

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

THAÍS ALMEIDA PURIFICAÇÃO

**“PARTICIPAÇÃO DAS PROTEÍNAS AS160 E RAB27A NA
SECREÇÃO DE INSULINA DE RATOS CONTROLES E
INSULINO-RESISTENTES POR DEXAMETASONA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Thaís Almeida Purificação
Boschiero
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschiero
Co-Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL'EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

P974p

Purificação, Thais Almeida, 1980-
Participação das proteínas AS160 e Rab 27A na
secreção de insulina de ratos controles e insulino-
resistentes por dexametasona / Thais Almeida Purificação.
– Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Antonio Carlos Boschiero.
Coorientador: Alex Rafacho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Dexametasona. 2. Langerhans, Ilhotas de. 3.
Proteína AS160. 4. Resistência à insulina. 5. Proteína
Rab27A. 6. Insulina – Secreção. I. Boschiero, Antonio
Carlos, 1943-. II. Rafacho, Alex. III. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Participation of protein AS160 and Rab 27A in insulin secretion in control rats and insulin-resistant by dexamethasone

Palavras-chave em Inglês:

Dexamethasone
Islands of Langerhans
AS160 protein
Insulin resistance
Rab27A protein
Insulin - Secretion

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Antonio Carlos Boschero [Orientador]
Carmen Veríssima Ferreira
Leonardo dos Reis Silveira

Data da defesa: 30-03-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

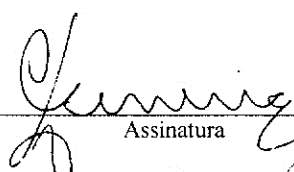
Campinas, 30 de Março de 2012

BANCA EXAMINADORA

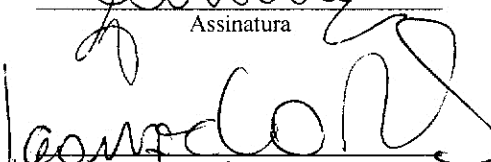
Prof. Dr. Antonio Carlos Boschiero (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira


Assinatura

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira


Assinatura

Prof. Dr. Gabriel Forato Anhe

Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ortis

Assinatura

“Sonhos só se realizam quando se transformam em metas.”

Thais Almeida

Às pessoas que eu amo incondicionalmente:

Minha mãe, Angélica.

Minha filha, Amanda.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero pelo apoio na escrita, por ter acreditado no meu trabalho, pela confiança, exemplo profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Alex Rafacho pela co-orientação, dedicação, apoio, amizade e, principalmente paciência, mesmo de longe.

À minha grande amiga Flavia, que foi extremamente importante na concretização deste trabalho e amizade construída ao longo desta jornada, sem palavras pra definir o quanto você é importante pra mim.

Ao Dr. Luiz Rezende pela colaboração na realização dos experimentos, análise dos resultados, preocupação e amizade.

Ao Prof. Dr. Everardo Carneiro pela oportunidade de ter me recebido em seu laboratório e pelos poucos diálogos, porém importantes, nesta minha caminhada e, a Prof^a. Dr^a. Helena Coutinho pelas discussões e sugestões importantes na conclusão deste trabalho.

À nossa amiga e “mãe” Marise, que sempre nos socorreu não só nas questões burocráticas, como também, nas pessoais, além da amizade.

Aos amigos José Maria e André, pelas longas conversas em momentos em que o desespero parecia não ter fim e ajuda nos experimentos.

Aos amigos de laboratório Jane, Ana Paula, Gustavo e Sandra pelo apoio nos momentos difíceis.

Ao Dr. Claudio Zoppi pela amizade e por ter me dado a oportunidade do contato com este grupo e de ter feito parte dele nestes dois anos e meio.

A amiga Nicoli pelos muitos momentos de desabafo e amizade construída.

Aos colegas de laboratório: Júnia, Tarlliza, Jean, Thiago, Rafael, Priscilla, Camila, Daniela, Rosane, Fernanda, Gabriel, Helena, Larissa, Juliana e Adriene pelos momentos compartilhados e pelo apoio em alguns momentos.

Aos membros da banca de qualificação: Prof^ª. Dra^a Carmem Veríssima Ferreira, Prof. Dr. Leonardo Silveira e Prof^ª. Dr^a. Helena Coutinho pelas importantes considerações para que o trabalho se concluísse da melhor forma possível.

À Dr^a. Vivian Calegari por ter me ensinado as primeiras técnicas de laboratório e incentivado a prestar a prova para entrar na pós-graduação.

À minha mãe Angélica e filha Amanda, pelo apoio, confiança, dedicação e, principalmente compreensão à minha ausência física na maior parte do tempo em que estive fora de casa.

À minha família pelo apoio nos momentos em que o choro de saudade foi meu porta-voz.

Às minhas grandes amigas/irmãs Danielle e Renata pelos longos conselhos à distância, por lembrarem-me sempre que o sacrifício valeria a pena.

Aos grandes amigos conquistados aqui: Michelly e Tião pelo acolhimento como parte da família e, as amigas Jaqueline e Gabriela importante nos momentos de apoio, diversão e carinho.

Às minhas amigas e companheiras de todos os dias Katia, Rubia, Bruna e Thais obrigada pelo apoio, carinho, acolhimento, dedicação e, principalmente amizade, sem vocês os dias seriam bem mais difíceis.

A minha psicóloga Ana Paula Miethke que tem me ensinado a compreender as entrelinhas do comportamento humano e a buscar um equilíbrio emocional, além da amizade construída, muito obrigada mesmo.

À dona Orlete pela compreensão nos momentos difíceis, amizade e carinho.

A todas as pessoas que, por ventura, aqui não se encontram citadas e que de alguma forma tenham feito parte da minha vida e colaborado para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A Capes/CNPq e Fapesp pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS	14
FIGURA 1. Possível mecanismo de inativação da AS160 no transporte de vesículas	14
FIGURA 2. Teste de tolerância à glicose intraperitoneal de ratos CTL e DEX.....	14
FIGURA 3. Peso Corporal e hepático de ratos CTL e DEX.	14
FIGURA 4. Secreção de Insulina por ilhota isolada.....	14
FIGURA 5. Expressão protéica, Fosforilação e razão pAkt/Akt.....	15
FIGURA 6. Secreção de Insulina por ilhota isolada exposta a Wortmanina.....	15
FIGURA 7. Expressão proteica, Fosforilação e razão pAS160/AS160.....	15
FIGURA 8. Secreção de Insulina em ilhotas ratos AS160 Knockdown.	15
FIGURA 9. Expressão da Rab27A e sua associação com a AS160.	16
FIGURA 10. Expressão, Fosforilação e razão pAMPK/AMPK.	16
FIGURA 11. Secreção de Insulina em ilhotas isoladas e estimuladas com AICAR.	16
FIGURA 12. Expressão, Fosforilação e razão pFoxO1/FoxO1.	16
FIGURA 13. Mecanismo de modulação da secreção de insulina por AS160/Rab27A.....	17
RESUMO	18
ABSTRACT	19
INTRODUÇÃO.....	21
Modelo de Resistência à insulina (RI) induzida por Glicocorticóides	21
AS160	23

AS160 e secreção de Insulina	26
OBJETIVO GERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
Animais:.....	30
Parâmetros Metabólicos:.....	30
Teste de Tolerância à Glicose intraperitoneal (ipGTT):	31
PCR – Real Time:	31
Extração proteica e Western Blot:	32
Imunoprecipitação:	33
Inibição com antisense da AS160 e Isolamento de Ilhotas Pancreáticas:.....	34
Secreção de insulina:	35
Análise Estatística:.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
Ratos tratados com Dexametasona são normoglicêmicos, têm insulinemia de jejum e peso do fígado aumentado, porém com peso corporal reduzido.	36
Secreção de insulina e envolvimento da via PI3K/Akt.....	38
Aumento do conteúdo e fosforilação da AS160 em Thr642 em ilhotas de ratos tratados com Dexametasona.	42
Potencialização da secreção de insulina em ilhotas isoladas de ratos knockdown para AS160.....	44
Expressão gênica e protéica da Rab27A e sua associação com a AS160.	47

Fosforilação da AMPK e secreção de insulina em ilhotas expostas a AICAR.....	48
Expressão e fosforilação da FoxO1.	50
CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS	55
ANEXO.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AS160 - Proteína ativadora de RabGTPase (*Akt Substrate* 160 kDa)

AICAR - 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside

AMPK - Adenosina monofosfato kinase

AKT - Proteína kinase B

AS - Antisense Anti-AS160

ATP - Adenosina trifosfato

ADP - Adenosina difosfato

BSA - Soro de albumina bovino

CO² - Gás carbônico

CTL - Controle

DEX - Dexametasona

DTT - Ditioneitol

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ENaC - Canais de sódio dependentes de aldosterona

FoxO1 – Proteína Forkhead box isoforma O1

GAP - Proteína ativadora de GTPases

GDP - Guanosina difosfato

GEF - Fatores de troca de nucleotídeos de guanina

GLUT4 - Transportador de glicose 4

GR - Receptor de glicocorticóide

GSVs - Vesículas armazenadoras de Gluts

GTP - Guanosina trifosfato

GTPases - Enzimas que hidrolisam GTP

IRS1 - Substrato do receptor de insulina 1

KCl - Cloreto de potássio

KH₂PO₄ - Hidrogenofosfato de Potássio

NaCl - Cloreto de sódio

ipGTT - Teste de tolerância a glicose intraperitoneal

PBS - Tampão fosfato-salino

PDX-1 - Pancreatic and duodenal homeobox 1 (fator de transcrição)

PI3K - fosfoinositídeo 3-quinase

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

PTB – Dominio de ligação tirosina fosfato

Rab27A (GTPase) – Gene homólogo da proteína Rab que hidrolisam GTP 27kDa

RCP-TR – Reação em Cadeia de Polimerase – Tempo Real

REP – Rab protetora

RIA – Radioimunoensaio

RI – Resistência à insulina

Ser - Serina

SNAP-25 – Proteína associada à sinaptossomal 25

SLP-4 – Granofilina 4 (proteína efetora da Rab 27A)

TA - Temperatura ambiente

TBC – Ter-2/Bud2/Cdc16

TBST - Solução tampão salina Tris e Tween-20

Thr - Treonina

t-SNARE – receptor solúvel de ligação NSF alvo

Tyr - Tirosina

v-SNARE – receptor solúvel de ligação NSF associado à membrana de vesícula.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Possível mecanismo de inativação da AS160 no transporte de vesículas. No estado basal, a AS160 está desfosforilada e, portanto ativa, exercendo função inibitória. Sob estímulo de insulina ou glicose, a AS160 é inativada por fosforilação permitindo, assim, o tráfego e ancoramento das vesículas a serem liberadas.

FIGURA 2. Teste de tolerância à glicose intraperitoneal de ratos CTL e DEX. (A) Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) dos ratos CTL e DEX. (B) Área sob a curva (AUC) da glicemia dos ratos tratados com 1mg/kg de Dexametasona (DEX) e Salina 0,9% (CTL). (C) insulinemia dos ratos CTL e DEX. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao ponto 0, *# diferença significativa entre CTL e DEX (30 e 60 min.), n=7, $P < 0,004$.

FIGURA 3. Peso Corporal e hepático de ratos CTL e DEX. (A) Diferenças no ganho de peso corporal e (B) hepático de ratos CTL e DEX. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=8, $P < 0,05$.

FIGURA 4. Secreção de Insulina por ilhota isolada. Secreção de insulina estimulada com, 2,8 ou 16,7 mM de glicose, de ilhotas isoladas de ratos CTL ou DEX. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=6, *# $P < 0,05$.

FIGURA 5. Expressão protéica, Fosforilação e razão pAkt/Akt. (A) Conteúdo total da AKT, (B) fosforilação em Thr308 e (C) razão do conteúdo de proteína fosforilada pela total em ilhotas isoladas de ratos CTL e tratados com DEX (1 mg/kg por cinco dias). Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=6, P<0,05.

FIGURA 6. Secreção de Insulina por ilhota isolada exposta a Wortmanina. Secreção de insulina estimulada com, 2,8 ou 16,7 mM de glicose de ilhotas isoladas de ratos CTL ou DEX, na presença ou ausência de wortmanina. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=6, *# P<0,05.

FIGURA 7. Expressão proteica, Fosforilação e razão pAS160/AS160. (A) conteúdo total da AS160, (B) fosforilação em Thr642 e (C) razão do conteúdo de proteína fosforilada pela total em ilhotas isoladas de ratos CTL ou tratados com DEX por cinco dias (1mg/kg). Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=6, * P<0,05.

