *The EMBO journal.* 1993;12(11):4251-4259.
- Olson LK, Sharma A, Peshavaria M, Wright CV, Towle HC, Rodertson RP et al. Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. *PNAS.* 1995;92(20):9127-9131.
- Orci L. The insulin factory: a tour of the plant surroundings and a visit to the assembly line. The Minkowski lecture 1973 revisited. *Diabetologia.* 1985;28(8):528-546.
- Permutt MA, Wasson J, Cox N. Genetic epidemiology of diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115(6):1431-1439.
- Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000;106(2):165-169.
- Pørksen N, Hussain MA, Bianda TL, Nyholm B, Christiansen JS, Butler PC et al. IGF-I inhibits burst mass of pulsatile insulin secretion at supraphysiological and low IGF-I infusion rates. *Am J Physiol.* 1997;272(3 Pt 1):E352-358.
- Porzio O, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Accili D, Lauro R et al. The Gly972-->Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Clin Inves.* 1999;104(3):357-364.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 1998;92(6):829-839.

Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.* 2003;24(1):78-90.

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

Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends in Cell Biology.* 2002;12(2):65-71.

Schriock ED, Buffington CK, Hubert GD, Kurtz BR, Kitabachi AE, Buster JE et al. Divergent correlations of circulating dehydroepiandrosterone sulfate and testosterone with insulin levels and insulin receptor binding. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1988;66(6):1329-1331.

Schwartz AG, Pashko L, Whitcomb JM. Inhibition of tumor development by dehydroepiandrosterone and related steroids. *Toxicol Pathol.* 1986;14(3):357-362.

Shilkaitis A, Green A, Punj V, Steele V, Lubet R, Christov K. Dehydroepiandrosterone inhibits the progression phase of mammary carcinogenesis by inducing cellular senescence via a p16-dependent but p53-independent mechanism. *Breast Cancer Res.* 2005;7(6):R1132-R1140.

Shima K, Morishta S, Sawazaki N, Tanaka R, Tarui S. Failure of exogenous insulin to inhibit insulin secretion in man. *Horm Metab Res.* 1977;9(6):441-443.

Shimokata H, Tobin JD, Muller DC, Elahi D, Coon PJ, Andres R. Studies in the distribution of body fat: I. Effects of age, sex, and obesity. *Journal of Gerontology.* 1989;44(2):M66-M73.

Slack JMW. Developmental biology of the pancreas. *Development.* 1995;121(6):1569-1580.

Song XM, Kawano Y, Krook A, Ryder JW, Efendic S, Roth RA et al. Muscle Fiber Type-Specific Defects in Insulin Signal Transduction to Glucose Transport in Diabetic GK Rats. *Diabetes.* 1999;48(3):664-670.

Stagner J, Samols E, Polonsky K, Pugh W. Lack of direct inhibition of insulin secretion by exogenous insulin in the canine pancreas. *J Clin Invest.* 1986;78(5):1193-1198.

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature.* 1991;352(6330):73-77.

Sun XJ, Wang LM, Zhang Y. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. *Nature.* 1995;377(6545):442-446.

