

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



SILVANA QUALLIO

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO E PLASTICIDADE CELULAR DE ILHOTAS PANCREÁTICAS EM MODELO DE RESISTÊNCIA À INSULINA INDUZIDA POR DEXAMETASONA EM RATOS

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

SILVANA QUALLIO

por Roberto Bosqueiro

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de mestrado apresentada
ao Instituto de Biologia para obtenção
do Título de Mestre em Biologia
Funcional e Molecular, na área de
Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO BOSQUEIRO

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Q25a	<p>Quallio, Silvana Avaliação da função e plasticidade celular de ilhotas pancreáticas em modelo de resistência induzida por dexametasona em ratos / Silvana Quallio. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientador: José Roberto Bosqueiro. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Resistência à insulina. 2. Langerhans, Ilhotas de. 3. Dexametasona. I. Bosqueiro, José Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
------	--

Título em inglês: Evaluation of the role and cellular plasticity of pancreatic islets in a model of insulin resistance induced by dexamethasone in rats.

Palavras-chave em inglês: Insulin resistance; Islands of Langerhans; Dexamethasone.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: José Roberto Bosqueiro, Everardo Magalhães Carneiro, Silvana Auxiliadora Bordin da Silva.

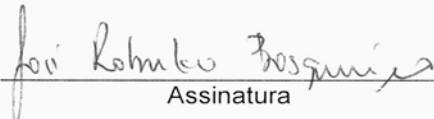
Data da defesa: 11/08/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.


Campinas, 11 de agosto de 2008

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva


Assinatura

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro


Assinatura

Prof. Dr. Kleber Luiz de Araújo e Souza

Assinatura

Profa. Dra. Eliana Pereira de Araújo

Assinatura

Aos meus pais e irmãos pelo amor, compreensão e apoio.
Dedico-lhes este trabalho.

Agradecimentos

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste estudo. Tenho certeza de que a colaboração de cada um foi imprescindível para a elaboração e execução bem sucedidas deste trabalho. Agradeço em especial:

A Deus, por me conceder a oportunidade de aprofundar meus estudos. Por me fortalecer e estar ao meu lado, iluminando meu caminho, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais e irmãos pela ajuda incondicional.

Ao professor orientador José Roberto Bosqueiro pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Aos professores do departamento que sempre se mostraram prestativos e acessíveis nos momentos de dúvidas.

A Fátima e família pela acolhida e pelo carinho.

A Rosane pela amizade, confiança e por estar presente em todos os momentos.

A todos os meus amigos, pela amizade, força, companheirismo e incentivo.

Ao Alex pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de pâncreas endócrino e metabolismo da unicamp e LAFIPE da unesp-Bauru pela ajuda nos experimentos, companheirismo, amizade, e ensinamentos.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica.

Ao prof. Dr. Gerson Francisco de Assis e a Tânia Maria Cestari, (USP-Bauru), pelo apoio técnico, receptividade e permissão para uso de equipamentos.

A família Alves Fernandes pela hospedagem nesses últimos meses, pelo carinho e apoio.

A CAPES, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
Resumo	xii
Abstract.....	xivv
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	9
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO	38
CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus centígrados

µg – micrograma

µl – microlitro

µM – micromolar

ANOVA – análise de variância

ADP – adenosina difosfato

AMPcíclico – monofosfato de adenosina cíclico

ATP – trifosfato de adenosina

Ca²⁺ – cálcio

Cch – carbacol

CDK4 – cinase dependente de ciclina-4

DAG – diacilglicerol

DDT – ditioneitol

DEPC – dietil pirocarbonato

dl – decilitro

DMSO – dimetil sulfóxido

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EPM – erro padrão da média

Forsk – forskolin

GC – glicocorticóides

GR – receptores de glicocorticóides

GTT – Teste de tolerância à glicose

IP3 – inositol 1,4,5 trifosfato

ITT – teste de tolerância à insulina

K⁺ – potássio

KCl – Cloreto de potássio

kDA – quilodalton

kITT – Constante de decaimento de glicose

KOH – hidróxido de potássio

mg – miligrama

min – minuto

ml – mililitro

mM – milimolar

PBS – tampão fosfato salina

PI3-cinase – fosfatidilinositol 3-cinase

PKA – proteína cinase A

PKC – proteína cinase C

PMA – phorbol 12-myristate-13-acetate

PMSF – fluoreto de fenilmetil sulfonila

RIA – radioimunoensaio

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

SDS – duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio

Tris – tri(hidroximetil)-aminometano

TBE – tris borato EDTA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Peso dos animais durante o tratamento com dexametasona.....	22
Figura 2 – Teste de tolerância à glicose e à insulina.....	24
Figura 3 – Secreção de insulina por ilhotas de ratos na presença de 2.8, 5.6; 8.3; e 16.7mM de glicose.....	25
Figura 4 – Secreção de insulina por ilhotas de ratos em presença de 5.6 mM de glicose e PMA, Cch e Forsk	26
Figura 5 – Secreção de insulina por ilhotas de ratos em presença de 2.8mM de glicose e arginina, leucina e KCl.....	27
Figura 6 – Hipertrofia adaptativa de ilhotas pancreáticas de ratos.....	28
Figura 7 – Aumento de densidade de ilhotas e porcentagem de células β	29
Figura 8 – Expressão de proteínas relacionadas ao controle do ciclo Celular.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso de órgãos em g/kg de peso corpóreo.....	21
Tabela 2 – Parâmetros sanguíneos e sérico e glicogênio hepático.....	22

Resumo

Introdução e objetivos: O aumento nos níveis de glicose circulante é o principal estímulo para a secreção de insulina. A insulina se liga a receptores de membrana desencadeando diversas respostas celulares. Qualquer alteração na sensibilidade à insulina pode levar a disfunções fisiológicas como a resistência à insulina observada em pacientes diabéticos tipo 2 (T2DM). Experimentalmente, essa condição patológica pode ser mimetizada pela administração de altas doses de glicocorticóides, provendo assim um bom modelo para seu estudo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a plasticidade das ilhotas pancreáticas submetidas à variação na necessidade secretória de insulina por indução de resistência periférica ao hormônio por tratamento com dexametasona e posterior interrupção do tratamento. **Métodos:** Ratos wistar com 90 dias de vida foram tratados com dexametasona (1mg/kg, ip) por 5 dias consecutivos (DEX). Em outro grupo (DEX₁₀), os animais foram tratados da mesma maneira e avaliados 10 dias após o último dia da administração de dexametasona. Ratos controle (CTL) receberam administração de NaCl 0,9% apenas. As ilhotas foram isoladas pelo método da colagenase. A expressão de proteínas foi feita por *immunoblotting*. As análises morfométricas foram realizadas microscopicamente. **Resultados:** O grupo DEX exibiu marcante resistência periférica à insulina, que foi revertida após o período de 10 dias no grupo DEX₁₀. As ilhotas do grupo DEX apresentaram alterações funcionais e morfológicas como aumento da secreção de insulina estimulada por secretagogos, da área, da densidade e tendência de aumento na massa de células β ao contrário do grupo DEX₁₀. O conteúdo de proteínas relacionadas ao ciclo celular como a CD2 e CDK4 e

a fosforilação da AKT aumentou em ilhotas do grupo DEX, mas retornou aos níveis do CTL em ilhotas DEX₁₀. **Conclusão:** Estes resultados mostram a plasticidade do pâncreas endócrino haja vista a habilidade de se adaptar a situações que exigem maior ou menor demanda de insulina.

Abstract

Introduction and aims: Insulin binds to plasma membrane receptors leading to a variety of cellular responses. Malfunction in any of the insulin cell signalling pathways in target tissues may lead to several conditions and diseases, like hyperglycemia, insulin resistance and type 2 diabetes mellitus (T2DM). These effects may be experimentally reproduced using high doses of glucocorticoids, providing thus a good model for the study of T2DM. The aims of this study were to evaluate the plasticity of pancreatic islets subject to variation on the need for insulin secretory induction of peripheral resistance to the hormone by treatment with dexamethasone and subsequent treatment interruption. **Methods:** Male wistar rats (90 days old) were treated with dexamethasone (1mg/kg, ip) for 5 consecutive days (DEX). In another group (DEX₁₀), the animals were treated in the same way and assessed 10 days after the last day of administration. Control rats (CTL) received equivalent volume of vehicle. Protein expression was assayed through immunoblotting. Morphometric analyses were done using a optical microscope and specific digital analysis programs. **Results:** DEX group showed marked peripheral insulin resistance, reverted after the recovering period in the DEX₁₀ group. DEX islets showed functional and morphological changes, like increased insulin secretion, superficial area, population density, and a tendency for increase in the total mass content of beta cell. Cell cycle proteins CD2 and CDK4 and AKT phosphorylation were increased in the DEX group when compared to CTL group. All these effects were reverted in the group DEX₁₀. **Conclusions:** These results show that the endocrine pancreas

possess a plasticity regarding the capacity of pancreatic islets to adapt themselves to situations where a higher or lower demand for insulin is needed.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1- Secreção de Insulina

As ilhotas de Langerhans são constituídas de agrupamentos celulares, muito vascularizadas, distribuídas por todo pâncreas. Estes microórgãos sintetizam e secretam diferentes hormônios, entre eles a insulina, encarregada de regular a homeostase glicêmica. Portanto, qualquer déficit na secreção ou alteração da ação da insulina interfere na utilização da glicose e pode induzir aumento dos níveis de glicose sanguínea e, em estágios avançados, *Diabetes Mellitus* (Kahn, 2003).

A síntese e secreção de insulina são processos complexos regulados por inúmeros fatores. Entre os estimuladores mais importantes estão alguns nutrientes como a glicose e os aminoácidos, hormônios, neurotransmissores além de agentes farmacológicos. Há, portanto, controle multifatorial sobre as células β pancreáticas que determina a secreção deste hormônio em quantidade e tempo adequados, regulando perfeitamente os níveis de nutrientes no sangue em diferentes situações fisiológicas (Gao *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). A glicose, transportada para a célula β pancreática através do transportador de glicose tipo 2 (GLUT-2) localizado na membrana plasmática, é metabolizada dentro destas células desencadeando aumento na concentração de ATP. O aumento da razão ATP/ADP no interior da célula promove fechamento de canais de K^+ sensíveis a ATP impedindo o efluxo desse íon, e causa despolarização da membrana com posterior abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem. Em seguida há influxo e aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) com subsequente ativação da maquinaria secretória.

Esta ativação resulta na extrusão dos grânulos e liberação de insulina para o meio extracelular, atingindo a corrente sanguínea (Draznin, 1998). Um efeito secundário da elevação do ($[Ca^{2+}]_i$) é a ativação da adenilil ciclase e fosfolipase C (PLC) que, agindo sobre substratos específicos, geram AMP cíclico (AMPc), diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP3) (Ganesan, 1992; Zawalich, 1996).

2- Glicocorticóides

Os glicocorticóides (GC) são conhecidos por seus efeitos antiinflamatórios e imunossupressores. Esses efeitos são mediados pela ligação do receptor de glicocorticóide intracelular (GR), que permanece na forma inativa em diversas células (Buttgereit *et al.*, 1998). Após interação com o hormônio, o complexo hormônio-GR é direcionado ao núcleo, onde se liga a seqüências específicas, denominadas de elementos responsivos aos glicocorticóides (GREs). Estes GREs podem ser elementos repressivos (nGRE) ou estimuladores (pGRE) da expressão gênica de genes ligados ao metabolismo, bem como de proteínas relacionadas a processos inflamatórios e respostas imunes (Riccardi *et al.*, 1999). De acordo com Amsterdam (2002) os GC podem induzir apoptose em células hematopoiéticas, como monócitos, macrófagos e linfócitos T que estão diretamente envolvidos nos processos inflamatórios. Porém, em algumas células (células epiteliais da glândula mamária, células foliculares do ovário, hepatócitos e fibroblastos) os GC protegem contra a morte celular programada, através da modulação de genes envolvidos no processo de sobrevivência como Bcl-2, Bcl-xl e NFkB.