FIGURA 8. Secreção de Insulina em ilhotas ratos AS160 Knockdown. Secreção de insulina estimulada com, 2,8 ou 16,7 mM de glicose em ilhotas isoladas de ratos AS160kd (*Knockdown*) e controles e AS160kd (*Knockdown*) tratados ou não com Dexametasona. O tratamento com anti-sense anti-AS160 foi feito por cinco dias com duas doses diárias de 100 nmol do anticorpo. O grupo não tratado com anti-sense recebeu tratamento semelhante com “mismatch”. Os resultados

foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=8, *# P<0,05.

FIGURA 9. Expressão da Rab27A e sua associação com a AS160. (A) níveis de mRNA de Rab27A, (B) níveis proteicos da Rab27A e (C) associação da Rab27A com AS160 em ilhotas isoladas de ratos CTL e tratados com DEX. Resultados expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=4, * P<0,05.

FIGURA 10. Expressão, Fosforilação e razão pAMPK/AMPK. (A) Conteúdo total da AMPK, (B) fosforilação da AMPK α 2 e, (C) razão do conteúdo de proteína fosforilada pela total em ilhotas isoladas de ratos CTL e tratados com DEX. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=5, * P<0,05.

FIGURA 11. Secreção de Insulina em ilhotas isoladas e estimuladas com AICAR. Secreção de insulina estimulada com, 2,8 ou 16,7 mM de glicose em ilhotas de ratos CTL e DEX na presença ou ausência de AICAR (ativador da AMPK, análogo de AMP). Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=8, * # P<0,05.

FIGURA 12. Expressão, Fosforilação e razão pFoxO1/FoxO1. (A) conteúdo total da FoxO1, (B) fosforilação da pFoxO1 e, (C) razão do conteúdo de proteína fosforilada pela total em ilhotas isoladas de ratos CTL e tratados com DEX. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=5, *P<0,05.

FIGURA 13. Mecanismo de modulação da secreção de insulina por AS160/Rab27A.

(A) Em condições basais a Rab 27A está constitutivamente inativa através da atividade GAP da AS160/TBC1D4, inibindo assim o transporte e ancoramento das vesículas contendo insulina. (B) Sob estímulo da hiperinsulinemia, a via PI3K/Akt é ativada, que fosforila a AS160, inativando-a. Sua inativação inibe sua função inibitória sobre a Rab 27A, permitindo assim o transporte e ancoramento dos grânulos de insulina.

RESUMO

Administração de glicocorticóides em roedores e humanos aumenta a resistência à insulina (RI). A RI, provocada por dexametasona, leva a hiperinsulinemia por aumento da secreção do hormônio pelas ilhotas pancreáticas. Recentemente, demonstrou-se que a AS160, uma GAP (proteína ativadora de GTPase), participa no tráfego de vesículas em diferentes tipos celulares que, por sua vez, pode ser alterado por dexametasona. Neste trabalho, avaliamos possível participação da AS160 na secreção de insulina em ilhotas de ratos RI por dexametasona, para isto foram avaliadas proteínas envolvidas no processo de secreção; pAS160, Akt e AMPK. Ratos Wistar adultos foram tratados com o glicocorticóide (DEX) com 1mg/kg (*ip*) de peso corporal, ou salina (CTL), durante 5 dias. Ao final do período de tratamento, os ratos foram submetidos a um Teste de Tolerância à Glicose intraperitoneal (ipGTT) e, após sacrifício, amostras de sangue foram coletadas para dosagem de insulina. As ilhotas pancreáticas foram isoladas por digestão do pâncreas com collagenase. As proteínas insulares foram avaliadas por Western Blot e os genes por RCP-TR. A insulina, contida nas amostras de sangue e nas incubações de ilhotas, foi medida por radioimunoensaio (RIA). A razão pAS160/AS160 foi aumentada nas ilhotas DEX ($P<0,05$). Nestas ilhotas, resultados semelhantes foram observados para a razão pAkt/Akt ($P<0,05$). O tratamento com DEX também aumentou a expressão gênica e protéica da Rab27A ($P<0,05$), contudo, reduziu significativamente sua associação com a AS160 ($P<0,05$). A associação entre essas duas proteínas foi observada pela primeira vez nas ilhotas neste trabalho. O tratamento com DEX também reduziu as expressões gênica e protéica bem como a fosforilação da AMPK. A secreção de insulina foi maior nas ilhotas DEX comparado à CTL e, em ambas, a secreção foi diminuída pela wortmanina (inibidor da PI3K). Ilhotas de ratos

CTL e DEX, tratados com anti-sense anti-AS160, tiveram o conteúdo protéico da AS160 reduzido em $\pm 80\%$, comparado ao CTL ($P < 0,05$). Nas ilhotas de ratos CTL *knockdown*, a secreção de insulina foi maior que nos CTL e, nas ilhotas dos DEX *knockdown* a secreção foi semelhante às DEX. Concluindo, o aumento da secreção de insulina em ilhotas de ratos RI por dexametasona envolve a participação da AS160 e, essa potencialização parece ser mediada pela via PI3K/Akt. Esse aumento de secreção parece também ser diretamente proporcional ao aumento da dissociação entre a Rab27A e a AS160.

ABSTRACT

It is well known that glucocorticoids induce insulin resistance (IR). It is also known that dexamethasone-induced IR is linked to increased levels of plasma insulin due to higher insulin secretion by pancreatic islets. Recent findings show that the Rab-GTPase AS160 plays a role in the traffic of vesicles in different cells type that, in turn, may be affected by dexamethasone. Here, we evaluated the participation of AS160 in the insulin secretion in islets from dexamethasone treated rats. Adult rats were treated with dexamethasone (DEX) with 1.0 mg/kg, body weight (*ip*) or saline (CTL) for 5 consecutive days. Insulin resistance was evaluated by intraperitoneal Glucose Tolerance Test (ipGTT). After, the rats were sacrificed and the islets isolated by the digestion of their pancreases with collagenase. Protein was measured by Western-Blot, and insulin by RIA. AS160 expression, phosphorylation, and the pAS160/AS160 ratio were increased in DEX islets ($P < 0.05$). Similar results were observed for Akt ($P < 0.05$). Dexamethasone also increased Rab27a protein and gene expression but significantly reduced its association with AS160. The association between these two proteins was observed in pancreatic

islets for the first time in this work. AMPK gene and protein expression as well as phosphorylation were reduced by Dexamethasone ($P<0.05$).

The insulin secretion was higher in DEX compared with CTL islets ($P<0.05$). Both secretions were reduced by wortmanin. Islets from CTL and DEX rats, treated with anti-sense anti-AS160, showed $\pm 80\%$ reduction on its expression. The CTL knockdown islets secreted more insulin than CTL and the DEX knockdown secreted similar amount of insulin than DEX islets. In conclusion, these results indicated that AS160 participates in the increased insulin secretion in islets from DEX rats, and this effect seems to be dependent on the activation of the PI3K/Akt pathway. The increase in insulin secretion also depends on the dissociation between Rab27a and AS160.

Keywords: Dexamethasone, pancreatic islets, AS160, insulin resistance, Rab27A

INTRODUÇÃO

Modelo de Resistência à insulina (RI) induzida por Glicocorticóides

Os glicocorticóides podem ser utilizados experimentalmente para indução de RI. Esta classe de hormônios esteróides atua em tecidos responsivos à insulina como os tecidos muscular, adiposo e hepático, reduzindo a ação da insulina. Nesse sentido, músculo esquelético de ratos, tratados com dexametasona (0.9 mg/kg por 2 dias), estimulado com insulina, apresentaram redução da captação de 2- [3^H]deoxiglicose e do marcador de superfície celular para o GLUT-4 (Weinstein *et al*, 1998). Em tecido muscular esquelético e adiposo a RI, induzida por dexametasona, pareceu ser mediada por mecanismos pós-receptores. Esses tecidos, quando estimulados por insulina, apresentaram diminuição da fosforilação das proteínas Akt e glicogênio sintase cinase-3 (GSK-3) (Ruzzin *et al*, 2005), bem como redução da translocação da proteína GLUT 4 para a membrana celular (Weinstein *et al*, 1998). Adipócitos de ratos, cultivados na presença de dexametasona por 24 h, apresentaram redução da captação de glicose basal ou induzida por insulina, independente da concentração de glicose presente no meio de cultivo (Burén *et al*, 2002). Ainda, observou-se diminuição do conteúdo total das proteínas IRS1 e Akt, acompanhada por menor fosforilação da Akt, (Burén *et al*, 2002) mostrando uma ação direta da dexametasona no transporte de glicose nestes tecidos. Redução na captação de glicose, mediada por GLUT4, tem sido um sinal marcante nos quadros de RI. Estudos apontaram para a menor fosforilação de uma proteína chave no transporte do GLUT4, a AS160, um substrato da Akt, onde levou a uma diminuição na translocação das Vesículas Armazenadoras de GLUT4 (GSVs) (Chol & Klm, 2010). Uma série de investigações explorou os mecanismos pelos quais os glicocorticóides reduzem a captação de glicose em diferentes tecidos. Embora ainda controversos

(Bazuine et al., 2004; Burén et al., 2002; Shao et al., 2000), os resultados indicaram que os glicocorticóides exerceu seu principal efeito na cascata de sinalização da insulina reduzindo a fosforilação de proteínas chaves, levando a uma diminuição do tráfego de GLUT4 para a membrana plasmática (Sakoda et al., 2000). Contudo, a ação dos glicocorticóides sobre a expressão e função da AS160 foi pouco abordada. Estudos apontaram que a dexametasona reduziu a fosforilação da AS160 (Thr642) sob estímulo basal de insulina, diminuindo em 80% a captação de glicose em adipócitos. Demonstrou-se, ainda, que este efeito foi mediado pelo receptor glicocorticóide (GR) (Ngo et al, 2009). Os resultados desse estudo apontaram que os glicocorticóides alteraram a captação de glicose em diversos tipos de linhagem de células adiposas insulino-sensíveis, em grande parte, através redução da incorporação de GLUT4 na membrana plasmática. Contudo e, ao contrário do observado em outros estudos, neste trabalho não foram mostradas alterações na fosforilação da Akt, porém foi visto uma redução significativa na fosforilação da AS160, também conhecida como TBC1D4, mostrando uma modulação direta da dexametasona sobre esta proteína. Nesse trabalho foi mostrado, pela primeira vez, que dexametasona reduziu a fosforilação da AS160 em Thr642. O autor justificou essa discrepância sugerindo uma possível participação da isoforma TBC1D1, modulada pela ação do GR. Membro da família das proteínas TBC (Ter-2/Bud2/Cdc16), essa família parece ter papel fundamental no transporte de GLUT4 (Fakuda, 2011). Outros autores mostraram que a superexpressão da isoforma TBC1D1 em linhagem de célula muscular inibiu a translocação do GLUT 4 para a membrana plasmática (Roach et al, 2007), levantando a hipótese de que o GR poderia estar agindo aumentando a transcrição desta isoforma, com isso reduzindo a fosforilação da AS160. É importante salientar que, em tecidos insulino-sensíveis, o aumento do transporte de glicose por

GLUT4, estimulado por insulina, se dá pelo aumento da fosforilação da AS160 no sítio de fosforilação em Thr642 (Chadt *et al*, 2008). Concluindo, os trabalhos citados identificaram a AS160 como um elemento chave na RI, induzida por Dexametasona. Este efeito na periferia gera um quadro de hiperglicemia levando a célula beta a secretar unidades maiores de insulina na tentativa de manter os níveis glicêmicos normais. Este quadro leva a alterações fisiológicas no pâncreas endócrino gerando um mecanismo de secreção de insulina compensatória e, conseqüentemente hiperinsulinemia (Rafacho *et al*, 2010). Contudo, não existem indicações da relação da ação dos glicocorticóides com a AS160 no processo de secreção de insulina nas células β pancreáticas. Portanto, os mecanismos moleculares envolvidos nessa possível associação ainda precisam ser elucidados, podendo trazer informações para o tratamento da Diabetes Mellitus do tipo 2.