- Taguchi T, Takao T, Iwasaki Y, Nishiyama M, Asaba K, Hashimoto K. Suppressive effects of dehydroepiandrosterone and the nuclear factor-kappaB inhibitor parthenolide on corticotroph tumor cell growth and function in vitro and in vivo. *J Endocrinol*. 2006;188(2):321-331.
- Tchernof A, Després JP, Bélanger A, Dupont A, Prud'homme D, Moorjani S et al. Reduced testosterone and adrenal C19 steroid levels in obese men. *Metabolism*. 1995;44(4):513-519.
- Tchernof A, Labrie F. Dehydroepiandrosterone, obesity and cardiovascular disease risk: a review of human studies. *Eur J Endocrinol*. 2004;151(1):1-14.
- Terauchi Y, Takamoto I, Kubota N, Matsui J, Suzuki R, Komeda K et al. Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory β cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2007;117(1):246-257.
- Tuttle RL, Gill NS, Pugh W, Lee JP, Koeberlein B, Furth EE et al. Regulation of pancreatic β -cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKB α . *Nat Med*. 2001;7(10):1133-1137.
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*. 2000;346(Pt3):561-576.
- Velloso LA, Carneiro EM, Crepaldi SC, Boschero AC, Saad MJA. Glucose- and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and its primary substrates IRS-1 and IRS-2 in rat pancreatic islets. *FEBS Letters*. 1995;377(3):353-357.
- Villareal DT, Holloszy JO. Effect of DHEA on abdominal fat and insulin action in elderly women and men: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;292(18):2243-2248.
- Yen TT, Allan JA, Pearson DV, Acton JM, Greenberg MM. Prevention of obesity in Avy/a mice by dehydroepiandrosterone. *Lipids*. 1977;12(5):409-413.
- Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C. Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol*. 1996;10(11):1327-1334.
- Watada H, Kajimoto Y, Umayahara Y, Matsuoka T, Kaneto H, Fujitani Y et al. The Human Glucokinase Gene β -Cell-Type Promoter: An Essential Role of Insulin Promoter Factor 1/PDX-1 in Its Activation in HIT-T15 Cells. *Diabetes*. 1996;45(11):1478-1488.
- Welsh M, Welsh N, Bendtzen K, Mares J, Strandell E, Oberg C et al. Comparison of mRNA contents of interleukin-1 beta and nitric oxide synthase in pancreatic islets isolated from female and male nonobese diabetic mice. *Diabetologia*. 1995;38(2):153-160.
- White MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem*. 1998;182(1-2):3-11.

- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27(10):1047-1053.
- Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. 1998;391(6670):900-904.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and function through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 1999;98(1):115-124.
- Xilouri M, Avlonitis N, Calogeropoulou T, Papazafiri P. Neuroprotective effects of steroid analogues on P19-N neurons. *Neurochem Int*. 2007;50(4):660-670.
- Xu GG, Gao ZY, Borge PD Jr, Wolf BA. Insulin receptor substrate 1-induced inhibition of endoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake in beta-cells. Autocrine regulation of intracellular Ca^{2+} homeostasis and insulin secretion. *J Biol Chem*. 1999;274(25):18067-18074.
- Yapanoglu T, Aksoy Y, Gursan N, Ozbey I, Ziypak T, Calik M. Antiapoptotic effects of dehydroepiandrosterone on testicular torsion/detorsion in rats. *Andrologia*. 2008;40(1):38-43.
- Zimmet P, Alberti KGMM, Shaw J. Global and Societal Implications of the Diabetes Epidemic. *Nature*. 2001;414(6865):782-787.

ANEXOS

Anexo 1 – Secreção estática de insulina estimulada por glicose em ilhotas cultivadas por 24 horas com ou sem DHEA. Soro Fetal Bovino tratado com carvão ativado conforme descrito em Material e Métodos. Grupos de 5 ilhotas foram incubadas por 60 minutos com meio de Krebs-bicarbonato contendo glicose nas concentrações de 2.8 e 11.1 mM. As ilhotas foram lavadas com Krebs-bicarbonato após o cultivo, antes da realização do experimento de secreção. Alíquotas do sobrenadante foram submetidas a técnica de radioimunoensaio para quantificação dos níveis de insulina conforme descrito em Material e Métodos. Resultados apresentados como média $\pm$ EPM de 3 experimentos distintos.

* $p < 0,05$ em relação a 2.8 mM de glicose.

Anexo 2 – Secreção estática de insulina estimulada por glicose em ilhotas cultivadas por 72 horas com ou sem DHEA. Grupos de 5 ilhotas foram incubados por 60 minutos com meio de Krebs-bicarbonato contendo glicose nas concentrações de 2.8 e 11.1 mM, em quadruplicatas. As ilhotas foram lavadas com Krebs-bicarbonato após o cultivo, antes da realização do experimento de secreção. Alíquotas do sobrenadante foram submetidas a técnica de radioimunoensaio para quantificação dos níveis de insulina conforme descrito em Material e Métodos. Resultados apresentados como média $\pm$ EPM de 2 experimentos distintos. * $p < 0,01$ em relação ao controle 2,8mM de glicose.