3- Glicocorticóides e secreção de insulina

Os GC são hormônios com atividade hiperglicemiante importante por exercerem efeitos sobre a homeostasia celular tanto em condições normais quanto patológicas (Strack *et al.*, 1995). Os GC e seus análogos sintéticos, como a dexametasona, produzem inúmeros efeitos dependentes da concentração e tempo em que são administrados. Em algumas condições onde há excesso de GC endógeno ou exógeno observa-se hiperglicemia, resistência periférica à insulina e hiperinsulinemia (Lenzen *et al.*, 1984). Esse quadro é resultado da adaptação de diversos órgãos como pâncreas, fígado, tecido adiposo e o músculo em resposta a administração de GC. Recentemente, a identificação do receptor de GC em células β pancreáticas sugere efeito direto sobre a secreção de insulina e transcrição gênica, estimulando ou reprimindo a expressão de alguns genes (Jeong *et al.*, 2001).

A resistência periférica à insulina devido ao excesso de GC está bem documentada em pacientes com síndrome de Cushing (Nosadini *et al.*, 1983). Os GC estimulam a produção hepática de glicose, síntese muscular e hepática de glicogênio e resistência periférica à insulina provavelmente por diminuição da fosforilação em tirosina do receptor de insulina (Ruzzin *et al.*, 2005). A resistência à insulina induzida pela dexametasona promove aumento da massa de células β através de hipertrofia e neogênese celulares, para fazer frente à demanda aumentada de insulina. Esta alteração previne temporariamente a progressão da resistência periférica à insulina para o quadro de diabetes não controlado (Choi *et al.*, 2006).

Os GC são amplamente utilizados na prática clínica, por sua ação antiinflamatória e imunossupressora. Entretanto, a terapia crônica com este

hormônio está associada a efeitos colaterais como dislipidemia, hipertensão resistência periférica à insulina. Ainda, dependendo da dose e tempo de tratamento, podem causar ou agravar o diabetes tipo 2 (Buckingham, 2006).

Durante a resistência à insulina associada a obesidade (Holness *et al.*, 2005; Prada *et al.*, 2005) ou induzida por tratamento com glicocorticóide (Andrew, Walker, 1999), são observados normoglicemia ou moderada hiperglicemia de jejum juntamente com hiperinsulinemia. Resistência à insulina induzida pela dexametasona está geralmente associada ao aumento compensatório da massa de células β (Ogawa *et al.*, 1992; Rafacho, 2007), aumento do conteúdo total de insulina no pâncreas (Bonner-Weir *et al.*, 1981) e aumento da secreção de insulina estimulada por glicose (Novelli *et al.*, 1999). Em contraste, no diabetes tipo 2 induzido por GC, marcante hiperglicemia de jejum é observada juntamente com redução dos níveis de insulina sérica (Efendic, Luft, Wajngot, 1984), redução do conteúdo total de insulina, da expressão do RNAm da insulina (Toriumi, Imai, 2003) e, especialmente, diminuição da secreção de insulina induzida por glicose *in vivo* (Ohneda *et al.*, 1993), bem como *in vitro* (Gremlich, Roduit, Thorens, 1997).

4- Resistência à insulina e plasticidade de ilhotas pancreáticas

A consequência mais direta da resistência à insulina é o aumento dos níveis glicêmicos. Indiretamente observa-se, de maneira importante, aumento de triglicerídeos e diminuição do colesterol HDL. Na presença da resistência à insulina os tecidos ficam menos responsivos à ação desse hormônio e, como mecanismo compensatório, o pâncreas secreta maiores quantidades de insulina. A

hiperinsulinemia compensatória ajuda a manter os valores glicêmicos dentro de valores normais para o organismo.

Durante muito tempo acreditou-se que a massa de células β seria fixa. Porém, nas últimas décadas evidências têm mostrado claramente que a massa de células β é dinâmica e tem grande capacidade de adaptação a fim de manter os valores de glicose controlados. Esta habilidade em aumentar ou diminuir a quantidade de células é denominada plasticidade da massa de células β (Prato *et al.*, 2004). As células β respondem à mudanças periféricas que exigem alteração na demanda de insulina para manter a homeostase glicêmica. A presença de resistência periférica à insulina em indivíduos obesos normoglicêmicos resulta em aumento de 150% na massa de células β em relação aos indivíduos magros (Vinik *et al.*, 1996). A hiperglicemia é um potente estimulador da secreção de insulina e está associada à hipertrofia e hiperplasia das células β . Entretanto, a exposição prolongada a altas concentrações de glicose tem efeito deletério sobre as células β (Bernard-Kargar, Ktorza, 2001).

As alterações da massa de células β são particularmente importantes e observadas durante gravidez e na obesidade (Parsons, 1992; Prada *et al.*, 2005). O controle da massa de células β depende do balanço entre proliferação, crescimento e morte celular (Finegood *et al.*; 1995). Estudos mostram que 48h de infusão de glicose (22mM) promove aumento da massa de células β em ilhotas pancreáticas de ratos. Neste modelo, ratos submetidos ao aumento abrupto na glicemia requerem rápido aumento na secreção de insulina para manter os níveis de glicose adequados. Após 48h de infusão de glicose a área das células β aumenta

significativamente, provavelmente por hipertrofia. Também ocorre aumento da massa e porcentagem de células β . Sete dias após o término da infusão de glicose a área, massa e porcentagem de células β são similares ao grupo controle (Bernard *et al.*, 1999). Isso demonstra que a massa de células β pode aumentar rapidamente mostrando a plasticidade do pâncreas endócrino e sua capacidade regenerativa no animal adulto.

No animal adulto normal a reposição da população de células β ocorre num ritmo de cerca de 2 a 3% ao dia (Swenne, 1983). O aumento da massa de ilhota ocorre por aumento do tamanho da ilhota ou por formação de novas ilhotas (Skau *et al.*; 2001). Na presença de obesidade observa-se resposta compensatória pelo aumento da secreção de insulina e da massa de células β (Klöppel, 1985). Em ratas prenhes foi observado aumento do número de células β e hipertrofia celular. Em mulheres grávidas também foi observado aumento no tamanho da ilhota e hiperplasia das células β (Bouwens, Rooman, 2005; Van Assche *et al.*, 1978). Após o nascimento há uma rápida diminuição da massa de células β em ratos, acompanhada de diminuição na replicação e tamanho das células e aumento no percentual de apoptose (Scaglia, 1995).

A proliferação de células β é o fator predominante na manutenção de sua massa. Com o aumento do conteúdo de ciclinas D1 e D2, após estímulos mitogênicos, ocorre aumento da ativação da proteína cinase dependente de ciclina-4 (CDK4). A CDK4 fosforila a proteína retinoblastoma (Rb) e esta, na forma fosforilada ou multifosforilada, se desacopla do fator de iniciação de transcrição 2 (e2F) e este por sua vez ativa a expressão gênica de componentes necessários para a execução

da divisão celular (Cozar-Castellano *et al.*, 2004). As ciclinas do tipo D e as CDK4/6 são proteínas essenciais durante o controle do ciclo celular na fase de transição G1/S (Martin *et al.*, 2003). A proteína cinase de serina-treonina (AKT) induz proliferação das células β através da modulação das ciclinas D1 e D2, o que resulta na ativação da CDK4. Camundongos transgênicos que super expressam AKT em células β pancreáticas apresentam aumento de massa destas células, mediado pelo aumento da proliferação e tamanho das mesmas (Fratai *et al.*, 2006).

Em resumo, estes resultados mostram a capacidade das células β em aumentarem ou diminuírem sua massa de acordo com a necessidade metabólica, utilizando-se de mecanismos de replicação e de morte celular programada. Assim, mantêm os níveis de glicose sangüínea sempre ajustados frente a inúmeras condições ambientais em que o organismo se encontra.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Avaliar a plasticidade das ilhotas pancreáticas submetidas à variação na necessidade secretória de insulina por indução de resistência periférica ao hormônio por tratamento com dexametasona e posterior interrupção do tratamento.

1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a concentração plasmática de glicose e sérica de insulina durante o estado alimentado e no jejum;
- Observar a sensibilidade periférica à glicose e/ou à insulina por meio do teste de tolerância à glicose e à insulina, respectivamente, em animais controle, tratados com dexametasona e após 10 dias do término do tratamento;
- Avaliar a secreção de insulina na presença de várias concentrações de glicose, L-leucina e de agentes potencializadores e despolarizantes (PMA, forskolin, carbacol, KCl, arginina) em ilhotas pancreáticas isoladas dos grupos em estudo;
- Analisar a morfologia da ilhota e determinar a área e densidade de ilhotas pancreáticas, bem como a massa de células β nos grupos estudados;
- Quantificar a expressão protéica de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular em ilhotas pancreáticas dos grupos em estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos provenientes do CEMIB - UNICAMP, Campinas, SP. Os animais foram mantidos sob temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12 horas) controlados, tendo livre acesso à ração e água por todo período experimental. Aos 90 dias de vida os animais foram divididos em três grupos:

- 1) **Controle (CTL)**: animais tratados com salina por 5 dias consecutivos (1ml/kg, peso corpóreo) via intraperitoneal (ip).
- 2) **Dexametasona (DEX)**: ratos tratados com injeção ip durante 5 dias consecutivos com 1mg/kg de fosfato de dexametasona (Decadron®) diluída em salina.
- 3) **Dexametasona 10 (DEX10)**: animais que receberam injeções ip de 1mg/kg por 5 dias e analisados 10 dias após o término do tratamento.

O tratamento foi realizado diariamente entre as 7:30 – 8:30h. Passado este período os ratos foram mortos por exposição à CO_2 , seguido por decapitação. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

2- Parâmetros Metabólicos e Bioquímicos

2.1- Parâmetros Gerais

O peso corporal dos grupos em estudo foi monitorado durante o período de tratamento.

Ao final do período experimental (morte dos animais) as glândulas adrenais, fígado, baço, rins e gorduras retroperitoneais foram retirados e pesados.

2.2- Glicemia e Insulinemia

A concentração de glicose plasmática foi verificada pelo sistema de fitas (monitor digital) “one touch” (Johnson & Johnson) a partir de sangue retirado da cauda.

Ao final do período experimental, após a decapitação, o sangue foi coletado em tubo de ensaio de vidro, previamente lavado com solução salina, e levado à estufa a 37°C por 1h para formação do precipitado (coagulação) e do soro. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1.500rpm por 10 min a 22°C (Eppendorf 5810R) e o soro foi armazenado a -20°C para posterior quantificação da insulina por RIA (Scott; Atwater; Rojas, 1981).

2.3- Glicogênio Hepático:

Amostras pesando entre 300 e 500mg de tecido hepático foram digeridas em solução de KOH 30% em tubos de ensaio em banho Maria fervente por 1h. Em seguida, foi acrescentado Na₂SO₄ e etanol. O material foi homogeneizado e conduzido ao banho Maria novamente por 15 segundos. Após centrifugação, o sobrenadante, contendo lípidos saponificados, aminoácidos, etc foi descartado e o “pellet” ressuspendido em água destilada quente. Etanol foi adicionado em seguida, homogeneizou-se o material e após novo aquecimento rápido em banho Maria o material foi centrifugado. Após diluição do precipitado em H₂O destilada, o conteúdo

de glicogênio foi quantificado por espectrofotometria em reação com reagente fenol (Lo; Russel; Taylor, 1970).

3-Teste de Tolerância à Glicose intraperitoneal (ipGTT)

Os animais dos grupos em estudo, após 12 horas de jejum, foram anestesiados com anestésico tiopental sódico (THIOPENTAX[®], 60mg/kg; peso corpóreo). Depois de ter verificado a ausência de reflexos pelo pinçamento entre os dedos da pata posterior, os ratos tiveram a extremidade da cauda seccionada para a coleta de sangue para a averiguação da glicemia de jejum (tempo 0). Em seguida, foi injetada, via ip, solução de glicose (2g/kg peso corpóreo) e a glicemia avaliada aos 30, 60, 90 e 120 min após a administração da glicose.

4-Teste de Tolerância à Insulina intraperitoneal (ipITT)

Os ratos, alimentados, foram anestesiados conforme descrito anteriormente. A glicemia foi avaliada no tempo 0, e em seguida solução de insulina humana recombinante (Biohulin[®]) equivalente 2U/kg de peso corpóreo foi injetada via ip. Depois da administração de insulina, amostras de sangue foram coletadas para avaliação da glicemia nos tempos: 10, 20, e 30 min. Ao final do experimento a constante de decaimento de glicose (K) foi calculada a partir do inclinação da linha de regressão obtida com valores de glicose log-transformadas entre 0 e 30min depois da administração da insulina.