AS160

A AS160, uma proteína de 160kDa, com atividade GAP, foi identificada quando se tentava identificar, em adipócitos, substratos da AktSer308. Sugeriu-se que essa proteína estava diretamente relacionada à via de sinalização do receptor de insulina no tráfego do GLUT4 (Kane *et al*, 2002). De fato, a AS160 (*Akt Substrate 160kDa*) é uma proteína que, quando fosforilada pela Akt, é inativada aumentando o transporte de vesículas contendo GLUT 4 para a membrana plasmática (Sano *et al*, 2003), confirmando que a AS160 é um elemento chave no *link* da PI3K com o tráfego de vesículas quando da estimulação por insulina. Foi mostrado também que mutação nos sítios de fosforilação da AS160 levou a uma diminuição significativa no transporte da vesícula de GLUT4 (Sano *et al*, 2003). Os estudos apontaram que o efeito dessa proteína sobre

o transporte vesicular tem característica estrutural própria com domínio de atividade GAP (Proteína ativadora de GTPases), incluindo também duas regiões de domínios tirosinas fosfatos (PTB) e uma Calmodulina (Cartee *et al*, 2007). Esses domínios de ligação indicam ser um ponto de convergência local da sinalização da insulina e as vias relacionadas à contração muscular no transporte da glicose no músculo esquelético, podendo ser fosforilada pela Akt, através da ativação da via da insulina ou pela AMPK através de vias ativadas independentes da ação da insulina (Cartee, 2007; Kramer *et al*, 2006; Taylor *et al*, 2008). O mecanismo molecular pelo qual a AS160 age indica que essa proteína participa, de forma geral, nos eventos intracelulares que modulam o tráfego de vesículas. Em cardiomiócitos, sob estímulo da insulina, detectou-se um aumento de quatro vezes na captação de glicose e conteúdo de glicogênio, associados a um aumento na fosforilação da AS160 (Ginion *et al*, 2011). Foi mostrado também que a pAS160 modula (aumenta) o tráfego de íons sódio nos canais dependentes de estímulo de aldosterona (ENaC), no nefron distal (Liang *et al*, 2010). Ainda, em células de ductos coletores de camundongos, silenciadas para a AS160, aumentou o transporte de AQP2 (Aquaporina 2) na membrana plasmática, quando comparado ao grupo controle (Jung & Kwon, 2010). Em seu estado ativo a AS160 efetora está ligada a uma Rab de vesícula onde, através da sua atividade GAP (Proteína ativadora de GTPase), ativa um fator intrínseco das Rabs. Este fator leva esta pequena proteína a exercer uma atividade GTPase, onde é capaz de clivar GTP/GDP. As Rabs ligadas a GDP encontram-se no seu estado inativo inibindo assim o transporte de vesícula. Quando ocorre fosforilação da Akt ou proteínas kinases efetoras, a AS160 é fosforilada perdendo sua função inibitória sobre as Rabs, Assim as Rabs se ligam a GTP passando para a forma ativa e promove o transporte e ancoramento das vesículas na membrana plasmática (Fakuda, 2011).

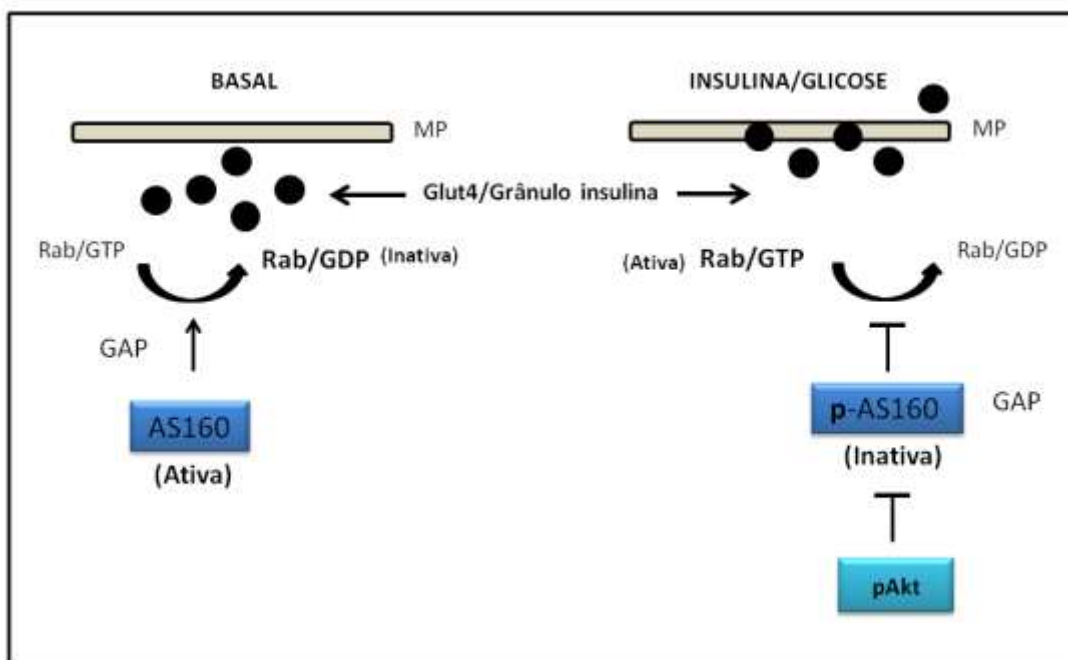


Figura 1. Possível mecanismo de inativação da AS160 no transporte de vesículas contendo **GLUT4** ou **insulina**. No estado basal (esquerda), a AS160 está desfosforilada, portanto ativa e através da sua atividade GAP (Proteína ativadora de GTPase) modula (positivamente) a atividade GTPase (capacidade de clivar GTP em GDP) das pequenas Rabs. Neste estado, as Rabs ligadas a GDP inibem o tráfego e ancoramento de vesículas contendo GLUT4/Insulina. Sob estímulo de insulina ou glicose (direita), a AS160 é inativada por fosforilação, portanto sua atividade GAP está diminuída, o que permite maior ativação das Rab, promovendo o transporte das vesículas a serem liberadas.

AS160 e secreção de Insulina

Assim como nos tecidos periféricos a proteína AS160 parece exercer função moduladora (inibitória) sobre as células beta pancreáticas, especialmente sobre o processo de secreção de insulina. Em 2008, demonstrou-se que a AS160, proteína ativadora de GTPases (Figura 1), em seu estado ativo ela encontra-se desfosforilada, ao ser fosforilada por estímulo de glicose ou insulina perde sua atividade e função inibitória sobre as vesículas. É expressa em células β de humanos e camundongos exercendo um papel inibitório sobre as vesículas contendo grânulos de insulina (*FEEDBACK* positivo/regulação autócrina) (Bouzakri *et al*, 2008). *Knockdown* para a AS160 em célula beta resultou redução marcante da proliferação celular e aumento de quatro vezes na atividade da Caspase3. Esses dados revelam seu envolvimento também na sobrevivência das células β , regulação da proliferação celular e na secreção de insulina (Bouzakri *et al*, 2008). Neste estudo, redução de 80% no conteúdo de AS160 em células β transfectadas com o gene do GH (hormônio do crescimento), induziu um aumento significativo na secreção do GH, mostrando o envolvimento da AS160 na capacidade secretória dessas células. Utilizando as mesmas células β *Knockdown* para AS160, resultados semelhantes foram obtidos em células β primárias de camundongos para a secreção de insulina. O autor sugere que a AS160 pode exercer o papel modulador (repressor) em célula β , semelhante aos tecidos periféricos em relação à movimentação das GSVs que ao ser fosforilada é inativada e perde sua função inibitória promovendo o tráfego dos GLUTs e/ou grânulos de insulina. Contudo, o mecanismo pelo qual isso acontece ainda não foi completamente esclarecido. A AS160 parece ter uma relação direta com os mecanismos secretórios de insulina pela sua função Rab-GAP. Como dito anteriormente, faz parte da família de proteínas TBC de 4 membros (TBC1D1, 2, 3 e 4) com domínio GAP

(capacidade de ativar GTPases) e, pode ser fosforilada em seis resíduos (S318, S341, S588, T642, S666 e S751) (Treebak *et al*, 2009) sendo cinco em Serina e um em Treonina, em resposta a insulina (Brouzaki, 2008). Dois desses sítios, Thr 642 e Ser 588, são fosforilados pela Akt (Kane *et al*, 2002). Proteínas com domínio GAP modulam (reprimir) as pequenas Rabs, ativando sua atividade GTPase, inibindo o tráfego e ancoramento de vesículas. As Rabs, através da sua atividade GTPase, clivam GTP em GDP e, se alternam em dois estado conformacionais: a forma Rab/GTP (ativa) permitindo a liberação das vesículas e a forma Rab/GDP inibindo a liberação das vesículas (inativa) (Fakuda, 2011). Em humanos, há mais de 60 membros da família Rab localizados em distintas membranas intracelulares (Schwartz *et al*, 2007; Zerial & McBride, 2001). As Rabs podem mediar ligações entre as vesículas e fatores que interagem com as moléculas aceptores de membrana. Tais fatores podem interagir com as SNAREs e seus reguladores que ativam a formação do complexo SNARE, o que resulta na fusão de membrana (Sternmark, 2009). A elucidação de como as Rabs controlam os complexos SNARE já foi mostrada em estudos de exocitose, por exemplo a Rab 27A que, além de mediar a conexão, fixação e aderência da vesícula, controla também o ancoramento de vesículas na membrana plasmática (Fukuda, 2005; Tsuboi & Fukuda 2006). Especificamente, a granofilina, efetora da Rab 27A (também conhecida como SLP4), interage diretamente com o complexo Sec1-Munc18-1 (conhecida como proteína de ligação sitaxina1), que promove o ancoramento das vesículas do núcleo na membrana plasmática (Gomi *et al*, 2005). A granofilina, originalmente identificado como um gene preferencialmente expresso em células β pancreáticas (Wang *et al.*, 1999), interage com as pequenas GTPases Rab 27A (Yi *et al.*, 2002). Contudo, o excesso de granofilina parece aumentar o ancoramento, mas inibe a exocitose (Tsuboi & Fukuda 2006). Diante dessas

informações, decidimos estudar a associação entre a AS160 e a Rab27A e sua participação sobre a secreção de insulina em modelo de RI induzida por glicocorticóides.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação da proteína AS160 e Rab27A sobre o processo secretório de insulina em ilhotas pancreáticas de ratos hiperinsulinêmicos induzidos pelo tratamento com Dexametasona.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em ilhotas CTL e DEX:

- Avaliar a expressão da AS160;
- Avaliar participação da via PI3K/Akt na secreção de insulina estimulada por glicose na presença de Wortmanina (inibidor da PI3-k);
- Avaliar a participação da AMPK na secreção de insulina estimulada por glicose na presença de AICAR (ativador da AMPK);
- Avaliar a participação da AS160 na secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas de ratos tratados com anti-sense para a AS160;
- Avaliar a expressão da Rab27A;
- Avaliar a associação entre as proteínas Rab27A e AS160;
- Avaliar a expressão da AMPK e FoxO1.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados ratos Wistar machos com 90 ± 10 dias de vida, provenientes do Biotério Central da UNICAMP, Campinas, SP. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), com livre acesso à ração e água. Os ratos receberam injeção intraperitoneal diária (fosfato de dexametasona, Decadron[®], 1,0 mg/kg, *p.c.*, diluída em salina) entre 7:30 – 8:30h, durante 5 dias consecutivos (DEX), enquanto um grupo controle recebeu salina (CTL). No dia seguinte ao término do tratamento (6º dia), os animais de ambos os grupos foram sacrificados por exposição à CO₂, seguido por decapitação, para remoção dos tecidos. Os procedimentos experimentais foram submetidos à análise e aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal – CEEA – IB – UNICAMP, nº do processo 2291-1.

Parâmetros Metabólicos: Crescimento: Foi realizada determinação diária do peso corpóreo dos animais ao longo do período de tratamento. Glicose sanguínea: foi quantificada a glicemia dos ratos no período pós-absortivo de 12h com uso de glicosímetro digital “Accu-Chek[®]” (Perfoma) antes do sacrifício a partir da gota de sangue retirado da ponta da cauda. Insulina sérica: Após a decapitação dos ratos tratados, o sangue foi coletado em tubo de vidro, previamente lavado com solução salina. Em seguida, os tubos foram mantidos por 1 h a 38°C em estufa para formação do soro e a centrifugados a 2.000 g por 10 min. a 22°C (eppendorf 5810R) e o soro aliquoteado e armazenado a -20°C para posterior quantificação da insulina por Radioimunoensaio (RIA) (Rafacho et al., 2008a).

Teste de Tolerância à Glicose intraperitoneal (ipGTT): Após 12 horas de jejum, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (THIOPENTAX[®], 60mg/kg p.c.) e, depois de verificação de ausência de reflexos pelo pinçamento entre os dedos da pata posterior, os animais tiveram a extremidade da cauda seccionada para a coleta de sangue no tempo 0. A seguir, foi administrada, por via intraperitoneal, solução de glicose 50% (2g/kg, peso corpóreo) e coletadas amostras de sangue da cauda dos animais aos 30, 60 e 120 min. para determinação das concentrações de glicose como descrito acima (Rafacho et al., 2007, Rafacho et al 2008a).

PCR – Real Time: 3µg de RNA total foram submetidos à reação de transcrição reversa (RT). A reação foi composta por primers randômicos, enzima transcriptase reversa, dNTP mix e tampão mantidos por 10 min. à 25°C, 120 min. à 37°C, 5 seg. à 85°C e para finalizar um resfriamento à 4°C. A reação de PCR (Reação em cadeia de polimerase) quantitativo foi de um volume final de 15 µl, composta por 0,5 µl de cDNA, 10 µmol/l de cada primers e 7,5 µl de SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de ciclagem foram de 95°C por 10 min., seguido de 40 ciclos a 95°C por 10 seg. e 60°C por 45 seg. As curvas de amplificação foram analisadas utilizando-se o *Sequence Detector System 1.7* (Applied Biosystems). Os resultados estão apresentados como % do controle a partir do valor de RQ (*Relative Quantity*), que obedece a fórmula matemática $2^{-(\Delta\Delta CT)}$. O valor de $\Delta\Delta CT$ compreende a diferença entre o valor do ciclo da amostra em que se inicia a fase exponencial da curva de amplificação do gene em análise, normalizado pelo valor do ciclo do gene utilizado como controle endógeno e, o valor do ciclo da amostra referência em que se inicia a fase exponencial da curva de amplificação do gene em análise (Roma *et al.*, 2009). Foram avaliados os genes P85, Akt2, AS160, AMPK α 2 e Rab27A.

Extração proteica e Western Blot: As ilhotas foram isoladas e homogeneizadas em solução de lise celular a 4°C (Cell Signaling, MA, USA). A determinação da concentração protéica total do lisado foi realizada pelo método Bradford, de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad, CA, USA). As amostras foram então incubadas a 100 °C por 3 min. em Tampão de Laemmli (30% do volume da amostra) (Azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1M, glicerol 50%, SDS 10%) contendo DTT. Para corrida eletroforética foi aplicado um volume correspondente a 30 µg de proteína em gel bifásico: gel de empilhamento (EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 750 mM, pH 6.7) e gel de resolução (EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 50 mM, pH 8.9). A corrida foi efetuada a 90 Voltz por aproximadamente 1,5 h e 3 h, para a AS160, com Tampão de Corrida (Trisma base 50 mM, glicina 0,38 M, EDTA 1,795 mM e SDS 0,1%). As amostras foram transferidas para uma membrana de Nitrocelulose (BioRad) durante 2 h à 120 Voltz em gelo, banhada com Tampão de Transferência (Trisma base 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%). Após transferência, a membrana foi bloqueada em solução de TBST (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl e 0,1% Tween-20) contendo com 5% de leite desnatado por 40 min., TA. As proteínas relacionadas ao estudo foram detectadas na membrana de nitrocelulose por incubação de 14-16 h, 4° C, com anticorpo específico (proteínas t-Akt2, p-Akt2 (Thr308), t-AS160, p-AS160 (Thr 642), t-AMPK, p-AMPK (Thr172), P85, t-FoxO1, p-FoxO1 e Rab GTPase 27A). Em seguida, a membrana foi incubada por 2 h em solução contendo anticorpo policlonal anti-IgG (diluição 1:10000 em TBST com 2% de leite desnatado). As membranas foram lavadas com TBST, incubadas por 3 min. com reagentes de quimiluminescência e expostas em cassetes a filmes de raio-X (Kodak, AM, Brasil). A intensidade e quantificação das bandas foram medidas por densitometria (ImageJ, Bethesda, USA), sendo os valores das bandas normalizados pelos valores

de densitometria do controle endógeno α -tubulina. Para análise da fosforilação protéica, os valores da densitometria das proteínas fosforiladas foram normalizados pela expressão das proteínas totais (Fosforilação proteica = proteína fosforilada/ proteína total).

Imunoprecipitação: Após determinação do conteúdo de proteínas totais para ilhotas isoladas em cada grupo experimental, 500 μ g de proteínas foi utilizado para imunoprecipitação overnight, à 4°C, com anticorpos específicos anti-AS160. O imunoprecipitado foi separado após incubação com proteína A-Sepharose 6 MB por 2 horas à 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (15.500 x g, 20 minutos, 4 °C) e submetidas à lavagem com tampão de lavagem por 3 vezes de 5 minutos cada (15.500 x g, 4 °C). As proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970) contendo 100 mmol/l de DTT e aquecidas em água fervente por 5 minutos. A seguir, quantidades iguais de proteína (500 μ g) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD miniature slab gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 120 Voltz em períodos de tempo variáveis em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD, como descrito (Towbin *et al.*, 1979). A ligação dos anticorpos às proteínas não específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 120 minutos com tampão de bloqueio à temperatura ambiente (TA). A membrana de nitrocelulose foi então incubada, overnight com anticorpos específicos anti-Rab27A diluídos em solução para anticorpo, e então, lavada por 15 minutos com solução basal. Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (Invitrogen), diluído 1:10000 em albumina a 5%, por 2h e, conseqüentemente lavadas com solução basal. Após

lavagem, as membranas foram banhadas em solução reveladora Super Signal (Pierce) e colocadas junto a filmes radiográficos (Kodak) para auto-radiografia e/ou aparelho fotodocumentador, Luminescent Image Analyzer (ImageQuant LAS 4000) da marca GE. A intensidade das bandas foram avaliadas por densitometria pelo programa ImageJ.

Inibição com antisense da AS160 e Isolamento de Ilhotas Pancreáticas: Para o *knockdown in-vivo* da AS160, ratos receberam 100 nmol de oligonucleotídeo antisense específico para AS160 (AS) (mG*mU*mC* mC*mU*C* T*T*C* C*T*C* C*C*T* mU*mC*mU* mC*mC) ou Mismatch (CTL) (mG*mU*mC* mG*mU*C* A*T*G* C*A*C* C*C*T* mU*mC*mU* mC*mC), ambos com esqueleto fosforado e metilações flanqueadas nas extremidades, dissolvidos em solução Tris-EDTA, aplicados a cada 12 horas por cinco dias seguidos, paralelo a injeção de dexametasona. No sexto dia os ratos foram mortos por exposição à câmara de CO₂ seguido de decapitação. Após incisão abdominal o pâncreas foi retirado e transferido para um falcon de 50 ml contendo solução de Hanks enriquecida com 0,8 mg/ml de collagenase. O pâncreas na solução de Hanks foi mantido em banho a 37°C por 23 min. Ao final deste período foi realizada uma leve agitação de 15 segundos seguida de uma brusca agitação de 20 segundos para facilitar a desagregação do tecido pancreático. A digestão do tecido foi interrompida mediante adição de Hanks a 4 °C. O material foi lavado quatro vezes de 3 minutos em solução de Hanks para a remoção da collagenase e enzimas digestivas liberadas durante a incubação. As ilhotas, completamente separadas do tecido acinar, foram coletadas uma a uma, por aspiração com o auxílio de pipeta Pasteur, previamente estirada e siliconada. Foram avaliadas expressão protéica da AS160 e a secreção de insulina estimulada por glicose.

Secreção de insulina: Ilhotas pancreáticas foram pré-incubadas em solução de Krebs contendo 5,6 mM de glicose por 1 h a 37°C sob gaseamento com carbogênio – 95% O₂ : 5% CO₂. Em seguida as ilhotas foram reincubadas, com solução de Krebs contendo 2,8 ou 16,7 mM de glicose por período suplementar de 1 h a 37°, com ou sem a adição de Wortmannin (100 nM) diluídos em DMSO (1000uM) ou AICAR (200uM) diluídas em H₂O milliQ. Foram utilizadas também ilhotas de ratos *knockdown* para AS160 para secreção na presença de 2,8 e 16,7mM de glicose. Ao término do período de 1 h da segunda incubação, o sobrenadante foi coletado e a insulina contida nesse meio foi medida posteriormente por RIA. A secreção foi expressa ng. ml⁻¹. h⁻¹. Ilhota⁻¹.

Análise Estatística: Os resultados com dois grupos foram analisados pelo teste *t-student*. As análises foram feitas com o programa GraphPad Prism 4 e Origin 4. O nível de significância adotado para as análises foi $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ratos tratados com Dexametasona são normoglicêmicos, têm insulinemia de jejum e peso do fígado aumentado, porém com peso corporal reduzido.

Observa-se que a glicemia de jejum foi semelhante entre os ratos dos dois grupos ($89,57 \pm 5,79$ vs. $90,43 \pm 4,76$ mg/dL, respectivamente para CTL e DEX, $n=7$, $P<0,91$). Ainda, o ipGTT revela que a glicemia dos ratos tratados com dexametasona foi significativamente maior após administração da sobrecarga à glicose nos tempo 30 e 60 min, comparado aos controles, porém voltando a valores próximos ao basal em 120 min (Fig. 2A). A área sob a curva (AUC) também foi significativamente maior nos ratos tratados com Dexametasona (Fig. 2B) e a insulinemia (Fig. 2C) foi significativamente maior nos ratos tratados com dexametasona ($1,07 \pm 0,19$ vs. $7,06 \pm 2,39$ ng/ml, respectivamente para CTL e DEX, $P<0,03$). Este quadro nos mostra de forma clara que uma resistência a insulina foi instalada nos animais tratados com DEX quando observamos uma glicemia de jejum próximo aos valores do CTL, porém, uma intolerância quando estes animais foram desafiados com cargas supra-fisiológicas de glicose, apresentado também uma hiperinsulinemia, mecanismo claro de compensação gerado na célula beta (Rafacho et al, 2008;2009). Como observado por outros pesquisadores (Gounarides et al, 2008), o peso corporal dos ratos tratados com dexametasona foi significativamente menor do que os controles (Fig. 3A) mostrando, também, diferenças significativas no peso dos fígados (Fig. 3B) entre os dois grupos (CTL $10,83 \pm 0,6$ g vs. DEX $13,33 \pm 0,7$ g, $n=6$, $P<0,02$). Outros grupos também atribuíram esta perda de peso a redução na captação de glicose no tecido muscular causada pela administração com Dexametasona (Santos et al, 2007; Rafacho et al, 2008), podendo também ter um efeito

anorexigênico causado pela ação da insulina no hipotálamo (Wood et al, 1979). Dessa forma, verificamos que o tratamento com DEX de fato promoveu as respostas fisiológicas esperadas.

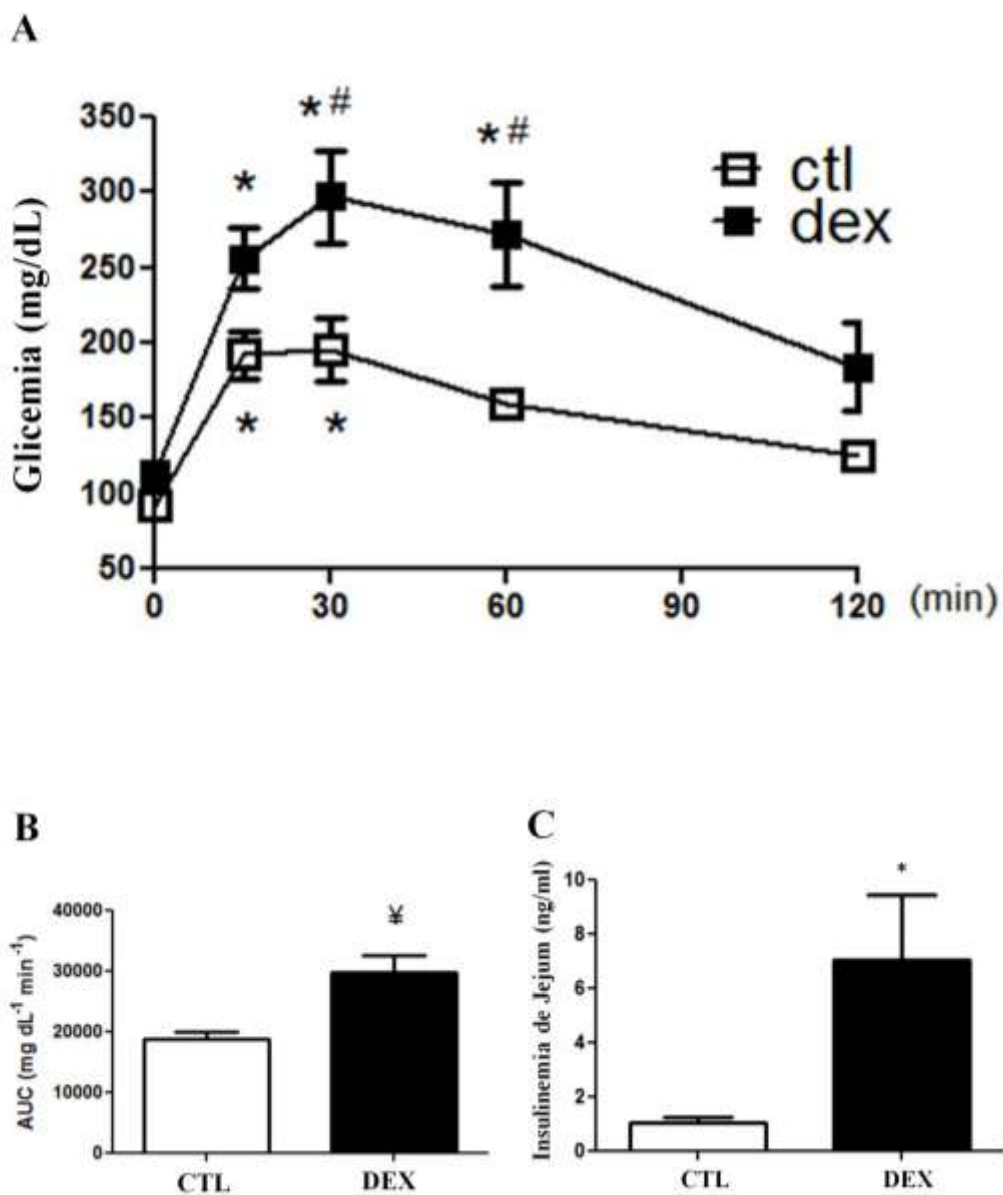


Figura 2. ipGTT de ratos controle e tratados com Dexametasona. (A) Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) dos ratos CTL e DEX. (B) Área sob a curva (AUC) da glicemia dos ratos tratados com 1mg/kg de Dexametasona (DEX) e Salina 0,9% (CTL). (C) insulinemia

dos ratos CTL e DEX. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao ponto 0, *# diferença significativa entre CTL e DEX (30 e 60 min.), $n = 7$, $P < 0,004$.