5- Isolamento das Ilhotas, Conteúdo de Insulina e Protocolos de Secreção

Estática

As ilhotas foram isoladas pela digestão do pâncreas por colagenase como descrito (Lacy; Kostianovsky, 1967) com algumas modificações (Boschero; Delattre; Santos, 1980). O conteúdo de insulina das ilhotas foi determinado pela extração em solução ácido-álcool. Para incubação estática, grupos de 5 ilhotas foram primeiramente incubadas por 1 h a 37°C em solução Krebs-bicarbonato nas seguintes composições (em mM): 115 NaCl, 5 KCl, 2.56 CaCl₂, 1 MgCl₂, 24 NaHCO₃, 15 HEPES e 5.6 glicose, suplementada com 0.5% de albumina sérica bovina e equilibrada com mistura de 95% O₂ : 5% CO₂, pH 7.4. O meio foi então trocado com solução fresca contendo: 2.8, 5.6, 8.3, e 16.7 mM de glicose, 1 mM carbacol, 200nM PMA, 10µM Forskolin na presença de 5.6 mM de glicose, 20 mM arginina, 20 mM leucina, e 50 mM KCl (nos experimentos com 50 mM KCl, a concentração de NaCl foi diminuída proporcionalmente para manter a osmolaridade) na presença de 2.8 mM glicose no meio, e incubadas posteriormente por 1 h. Ao final da incubação as amostras foram armazenadas a -20°C para subsequente mensuração do conteúdo de insulina por RIA. A secreção foi normalizada pelo conteúdo total de insulina.

6- Identificação e Quantificação Protéica por “Immunobloting”.

As ilhotas foram homogeneizadas por sonicação (VirSoni 60) por 10 segundos em velocidade máxima em tampão de lise celular comercial (CellSignal). As amostras foram tratadas com tampão Laemmli contendo 10% de 2-beta mercaptoetanol, aquecidas em água fervente por 5 min. Alíquotas de 100µg de proteínas totais foram

aplicadas em SDS-PAGE (6-15% Tris-acrilamida) em aparelho minigel (Miniprotean) em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Após corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Esta foi incubada por 2 h em solução bloqueadora para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. A seguir as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-phospho-AKT (ser473) (p-AKT), anti-AKT, anti-Bax, anti-Bcl2, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), cyclin D₂ (CD₂) (Lab Vision Corporation (Fremont, CA, USA)), protein retinoblastome (pRb) (BD Bioscience, Mississauga, ON, CA), e proteína cinase dependente de ciclina-4 (CDK4) Abcam (Cambridge, MA, USA), por 12 hs. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (Sigma) por 2 hs. Após lavagem, as membranas foram incubadas em solução reveladora Super Signal (Pierce) e colocadas junto a filmes radiográficos (Kodak) para auto-radiografia. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria pelo programa Scion Image (Scion Corporation).

7- Morfologia, Estereologia e Morfometria das Ilhotas Pancreáticas

Para estudar a massa e a morfologia das ilhotas pancreáticas 5 pâncreas de cada grupo foram coletados e a gordura e linfonodos foram retirados, pesados e fixados em solução de Bouin por 12h, desidratados em uma série ascendente de etanol e incluídos em parafina. A intervalos de 250µm, cortes seriados (5µm) foram obtidos em micrótomo giratório e aderidos em lâminas de vidro individuais.

Imunoistoquímica: A distribuição celular para insulina foi feita usando método indireto padrão da imunoperoxidase. Após a remoção da parafina, as seções foram

reidratadas e a atividade endógena da peroxidase foi bloqueada com H₂O₂ a 1%. Após a lavagem com solução fosfato a 0.01M (PBS, pH 7.4) as seções foram tratadas com solução de citrato de Sódio a 0.01M (0.05% Tween 20, pH 6.0) em água fervente para recuperar a antigenicidade da insulina e incubada por 30 minutos com o PBS (0.05% Tween 20 e 5% de leite) seguido por incubação de 2 h com o anticorpo em temperatura ambiente. O anticorpo usado foi anti-insulina policlonal de coelho (Santa Cruz Biotechnology) diluído em 1:150 em PBS com 2% de leite. Depois das lavagens com PBS, as seções foram incubadas em temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos com LSAB (DakoCytomation) para insulina. As seções foram incubadas com solução estreptoavidina conjugada com peroxidase (LSAB) para insulina por 30 minutos. Os complexos biotina-estreptoavidina foram detectados com solução de diaminobenzidina (DAB) (0.1% DAB e 0.02% H₂O₂ em PBS). Finalmente, as seções foram coradas rapidamente com Hematoxilina e montadas para a observação microscópica.

Análise Quantitativa: Grupos de 1000 ilhotas, isoladas pela digestão da colagenase do pâncreas, foram coletados com uma pipeta de Pasteur e imediatamente fixadas em paraformaldeído 4%. As ilhotas íntegras foram coradas pela Reação de Feulgen para DNA (Mello, 1997). O perímetro (μm) foi obtido automaticamente pelo programa Image-Pro-Plus[®] Media Cybernetics acoplado em fotomicroscópio Olympus BX-60. As imagens das ilhotas coradas pelo método de Feulgen em bloc foram capturadas com Câmara CCD e destas imagens obteve-se, automaticamente os valores de área (μm^2).

8- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Análise de variância de 1 via (one way - ANOVA) seguido de post test Tukey utilizada para comparação múltipla. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1- Peso corpóreo e parâmetros metabólicos

O peso corpóreo dos animais foi acompanhado ao longo de todo o tratamento. Após o terceiro dia de administração de dexametasona houve redução significativa no peso corpóreo nos grupos DEX e DEX₁₀ comparados ao grupo CTL (Figura 1) ($n = 7$; $P < 0.05$). Redução adicional foi observada até o quinto dia do tratamento nestes grupos ($n = 7$; $P < 0.05$). O grupo DEX₁₀ apresentou ganho de peso corpóreo após a suspensão do tratamento como se observa a partir do sexto dia ($n = 7$, $P < 0.05$). Porém, até o dia do sacrifício ainda houve diferença significativa em relação ao grupo CTL Figura 1. O peso do baço ($n = 7$, $P < 0.05$), adrenais e gordura retroperitoneal apresentou redução significativa no grupo DEX quando comparado com o grupo CTL Tabela 2 ($n = 7$, $P < 0.05$). Entretanto, no grupo DEX₁₀ o valor médio referente a estes órgãos não exibiu diferença em relação ao grupo CTL indicando recuperação de massa (Tabela 1). Adicionalmente, foi observado aumento significativo no peso do fígado e dos rins nos ratos DEX comparado aos ratos CTL ($n = 7$, $P < 0.05$). Nos ratos DEX₁₀, houve restabelecimento da massa do fígado, mas não dos rins.

Tabela 1 Peso de órgãos relacionados ao metabolismo em g/kg de peso corpóreo em ratos DEX, DEX₁₀ e CTL.

	Adrenal	Fígado	Rim	Baço	Gordura Retroperitoneal
CTL	0,14 ± 0,004	31,2 ± 0,2	5,7 ± 0,08	2,5 ± 0,27	18,3 ± 1,9
DEX	0,11 ± 0,009 ^a	36,9 ± 1,4 ^a	6,8 ± 0,17 ^a	1,5 ± 0,14 ^a	12,1 ± 0,6 ^a
DEX ₁₀	0,13 ± 0,007	33,6 ± 1,0	6,2 ± 0,12 ^{ab}	2,2 ± 0,11	20,2 ± 3,1 ^b

Resultados representam média ± E.P.M. ^a diferença significativa vs. CTL e ^b vs. DEX. $P < 0.05$; $n = 7$. ANOVA com *post test* Tukey.

Animais resistentes à insulina (grupo DEX) mostraram aumento significativo nos níveis de glicose sanguínea comparado aos animais CTL ($n = 5$, $P < 0.05$) (Tabela 2). Após 10 dias do término do tratamento a glicemia retornou aos níveis do CTL no grupo DEX₁₀. Os níveis de insulina sérica de jejum e alimentado apresentaram aumento significativo nos ratos DEX em relação ao grupo CTL ($n = 5$, $P < 0.05$). Houve restabelecimento dos níveis de insulina em ambos estados alimentares após os 10 dias de interrupção do tratamento no grupo DEX₁₀. (Tabela 2). Aumento de 2,2 vezes no conteúdo de glicogênio hepático foi notado no grupo DEX em relação ao grupo CTL ($n = 5$, $P < 0.05$). No grupo DEX₁₀ o glicogênio hepático teve diminuição em relação aos grupos DEX e CTL, provavelmente um efeito rebote da retirada do estímulo.

Tabela 2 Parâmetros sanguíneos e séricos e glicogênio hepático nos grupos DEX, DEX₁₀ e CTL.

	Glicose jejum (mg/dl)	Insulina jejum (ng/ml)	Insulina alimentado (ng/ml)	Glicogênio hepático (mg/100mg de tecido)
CTL	79,2 ± 1,6	1,8 ± 0,1	3,4 ± 0,5	2,1 ± 0,1
DEX	112,4 ± 12,1 ^a	13,5 ± 1,2 ^a	29,5 ± 7,1 ^a	4,7 ± 0,1 ^a
DEX₁₀	71,8 ± 2 ^b	1,9 ± 0,4 ^b	4,1 ± 0,4 ^b	1,2 ± 0,1 ^{ab}

Resultados representam a média ± E.P.M. ^a diferença significativa vs. CTL e ^b vs. DEX. $P < 0.05$; $n = 5$. ANOVA com *post test* Tukey.

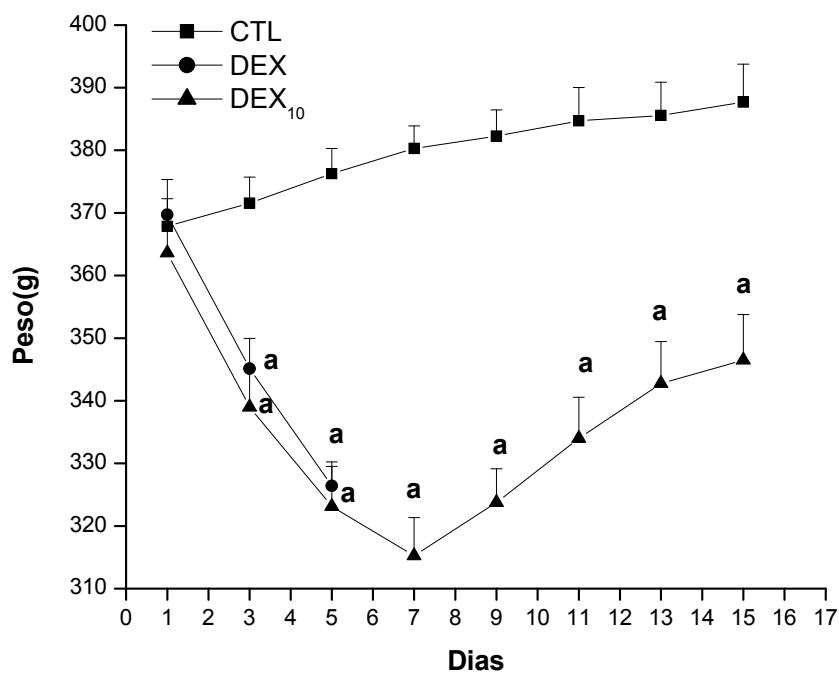


Figura 1 Após 48h do início do tratamento houve redução de peso corpóreo no grupo DEX e DEX₁₀. Embora os valores mantiveram-se significativamente diferentes em relação ao grupo CTL, os animais do grupo DEX₁₀ exibiram recuperação parcial como é observado pela tendência de recuperação do peso corpóreo até o dia do sacrifício. Resultados representam a média ± E.P.M. ^a diferença significativa vs. CTL. $P < 0.05$; $n = 10$. ANOVA com *post test* Tukey.

2- A sensibilidade à glicose e à insulina são restabelecidas após 10 dias da suspensão do tratamento com dexametasona

Os níveis de glicose sanguínea dos ratos DEX mantiveram-se significativamente elevados durante todos os pontos de coleta no protocolo de ipGTT em comparação aos níveis glicêmicos do CTL ($n = 7$, $P < 0.05$) (Figura 2A). Não obstante, a área sob a curva foi significativamente maior nos ratos DEX ($P < 0.05$) (Figura 2B). Os níveis de glicose sanguínea nos ratos do grupo DEX₁₀ foram similares aos do grupo CTL e não se notou diferença da área sob a curva dos pontos de glicose entre estes dois grupos. Finalmente, o grupo DEX mostrou redução de 32,4% na constante de decaimento da glicose sanguínea a se julgar pelo k_{ITT} obtido a partir dos níveis glicêmicos mensurados ao longo do experimento quando comparado ao grupo CTL ($n = 7$; $P < 0.05$) (Figura 2C e 2D). O grupo DEX₁₀ apresentou valores de constante de decaimento similares aos valores obtidos com os animais do grupo CTL.