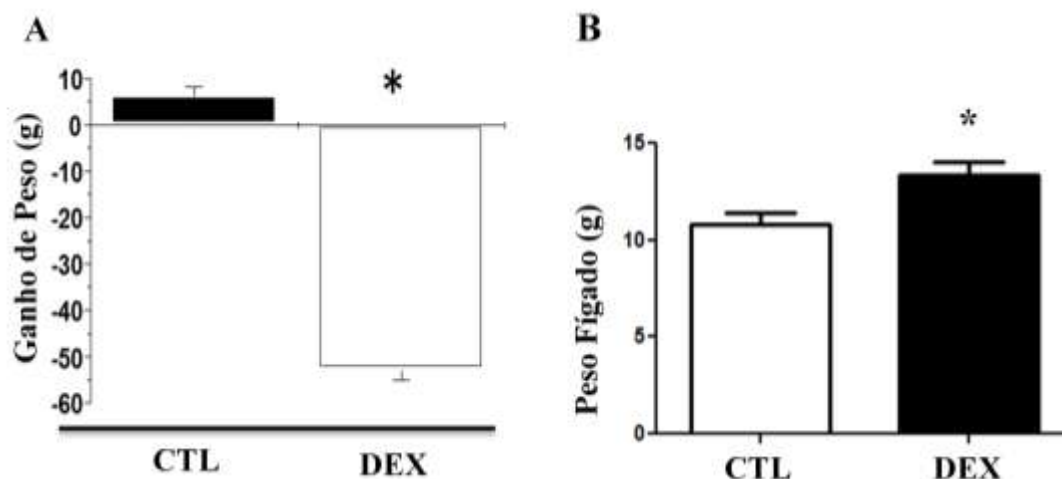


Figura 3. Peso corporal e hepático de ratos CTL e DEX. (A) Diferenças no ganho de peso corporal e (B) hepático de ratos CTL e DEX. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, $n=8$, $P < 0,05$.

Secreção de insulina e envolvimento da via PI3K/Akt.

Nossos experimentos mostraram um aumento significativo na secreção de insulina em ilhotas isoladas de ratos tratados com dexametasona, expostas às concentrações sub- (2,8 mM) e supra limiares de glicose (16,7 mM) (Fig. 4). Esses resultados corroboram observações anteriores (Rafacho *et al*, 2009a; 2010) indicando que o modelo de hipersecreção de insulina, aqui adotado, foi adequado.

É sabido que a Dexametasona aumenta a secreção de insulina pela estimulação da via da PI3K/Akt (Rafacho, 2008a). Nesse sentido, a Figura 5A mostra que não houve aumento

significativo na expressão da Akt, importante membro dessa via. Contudo, em ilhotas de animais tratados com Dexametasona houve aumento significativo da fosforilação da Akt em Thr308 (CTL $100 \pm 16,3$ e DEX $203,3 \pm 32,0$; $n=6$) (Fig. 5B) bem como a relação de proteína fosforilada sobre a total (CTL $100 \pm 10,41$ e DEX $204,2 \pm 25,6$) em ilhotas de ratos tratados com dexametasona, comparado ao grupo CTL ($P<0,05$) (Fig. 5C). A PI3K é uma proteína importante na ativação da cascata da via de sinalização da insulina em células beta, tendo como proteína alvo a Akt. Esta, quando fosforilada, ativa uma série de vias relacionadas à sobrevivência da célula beta e de proteínas importantes para o processo secretório. Por tanto decidimos avaliar a secreção de insulina quando dá inibição da via PI3k/Akt. Em ilhotas incubadas na presença de wortmanina, inibidor farmacológico da PI3K, o aumento da secreção de insulina, induzida por dexametasona, foi inibido, tanto em concentrações sub (2,8 mM) quanto supra estimulatórias de glicose (16,7 mM) (Fig. 6A). Dados mostraram (Fig. 6B) uma redução na fosforilação da Akt Thr308 em $\pm 150\%$ nas ilhotas DEX expostas a Wortmanina, nos indicando um papel importante na secreção de insulina induzida pela Dexametasona. Esses resultados indicam a participação da via da PI3K no processo secretório potencializado pelo glicocorticóide.

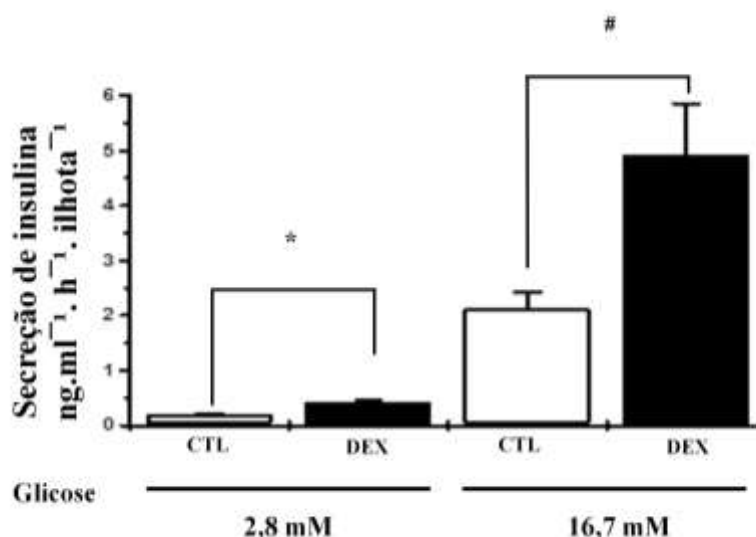


Figura 4. Secreção de insulina por ilhotas isoladas. Secreção de insulina estimulada com, 2,8 ou 16,7 mM de glicose, de ilhotas isoladas de ratos CTL ou DEX. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL *# $P < 0,05$; $n = 6$.

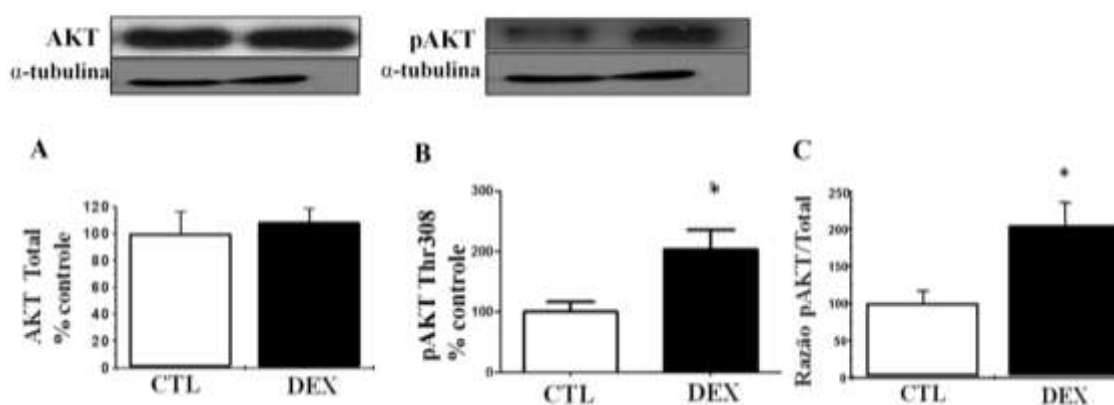
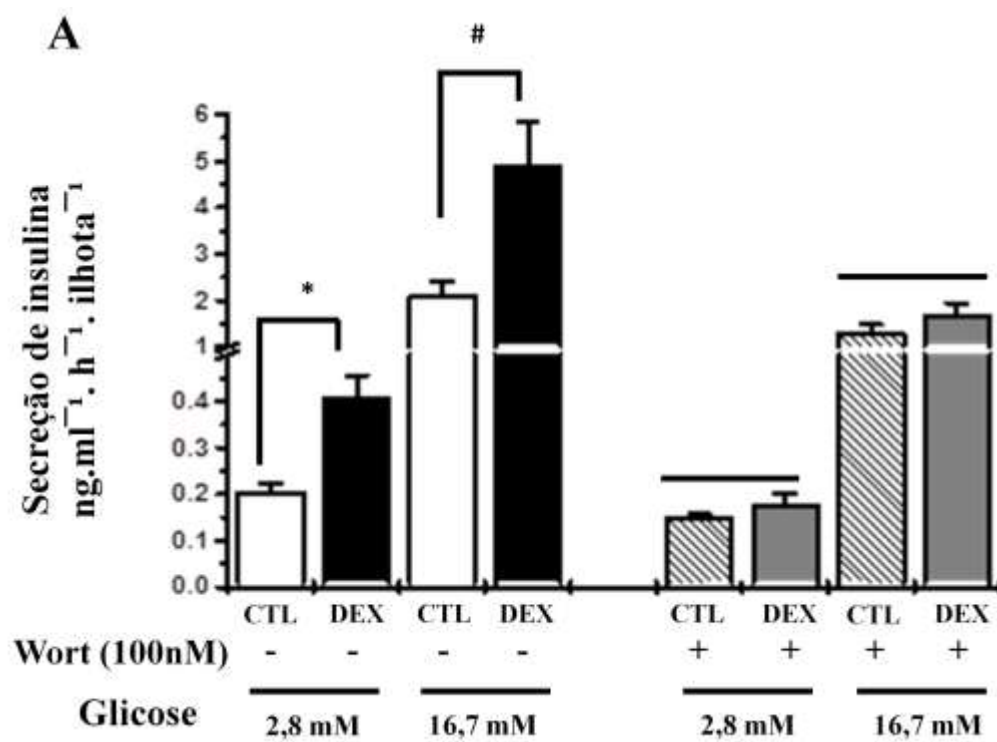


Figura 5. Expressão, Fosforilação da Akt e razão pAkt/Akt. (A) Conteúdo total da AKT, (B) fosforilação em Thr308 e (C) razão do conteúdo de proteína fosforilada pela total em ilhotas isoladas em ilhotas isoladas de ratos CTL e tratados com DEX (1 mg/kg por cinco dias). Os

resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferente em relação ao CTL, n=6, P<0,05.