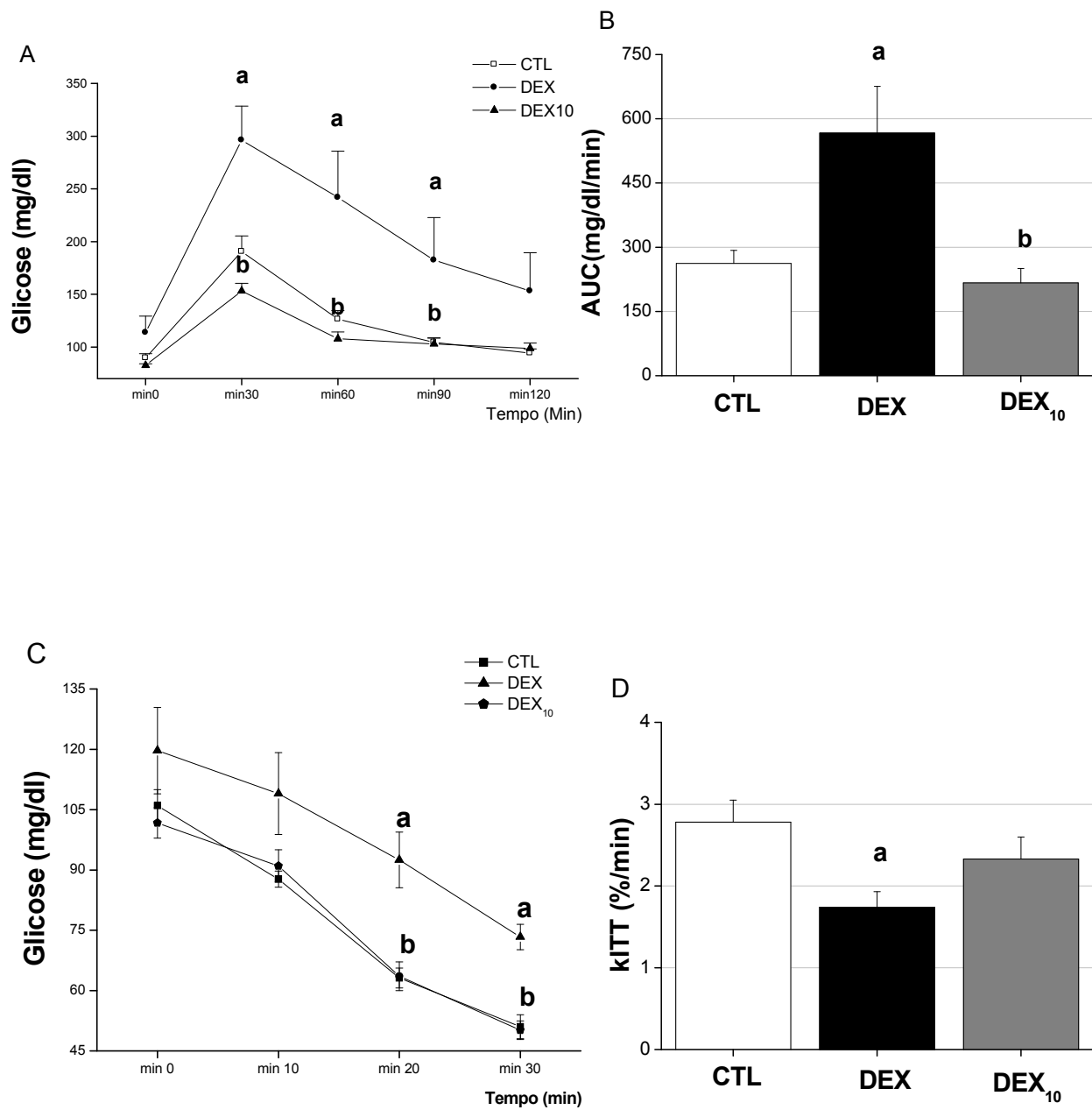


Figura 2 Perfil glicêmico obtido durante o ipGTT em ratos CTL, DEX e DEX₁₀. **(A)**. Área-sob-a-curva (AUC) **(B)**. Decaimento de glicose obtido durante o ipITT **(C e D)**. Resultados representam a média ± E.P.M. ^a diferença significativa vs. CTL e ^b vs. DEX. $P < 0.05$; $n = 7$. ANOVA com *post test* Tukey.

3- Restabelecimento do padrão de resposta à glicose após 10 dias da suspensão do tratamento com dexametasona

Como mostrado na figura 3, em concentração de glicose sub-estimulatória (2.8 mM), a secreção de insulina difere entre os grupos após normalização pelo conteúdo total de insulina. Em glicose 5.6, 8.3 e 16.7 mM, a secreção de insulina aumentou significativamente no grupo DEX (11.6, 6.6 e 1.7 vezes maior para 5.6, 8.3 e 16.7 mM respectivamente, comparado com CTL; $n = 12$, $P < 0.05$). Esses valores mostram aumento da responsividade à glicose nas ilhotas provenientes do grupo DEX comparadas ao grupo CTL em todas as concentrações de glicose analisadas. A resposta obtida com ilhotas de ratos DEX₁₀, entretanto, foi semelhante à das ilhotas do grupo CTL.

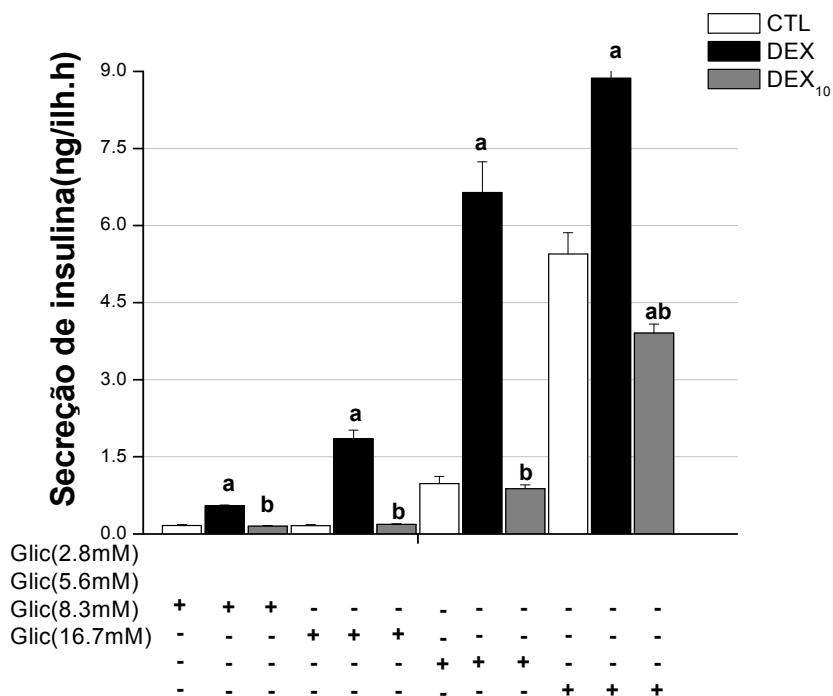


Figura 3 Secreção de insulina estimulada por glicose proveniente de ilhotas de ratos CTL, DEX e DEX₁₀. Os resultados representam média \pm E.P.M. ^a diferença significativa vs. CTL, ^b vs. DEX. $P < 0.05$; $n = 24$. ANOVA com *post test* Tukey.

4- Restabelecimento da secreção de insulina para PMA, carbacol e forskolin após 10 dias da suspensão do tratamento com dexametasona

A incubação de ilhotas do grupo DEX com PMA, carbacol e forskolin na presença de 5.6 mM de glicose levou a marcante aumento da secreção de insulina quando comparada ao grupo CTL ($n = 12$, $P < 0.05$) (Figura 4). O aumento foi de 6.6 vezes para PMA, 6.4 vezes para Cch e de 10.5 vezes para forskolin. Enquanto nas ilhotas do grupo DEX₁₀ observa-se restabelecimento integral da resposta quando comparada ao grupo CTL.

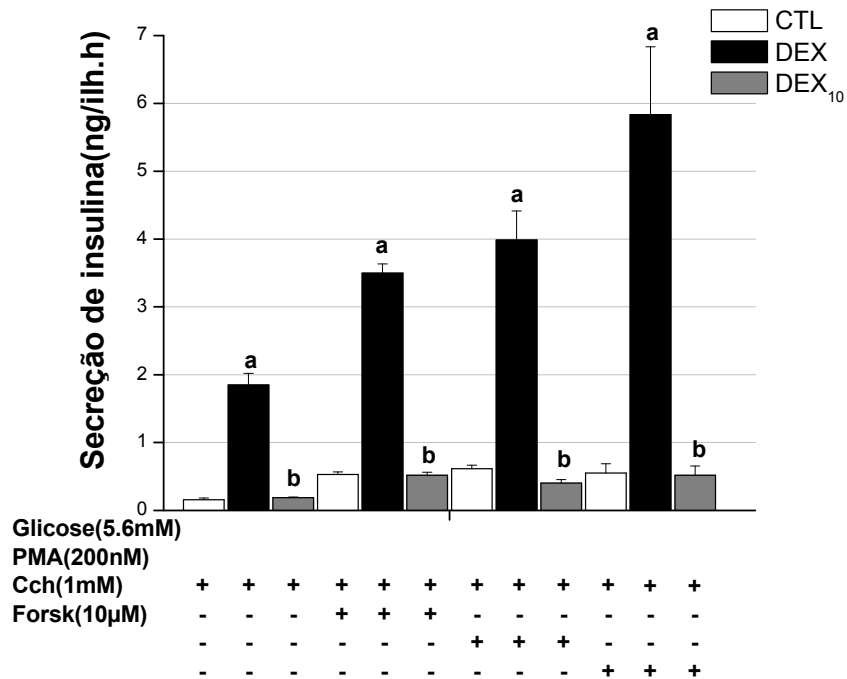


Figura 4 Secreção de insulina proveniente de ilhotas de ratos CTL, DEX e DEX₁₀ na presença de 5.6mM de glicose mais PMA 200nM, Cch 1mM e Forsk 10µM. Resultados representam a média \pm E.P.M. ^a diferença significativa vs. CTL, ^b vs. DEX. $P < 0.05$; $n = 12$. ANOVA com *post test* Tukey.

5- Restabelecimento da secreção de insulina estimulada por leucina, arginina e KCl após 10 dias da suspensão do tratamento com dexametasona

A figura 5 mostra marcante aumento da secreção de insulina pelas ilhotas do grupo DEX quando submetidas a incubação com arginina 20 mM, leucina 20 mM e KCl 50 mM na presença de 2.8 mM de glicose quando comparado com a secreção obtida em ilhotas do grupo CTL ($n = 12$, $P < 0.05$). O aumento foi de 1.7 vezes para leucina, 2.6 vezes para arginina e de 4.8 vezes para KCl. Como se observa, a resposta secretória a estes secretagogos nas ilhotas do grupo DEX₁₀ assemelha-se a resposta obtida no grupo CTL, demonstrando restabelecimento do padrão secretório neste grupo.

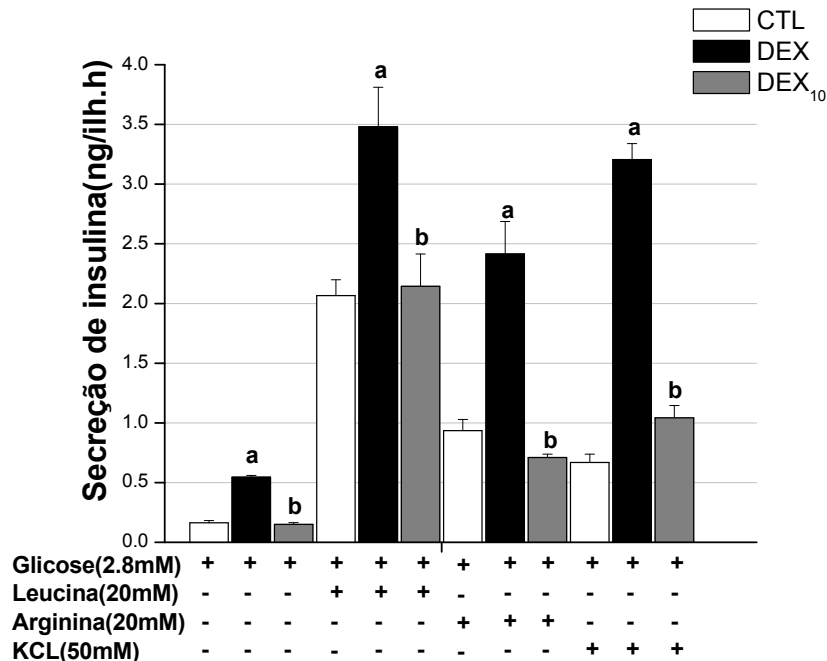


Figura 5 Secreção de insulina proveniente de ilhotas de ratos CTL, DEX e DEX₁₀. Ilhotas de ratos DEX, respondem a arginina 20 mM, a leucina 20 mM e a KCl 50 mM com aumento da secreção. Resultados representam a média \pm E.P.M. ^a diferença significativa vs. CTL, ^b vs. DEX. $P < 0.05$; $n = 12$. ANOVA com *post test* Tukey.

6- Hipertrofia das ilhotas presente na situação de resistência à insulina não é observada em ratos do grupo DEX₁₀

A área das ilhotas do grupo DEX exibiu aumento significativo de 87% quando comparado com os valores da área das ilhotas do grupo CTL ($n = 300$, $P < 0.05$) (Figura 6). Contudo, ilhotas do grupo DEX₁₀ exibiram valores similares ao observado no grupo CTL indicando claramente a plasticidade deste microórgão e a capacidade de se adaptar a diferentes condições de estado metabólico. Os valores foram de 9.846 ± 237 , 18.160 ± 423 e $9.727 \pm 239 \mu\text{m}^2$ para CTL, DEX e DEX₁₀, respectivamente.

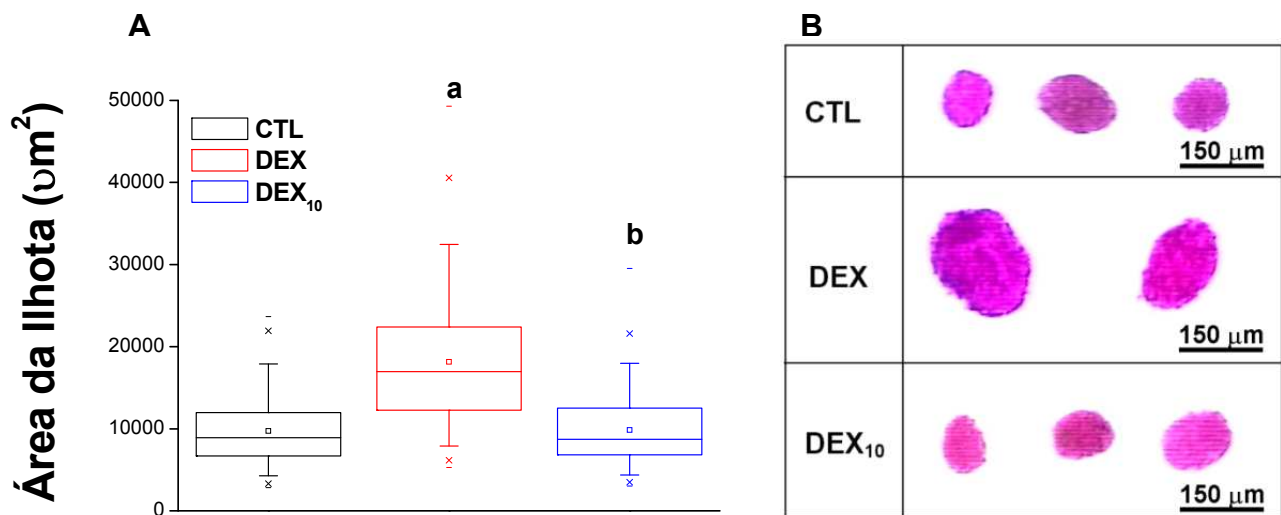


Figura 6 Hipertrofia adaptativa de ilhotas pancreáticas de ratos resistentes à insulina. **(A)** Gráfico do tipo “box chart”. **(B)** Imagens obtidas através de câmera CCD em aumento de 100x. Note hipertrofia das ilhotas DEX e restabelecimento deste parâmetro em ilhotas DEX₁₀. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos: ^a vs CTL; ^b vs DEX. $P < 0.05$; $n = 300$. ANOVA com *post test* Tukey.

7- Massa de células β apresentou tendência de aumento no grupo DEX

Houve aumento da densidade de ilhotas por área de pâncreas no grupo DEX quando comparada ao grupo CTL. (n = 5, P < 0.05) (Figura 7^a). 10 dias após interrupção do tratamento com a dexta (grupo DEX10) houve restabelecimento apenas parcial da densidade de ilhotas sem ocorrer, entretanto, diferença estatística com relação ao grupo CTL. A massa de células β apresentou tendência de aumento no grupo DEX, mas não ocorreu diferença estatisticamente significativa. Isto se deve provavelmente ao baixo número de amostras analisadas das análises (Figura 7B). Semelhante aos dados para densidade de ilhotas, também pareceu ocorrer apenas restabelecimento parcial da massa de células β no grupo DEX₁₀.

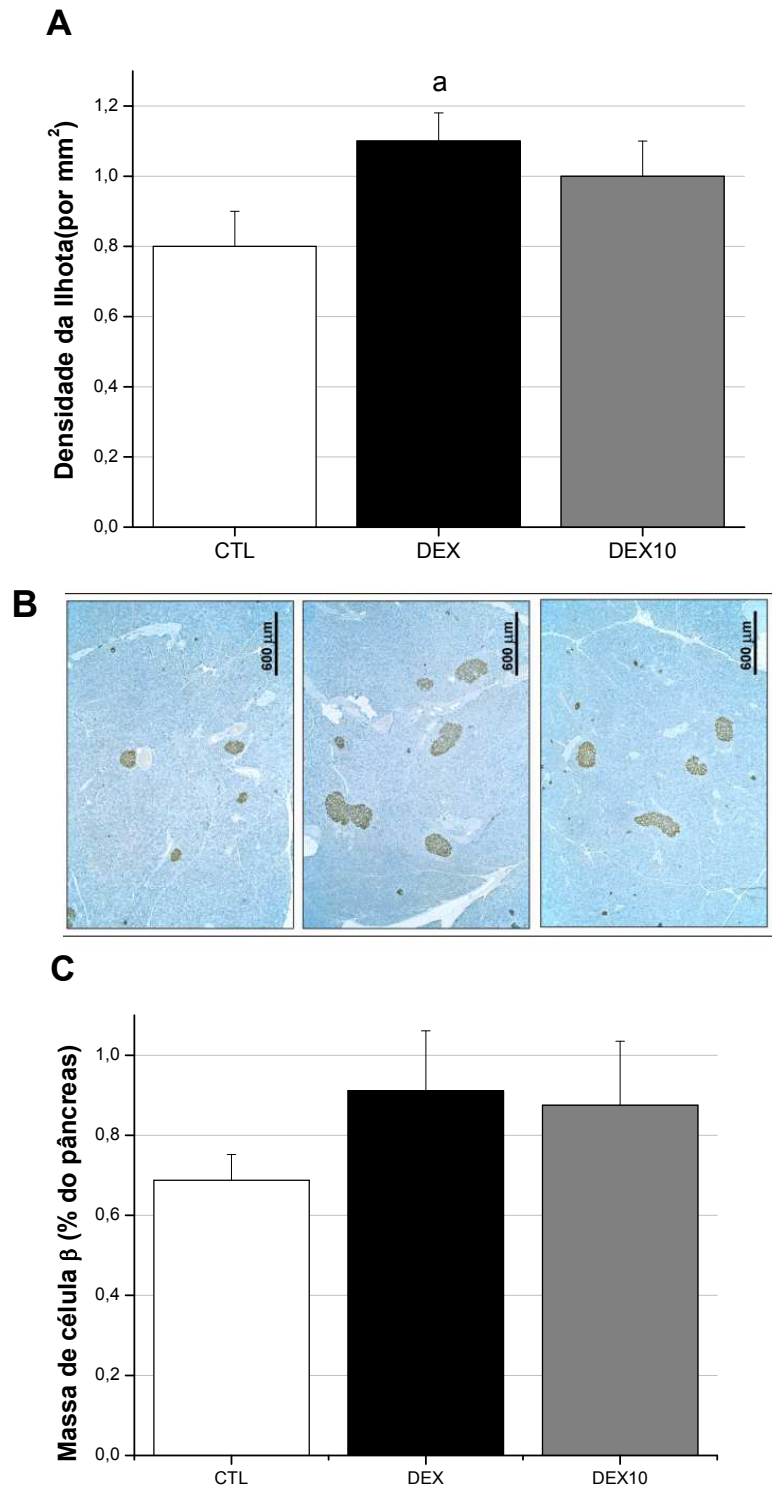


Figura 7 Aumento de densidade de ilhotas em DEX e parcial restabelecimento em DEX₁₀. Densidade de ilhotas por área do pâncreas (A). Imagens das ilhotas obtidas através de câmera CCD (B). Porcentagem de massa de célula β por pâncreas (C). Os valores são expressos como média \pm EPM. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos: ^a vs CTL; ^b vs DEX. (P < 0.05); n =. ANOVA seguida de Tukey.

8- Padrão de expressão protéica para CD2 e CDK4 e fosforilação da AKT é restabelecida após 10 dias da suspensão da indução da resistência

Como demonstrado na figura 8B, houve aumento na fosforilação da AKT em 2,3 vezes nas ilhotas DEX, retornando aos valores do CTL após 10 dias do término do tratamento (n = 5. P < 0.05). A expressão da proteína CD2 aumentou 2,2 vezes no grupo DEX em relação ao CTL, enquanto no grupo DEX₁₀ não houve diferença significativa quando comparado ao grupo CTL (n = 5. P < 0.05) (Figura 8C). A expressão da proteína CDK4, em ilhotas de ratos DEX aumentou 2 vezes comparada ao CTL e, após 10 dias da suspensão do tratamento, estes níveis se normalizaram (n = 6. P < 0.05) (Figura 8D). Não houve diferença significativa na expressão da pRB (n = 5. P < 0.05) e AKT (n = 4. P < 0,05) entre os 3 grupos estudados (Figura 8E e 8A).

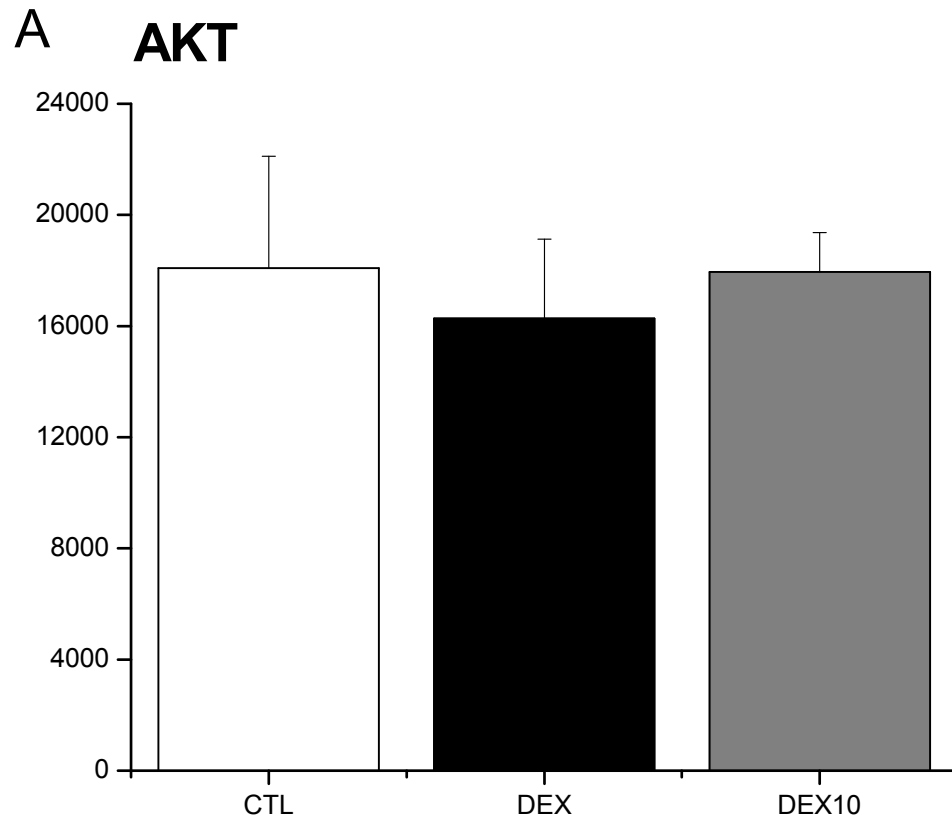


Figura 8A Expressão protéica da AKT (n = 4. P < 0,05). Em ilhotas de ratos CTL, DEX e DEX₁₀. Dados mostram médias ± EPM. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos: ^a vs CTL; ^b vs DEX.