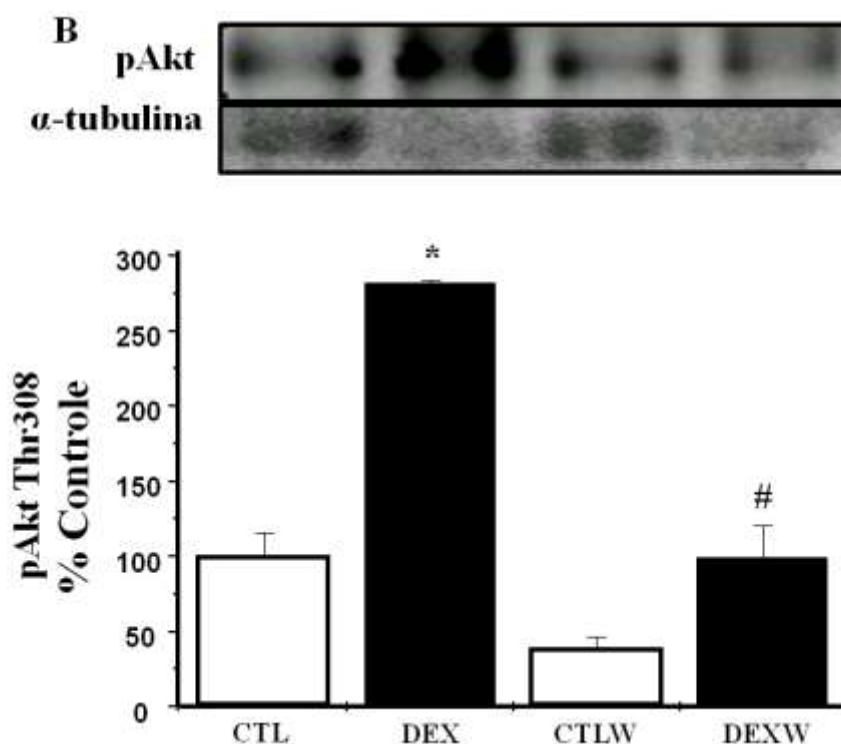


Figura 6. Secreção de insulina por ilhotas isoladas estimuladas por glicose na presença de wortmanina. (A) Secreção de insulina estimulada com, 2,8 ou 16,7 mM de glicose de ilhotas isoladas de ratos CTL ou DEX, na presença ou ausência de wortmanina. (B) Níveis protéicos de pAkt Thr308 em ilhotas de ratos expostas a Wortmanina. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=6, *# P<0,05.

Aumento do conteúdo e fosforilação da AS160 em Thr642 em ilhotas de ratos tratados com Dexametasona.

As ações da dexametasona sobre o aumento da massa e funcionalidade das ilhotas pancreáticas foram detalhadas em vários trabalhos do nosso grupo (Rafacho et al, 2009a; 2008a, 2007). Contudo, ainda não está esclarecida uma possível participação da AS160 nas alterações

induzidas pela dexametasona, citadas acima. Como a AS160 parece ser importante na manutenção das células beta e na secreção basal de insulina (Brouzaki et al, 2008) nosso próximo passo foi analisar a expressão e a fosforilação da AS160 em ilhotas de ratos tratados ou não com dexametasona. O tratamento com o glicocorticóide aumentou, significativamente, a expressão (CTL $100,3 \pm 8,3$, $n=5$ vs. DEX $210,9 \pm 42,9$; $n = 6$) e a fosforilação da AS160 em Thr642 (CTL $101,0 \pm 26,1$ vs. DEX $381,4 \pm 87,6$; $n = 4$), comparado às ilhotas controles (Figs. 7A e B, respectivamente). Observou-se também que a relação pAS160/AS160 foi maior nas ilhotas tratadas com dexametasona (CTL $102,2 \pm 19,2$ vs. DEX $257,7 \pm 57,1$, $n=4$, $p<0,05$) (Fig. 7C). Esses resultados fortemente indicam uma participação efetiva da AS160 na manutenção da massa e funcionalidade das ilhotas de ratos tratados com dexametasona, além disso, ela pode está participando de forma efetiva na hipersecreção de insulina induzida pelo glicocorticóide, já que ela fosforilada encontra-se inativa permitindo o transporte de vesículas.

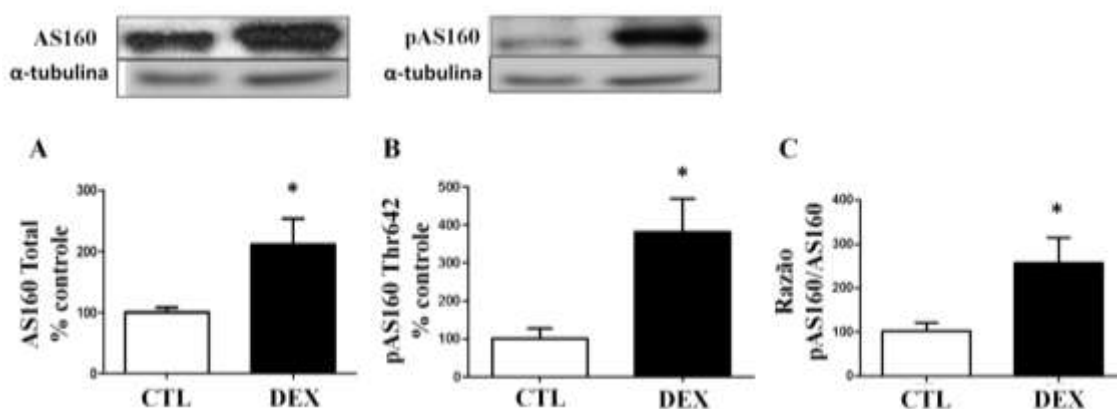


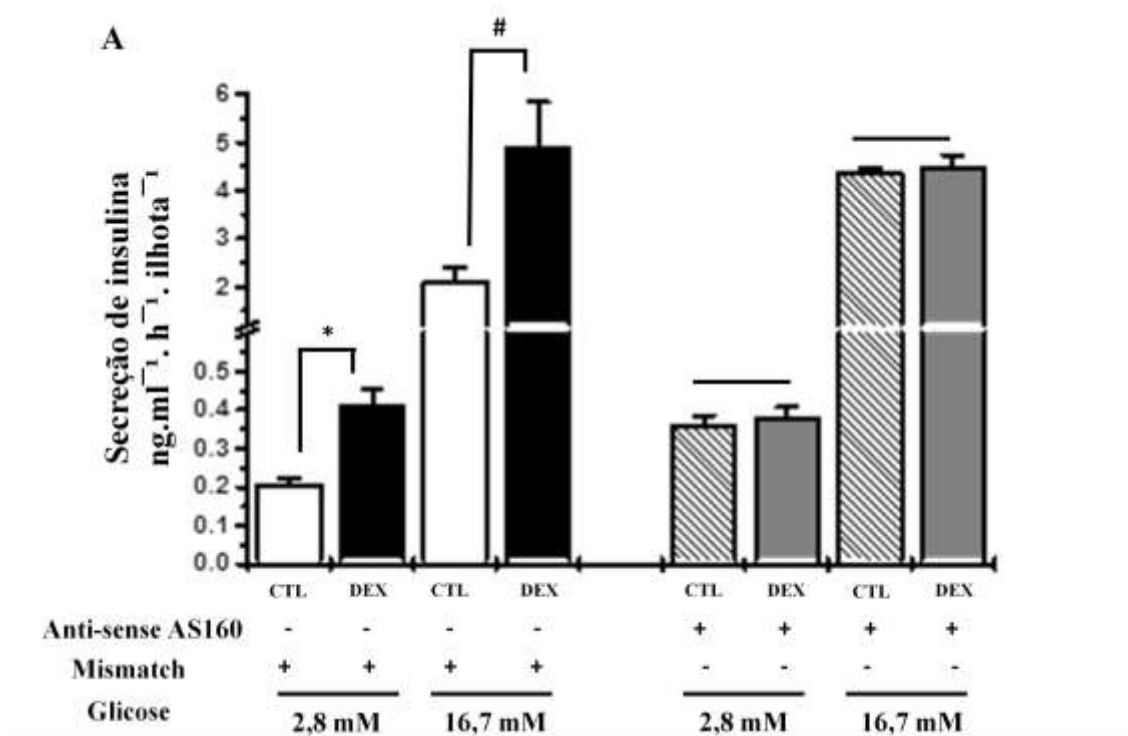
Figura 7. Expressão protéica, fosforilação da AS160 e razão pAS160/AS160. (A) conteúdo total da AS160, (B) fosforilação em Thr642 e (C) razão do conteúdo de proteína fosforilada pela

total em ilhotas isoladas de ratos CTL ou tratados com DEX por cinco dias (1mg/kg). Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=6, * P<0,05.

Potencialização da secreção de insulina em ilhotas isoladas de ratos knockdown para AS160.

Como mencionado na introdução, a AS160 é uma proteína com atividade GAP. No tecido muscular esquelético e adiposo, quando desfosforilada, sua função é inibir a atividade de uma proteína Rab, impedindo que esta se torne ativa quando ligada a GTP em reações necessárias para o transporte de vesículas que contêm GLUT4 do citoplasma para a periferia. Por analogia, pode-se inferir que a AS160 inibe a translocação das vesículas que contém os grânulos de insulina em direção à membrana plasmática das células beta pancreáticas, diminuindo assim a secreção basal de insulina (Bouzakri et al, 2008). Essa função é fundamental, uma vez que não é indicado secretar insulina em períodos de jejum. Confirmando essa linha de raciocínio, observa-se (Fig. 8) que a secreção de insulina, estimulada por concentrações sub (2,8 mM) ou supra-estimulatória (16,7 mM) de glicose, foi semelhante nas ilhotas provenientes de ratos tratados com Dexametasona que tiveram a expressão da AS160 reduzida por tratamento com anti-sense anti-AS160 (AS160kd). Pode-se argumentar que, como não houve alteração na secreção induzida por DEX nas ilhotas de animais AS160kd, a AS160 não compromete a GSIS. No entanto, é preciso atentar para o fato de que, no caso da AS160, em particular, o aumento em sua fosforilação possui o mesmo efeito sobre a secreção de insulina que a redução em sua expressão, visto que na ausência da ação repressora de AS160, a secreção de insulina é potencializada. Portanto,

podemos afirmar que a AS160 participa do efeito da DEX sobre a GSIS, visto que, quando sua expressão é reduzida, os efeitos de DEX são iguais aos observados em ilhotas de animais DEX com expressão regular de AS160, mas não possui efeito potencializador quando comparado a animais CTL AS160kd. Estes dados foram fortemente reforçados quando observamos uma redução significativa de aproximadamente 80% nas ilhotas CTL/AS e de 112,5% nas ilhotas DEX/AS (Fig. 8B).



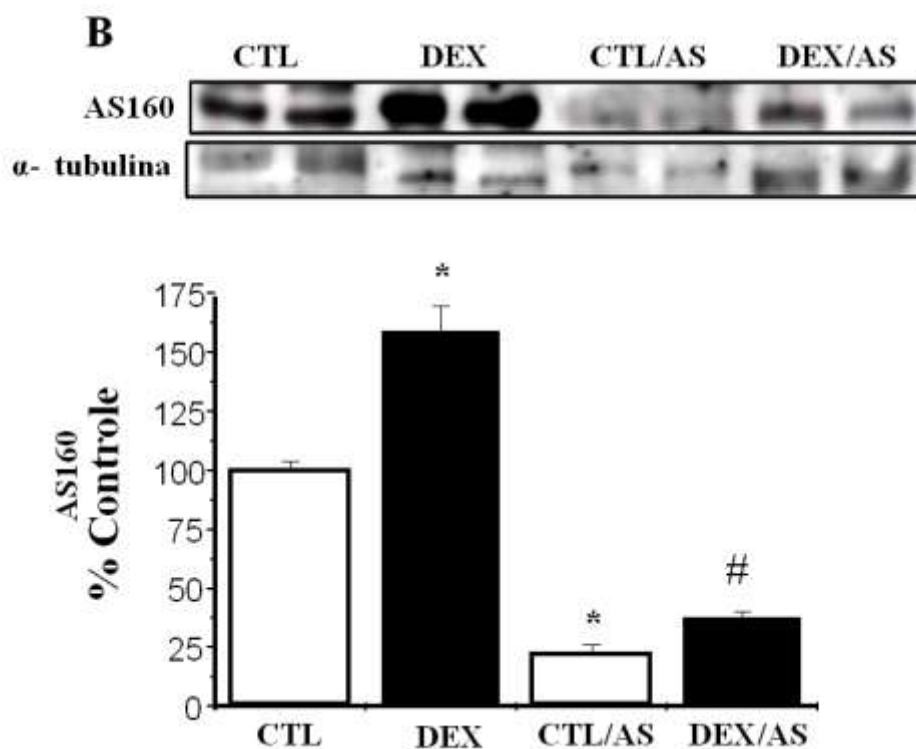


Figura 8. Secreção de insulina estimulada com glicose em ilhotas de ratos tratados ou não com anti-sense anti-AS160. (A) Secreção de insulina estimulada com, 2,8 ou 16,7 mM de glicose em ilhotas isoladas de ratos AS160kd (*Knockdown*) e controles e AS160kd (*Knockdown*) tratados ou não com Dexametasona. O tratamento com anti-sense anti-AS160 foi feito por cinco dias com duas doses diárias de 100 nmol do anticorpo. O grupo não tratado com anti-sense recebeu tratamento semelhante com *Mismatch*. (B) Níveis protéicos de AS160 em ilhotas CTL e DEX, *Mismatch* e *kd*, respectivamente. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=8, *# P<0,05.

Expressão gênica e protéica da Rab27A e sua associação com a AS160.