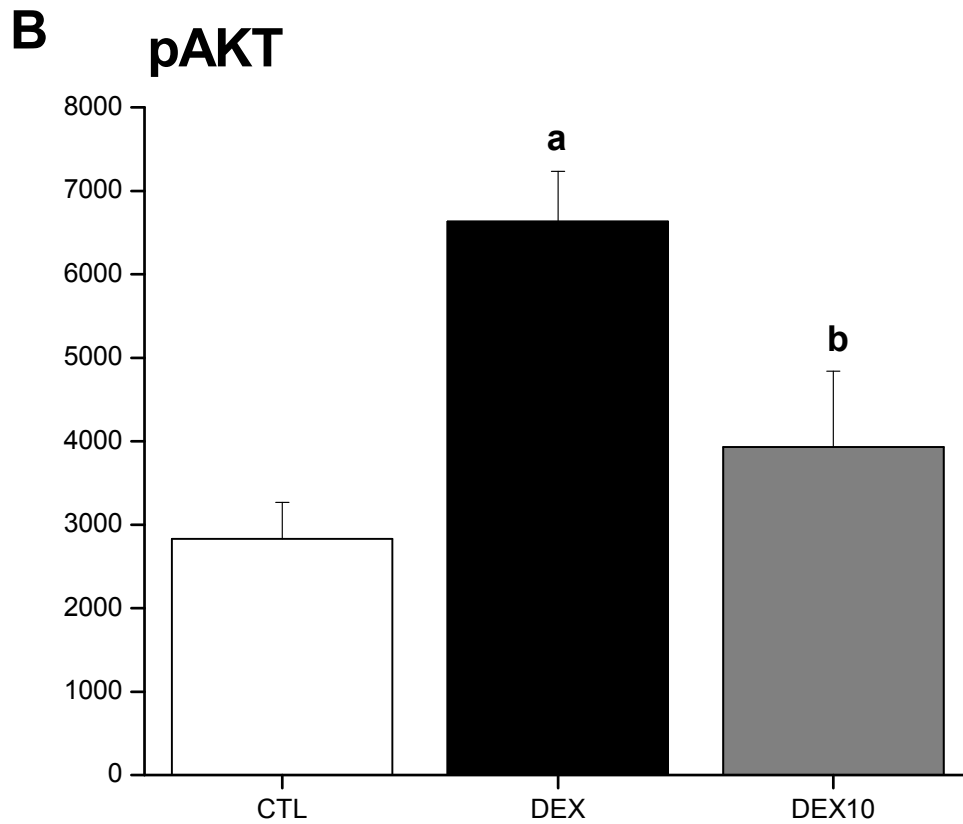
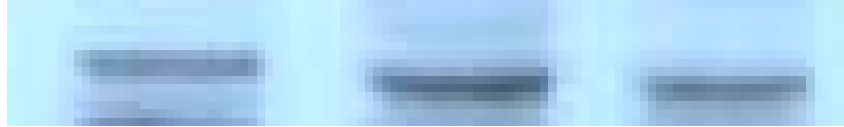


Figura 8B Fosforilação proteína AKT (n = 5. P < 0,05). Em ilhotas de ratos CTL, DEX e DEX₁₀. Dados mostram médias ± EPM. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos: ^a vs CTL; ^b vs DEX.

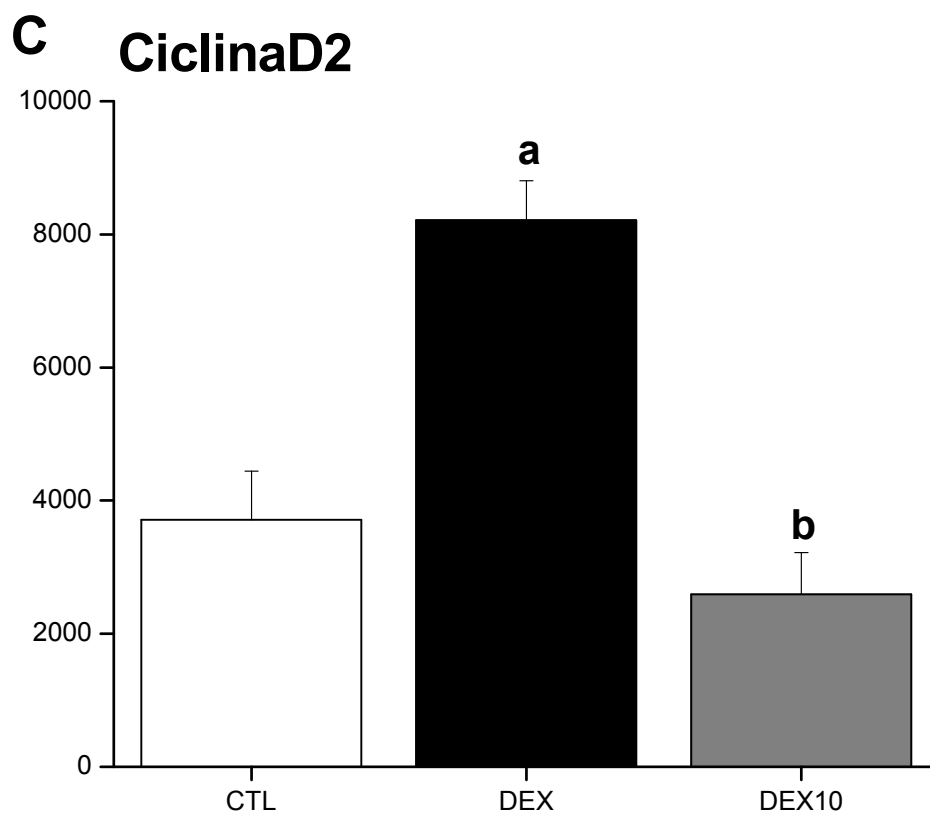


Figura 8C Expressão protéica da ciclinaD2 (n = 5. P < 0,05). Em ilhotas de ratos CTL, DEX e DEX₁₀. Dados mostram médias ± EPM. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos: ^a vs CTL; ^b vs DEX.

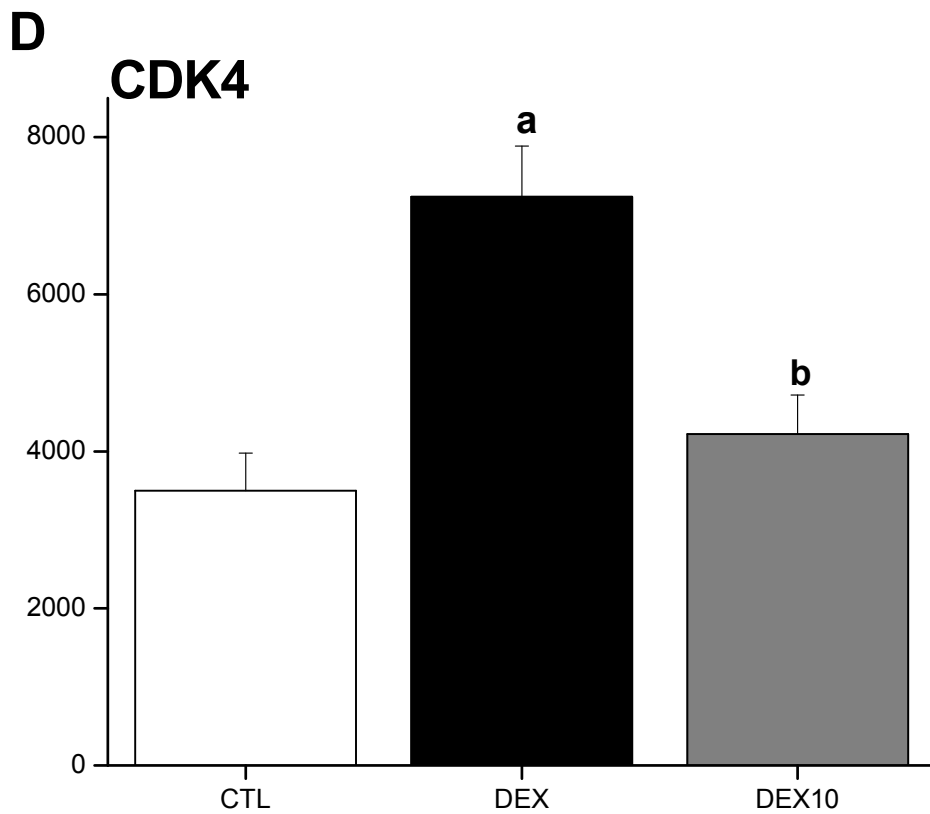
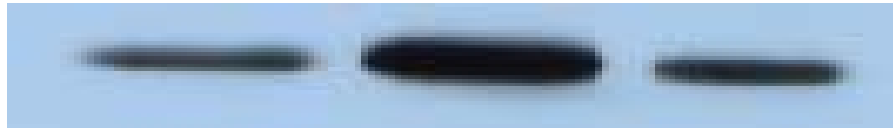


Figura 8D Expressão protéica da CDK4 (n = 6. P < 0,05). Em ilhotas de ratos CTL, DEX e DEX₁₀. Dados mostram médias ± EPM. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos: ^a vs CTL; ^b vs DEX.

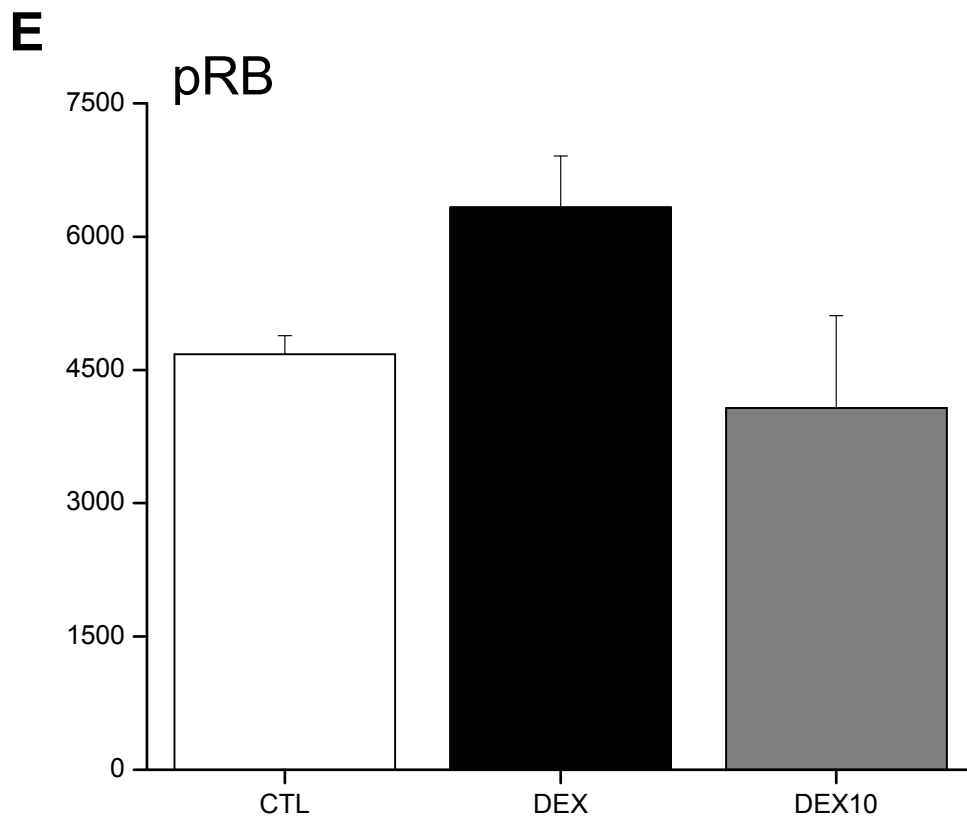


Figura 8E Fosforilação da proteína RB (n = 5. P < 0,05). Em ilhotas de ratos CTL, DEX e DEX₁₀. Dados mostram médias ± EPM. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos: ^a vs CTL; ^b vs DEX.