Uma vez demonstrado que o efeito potencializador da secreção de insulina pelo tratamento com Dexametasona envolve a participação da AS160, analisamos também os efeitos do glicocorticóide sobre a expressão gênica e protéica da Rab27A bem como sobre sua associação com a AS160. A Rab 27A é uma proteína importante na maquinaria de extrusão do grânulo de insulina na célula beta. Sua associação com GTP à torna ativa e permite o acoplamento da vesícula, contendo insulina, à membrana plasmática (Kimura et al, 2008; Stenmark, 2009) mediando a secreção de insulina estimulada por glicose (Kasai et al, 2005). Estudo já realizado pelo nosso grupo mostrou um aumento considerável no número de grânulos de insulina ancorados na membrana de células beta de ratos tratados com dexametasona (Rafacho et al, 2010), mas não a modulação sobre a Rab27A e sua relação com a maquinaria de exocitose. Como descrito anteriormente, a Rab está diretamente envolvida no *docking* das vesículas que contêm insulina em células beta. Nossos resultados mostraram que o tratamento com dexametasona aumentou a expressão gênica e protéica da Rab27A (Figs. 9A e B), contudo, diminuiu, significativamente, a associação entre essa proteína e a AS160 em ilhotas pancreáticas (CTL 100.0 ± 2.4 , n=5 vs. DEX 86.9 ± 1.6 , n=6) ($P < 0,05$) (Fig. 9C). Esses resultados indicam que a secreção de insulina, potencializada pelo tratamento com dexametasona, parece envolver a inativação da AS160, aumento da expressão da Rab27A e, menor associação entre estas proteínas.

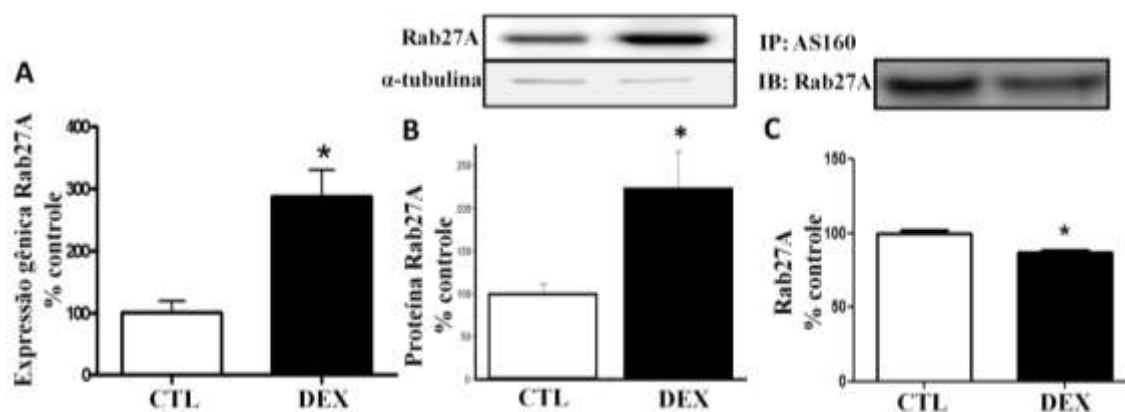


Figura 9. Expressão gênica e protéica da Rab27A e sua associação com a AS160. (A) expressão gênica da Rab27A, (B) conteúdo total da Rab27A e (C) associação da Rab27A com AS160 em ilhotas isoladas de ratos CTL e tratados com DEX. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=4, * P<0,05.

Fosforilação da AMPK e secreção de insulina em ilhotas expostas a AICAR.

É conhecido que a AMPK, importante para a determinação do estado energético celular, promove a fosforilação da AS160, inativando-a, através de via independente a insulina em tecido muscular e adiposo (Funai & Cartee, 2009). Nosso próximo passo foi verificar em que estado se encontra a AMPK nas ilhotas de ratos tratados com DEX, buscando identificar por qual via está ocorrendo à modulação (aumento) da AS160. As figuras 10A e B mostram que tanto a expressão (CTL $100,1 \pm 36,6$ vs. DEX $31,4 \pm 14,6$; n = 4) quanto à fosforilação (CTL $100,7 \pm 12,1$ vs. DEX $60,2 \pm 11,2$ n=5) da AMPK α 2 estão diminuídas em ilhotas tratadas com o glicocorticoide, comparado a ilhotas CTL (P<0,05). Ainda, a Figura 10 C mostra que a relação da pAMPK/AMPK, nas ilhotas de ratos DEX tendeu a ser menor, porém não foi significativo (CTL

100,6 $\pm$ 43,6 vs. DEX 57,8 $\pm$ 29,4; n=4). Por tanto esses dados nos leva a pensar que a fosforilação da AS160 aumentada nas ilhotas DEX pode estar ocorrendo via fosforilação da Akt. O quadro é reforçado quando observamos que a secreção de insulina, pelas ilhotas controles e ilhotas tratadas com dexametasona, foi atenuada em baixa concentração de glicose (2,8mM) com a estimulação da AMPK pelo AICAR (análogo de AMP) (Fig. 11). Observamos que apesar da secreção de insulina se manter diminuída nas ilhotas tratadas com AICAR, um perfil secretório aumentado nas ilhotas DEX ainda se mantém, mostrando que sua modulação (aumento) independe da AMPK. Esses resultados reforçam que o aumento na fosforilação da AS160 e potencialização da secreção de insulina, induzida por Dexametasona, parece estar relacionada à ativação da via PI3K/Akt.

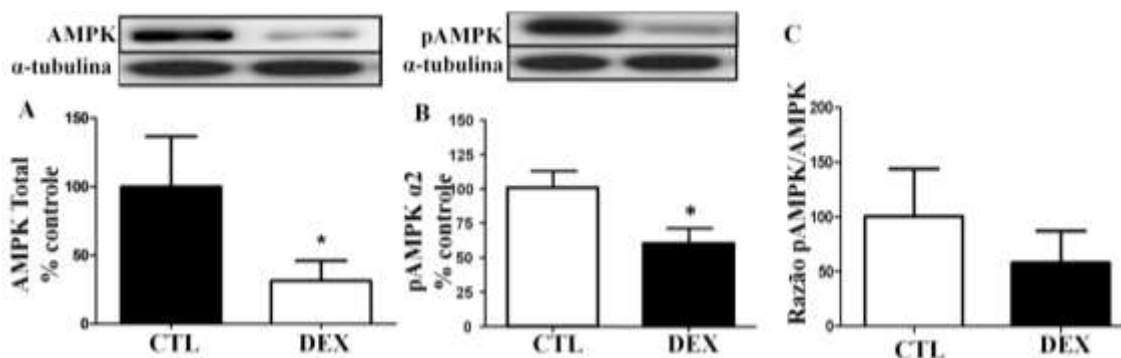


Figura 10. Expressão, Fosforilação da AMPK e razão pAMPK/AMPK. (A) conteúdo total da AMPK, (B) fosforilação da AMPK α 2 e, (C) razão do conteúdo de proteína fosforilada pela total em ilhotas isoladas de ratos CTL e tratados com DEX. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=5, * P<0,05.

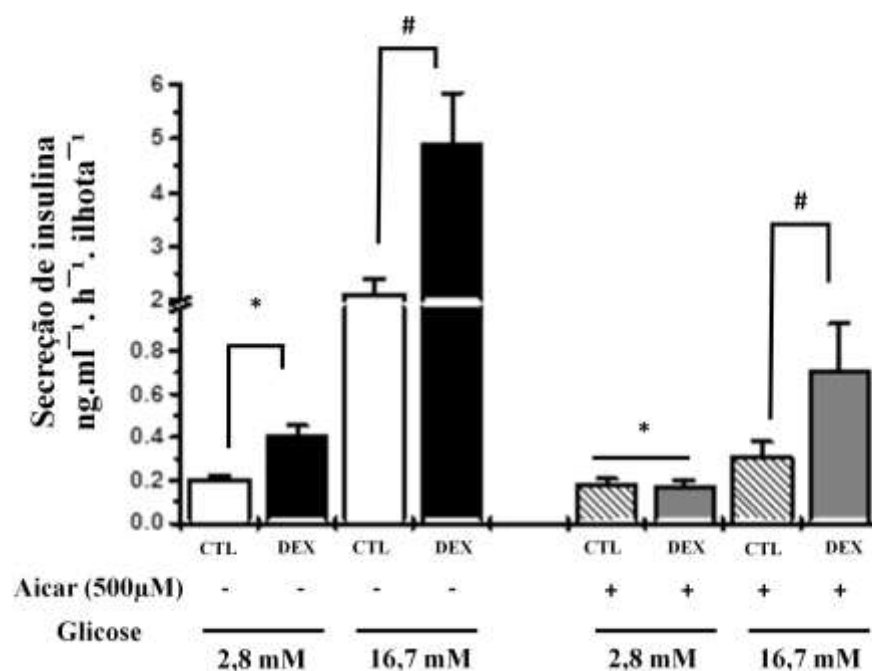


Figura 11. Secreção de insulina em ilhotas isoladas e estimuladas com glicose na presença de AICAR. Secreção de insulina estimulada com, 2,8 ou 16,7 mM de glicose em ilhotas de ratos CTL e DEX na presença ou ausência de AICAR (ativador da AMPK, análogo de AMP). Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=8, * # p<0,05.

Expressão e fosforilação da FoxO1.

Após avaliar as proteínas envolvidas na fosforilação e inativação da AS160, verificamos uma possível participação da FoxO1, proteína *downstream* da Akt e importante marcador, na ação da dexametasona em ilhotas. Estudo em adipócitos de murinos e humanos mostrou um aumento significativo da pFoxO1 e uma diminuição da pAS160 (Ngo *et al*, 2009). O autor sugere que a redução da fosforilação da AS160 pode ser via FoxO1, modulada pela DEX. Essa suposição levanta a hipótese que proteínas fosfatases poderiam agir reduzindo a pAS160, uma

vez que não houve alteração de proteínas upstream da via da insulina, principalmente da Akt. O que também explicaria a diminuição na captação de glicose nestes tecidos. Porém nossos dados mostraram o contrário. Na célula beta, sob a ação da dexametasona, parece ser necessário o aumento na fosforilação dessas duas proteínas. Apesar de nossos resultados não apresentar diferença significativa na expressão da proteína FoxO1 (Fig. 12A), observamos um aumento significativo na fosforilação e razão pFoxO1/FoxO1 (Fig. 12B e C) nas ilhotas de ratos tratados com Dexametasona. A FoxO1 quando ativa (desfosforilada) inibe a PDX-1, importante fator de transcrição para o desenvolvimento da célula beta. Quando fosforilada pela Akt, a FoxO1 deixa de inibir a PDX-1, permitindo assim a proliferação da massa da célula beta. No estado hipersecretório apresentado na célula beta de ratos tratados com DEX é necessário uma massa maior para que unidades maiores de insulina seja secretado para a manutenção da glicemia circulante e, ao mesmo tempo manter a célula viva. Esses resultados corroboram estudos já mostrados em que o aumento da fosforilação da Akt modula a fosforilação da FoxO1 induzida por dexametasona (Zhang *et al*, 2009). Diante das informações da literatura, associadas aos nossos resultados e, considerando a necessidade dos animais tratados com dexametasona em manter uma massa maior de células beta, principalmente para manter as células vivas e secreção aumentada, é provável que esse mecanismo envolva a participação dessas duas proteínas.

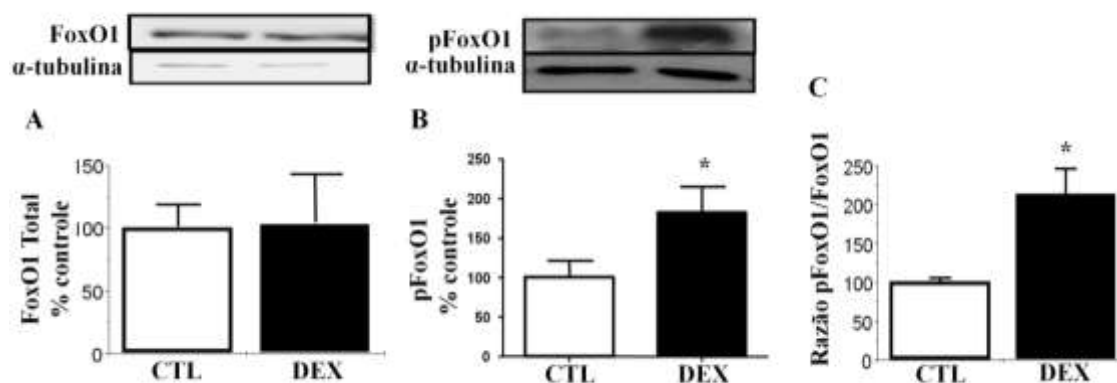


Figura 12. Expressão protéica, Fosforilação da FoxO1 e razão pFoxO1/FoxO1. (A) conteúdo total da FoxO1, (B) fosforilação da pFoxO1 e, (C) razão do conteúdo de proteína fosforilada pela total em ilhotas isoladas de ratos CTL e tratados com DEX. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM, *significativamente diferentes em relação ao CTL, n=5, *P<0,05.