9- Expressão da proteína pró-apoptótica Bax encontrou-se aumentada nos grupos DEX e DEX₁₀

Não houve diferença significativa na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl2 ($n = 4$. $P < 0,05$) entre os grupos CTL, DEX e DEX₁₀, enquanto a expressão da proteína pró-apoptótica Bax está aumentada 1.52 vezes no grupo DEX e 1.36 vezes no grupo DEX₁₀ em relação ao CTL ($n = 4$. $P < 0.05$). Tal alteração na expressão da proteína Bax ocasionou o aumento da razão Bax/Bcl2 (Figura 9).

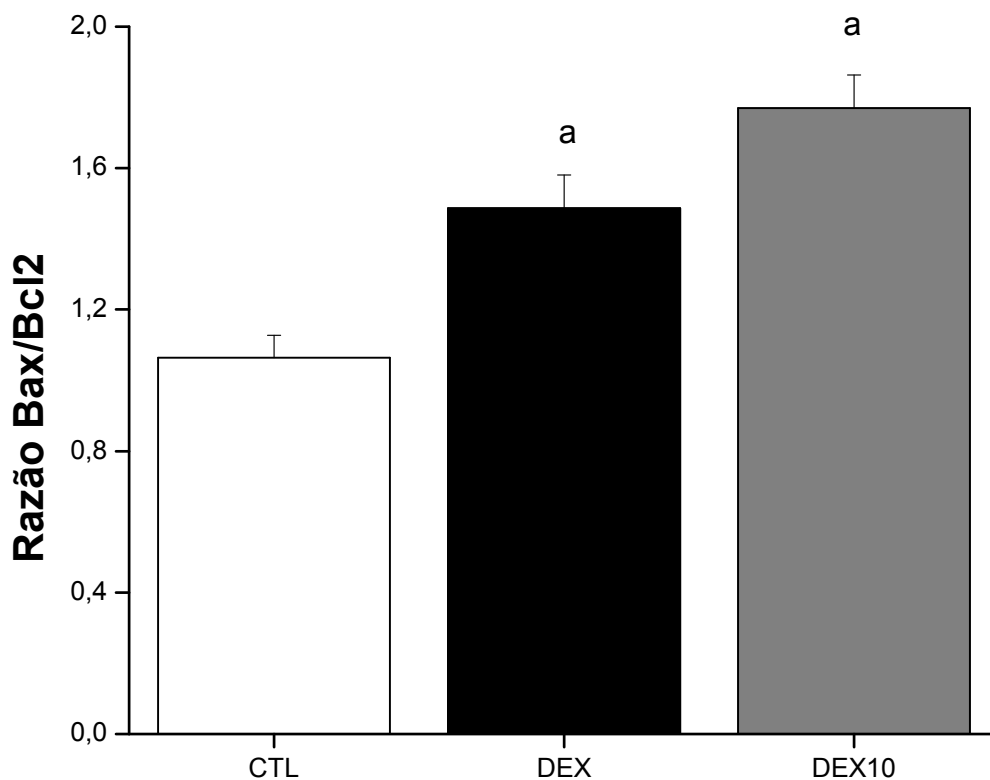


Figura 9 Razão Bax /Bcl2 ($n = 4$. $P < 0.05$) . Dados mostram médias \pm EPM. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos: ^a vs CTL; ^b vs DEX.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos alterações adaptativas que ocorrem no pâncreas endócrino durante a resistência à insulina induzida pela dexametasona e se estas alterações permanecem após 10 dias do término do tratamento. Nossos resultados confirmaram as adaptações presentes em modelos de resistência como o aumento moderado dos níveis glicêmicos e hiperinsulinemia associado à diminuição da sensibilidade periférica à insulina e à glicose. O aumento da responsividade das ilhotas de animais DEX em resposta a nutrientes, potencializadores e agentes despolarizantes, bem como a hipertrofia das ilhotas destes animais demonstram o potencial adaptativo frente a redução da sensibilidade periférica à insulina. Após interrupção do tratamento há restauração de quase todas as alterações observadas nos animais resistentes. Portanto, nossos dados apresentam evidências importantes que mostram a plasticidade do pâncreas endócrino frente a diferentes estímulos que alteram a ação periférica da insulina.

Ratos DEX apresentaram redução significativa de massa corpórea, adrenal, baço e da gordura retroperitoneal ao passo que tiveram aumento da massa do fígado e rins, comparados aos ratos CTL. Neste modelo, os animais apresentam redução na ingestão de alimento a partir do terceiro dia de tratamento (Rafacho *et al.*, 2007), o que explica a redução na massa corpórea. Sabe-se que a insulina exerce efeitos anorexigênicos no hipotálamo (Wood *et al.*, 1979). A injeção de insulina no ventrículo lateral cerebral de ratos resulta em redução de 50% da ingestão de alimento (Torsoni *et al.*, 2003). Inversamente, durante a administração crônica de baixas doses de

dexametasona (0.1-4µg, dissolvida na água de beber) os ratos não exibem a redução na ingestão de alimento. A perda de massa corpórea nesses animais ocorre, pelo menos em parte, devido ao aumento da lipólise (Palacios *et al.*, 1995; Franco-Colin *et al.*, 2000).

A diminuição da sensibilidade periférica à insulina e à glicose foi observada nos animais DEX. Os valores glicêmicos observados após sobrecarga de glicose demonstraram que a secreção suplementar de insulina não foi suficiente para manter os níveis sanguíneos normais de glicose. Esses resultados estão de acordo com estudos *in vivo* realizados em ratos com 18 e 26 meses tratados com dexametasona (Novelli *et al.*, 1999). Entretanto, nos ratos DEX₁₀ a resistência à insulina foi revertida, apresentando resultados semelhantes ao grupo CTL, o que também foi observado em outros modelos e/ou situações de resistência à insulina, como gravidez (Bouwens, Rooman, 2005; Van Assche *et al.*, 1978) e infusão de glicose (Bernard *et al.*, 1999).

A maior sensibilidade das ilhotas frente à glicose pode ser consequência da resistência periférica à insulina. Para compensar a diminuição da ação periférica deste hormônio as ilhotas secretam mais insulina (Guillaume-Gentil, 1993). Nas ilhotas de ratos DEX₁₀ a secreção de insulina estimulada por glicose é semelhante ao grupo CTL (Figura 3). Isto indica indiretamente que, após 10 dias do término do tratamento, ocorre normalização no metabolismo de glicose pelas ilhotas. As ilhotas derivadas dos ratos DEX secretam mais insulina em resposta a arginina, leucina e em concentrações despolarizantes de K⁺ (Figura 5), indicando que as ilhotas desse grupo estão mais sensíveis também a esses estímulos. Sabe-se que glicose, leucina

e em menor extensão a arginina, aumentam a relação ATP/ADP, provocando uma cascata de eventos que levam ao aumento na secreção de insulina (Draznin, 1998). Assim, o aumento da secreção de insulina nas ilhotas do grupo DEX não deve estar relacionado apenas ao aumento do metabolismo. Provavelmente há alterações relacionadas a mobilização do Ca^{2+} citoplasmático visto que as ilhotas apresentam respostas aumentadas quando incubadas com Cch, forskolin e PMA (Figura 4) (Gao *et al.*, 1994; Mikai, *et al.*, 2000). Observamos que, na presença de PMA, a secreção de insulina foi maior no grupo DEX, comparado ao grupo CTL. Isso indica que a atividade da enzima proteína cinase C pode estar aumentada nesse grupo. No grupo DEX₁₀ a secreção de insulina foi semelhante ao grupo CTL, o que indiretamente aponta para a reversão da resistência periférica à insulina após 10 dias da interrupção do tratamento.

Outro resultado interessante no grupo DEX é a hipertrofia da ilhota (Figura 6), bem como aumento do número de ilhotas por área de pâncreas (Figura 7A). Ilhotas de ratos DEX apresentam alterações funcionais e morfológicas. Dentre as alterações, pôde ser observada tendência de aumento na massa de células β (Figura 7C). Estas alterações morfológicas são bem documentadas em modelos de resistência à insulina e estão relacionadas com quadros de hiperinsulinemia (Klöpper *et al.*, 1985; Vinik *et al.*, 1996) e hiperglicemia (Bernard-Kargar, Ktorza, 2001; Alonso, *et al.*, 2007). Portanto, nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que apontam para mecanismos compensatórios adaptativo das células β frente à diminuição da ação da insulina nos tecidos periféricos (Tomita *et al.*, 1984; Ogawa *et al.*, 1992; Rafacho *et al.*, 2007). Após 10 dias do término do tratamento, houve

restabelecimento parcial da densidade de ilhotas em relação ao grupo DEX, porém sem diferença estatística (Figura 7A). A tendência a aumento na massa de células β , vista no grupo DEX, também foi apenas parcialmente restabelecida no grupo DEX 10 (Figura 7C).

A análise da expressão de proteínas envolvidas diretamente no controle da progressão do ciclo celular revelou dados interessantes. Ratos DEX apresentaram aumento na fosforilação da AKT (Figura 8B). A AKT induz proliferação das células β modulando as ciclinas D1 e D2, o que resulta em ativação da CDK4. Camundongos transgênicos que superexpressam AKT em células β pancreáticas têm aumento da massa destas células. Esta expansão é mediada por aumento da proliferação e tamanho de células β juntamente com aumento na expressão de ciclina D1, D2 e atividade da CDK4 (Fratai *et al.*, 2006). A expressão de ciclina D2 (Figura 8C) e CDK4 (Figura 8D) está aumentada nos ratos DEX e podem explicar, em parte, a tendência de aumento da massa de células β nestes animais. Não houve diferença na expressão da proteína pRB (Figura 8E). Entretanto, animais knockout para pRB em ilhotas pancreáticas não apresentam nenhum aumento da massa de células β , descartando o papel único desta proteína como regulatória final do controle da progressão do ciclo celular deste tipo celular (Vasavada, 2007).

Observamos aumento da secreção de insulina, da área e da densidade das ilhotas juntamente com aumento na expressão de proteínas envolvidas com ciclo celular. Estes resultados estão de acordo com o aumento compensatório da massa de células β observados em estado de resistência a insulina induzida por infusão de glicose (Bernard *et al.*, 1999), obesidade (Holness *et al.*, 2005; Prada *et al.*, 2005).

Após 10 dias do término do tratamento com dexametasona a secreção de insulina, concomitante com a mudança no tamanho e número de ilhotas pancreáticas e na expressão de proteínas envolvidas no ciclo celular, retornam aos níveis próximos aos do CTL. Nossos resultados são semelhantes aos observados por Bernard (1999) em animais após 7 dias de infusão de glicose por 48 horas. Em ratas, após o parto, também ocorre normalização na secreção de insulina e na massa de células β (Scaglia *et al.*, 1995; Bouwens, Rooman, 2005; Bernard *et al.*, 1999).

Genes da família Bcl-2 são importantes para a regressão ou ativação da morte celular. Sendo a Bax e a Bcl-2 consideradas reguladoras da apoptose. A proteína Bcl-2 promove sobrevivência da célula e inibe o processo de apoptose, enquanto que a Bax determina suscetibilidade para apoptose (Chao, Korsmeyer, 1998; Vaux, Cory, Adams, 1988). Muitos trabalhos utilizam a razão Bax/Bcl-2 como parâmetro de apoptose, pois o aumento ou a diminuição entre elas que resulta na formação do poro na mitocôndria e posteriormente extravasamento do citocromo c e consequentemente morte da celular (Van de Castele *et al.*, 2002). Em nosso estudo houve aumento na expressão da Bax, porém não ocorre mudança na Bcl-2 o que contribui para o aumento na razão Bax/Bcl-2 (Figura 9) sugerindo que a ilhota de animais do grupo Dex e Dex10 está em processo apoptótico.

Nossos resultados mostram a plasticidade do pâncreas endócrino e a potente capacidade regenerativa no animal adulto após estímulo estressor. Dez dias após a cessação do estímulo ocorre regressão do excesso de tecido endócrino pancreático, sendo que a secreção de insulina retorna a valores normais, semelhantes ao grupo CTL. Isso acontece concomitantemente à diminuição da expressão das proteínas

envolvidas no ciclo celular e manutenção dos níveis aumentados de expressão de proteínas Bax, relacionadas a apoptose. Sendo assim, essa regressão provavelmente ocorre através do balanço entre inibição da replicação e aumento na frequência de apoptose das células β .

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Nossos resultados permitem as seguintes conclusões:

1. Ilhotas de animais tratados com dexametasona 1mg/kg por 5 dias apresentam maior secreção de insulina em relação ao controle quando estimulados por glicose e outros secretagogos;
2. O tratamento com dexametasona induz resistência periférica à insulina e aumento compensatório na secreção de insulina, aumentando tamanho e densidade das ilhotas e tendência a aumento na massa de célula β ;
3. A expressão de proteínas envolvidas no ciclo celular está aumentada nos animais DEX, indicando aumento na proliferação das células β ;
4. Após 10 dias do término do tratamento, a resistência periférica à insulina é revertida. Tamanho e densidade das ilhotas e a expressão de proteínas envolvidas no ciclo celular são semelhantes ao grupo CTL, mostrando a plasticidade da ilhota em recuperar seu funcionamento normal após passar por estímulo estressor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrews RC, Walker BR. (1999). Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clin Sci*. 96:513-23.
- Bernard C, Berthault M, Saulnier C, Ktorza A. (1999). Neogenesis vs. apoptosis as main components of pancreatic β -cell mass changes in glucose-infused normal and mildly diabetic adult rats. *FASEB J*.13:1195-05.
- Bonner-Weir S, Trent DF, Zmachinski CJ, Clore ET, & Weir GC. (1981). Limited beta cell regeneration in a beta cell deficient rat model: studies with Dexamethasone. *Metabolism*. 9:914-18.
- Bonora E, Manicardi V, Zavaroni I, Coscelli C, Butturini U. (1987). Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. *Diabete Metab*. 2:116-21.
- Boschero AC, Delattre E, Santos ML. (1980). Isolamento de ilhotas de Langerhans de rato. In *Anais XII Congresso Sociedade Brasileira Fisiologia*. pp 117. Ribeirão Preto, SP.
- Bouwens L, Rooman I. (2005) regulation of pancreatic Beta-Cell Mass. *Physiol Rev*. 85:1255-70.
- Buttgereit F, Wehling M, Burmester GR. (1998) A new hypothesis of modular glucocorticoids actions. *Arthritis Rheum*. 41(5):761-67.
- Chao DT, Korsmeyer S (1998) Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16:395–419.
- Choi SB, Jang SJ, Hong SM, Dong Wha, Jun DW, Park S. (2006). Exercise and dexamethasone oppositely modulate *b*-cell function and survival via independent pathways in 90% pancreatectomized rats. *Journal of Endocrinology*. 190:471–82.
- Cozar-Castellano I, Takane KK, Bottino R, Balamurugan AN, Stewart AF (2004). Induction of B-cell proliferation and retinoblastoma protein phosphorylation in rat and in human islet using adenovirus-mediated transfer of cyclin-dependent kinase-4 and cyclin D1. *Diabetes*. 53:149-59.

- Draznin B. (1988) Intracellular calcium, insulin secretion, and action. *Am J Med*.28: 44-58. Review.
- Delaunay F, Khan A, Cintra A, Davani B, Ling Z, Andersson A, Östenson C, Gustafsson J, Efendic S, Okret S. (1997). Pancreatic β Cells Are Important Targets for the Diabetogenic Effects of Glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* 100:2094–98.
- Efendic S, Luft R, Wajngot A. (1984). Aspects of the patogenesis of type 2 diabetes. *Endocrinol Reviews*.5:395-10.
- Flatt PR. (1996). In: *Textbook of Diabetes*, 2nd ed, pp.9.1-9.7 [J.C. Pickup and G. Williams, editors]. Oxford: Blackwell.
- Franco-Colin M, Tellez-Lopez AM, Quevedo-Corona L, *et al.* (2000). Effects of long-term high-sucrose and dexameyhasone on fat depots, liver fat, and lipid fuel fluxes through the retroperitoneal adipose tissue splanchnic area in rats. *Metabolism*. 49:1289-94.
- Fatrai S, Elghazi L, Balcazar N, Cras-Meneur C, Krits I, Kiyokawa H, Bernal-Mizrachi E (2006). AKT induces B-cell proliferation by regulating cyclin D1, cyclin D2, and p21 levels and cyclin-dependent kinase-4 activity. *Diabetes* 55:318-25.
- Ganesan S, Calle R, Zawalich K, Greenawalt K, Zawalich W, Shulman GI, Rasmussen H. (1992). Immunocytochemical Localization of α -Protein Kinase C in Rat Pancreatic β -Cells During Glucose-induced Insulin Secretion. *The Journal of Cell Biology*. 119(2):313-24.
- Gao ZY, Gilon O, Henquin JC. (1994). The role of protein kinase-C in signal transduction through vasopressin and acetylcholine receptors in pancreatic B cells from normal Mouse. *Endocrinology*. 135:191-99.
- Gao Z, Young RA, Li G, Najafi H, Buettger C, Sukumvanich SS, Wong RK, wolf BA, Matschinsky FM. (2003). Distinguishing features of leucine and alpha-ketoisocaproate sensing in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 144:1949-57.
- Gauthier BR, Brun T, Sarret EJ, Ishihara H, Schaad O, Descombs P, Wolheim BC. (2004). Oligonucleotide Microarray Analysis Reveals PDX1 as an Essential Regulator of Mitochondrial Metabolism in Rat Islets. *Biol. Chem*. 279:31121-130.

- Gremlich S, Roduit R, Thorens B. (1997). Dexamethasone induces posttranslational degradation of GLUT2 and inhibition of insulin secretion in isolated pancreatic B cells. Comparison with the effects of fatty acids. **J Biol Chem.** 272:3216-22.
- Guillaume-Gentil C, Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B. (1993). Involvement of on-esterified fatty acid oxidation in glucocorticoid-induced peripheral insulin resistance in vivo in rats. **Diabetologia.** 36:899-06.
- Haber PE, Curi C, Carvalho CRO, Carpinelli RA. (2001). Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 45(3): 219-27.
- Höer Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Amaral MEC, NF, Boschero AC, Saad MJA. (2005). Western diets modulate insulin signaling, c-Jun N-terminal activity, and insulin receptor substrate-1 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology.** 146:1576-87.
- Holness MJ, Smith ND, Greenwood GK, et al. (2005). Interactive influences of peroxisome proliferator-activated receptor α activation and glucocorticoids on pancreatic beta cell compensation in insulin resistance induced by dietary saturated fat in the rat. **Diabetologia.** 48:2062-68.
- Hui H, Perfetti R. (2002). Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. **European Journal of Endocrinology.** 146:129-41.
- Jeong In- Kyung, Oh Seung-Hoon, Kim Byung-Joon, Chung Jae-Hoon, Min Yong-Ki, Lee Myung-Shik, Lee Moon-Kyu, Kim Kwang-Wong. (2001). The effects of dexamethasone on insulin release and biosynthesis are dependent on the dose and duration of treatment. **Diab. Reserc. Clin. Pract.** 51:163-71.
- Kahn SE, Prigeon RL, Mcculloch DK, et al. (1993). Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. **Diabetes.** 42:1663-72.
- Lacy PE, Kostianovsky M. (1967). Method for isolation of the intact islet of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes.** 16:35-39.
- Lenzen S, Bailey CJ. (1984). Thyroid hormones, gonadal and adrenocortical steroids and the function of the islets of Langerhans. **Endocr. Rev.** 5:411-34.

- Li C, Buettger C, Kwagh H, Matter A, Daikhin Y, Nissim IB, Collins HW, Yudkoff M, Stanley CA, Matschinsky FM. (2004), A Signaling Role of Glutamine in Insulin Secretion. **J Biol. Chem.** 279(14): 13393-401.
- Lo S, Russel JC, Taylor AW. (1970). Determination of glycogen in small tissue samples. **J Appl Physiol.** 28:234-36.
- Marshak S, Benshushan E, Shoshkes M, Havin L, Cerasi E, Melloul D. (2001). Regulatory Elements Involved in Human pdx-1 Gene Expression. **Diabetes.** 50:S37-S38.
- Marshak S, Benshushan E, Shoshkes M, Cerasi E, Melloul D. (2001). A pancreatic β -cell-specific Enhancer in the Human PDX-1 Gene is Regulated by Hepatocyte Nuclear Factor 3 β (HNF-3 β), HNF-1 α , and SPs Transcription Factor. **J. Biol. Chem.** 276: 17533-540.
- Mora P. (2005). Post-transplantation diabetes mellitus. **Am J Med Sci.** 329:86-94.
- Mukai E, Ishida H, Fujimoto S. et al. (2000). The insulinotropic mechanism of the novel hypoglycaemic agent JTT-608: direct enhancement of Ca²⁺ entry and increase of Ca²⁺ influx by phosphodiesterase inhibition. **British Journal of Pharmacology.** 129:901-08.
- Nosadini R, Del Prato S, Tiengo A, Valeiro A, Muggeo M, Opocher G, Mantero F, Duner E, Marescotti C, Mollo F. et al. (1983). Insulin resistance in Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.** 57:529-36.
- Novelli M, De Tata V, Bombara M, Lorenzini A, Masini M, Pollera M, Bergamini E, Masiello P. (1999). Insufficient adaptive capability of pancreatic endocrine function in dexamethasone-treated ageing rats. **J Endocrinol.** 162:425-32.
- Ogawa A, Johnson JH, Ohneda M, McAllister CT, Inman L, Alam T, Unger RH (1992). Roles of insulin resistance and β -cell dysfunction in dexamethasone-induced diabetes **J Clin Invest** 90, 497-504.
- Ohneda M, Johnson JH, Inman L, Unger RH. (1993). Glut-2 function in glucosa-unresponsive β -cells of dexamethasone-induced diabetes in rats. **J Clin Invest.** 92:1950-56.

- Palacios E, Piñon-López MJ, Racotta IS, Racotta R. (1995) Effect of lipectomy and long-term dexamethasone on visceral fat and metabolic variables in rats. ***Metabolism***. 44 (12):1631-38.
- Prato DS, Wishner WJ, Gromada J, Schluchter BJ. (2004). β -Cell mass plasticity in type 2 diabetes. ***Diabetes, Obesity and Metabolism***; 6:319-31.
- Ogawa A, Johnson JH, Ohneda M, McAllister CT, Inman L, Alam T, Unger RH (1992). Roles of insulin resistance and β -cell dysfunction in dexamethasone-induced diabetes ***J Clin Invest*** 90:497-504.
- Rafacho A, Roma LP, Taboga SR, Boschero AC, Bosqueiro JR (2007). Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexins 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. ***Can J Physiol Pharmacol***. 53:881-85.
- Rafacho A, Giozzet VAG, Boschero AC, Bosqueiro JR (2007). Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. ***Pancreas***.
- Ricardi C, Cifone MG, Migliorati G. (1999). Glucocorticoid Hormone-induced Modulation of gene expression and regulation of T-cell death: role of GITR and GILZ, two dexamethasone induce genes . ***Cell Death Differ***. 6:1182-89.
- Ruzzin J, Wagman AS, Jensen J. (2005). Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. ***Diabetologia***. 48: 2119–30.
- Scott AM, Atwater I, Rojas E. (1981). A method for the simultaneous measurement of insulin release and B-cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. ***Diabetologia***, 21:470-75.
- Seckl JR, Olsson T. (1995). Glucocorticoid hypersecretion and the age impaired hippocampus: cause or effect? ***Endocrinology***. 145: 201-11.
- Seckl JR. (2001) .Glucocorticoid Programming of the Fetus; adult phenotypes and Molecular Mechanisms. ***Mol Cell Endocrinol***. 185, 67-71.
- Tomita T, Visser P, Friesen S, Doull V. (1984). Cortisone-induced islet cell hyperplasia in hamsters. ***Virch Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*** 45:85-5.

- Torsoni MA, Carvalheira JB, Pereira-Da-Silva M, Carvalho-Filho MA, Saad MJA, Velloso AL. (2003). Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285:E216-E23.
- Toriumi C, Imai K. (2003) Altered expression of insulins I and II and their mRNAs in the islets of Langerhans in dexamethasone-induced diabetic rats. *Biomed Chromat.* 17:26-32.
- Vasavada RC, Cozar-Castellano I, Sipula D, Stewart AF. (2007). Tissue-specific deletion of the retinoblastoma protein in the pancreatic B-cell has limited effects on B-cell replication, mass, and function. *Diabetes.* 56:57-4.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440–442.
- Wood SC, Lotter EC, McKay LD, Porte DJr I. (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature.* 282:503-05.
- Zawalich WS, Zawalich KC. (1996). Regulation of Insulin Secretion by Phospholipase C. *Am. Physiol Society.* 271:E409–E16.