CONCLUSÃO

Concluimos que ilhotas pancreáticas de ratos, tratados com dexametasona, têm a expressão e fosforilação da AS160 significativamente aumentadas, comparado aos controles. Pelo fato desta enzima ser inativada quando fosforilada indica sua participação, de forma efetiva, no aumento da secreção de insulina nesse modelo de RI. Esse efeito parece ser via PI3K/Akt, pois, a secreção de insulina foi completamente abolida quando da inibição dessa via.

Além disso, a dexametasona aumentou a expressão gênica e protéica da Rab27A, mas diminuiu a associação entre esta proteína e a AS160. Fato este, relatado pela primeira vez em ilhotas pancreáticas. Essas informações indicam que a secreção de insulina aumentada neste modelo depende da inativação da AS160 e da redução da associação entre essas duas proteínas.

Acreditamos que nossos resultados apontaram a AS160 e Rab 27A como grandes alvos para a indústria farmacológica no tratamento de indivíduos que apresentam o quadro de hiperinsulinemia gerado pela RI.

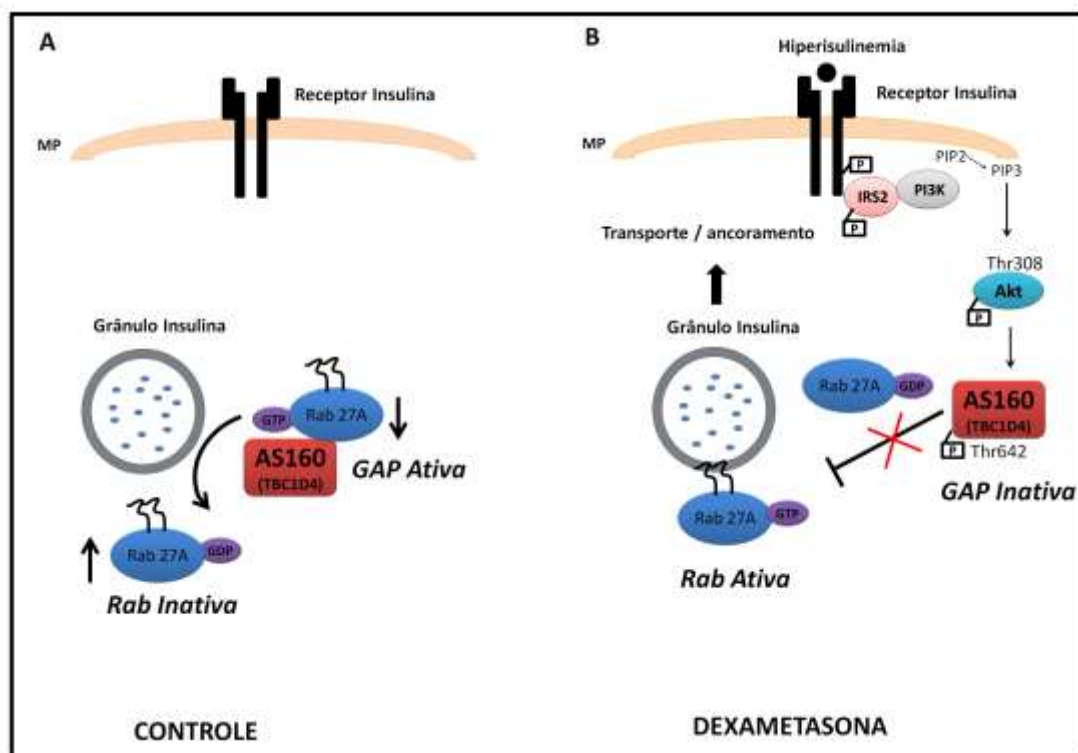


Figura 13. *Possível mecanismo de secreção de insulina sob a modulação da AS160/Rab 27A nas ilhotas pancreáticas. (A) Em condições basais a Rab 27A está constitutivamente inativa através da atividade GAP da AS160/TBC1D4, inibindo assim o transporte e ancoramento das vesículas contendo insulina. (B) Sob estímulo da hiperinsulinemia, a via PI3K/Akt é ativada, fosforilando a AS160, inativando-a. Sua inativação inibe sua função inibitória sobre a Rab 27A, permitindo assim o transporte e ancoramento dos grânulos de insulina.*

REFERÊNCIAS

- BOUZAKRI K. et al. Rab GTPase activating protein AS160 is major downstream effector of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic β -cells. *Diabetes*. Vol.57, may, 2008.
- BOUZAKRI K. et al. Silencing mitogen-activated protein 4 kinase (MAP4K4) protects beta cells from tumor necrosis factor- α -induced decrease of IRS-2 and inhibition of glucose-stimulated insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 284, N° 41, 27892-27898, Oct 2009.
- BURÉN J et al. Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. *Eur J Endocrinol*. 146:419-429, Mar, 2002.
- CARTEE G. D. & FUNAI K. Exercise and Insulin: Convergence or Divergence at AS160 and TBC1D1? *Exercise Sports Science Rev*. Vol. 37, N°4, 188-195, Oct, 2009.
- CHADT A. et al. Tbc1d1 mutation in lean mouse strain confers leanness and protects from diet-induced obesity. *Nature genetics*. Vol. 40, number 11, 1354-1359, Nov, 2008.
- CHEN F. et al. Dynamic Regulation of PDX-1 and FoxO1 expression by FoxA2 in Dexamethasone-induced pancreatic β -cells Dysfunction. *Endocrinology*. 152(25):1779-17788, My, 2011.
- DELAUNAY F. et al. Pancreatic β cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. *J. Clin. Invest*. 100:2094-2098. 1997
- FAKUDA M. TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Bioscience Reports*. Vol. 31 (3), 159-168, Jan, 2011.

- FUNAI K. & CARTEE G. D. Inhibition of Contraction-Stimulated AMP-Activated protein kinase inhibits Contraction-Stimulated Increases in PAS-TBC1D1 and Glucose Transport Without Altering PAS-AS160 in Rat Skeletal Muscle. *Diabetes*. Vol.58, May, 2009.
- GINION A. et al. Inhibition of the mTOR/p70S6K pathway is not involved in the insulin-sensitizing effect of AMPK on cardiac glucose uptake. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 301: H469–H477, May, 2011.
- GOMI et. al. Granuphilin molecularly docks insulin granules to the fusion machinery. *J. Cell Biol.* 171:99-109, Oct, 2005.
- GOUNARIDES J. S. et al. Effect of Dexamethasone on Glucose Tolerance and Fat Metabolism in a Diet-Induced Obesity Mouse Model. *Endocrinology*. 149:758-766, Nov, 2007.
- JUNG J. H. & KWON T-H. Membrane Trafficking of Collecting Duct Water Channel Protein AQP2 Regulated by Akt/AS160. *Electrolyte Blood Press.* 8:59-65, Dec, 2010.
- KWON T-H. & MORA P. Post-transplantation diabetes mellitus. *American Journal Medicine Science*. Vol. 329:86-94, 2005.
- NGO S. et al. Reduced phosphorylation of AS160 contributes to glucocorticoid-mediated inhibition of glucose uptake in human and murine adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 302, 33-40, Oct, 2008.
- KANE S. et al. A method to identify serine kinase substrates. *The journal of Biological Chemistry*. Vol. 277, N° 25, 22115-22118, May, 2002.
- KASAI K. et al. Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 115, N° 2, 388-396, Feb, 2005.

- KIMURA T. et al. The GDP-dependent Rab27a effector coronin 3 controls endocytosis of secretory membrane in insulin-secreting cell lines. *Journal of Cell Science*. Vol.121, 3092-3098, Jul, 2008.
- KRAMER HF et.al. Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle. *Diabetes*. 55:2067-76, Jul, 2006.
- RAFACHO A. et.al. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Can J Physiol Pharmacol*. 85:881-885, May, 2007.
- RAFACHO A. et.al. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. *Pancreas*. Vol. 36, N° 3, Apr, 2008(a).
- RAFACHO A. et.al. High doses of dexamethasone induce increased cell proliferation in pancreatic rat islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296: E681–E689, Jan, 2009a.
- RAFACHO A. et al. Glucocorticoids in Vivo Induce Both Insulin Hypersecretion and Enhanced Glucose Sensitivity of Stimulus-Secretion Coupling in Isolated Rat Islets. *Endocrinology*. 151:85-95, Jan, 2010.
- RAFACHO A. et al. The adaptive compensations in endocrine pancreas from glucocorticoid-treated rats are reversible after the interruption of treatment. *Acta Physiologica*. 200(3):223-35, Nov, 2010.
- ROACH WG et al (2007) Substrate specificity and effect on GLUT4 translocation of the Rab GTPase-activating protein Tbc1d1. *Biochem. J*. 403:353-358, Apr, 2007.
- ROMA LP et.al. Protection of insulin-producing cells against toxicity of dexamethasone by catalase overexpression. *Free Radic Biol Med*. 47:1386-1393, Nov, 2009.

- RUZZIN J et.al. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. *Diabetologia*. 48:2119-2130, Oct, 2005.
- SANO H. et.al. Insulin-stimulated phosphorylation of Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *The journal of Biological Chemistry*. Vol. 278, N° 17, 14599-14602, Mar, 2003.
- SAKODA H et.al. Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes*. 49:1700-1708, Oct, 2000.
- SHAO J. et.al. Decreased Akt kinase activity and insulin resistance in C57BL/KsJ-Leprdb/db mice. *J. Endocrinol*. 167:107-115, Oct, 2000.
- TAYLOR EB et. al. Discovery of TBC1D1 as an insulin-, AICAR-, and contraction-stimulated signaling nexus in mouse skeletal muscle. *J Biol Chem*. 283:9787-96, Apr, 2008.
- TORII et. al. Granuphilin modulates the exocytosis of secretory granules through interaction with syntaxin 1a. *Mol. Cell. Biol*. 22:5518-5526, Aug, 2002.
- TSUBOI T & FAKUDA M. The C2B domain of rabphilin directly interacts with SNAP-25 and regulates the docking step of dense core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem*. 280:39253-39259, May, 2005.
- TSUBOI T & FAKUDA M. The Slp4-a linker domain controls exocytosis through interaction with Munc18-1.syntaxin-1a complex. *Mol. Biol. Cell*. 17:2101-2112, May, 2006.
- TREEBAK JT, Frosing C, Pehmoller C, et. al. Potential role of TBC1D4 in enhanced post-exercise insulin action in human skeletal muscle. *Diabetologia*. 52 :891-900, May, 2009.

- SANTOS CL, Rafacho A, Bosqueiro JR. Efeitos da administração de dexametasona in vivo sobre glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes de tempo de tratamento. *Bioscience Journal*. 23(3) :101-110, 2007.
- STENMARK H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Doi:10.1038/nm2728, Jul, 2009.
- WANG J et. al. Novel rabphilin-3-like protein associates with insulin-containing granules in pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem*. 274:28542-28548, Oct, 1999.
- WEINSTEIN SP et al. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. *Metabol: Clin Experim*. 47:3-6, Jan, 1998.
- WOOD SC, Lotter EC, McKay LD. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Diabetes*. 53(2) : 330-335, 1979.
- YI Z et. al. The Rab27a/granuphilin complex regulates the exocytosis of insulin-containing dense-core granules. *Mol. Cell. Biol*. 22:1858-1867, Mar, 2002.
- ZHANG X. et al. Inhibition of Forkhead Box O1 protects pancreatic β -Cells against Dexamethasone-induced dysfunction. *Endocrinology*. 150:4065-4073, May, 2009.
- ZERIAL M & McBRIDE H. Rab proteins as membrane organizers. *Nature Rev. Mol. Cell Bio*. 2:107-117, Feb, 2001.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada: Participação das proteínas AS160 e Rab 27A na secreção de insulina de ratos controles e insulino-resistentes por dexametasona.

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

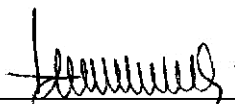
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição: _____.

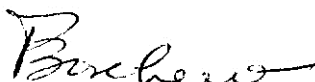
(x) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 2291-1, Instituição: UNICAMP.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



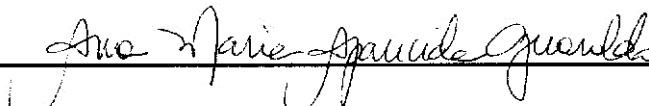
Thais Almeida Purificação



Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Carimbo e assinatura

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura