

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



LETÍCIA PRATES ROMA

Análise da Expressão Gênica e Protéica de Ilhotas de Ratos Tratados Com dexametasona

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

LETÍCIA PRATES ROMA

e aprovada pela Comissão Julgadora.

por José Roberto Bosqueiro

Tese 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

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Roma, Leticia Prates

R66a Análise da expressão gênica e protéica de ilhotas de ratos tratados com dexametasona / Leticia Prates Roma. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

**Orientador: José Roberto Bosqueiro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.**

1. Dexametasona. 2. Insulina - Secreção. 3. Langerhans, Ilhotas de. 4. Apoptose. 5. Expressão gênica. I. Bosqueiro, José Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Effect of dexamethasone treatment on gene and protein expression in pancreatic rat islets.

Palavras-chave em inglês: Dexamethasone; Insulin - Secretion; Islands of Langerhans; Apoptosis; Gene expression.

Área de concentração: Fisiologia.

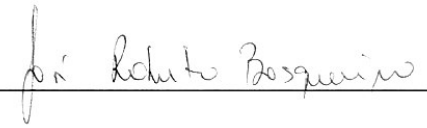
Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: José Roberto Bosqueiro, Carla Carvalho, Everardo Magalhães Carneiro.

Data da defesa: 23/02/2006.

Data da Defesa: 23/02/2006

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro (orientador) 

Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho 

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro 

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso _____

Profa Dra. Sandra Lucinei Balbo _____

Ao Daniel

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, tia e irmãos, por todo apoio, carinho e por serem tão maravilhosos.

Ao Daniel, por tudo que aprendi, pela ajuda e paciência todos os dias e mais que tudo, por me fazer feliz.

Às minhas amigas: Andrine, Ayira, Débora, Léli, Maria Paula, Paula, Renata, Stela, Morgana e Carol, por me mostrarem que em uma amizade não importa o tempo e a distância, mas sim o quão verdadeira ela é. Obrigada por serem tão presentes em meus dias e especiais em minha vida.

À Maria Cândida, por sua amizade, pela ajuda em épocas difíceis e sua presença em épocas felizes. Sua amizade é, sem dúvida, um dos melhores resultados dessa tese.

Aos meus queridos amigos do laboratório: Léli, Maria Lúcia, Eliane, Fabrizio, Baby, Heleninha, Kelly, Ana Paula, Cléber, Paty, Alessandro, Gabriel, Helena, Roberto, Morgana, Alex, Vanessa Arantes, Vanessa Giozzet, Amon, Thierry. Obrigada por fazerem do nosso laboratório um lugar maravilhoso e acima de tudo, por serem tão capazes de ajudar a todos que precisam.

A todos os novos amigos que fiz durante esses dois anos de mestrado que tornaram mais fáceis e divertidos os meus dias.

À professora Carla Carvalho, por ser sempre tão atenciosa e disposta a ajudar.

A todos os funcionários do departamento de biologia e da pós-graduação, em especial o Léscio pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos professores: Boschero, Helena e Everardo, por nos ensinarem, todos os dias, o que é fazer pesquisa.

Ao meu orientador, José Roberto Bosqueiro, por permitir a realização dessa pesquisa, pelo apoio e confiança.

À Capes, CnPq e Fapesp pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	viii
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xi
.	
Resumo	xii
Abstract	xiii
1 – Introdução	1
2 – Objetivos	11
3 - Material e Métodos	13
4 – Resultados	20
5 – Discussão	35
6 – Conclusão	46
7 - Referências Bibliográficas.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus centígrados

µg – micrograma

µl – microlitro

µM – micromolar

AMPcíclico: monofosfato de adenosina cíclico

ANOVA – análise de variância

ATP – trifosfato de adenosina

Ca²⁺ - cálcio

cDNA – ácido deoxiribonucléico complementar

DDT – ditiotreitol

DEPC – dietil pirocarbonato

dl – decilitro

DMSO – dimetil sulfoxido

EDTA – ácido etilendiaminotetracético

EPM – erro padrão da média

GH – hormônio do crescimento

GLUT – transportador de glicose

K⁺ - potássio

kDA – quilodalton

MAP-cinase – proteína cinase ativada por mitógenos

mg – miligrama

min – minuto

ml – mililitro

mM – milimolar

NSF – fator sensível à N-etilmaleimida

PBS – tampão fosfato salina

PCR – reação em cadeia da polimerase

PI3-cinase – fosfatidilinositol 3-cinase

RIE – radioimunoensaio

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

SDS – duodecil sulfato de sódio

TBE – tris borato EDTA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Insulina secretada por ilhotas isoladas de ratos controles e tratados com dexametasona por 5 ou 10 dias.....	23
Figura 2 -Expressão dos genes da Bad, Bcl-xl e Bax em ilhotas isoladas de ratos controles ou tratados com dexametasona por 5 dias.....	30
Figura 3 - Expressão dos genes da PI3K, AKT e P70 em ilhotas isoladas de ratos controles ou tratados com dexametasona por 5 dias.....	31
Figura 4 – Expressão dos genes JNK e Fas em ilhotas isoladas de ratos controles ou tratados com dexametasona por 5 dias.....	32
Figura 5 - Expressão protéica da Bcl-2 e Bax α por ilhotas isoladas ratos controles ou tratados com dexametasona por 5 dias	33
Figura 6 - Expressão protéica da PI3K e P70 por ilhotas isoladas controles ou tratados com dexametasona por 5 dias.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüência dos "primers" utilizados na PCR.....18

Tabela 2 -Dosagem de lipídeos plasmáticos.....21

Tabela 3 -Genes com expressão aumentada após tratamento com dexametasona por 5 dias25

Tabela 4 - Genes com expressão diminuída após tratamento com dexametasona por 5 dias.....27

Tabela 5 - Parâmetros utilizados na PCR..... 29

RESUMO

As células B pancreáticas possuem controle multifatorial que permite a secreção de insulina em quantidade e tempo adequados. Os glicocorticóides modulam a secreção de insulina dependendo do tempo e dose em que forem utilizados. Assim, o presente trabalho teve por objetivo analisar as alterações na expressão gênica e protéica de ilhotas de ratos tratados com dexametasona (1mg/kg, 5dias). Utilizando a técnica de cDNA Macroarray observamos que dos 1176 genes presentes na membrana, 66 tiveram sua expressão aumentada e 38 genes tiveram sua expressão diminuída. Os genes com expressão aumentada pertencem às vias de estresse celular (JNK1), inibidores do ciclo celular (p21) e vias de apoptose (Bax α e Fas). Os genes com expressão diminuída pertencem ao ciclo celular (ciclina D1 e D2, CDK4) e vias de sinalização PI3K, AKT1 e P70. Demonstramos também aumento na expressão protéica da Bax α , redução na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, PI3K e P70. Animais tratados com dexametasona por 5 dias possuem níveis plasmáticos aumentados de insulina, triglicérides e ácidos graxos livres. Ilhotas isoladas de animais tratados com dexametasona por 5 e 10 dias apresentaram maior secreção de insulina em relação aos controles, em concentrações basais e estimulatórias de glicose e 40mM de potássio. Porém, o tratamento por 10 dias com dexametasona induziu diminuição na secreção de insulina quando comparado aos animais tratados por 5 dias. Nossos dados sugerem o tratamento com dexametasona pode modular (direta ou indiretamente) a expressão de diversos genes e proteínas envolvidas na apoptose e sobrevivência de células na ilhota pancreática. Essa modulação pode, em longo prazo, se refletir na secreção de insulina como visto nos animais tratados por 10 dias.

ABSTRACT

Insulin secretion from pancreatic B-cells is regulated by nutrients like glucose and amino acids and by neurotransmitters, and hormones. Since glucocorticoids modulate insulin secretion we investigated the effects of dexamethasone on gene and protein expression in pancreatic islets from rats treated with the glucocorticoid for 5 days (mg/kg/day). Using cDNA array analysis we found that, out of 1176 genes presented in the array, 66 were up-regulated and 38 down-regulated after dexamethasone treatment. RT-PCR confirmed the macroarray results for 4 genes whereas the expression of these transcripts was confirmed by Western blotting for the corresponding proteins. Many of the up-regulated genes are implicated in apoptosis (Bax α , Fas), cell cycle regulation (p21) and stress response (JNK1) whereas many of the down-regulated were involved in cell cycle progression (cyclins D1 and D2, and CDK4), and survival and proliferations pathways (PI3K, AKT, P70). The protein expression of Bax α was increased whereas Bcl-2, PI3K and P70 repressed. The rats treated with dexamethasone for 5 days showed higher insulin, triglycerides and free fatty acids plasma levels than controls. The insulin secretion, in response to glucose and high concentrations of K⁺, in islets isolated from dexamethasone-treated rats for 5 and 10 days was higher than control rats. However, after 10 days of treatment with dexamethasone the insulin secretion was lower than after 5 days, but still higher than controls. In conclusion, these data indicate that dexamethasone-treatment (directly or indirectly) modulates the expression of several genes and proteins involved in apoptosis and survival of pancreatic islet-cells, and could, thereafter, modulates the insulin secretion in rats treated for 10 days.

I – INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A insulina participa de uma série de processos metabólicos, entre os quais o controle do metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas, desempenhando papel importante no armazenamento do excesso de substâncias energéticas. Disfunções no que diz respeito à sua ação podem conduzir ao Diabetes tipo 1 e 2. Este hormônio é responsável por monitorar o aumento nas concentrações dos nutrientes no sangue, em especial a glicose, sendo este último o principal estimulador da secreção de insulina. Entretanto, a secreção de insulina ocorre somente na presença de Ca^{++} extracelular (Deeney *et al*, 2000).

Hormônios, neurotransmissores e agentes farmacológicos agem na regulação dos mecanismos da secreção de insulina pelas células B para que esta seja difundida na circulação sistêmica em quantidade e tempo adequados e regulem perfeitamente os níveis de nutrientes no sangue em diferentes situações fisiológicas e ambientais (Boschero, 1996). Assim, a ocorrência de alterações no equilíbrio desses fatores leva a modificações na resposta secretória de insulina.

A glicose induz efeitos pleiotrópicos na célula B, potencialmente mediados pela ativação de múltiplas vias de sinalização intracelular. O efeito principal – o desencadeamento do processo secretório - é resultante da ligação de eventos metabólicos e elétricos. O metabolismo da glicose altera a razão ATP e ADP promovendo o fechamento dos canais de K^{+} sensíveis a ATP/ADP. (Ashcroft *et al*, 1984; Cook & Hales, 1984). A redução da condutância ao K^{+} despolariza a membrana plasmática, ativando canais de Ca^{2+} tipo L (voltagem dependentes) e conseqüente influxo de Ca^{2+} para o citoplasma (Gilon *et al*, 1993). A resposta a este processo é a

ativação da maquinaria secretória, que resulta na extrusão dos grânulos e liberação de insulina para o meio extracelular. O recrutamento de vesículas para a membrana plasmática é dependente do rearranjo de microtúbulos e microfilamentos, facilitado pelo aumento do $[Ca^{2+}]_i$ (Kakey *et al*, 1986).

1.2 Glicocorticóides e secreção de insulina

Os glicocorticóides são hormônios com atividade hiperglicemiante importante exercendo efeitos sobre a homeostasia metabólica celular tanto em condições normais quanto patológicas (Strack *et al*, 1995).

Os glicocorticóides e seus análogos sintéticos como a dexametasona, produzem uma variedade de efeitos que dependem da concentração e tempo em que são utilizados (Jeong *et al*, 2001). Em condições de excesso de glicocorticoide endógeno ou exógeno, instalam-se quadros de hiperglicemia, resistência à insulina e hiperinsulinemia (Lenzen *et al*, 1984). Esse fenômeno é resultado da interação de diversos órgãos como pâncreas, fígado e o tecido adiposo. Recentemente, a identificação do receptor de glicocorticóides nas células B pancreáticas sugere efeito direto sobre a secreção de insulina e na transcrição gênica, estimulando a expressão de alguns genes ou reprimindo outros (Jeong *et al*, 2001).

1.3 Mecanismos Gerais de Ação dos Glicocorticóides

Os glicocorticóides foram descobertos em 1940 por Hench e desde então são considerados antiinflamatórios potentes, sendo amplamente utilizados para o tratamento de diversas patologias. Apesar de sua eficácia, o uso prolongado ou excessivo de glicocorticóides pode desencadear diversos efeitos colaterais, entre eles

estão: osteoporose, miopatias, aspecto cushingóide, alterações no metabolismo de lipídios e da glicose, diabetes mellitus tipo 2, risco de indução de catarata, dentre outros. Produzidos pelas glândulas adrenais e regulados pelo eixo hipotálamo-hipófise-glândulas adrenais, os glicocorticóides estão entre os primeiros hormônios identificados a exercerem seus efeitos após ligação proteína-DNA, através do receptor de glicocorticóide (GR) (Hollenberg *et al*, 1985).

Os glicocorticóides exercem suas ações de duas maneiras (Buttgereit *et al*, 1998):

1. Ações dependentes de modificações na expressão gênica;
2. Ações não-transcricionais.

Essas ações são influenciadas pela dose e tempo de exposição à droga. Assim, doses baixas desencadeiam ações dependentes de modificação na expressão gênica, enquanto que doses altas acarretam as ações não-transcricionais (Buttgereit *et al*, 1998). A velocidade da resposta também é variada, sendo os efeitos de expressão gênica mais lentos, com pelo menos 30 minutos de ação, já que requerem passagem por diversas etapas metabólicas (Limbourg & Liao, 2003).

1. Ações dependentes de modificações na expressão gênica:

Os glicocorticóides são hormônios lipossolúveis, sendo assim, passam facilmente pela membrana das células e ligam-se a receptores intracitoplasmáticos, os quais existem sob duas formas: alfa e beta. A forma alfa é funcionalmente ativa, já a forma beta é incapaz de se ligar ao hormônio e, por isso atua como antagonista da forma alfa (Buttgereit *et al*, 1998). O receptor alfa, na sua forma inativa está ligado a uma proteína de choque térmico. A ligação do glicocorticóide ao receptor desfaz-se sua ligação da proteína de choque térmico e o conjunto glicocorticóide-receptor transloca-se

para o núcleo celular e se liga a seqüências palindrômicas específicas presentes no DNA (Baraniuk *et al*, 1996). No DNA, os pontos específicos para a ligação com os glicocorticóides são chamados elementos de resposta aos glicocorticóides (GREs) (Riccardi *et al*, 1999). Essa ligação inicia a transcrição de diversos genes e conseqüente síntese de várias proteínas. Os glicocorticóides também ativam outros fatores de transcrição e atuam através de interação proteína-proteína sem associação direta com o DNA (Stoecklin *et al*, 1997). Um exemplo deste mecanismo é a inibição pré-transcricional dos glicocorticóides sobre os fatores de transcrição AP-1 (activating protein 1) e NF- κ B (nuclear factor kappa B) (Rahmsdorf *et al*, 1990). Ocorre ainda ação deste hormônio pós-transcricional, desestabilizando o RNA mensageiro (RNAm) formado. Um exemplo deste tipo de mecanismo é a desestabilização do RNAm para a síntese da ciclooxigenase-2 (COX-2). Os glicocorticóides podem afetar também o transporte e a secreção de proteínas recém-formadas (Buttgereit *et al*, 1998).

2. Ações não-transcricionais

Esse mecanismo leva de segundos a minutos para ocorrer, e como já dito anteriormente, necessitam de doses mais altas de glicocorticóides (Trueba *et al*, 1991). Entre os efeitos mediados por este mecanismo está o feedback negativo ao ACTH, supressão da produção de prolactina, efeitos sobre a estabilização de membranas, indução de apoptose e possivelmente, ação antiinflamatória dos glicocorticóides. Ocorrem ações sobre a membrana interna da mitocôndria, aumento de permeabilidade aos prótons e conseqüente distúrbio no processo de fosforilação oxidativa. (Buttgereit *et al*, 1998). Diversos trabalhos demonstram que as ações não-transcricionais dos

glicocorticóides regulam importantes processos fisiológicos (Cato *et al*, 2002). Um exemplo desse mecanismo é a capacidade de glicocorticóides, andrógenos e estrógenos inibirem a apoptose de osteócitos e a perda óssea (Kousteni *et al*, 2002) através da ativação não-transcricional da proteína cinase Src e proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) (Kousteni *et al*, 2001). Entretanto, os mecanismos não-transcricionais dos glicocorticóides não são bem entendidos, sendo designados como inespecíficos (Buttgereit, 2002).

1.4 Apoptose

Apoptose é um processo ativo de morte celular regulado por sinais extrínsecos e intrínsecos, associado tanto ao desenvolvimento normal quanto a estados patológicos como câncer, doenças neurodegenerativas e imunológicas (Thompson, 1995).

A apoptose pode ser desencadeada por duas vias: extrínseca e intrínseca. A via extrínseca é ativada por ligantes de morte que se acoplam em receptores integrais de membrana encontrados nos mais diversos tipos celulares. Esses receptores pertencem à família dos Receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNFR) e já foram identificados seis tipos de receptores (TNFR1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas, DR6, DR3) e três receptores auxiliares (DcR1, DcR2, DcR3) que intensificam a resposta aos ligantes presentes nas células adjacentes. Esses receptores possuem domínios de morte que recrutam proteínas adaptadoras (FADD, TRADD, RIP) que por sua vez recrutam pró-caspases iniciadoras do processo apoptótico (caspases 8)(revisto por Curtin & Cotter *et al*, 2003). Ocorre então a ativação da cascata das caspases que além de clivar substratos na célula podem também ativar a via intrínseca mitocondrial através de interação com proteínas Bcl-2 pró-apoptóticas (Bid) (Budhardjo *et al*, 1999).

A via intrínseca tem a participação de proteínas da família Bcl-2, que competem entre si para formar poros na mitocôndria e liberar moléculas pró-apoptóticas como citocromo *c*, AIF (apoptosis inducing factor) e smac/diablo (Cory; Adams, 2002). A liberação dessas moléculas forma um complexo chamado apoptossomo que recruta pró-caspase 9 ativando caspases efetoras responsáveis pela clivagem de substratos na célula, culminando com a morte celular. Ambas as vias convergem na ativação de caspase 3, porém já foram descritas situações em que a apoptose ocorre independente da ativação de caspases. (Scott; Hengartner, 2001).

A família Bcl-2 pode ser dividida em três grupos de proteínas de acordo com sua estrutura. As proteínas Bax, Bak e Bok possuem três dos quatro domínios de homologia Bcl-2 (BH) e uma região N-terminal de ancoramento na membrana da mitocôndria. Esse grupo de proteínas tem função pró-apoptótica e estão presentes no citoplasma das células (Adams & Cory, 1998). Quando ativadas deslocam-se para a superfície da mitocôndria, formando poros e permitindo o extravasamento do material contido no espaço intermitocondrial (IMS). As proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xl permanecem na membrana da mitocôndria e são responsáveis pela sua proteção e integridade. Essas proteínas possuem quatro domínios BH, além da região N-terminal. A função protetora da Bcl-2 pode ser impedida por outro grupo de proteínas de domínio BH3 único: Bad, Bim e Bid que estão presentes no citosol, as quais se ligam às proteínas anti-apoptóticas alterando a permeabilidade da membrana mitocondrial (revisto por Cory; Adams, 2002).

A morte das células B pancreáticas pelo processo de apoptose é uma das hipóteses mais aceitas no desenvolvimento do Diabetes Mellitus tipo 1 (Mauricio & Mandrup-Poulsen T, 1998). Fatores extrínsecos como citocinas, óxido nítrico, ligantes

de morte e causadores de injúria celular são conhecidos por promoverem apoptose em linhagens de células B e ilhotas. Fatores intrínsecos como AMPc ou GMPc, diminuição na produção de ATP e presença de radicais livres no citoplasma, têm sido relatados como parte do sistema controlador da apoptose nas células B pancreáticas (Thompson et al, 1995). Porém o papel de genes ligados a apoptose (família Bcl2) ou Ca^{2+} intracelular não estão esclarecidos. (Eizirik & Mandrup- Poulsen T, 2001).

Os glicocorticóides induzem morte celular por diferentes vias, resultando em apoptose ou necrose dependendo da viabilidade celular e resposta da maquinaria apoptótica (Schmidt *et al*, 2004). Uma das vias é a modulação de genes que codificam proteínas pró e anti-apoptóticas (família Bcl2) presentes no citosol das células e membrana das mitocôndrias. Outra forma é a intervenção nas funções celulares de crescimento e diferenciação, diminuição do metabolismo celular, repressão de fatores de transcrição e sobrevivência (AP-1, c-myc, NF κ B) e ativação de caspases. Todos esses processos são resultados da ligação do complexo hormônio -receptor ao DNA (Disterlhorst, 2002).

Apoptose causada por glicocorticóides tem importância tanto biológica quanto clínica. Biologicamente, está relacionada com a geração do repertório e regulação das respostas imunes (Cidlowiski *et al*, 1996) e clinicamente tem sido explorada na terapia de doenças linfóides. (Gaynon & Carrel, 1999). Assim, os glicocorticóides são agentes terapêuticos essenciais para diversos tipos de leucemias, linfomas, doenças alérgicas e autoimunes (Kofler, 2000). Apesar de sua importância, os efeitos desencadeados pelos glicocorticóides sobre a maquinaria apoptótica das células são pouco conhecidos, permanecendo dúvidas sobre as principais vias de ativação e repressão.

1.5 Via PI3K/ AKT

Fosfatidil-inositol 3 cinases (PI3Ks) constituem uma família de cinases que fosforilam lipídeos de membrana (fosfatidil-inositol) no grupo 3' OH (Fruman *et al*, 1998). Essas cinases possuem duas subunidades: catalítica (p110) e regulatória (p85), podendo ser ativadas através de receptores com atividade tirosina cinase ou por receptores acoplados a proteína G. Os substrato da PI3K é fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PIP2) que gera o segundo mensageiro fosfatidil-inositol 3, 4,5 trifosfato (PIP3) (Vara *et al*, 2004).

A ativação dos receptores com atividade tirosina cinase resulta na associação da PI3K ao receptor através de um ou dois domínios SH2 presentes na unidade regulatória dessas cinases (Hunter, 2000). Essa associação leva a ativação alostérica da subunidade catalítica, e a produção de PIP3 em poucos segundos. PIP3, por sua vez recruta proteínas com domínio de ligação PH (pleckstrin homology) até a membrana, entre elas AKT/PKB e cinases dependentes de fosfoinositóis (PDKs) (Pawson, 2000).

A ligação AKT/PIP3 provoca alterações conformacionais que resultam na exposição dos sítios de fosforilação (resíduos treonina (T) 308 e serina (S)473) da AKT. Ocorre a aproximação da PDK-1 e a conseqüente fosforilação da AKT no resíduo T308 (Vara *et al*, 2004). A fosforilação de T308 ativa parcialmente a AKT, porém para a completa ativação é necessário a fosforilação em ambos resíduos: treonina e serina (Alessi *et al*, 1996). Depois de ativada, AKT é responsável pela fosforilação de diversos substratos na célula, envolvidos na sobrevivência, proliferação, ciclo celular e apoptose (Méier & Hemmings, 1999).

Na ilhota pancreática a via PI3K/ AKT é vista como papel central para a sobrevivência celular por fosforilar e inativar Bad, caspases, dentre outros. (Kim *et al*, 2003). A ativação da via PI3K e subseqüentemente da fosforilação da AKT, são importantes alvos na apoptose induzida por dexametasona (Leis *et al*, 2004), sendo os glicocorticóides responsáveis por inibir esta via e impedir suas ações antiapoptóticas em diversos tipos celulares (Chrysis *et al*, 2005).

Desta forma, o estudo sobre glicocorticóides e suas ações são importantes para a compreensão desses processos essenciais a proliferação e sobrevivência das células.

II - OBJETIVOS

2 - OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo analisar alterações na expressão gênica e protéica de ilhotas pancreáticas de ratos, tratados por 5 dias com dexametasona.

2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão gênica e protéica das proteínas envolvidas na maquinaria apoptótica em ilhotas de ratos tratados com dexametasona.
- Analisar a expressão gênica e protéica da via PI3K/AKT e estresse celular.
- Analisar a expressão de genes envolvidos no ciclo celular.
- Analisar parâmetros bioquímicos :insulina, glicose e lípides plasmáticos para caracterização do modelo.
- Analisar a secreção de insulina estimulada em condições basais e estimulatórias de glicose e potássio em animais tratados por 5 dias com dexametasona.
- Analisar os efeitos do tratamento por 10 dias com dexametasona sobre a secreção de insulina.

III – MATERIAL E MÉTODOS

3.0 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar de 90 a 120 dias de idade provenientes do biotério central da UNICAMP. Todos os protocolos seguem normas do comitê de ética. O tratamento com dexametasona consistiu em injeções diárias intraperitoniais de dexanil (fosfato dissódico de dexametasona) durante 5 ou 10 dias (1mg/Kg corpóreo/ dia). Os animais controle foram tratados com solução salina durante o mesmo período.

3.2 - Separação das ilhotas pelo gradiente descontínuo de ficoll

O isolamento das ilhotas foi feito pela técnica da digestão do pâncreas com colagenase. O material digerido foi passado em peneira, com malha de $240\ \mu\text{m}^2$, para a retenção e descarte de possíveis ductos pancreáticos ou fragmentos maiores, não digeridos. O material filtrado, oriundo de 8 ratos tratados com dexametasona e 8 controles, foi transferido para tubos cônicos de 50 ml em quantidades iguais e centrifugados por 1 min a 186 g (Centrifuges SORVALL RT 7). Retirado o sobrenadante, acrescentou-se solução de ficoll dializado a 27%, seguida de agitação para homogeneização do material. Sobre a solução de 27% acrescentou-se a solução de ficoll 21,6% e sobre esta ficoll 10,8%. A seguir os tubos foram centrifugados a 746 g por 10 min. Após a centrifugação, com auxílio de pipeta Pasteur, o material localizado entre as camadas 21,6% e 10,8% foi transferido para 2 novos tubos cônicos e lavados por 3 vezes com solução de Hanks para a remoção do ficoll. As ilhotas livres de material exócrino foram coletadas com auxílio de uma pipeta Pasteur.

3.3 - Secreção estática de insulina

Grupos de 5 ilhotas isoladas de ratos controles, ratos tratados com dexametasona por 5 ou 10 dias, foram pré-incubados em solução de Krebs-bicarbonato por 45 min a 37 °C e pH 7.4. A seguir, o meio de pré-incubação foi descartado e as ilhotas incubadas por período suplementar de 60 min também em Krebs-bicarbonato o qual continha diferentes concentrações de glicose. Após incubação, uma alíquota do sobrenadante foi estocada a -20 °C para dosagem de insulina.

3.4 - Dosagem de insulina

A insulina contida nos meios de incubação (secreção estática) e a insulina plasmática foram avaliadas por radioimunoensaio e a curva padrão confeccionada com insulina de rato.

3.5 – Análises Bioquímicas no Plasma

Colesterol total, triacilgliceróis e ácidos graxos foram determinados utilizando kits enzimáticos Boehringer Mannheim (Alemanha), Merck (Alemanha) e Wako (Alemanha) respectivamente, conforme instruções do fabricante. Para a dosagem da glicose plasmática foi utilizado o glicosímetro ACU-CHECK ADVANTAGE 2.

3.6 - Extração do mRNA

RNA total foi extraído de cerca de 300-500 ilhotas por meio de adição de 1,0 ml de reagente Trizol (GIBCO BRL - Life Technologies). As ilhotas foram homogeneizadas em vortex e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, 200 µl de clorofórmio foram adicionados e as amostras vigorosamente homogeneizadas por 15 sec. Após

incubação de 3 min, à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4 °C. O volume correspondente à fase aquosa foi transferido para outro tubo e o RNA precipitado pela adição de 500 µL de álcool isopropílico, seguido de incubação por 10 min, à temperatura ambiente. Nova centrifugação a 12.000 g por 15 min a 4 °C foi realizada, o pellet obtido foi lavado em seguida com 1ml de etanol 75%, centrifugado a 7500 g por 10 min a 4 °C e, posteriormente, lavado com 1 ml de etanol 100%. O etanol foi descartado e o pellet parcialmente seco em estufa a 37 °C. As amostras foram ressuspensas em 30 µl de água previamente tratada com DEPC.

A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose desnaturante para visualização das unidades ribossomais 28S e 18S. Após coloração com brometo de etídeo a quantificação do mesmo foi feita por leituras de absorbâncias a 260 e 280 nm em aparelho Genequant (Pharmacia Biotech).

3.7 - Macroarray

O perfil de expressão gênica foi analisado por cDNA Array (Clontech Laboratories, Atlas™ rat 1.2 cDNA array) contendo 1176 genes. RNA total foi extraído de aproximadamente 1000 ilhotas usando reagente de TRIZOL e tratado com DNase I (Invitrogen, USA). A qualidade e a pureza do RNA foi confirmada por eletroforese em gel desnaturante e por PCR. cDNA marcado ([⁻³³ dATP]) foi preparado usando 5-10ug do RNA total e CDS primer mix gene específico(Clontech Labs, Palo Alto,CA). O protocolo foi seguido segundo recomendações do fabricante. Após hibridização (overnight) e lavagens, as membranas foram expostas ao Phosphorimager screen (Molecular Dynamics, San José, CA) e em seguida foi utilizado o Scanner Storm 840 (Molecular Dynamics) para obtenção das imagens. As imagens foram então analisadas pelo programa Quantity One 4.41 (BioRad) e

normalizadas pelos controles internos após eliminação do background. Apenas mudanças de expressão maiores que 2,0 e menores que 0,5 (razão tratado/controle) foram consideradas significativas.

3.8- Obtenção de cDNA a partir de RNA total

A reação da transcriptase reversa foi realizada a 42 °C durante 50 min, em 20 µl de uma mistura contendo 2,0 µg de RNA total, 10 mM de dNTP mix, 40 U/µl de inibidor de RNase, 0,1 M de DTT, 5X first-strand buffer, 0,5 µg/ml de oligo dT e 200 U da enzima Super Script II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (GIBCO BRL – Life Technologies).

3.9 - PCR

O cDNA resultante foi amplificado com os "primers" listados na tabela 1.

Tabela 1. Seqüência dos "primers" utilizados na PCR.

Nome	Direto (d) ou Reverso (r)	Seqüência (5' a 3')	Registro GeneBank
Bax	d	AAGAAGCTGAGCGAGTGTCT	U49729
	r	CAAAGATGGTCACTGTCTGC	
Bad	d	CAGTGATCTGCTCCACATTC	AF003583
	r	ATGATAGGACAGCACCCAGT	
Pi3k	d	TCTCCTCTCATTACACCAACC	AJ006710
	r	TGCTCTAGGTTTTCCCATCA	
AKT1	d	CCTCAAGTACTCATTCCAGAC	D30040
	r	CTCATACACATCTTGCCACAC	
P70/S6K	d	GAATTCAATGTGCGGCTACCGCTG	M99169
	r	GTCGACTTAAGTGCTGAAGTAAACGA	
Bcl-xl	d	ATTGTTCCAACATGGCCCTGT	U72350
	r	TTGCAGTAGTTCTCCAGTT	
RPS29	d	AGGCAAGATGGGTCACCAGC	X59051
	r	AGTCGAATCATCCATTCAGGTCG	

PCR foi realizada em 15 µl de uma mistura contendo tampão da Taq polimerase, 50 mM de MgCl₂ , 10 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfato, 2,5 U/µl de Taq DNA polimerase, 10 pmol de "primer" direto, 10 pmol de "primer" reverso, e cDNA. Alíquotas de 5 µl do produto da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0 % preparado em tampão TBE.

3.10 - Identificação e quantificação protéica por “Western Blot”

A expressão das proteínas estudadas neste projeto foram avaliadas pela técnica de “Western blot”. As ilhotas foram homogeneizadas por sonicação com 6 pulsos de 5 sec com 5 sec de intervalo entre os pulsos (VirSoni 60). Os extratos foram centrifugados a 15.000 g a 4 °C por 45 min para remoção do material insolúvel. As

amostras foram tratadas com tampão Laemmli contendo DDT 10 mM, aquecidas em água fervente por 5 min. Alíquotas com concentrações protéicas semelhantes foram aplicadas no SDS-PAGE (10% 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-PI3K (p85), anti-Bax α (sc-526) anti-Bcl-2 (sc-492) na diluição 2 μ g/ml (Santa Cruz Biotechnology), por 4 hs. Após, 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).

3.11 - Análise Estatística

Para os ensaios da PCR e Western Blot foi utilizado o teste t de Student. Para os ensaios de RIE foi utilizado ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. As análises foram feitas utilizando-se o programa BioEstat (versão 2.0). Em todos os casos, o nível de significância adotado foi $p < 0.05$. As imagens obtidas no Macroarray foram normalizadas pelos controles internos após eliminação do background. As mudanças de expressão maiores que 2,0 vezes e menores que 0,5 vez (razão tratado/controle) foram consideradas significativas.

IV – RESULTADOS

4.1- Parâmetros bioquímicos plasmáticos

A dosagem de lipídios plasmáticos mostrou que os animais tratados com dexametasona possuem níveis plasmáticos elevados de triglicérides (TG) (31%) e ácidos graxos livres (AGL) (50%) em relação aos animais controles. O nível de colesterol (COL) não foi alterado pelo tratamento com dexametasona. A insulina plasmática de jejum foi 15 vezes maior nos animais tratados com dexametasona comparados aos controles (tabela 2).

Tabela 2. Dosagens de parâmetros bioquímicos plasmáticos. Valores expressos como média $\pm$ EPM. *P < 0,05.

Parâmetro	ctl	Dexa (5 dias)	n
AGL	96,25 $\pm$ 7,3 (mg/dl)	187,6 $\pm$ 8,7(mg/dl) *	9
TG	76,5 $\pm$ 8, 5 3 (mg/dl)	116,125 $\pm$ 13,5 (mg/dl) *	9
COL	80,5 $\pm$ 3,7 (mg/dl)	78,4 $\pm$ 7,1 (mg/dl)	9
INSULINA	0.14 $\pm$ 0.02 (ng/ml)	2.1 $\pm$ 0.4 (ng/ml) *	7
GLICEMIA	69,3 $\pm$ 1,7 (mg/dl)	137,3 $\pm$ 8,8 (mg/dl)*	10

Outro parâmetro avaliado foi glicemia de jejum. Os valores obtidos foram para os animais tratados com dexametasona por 5 dias foram significativamente diferentes dos animais controles (tabela 2). Posteriormente, o tratamento por 10 dias com dexametasona foi feito para analisar os efeitos prolongados da dexametasona sobre a glicemia plasmática. Nossos resultados mostram que a glicemia foi 213 $\pm$ 42,6 mg/dl

para os animais tratados com dexametasona por 10 dias, sendo esses valores significativamente diferentes dos animais controle e tratados por 5 dias com dexametasona ($69,3 \pm 1,7$ mg/dl e $137,3 \pm 8,8$ mg/dl, respectivamente) .

4.2- Secreção de insulina

A figura 1 mostra a secreção de insulina por ilhotas isoladas de ratos tratados ou não com dexametasona (1mg/kg, 5 - 10 dias), incubadas por 1 h em meio contendo 2.8 mM, 8.3 mM, 22 mM de glicose e 40 mM de K^+ . Os valores de secreção, registrados respectivamente para as concentrações de 2.8, 8.3, 22 mM de glicose e 40mM de K^+ foram: 0.8 ± 0.09 , 1.7 ± 0.31 , 14.3 ± 1.8 e 1.45 ± 0.4 ng/ml nos controles, 2.22 ± 0.3 , 17.9 ± 1.5 , 34.7 ± 4.5 e 10.6 ± 1.0 ng/ml nos animais tratados com dexametasona por 5 dias e 1.8 ± 0.35 , 11.35 ± 1.7 , 23.4 ± 2.9 e 7.0 ± 0.9 ng/ml nos animais tratados por 10 dias, por ilhota (n = 3 experimentos para todas as condições experimentais). Esses dados mostram que animais tratados com dexametasona durante 5 dias possuem secreção de insulina significativamente maior em relação aos controles em todas as concentrações estudadas. Os animais tratados por 10 dias possuem menor secreção de insulina em relação aos tratados por 5 dias em condições estimulatórias, mas ainda significativamente maior que os animais controles nas concentrações 2.8mM e 8.3mM e 22mM de glicose e 40mM de K^+ .

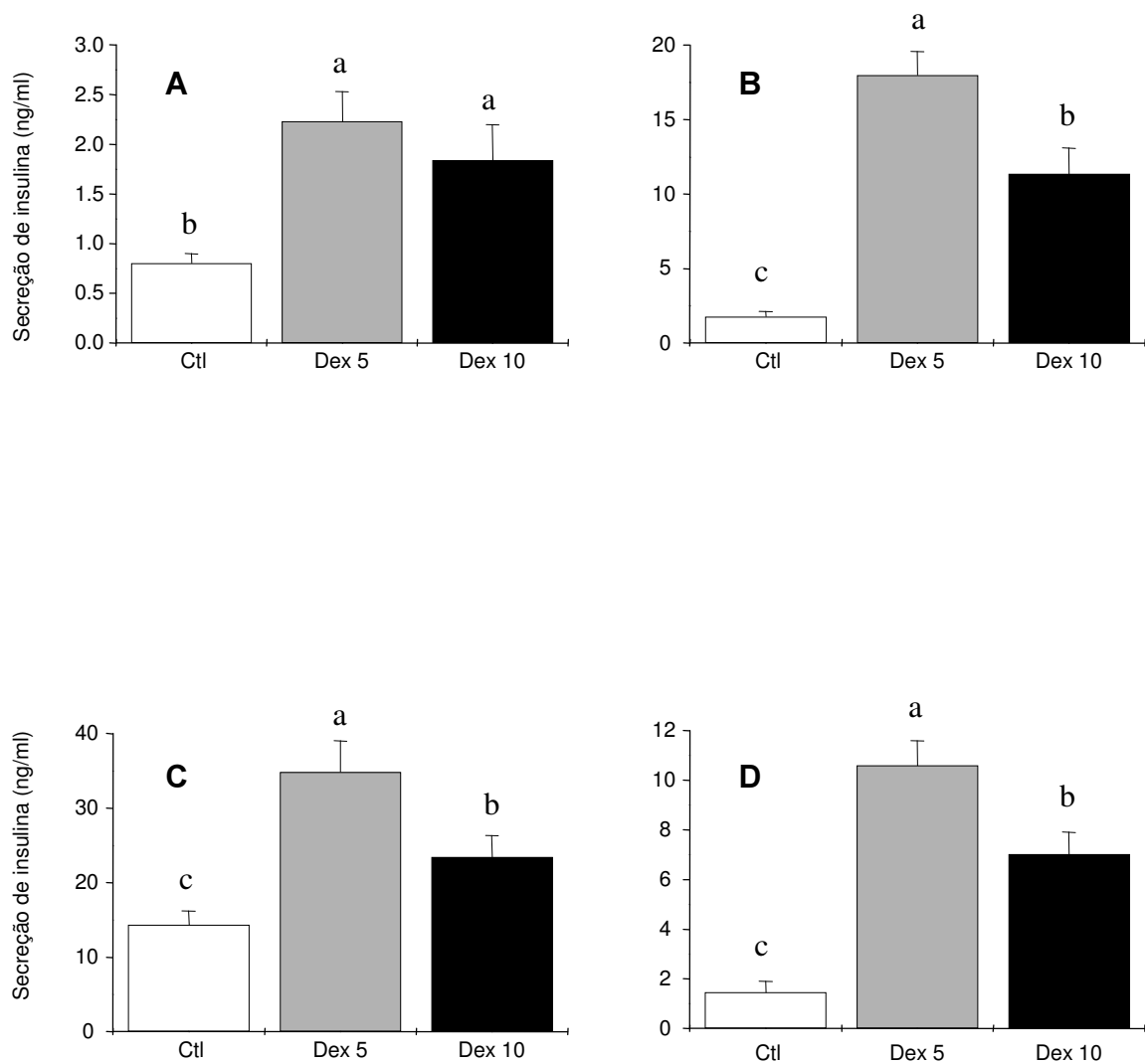


Figura 1. Insulina secretada por ilhotas isoladas de ratos controles (Ctl) ou tratados com dexametasona por 5 (Dex 5) e 10 dias (Dex 10), por 1 h na presença de (A) 2.8mM (B) 8.3mM, (C) 22 mM de glicose e (D) 40 mM K⁺. Dados mostram médias $\pm$ EPM, n = 3 experimentos. Letras diferentes correspondem a * P < 0.05.

4.3- Perfil de expressão multigênica

As tabelas 3 e 4 contêm as listas de genes que tiveram expressão diferenciada após tratamento com dexametasona (1mg/Kg corpóreo, i.p, 5 dias). Os genes foram classificados e agrupados de acordo com suas funções. Dos 1176 genes representados na membrana 41 tiveram expressão diminuída ($<0,5$) e 62 tiveram expressão aumentada ($>2,0$) pelo tratamento com dexametasona em relação ao controle (razão tratado/controle). Os genes com expressão diminuída são (1) cinases dependente de ciclinas 4 (CDK4) , ciclina D1 e ciclina D2, fator de transcrição AP-1 , (2) proteínas associadas à proteção celular contra radicais livres e proteção contra apoptose: AKT1 e glutathione redutase, peroxidase e sintetase (3) proteínas de choque térmico: HsP 70 e 90, (4) canais iônicos e canais voltagem-dependentes, (5) proteínas ligadas ao metabolismo energético, de lipídios, aminoácidos e xenobióticos: ATP sintase subunidade d, glicose-6-fosfato desidrogenase, (6) fatores de crescimento como NGF, IGF-1, (7) cinases moduladoras intracelulares: MEK 1, ERK2, P70/S6K.

Os genes que tiveram expressão aumentada pertencem as seguintes classes: (1) Receptores de morte (TNF receptor 1, Fas), (2) Oncogenes, supressores de tumor e do ciclo celular: H-ras proto-oncogene transforming p21, N-ras proto-oncogene transforming p21, p21(CDK inibidor) (3) Proteínas associadas a apoptose e em resposta ao estresse: Bax α , clusterin, calcineurina, JNK-1 (4) Efeitores, transdutores e moduladores intracelulares: Arrestina, Catepsina L, Granzyme M, IGFBP1,(5) Receptores de proteínas fosfatases e acoplados a proteína G: Adenosine, IP3 cinase, (6) Hormônios, interleucinas e interferons: interleucina 1 alfa e beta.

Tabela 3. Genes com expressão aumentada após tratamento com dexametasona por 5 dias

Dexa/ CTL	Gene Bank	Gene
Receptores de morte , fatores de crescimento e receptores de citocinas		
2,98	Z14119	Platelet-derived growth factor receptor, beta
4	X61479	Colony stimulating factor 1 receptor
3,69	AB003042	complement component 5, receptor 1
3,13	X52498	transforming growth factor, beta 1
2,55	D21095	cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2
21,32	D26112	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6; Fas, APO1
3,56	D42117	Tumor necrosis factor superfamily, member 8, CD30L
23,33	M63122	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a, TNFR1
Oncogenes e supressores de tumor; Fatores de transcrição ; proteínas do ciclo celular		
5,02	L41275	p21, cdk interacting ptn 1
6,9	D12498	Fibroblast growth factor receptor 1
6,37	M85214	trk precursor
2,29	Z14117	Platelet-derived growth factor
2,49	D44481	v-crk proto-oncogene
2,32	X06942	A-raf
2	M13011	H-ras proto-oncogene; transforming protein p21
2,66	X68394	N-ras proto-oncogene, transforming protein p21
2	L13151	RAS p21 protein activator 1
Transporte de membrana		
		solute carrier family 25(mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator)
3,08	D12771	
2,93	J03754	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 2
3,25	M28647	ATPase, Na+K+ transporting, alpha 1
2,65	M35052	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b,
3,21	D13123	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c
3,42	U90556	phosphatidate phosphohydrolase type 2a
4,38	J02657	Cytochrome P450, subfamily IIC (mephenytoin 4-hydroxylase)
2,87	U39208	cytochrome P450 4F6
11,3	J02669	Cytochrome P450 IIA1 (hepatic steroid hydroxylase IIA1) gene
2,46	L06040	arachidonate 12-lipoxygenase
3,21	X55572	apolipoprotein D
Proteínas associadas a apoptose, proteínas em resposta ao stress, proteínas kinases		
3,16	L03554	Calcineurin
3,02	L27129	c-jun N-terminal kinase 1, JNK-1- mapk8
3,5	U49729	Bax-alpha
8,48	M64723	clusterin
Receptores hormonais, receptores acoplados a proteínas G		
4,63	D45400	arginine vasopressin receptor 1B
4,05	U04738	somatostatin receptor 4

3,98	U13368	adrenergic receptor, alpha 1a
3,67	L19475	parathyroid hormone receptor
2,77	U42388	pancreatic polypeptide receptor 1
4,95	M25071	thyroid hormone receptor ErbA-beta-2, pituitary specific
Ligantes de canais iônicos, outros receptores		
2,97	L06096	inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor 3
2,43	X13722	Low density lipoprotein receptor
15,2	M20373	Neuropeptide Y
Transporte extracelular, proteínas de comunicação extracelular		
3,99	M89791	insulin-like growth factor binding protein 1
4,08	M55431	transforming growth factor beta (TGF-beta)
4,94	U02983	secretogranin III
Proteínas kinases Intracelulares, kinases de morte celular		
2,39	M87855	adrenergic receptor kinase, beta 2
2,77	M90661	insulin receptor-related receptor
Fosfatases intracelulares		
2,21	U09307	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
2,2	L27843	protein tyrosine phosphatase 4a1
2,27	U18293	protein tyrosine phosphatase 2E
Transdutores, efetores e moduladores intracelulares		
2,01	M25347	cAMP-specific 3,5-cyclic phosphodiesterase 4C
2,01	D29766	v-crk-associated tyrosine kinase substrate
5,04	M94721	GAP-associated protein (p190).
2,0	M91589	Arrestin, beta 1
2,59	U03629	arrestin-D
2,13	M76705	Protein convertase 1, prohormone convertase 1
2,16	L05175	Granzyme M
2,73	Y00697	Cathepsin L
Receptores de proteínas fosfatases e acoplados a proteínas G		
2	M64299	adenosine A1 receptor
2	M91466	adenosine A2B receptor
Hormônios, interleucinas e interferons		
2,99	U77776	interleukin 18
3,33	M98820	Interleukin 1 beta
4,24	AF010464	Interleukin 7
7,05	L26913	interleukin 13
3,48	M64711	endothelin 1
Fosfolipase e Fosfatidilinositol kinase		
3,82	U07798	phospholipase A2, group 2C
2,73	U17035	interferon gamma-induced protein 10

Tabela 4. Genes com expressão diminuída após tratamento com dexametasona por 5 dias

Dexa/	CTL	Gene Bank	Gene
Antígenos de superfície e receptores de adesão da matriz extracelular, célula-célula			
0,17	U60096		Integrin, beta 4
0,08	D25290		cadherin 6
0,36	D83349		cadherin 22
Oncogenes e supressores de tumor; Fatores de transcrição ; proteínas do ciclo celular			
0,33	D26307		Jun D proto-oncogene
0,47	D10862	Inhibitor of DNA binding 1, helix-loop-helix protein (splice variation)	
0,29	D16308		cyclin D2
0,35	AF148946		cyclin D1
0,11	X17163		transcription factor AP-1
0,24	X06942		A-raf
0,06	D30040		akt 1
Proteínas associadas a apoptose, proteínas em resposta ao stress, proteínas kinases			
0,27	X80477		ATP receptor, P2X purinoceptor 1
0,5	X02904		glutathione S-transferase, pi 2
0,37	X62404		glutathione peroxidase 5
0,48	X82679		glutathione peroxidase 4
0,2	U73174		glutathione reductase
Heat shock proteins			
0,36	M14050		heat shock 70kD protein 5
0,4	S45392	heat shock 90-kDa protein beta (HSP90-beta); HSP84; HSPCB	
0,12	Z27118		heat shock 70kD protein 1A
Metabolismo energético, metabolismo de lipídios, metabolismo de xenobióticos			
0,18	X15030		cytochrome c oxidase, subunit Va
0,1	X07467		glucose-6-phosphate dehydrogenase
0,09	D10021		ATP synthase subunit d
0,28	L38615		glutathione synthetase
Receptores hormônios, interleucinas e interferons			
0,47	X77797		interleukin 8 receptor, beta
0,34	M29014		insulin receptor
0,31	L04796		glucagon receptor
0,12	U16253		corticotrophin releasing hormone receptor 2
Receptores de neurotransmissores e ligantes de canais iônicos, outros receptores			
0,28	L31622		cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2
0,3	L31620		cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4
Fatores de crescimento, citocinas			
0,37	M36589		beta-nerve growth factor precursor (beta-NGF)
0,43	U37101		colony stimulating factor 3
0,27	D79215		fibroblast growth factor 10
0,24	M15480		insulin-like growth factor 1, IGF-1
0,33	U90448		CXC chemokine LIX
Proteínas kinases Intracelulares, kinases de morte celular			

0,3	M64300	ERK2, mitogen activated protein kinase 1
0,38	Z16415	mitogen activated protein kinase kinase 1
0,49	M99169	S6 protein kinase (Rsk-1), P70/S6k
0,24	U09307	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11

A PCR foi realizada para a confirmação dos resultados de alguns genes: Bax α , AKT1, P70, Fas e JNK1. Realizamos também PCR de Bcl-xl, Bad, PI3k pois estes genes promovem proteção, crescimento celular ou apoptose . PI3K faz parte da via da AKT1 e P70. Bcl-xl e Bad são integrantes da família Bcl-2. Para análise da expressão gênica foi necessário determinar o número de ciclos de amplificação utilizados para cada um deles na PCR. Para isto, foram feitas PCRs com número de ciclos variado, obtendo-se uma curva sigmóide. O EC50 da curva obtida foi utilizado como ciclo para as reações. Estes dados encontram-se na tabela 5. Foi utilizado como controle interno o gene da proteína ribossomal 29 (RPS29), pois não foram detectadas diferenças significativas na expressão gênica da mesma em ilhotas de ratos tratados com dexametasona, comparados aos controles. Os dados estão expressos como valor de densitometria do gene / valor de densitometria do controle interno. Para cada condição, os experimentos foram realizados a partir de 8 cDNAs originários de 4 grupos de animais com 5 animais cada.

Tabela 5. Parâmetros utilizados na PCR.

Gene	Nº de ciclos	Temperatura de anelamento	Fragmento obtido (bp)
Bax	33	59 °C	361
Bad	37	60 °C	330
Bcl-xL	31	61 °C	471
PI3K	32	59 °C	417
AKT1	29	59 °C	619
P70	29	57 °C	474
JNK	32	59°C	211
Fas	32	59°C	693
RPS29	29	57 °C	202

Foi observado aumento significativo de 53% na expressão do gene da Bax α em ilhotas de ratos tratados com dexametasona quando comparados ao controle. Por outro lado, ilhotas de ratos tratados com dexametasona e controles apresentaram níveis semelhantes do RNAm da Bad e Bcl-xl (figura 02).

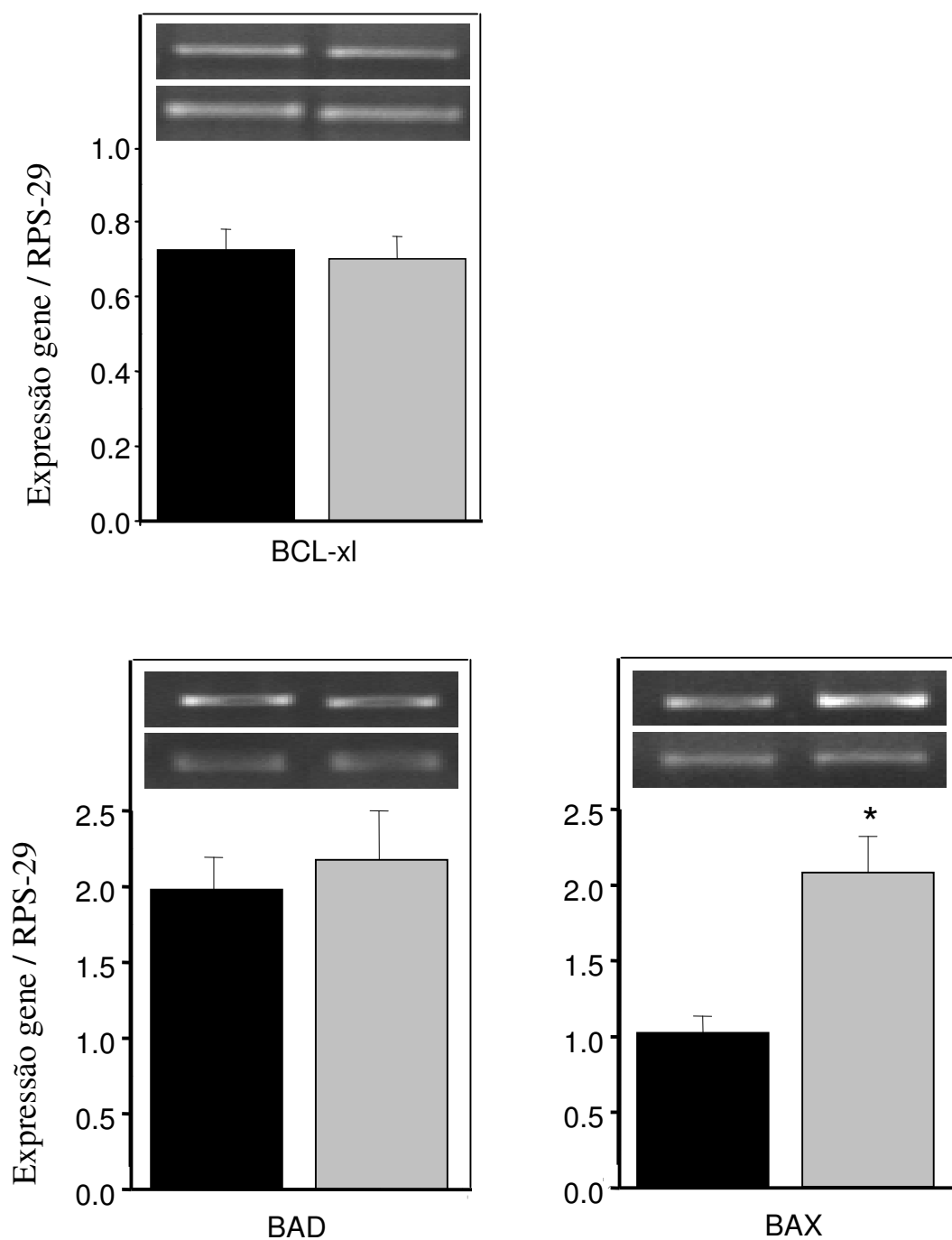


Figura 2: Expressão dos genes da Bad, Bcl-xl e Bax em ilhotas isoladas de ratos controles (■) ou tratados com dexametasona (□) por 5 dias. Dados mostram médias $\pm$ EPM, n = 8. * P < 0.05.

Analizamos também a expressão de alguns genes que codificam proteínas da via da PI3K, sendo eles: PI3K, AKT1 e P70/S6K em ilhotas de ratos tratados com dexametasona. Como demonstrado na figura 3, o RNAm da PI3K, AKT1 e P70 encontraram-se diminuídos nas ilhotas após o tratamento com dexametasona (40%, 29%, e 28% respectivamente).

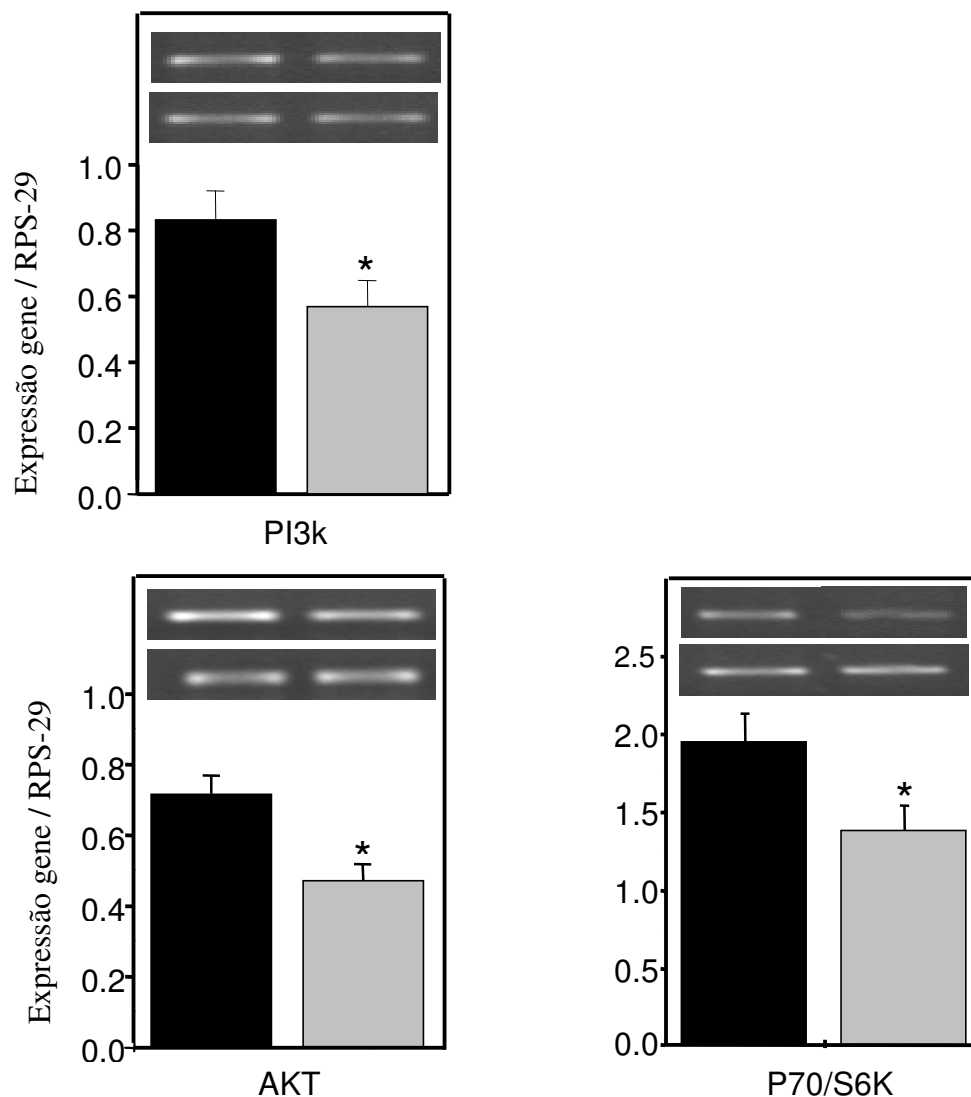


Figura 3: Expressão dos genes da PI3K, AKT e P70 em ilhotas isoladas de ratos controles (■) ou tratados com dexametasona (□) por 5 dias. Dados mostram médias $\pm$ EPM, n = 8. * P < 0.05.

A expressão dos genes Fas e JNK foi alterada pelo tratamento com dexametasona, como demonstrado no macroarray. Confirmamos por PCR este dado, sendo que a expressão de JNK aumentou 32% e Fas teve um aumento de 31% comparado aos controles (figura 4).

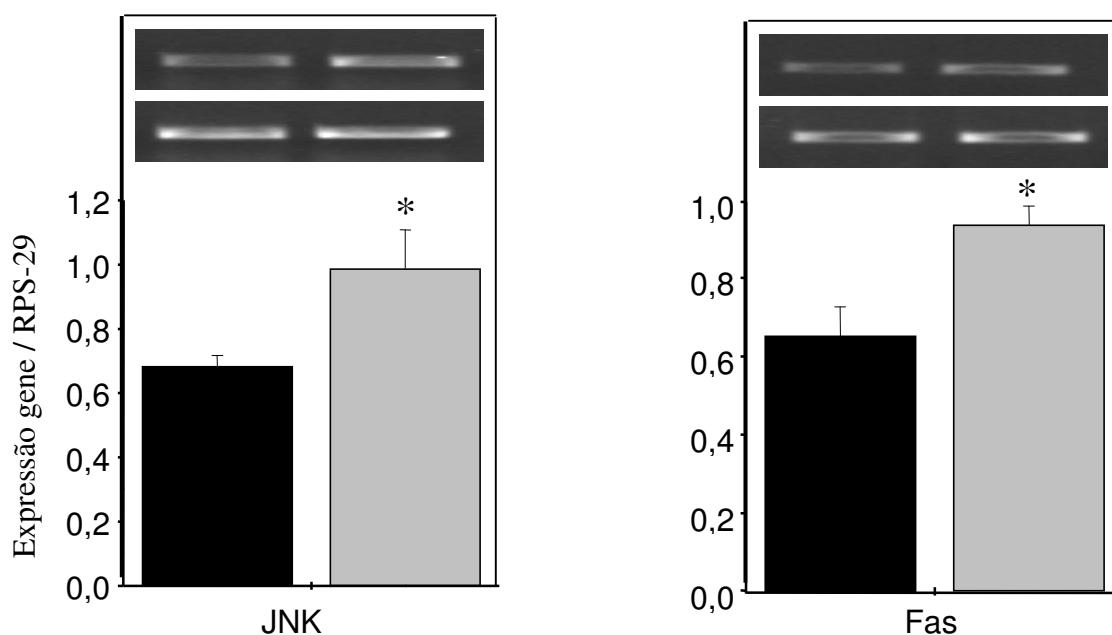


Figura 4: Expressão dos genes JNK e Fas em ilhotas isoladas de ratos tratados controles (■) ou tratados com dexametasona (□) por 5 dias. Dados mostram médias $\pm$ EPM, n = 8. * P < 0.05.

4.2 - Expressão Protéica em Ilhotas de Ratos Tratados com Dexametasona

A expressão da proteína Bcl-2, em ilhotas de ratos tratados com dexametasona durante 5 dias, diminuiu 44% comparado aos controles. A proteína Bax α teve sua expressão aumentada em 66% após o tratamento com dexametasona.

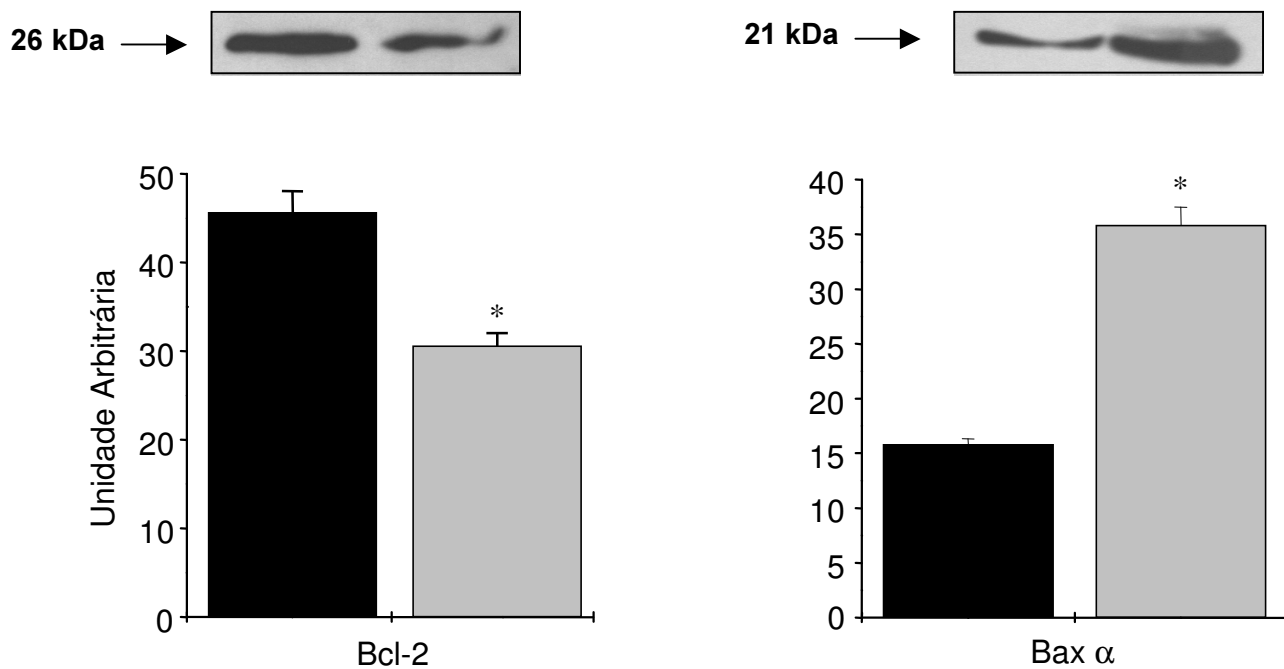


Figura 5. Expressão protéica da Bcl-2 e Bax α por ilhotas isoladas ratos controles (■) ou tratados com dexametasona (□) por 5 dias. Dados mostram médias $\pm$ EPM, expressos em unidades arbitrárias (UA), n = 4. * P < 0.05.

Como mostrado na figura 6, houve diminuição na concentração da PI3K e P70 (45% e 43% respectivamente) nas ilhotas de ratos tratados com dexametasona 1mg/kg, durante 5 dias.

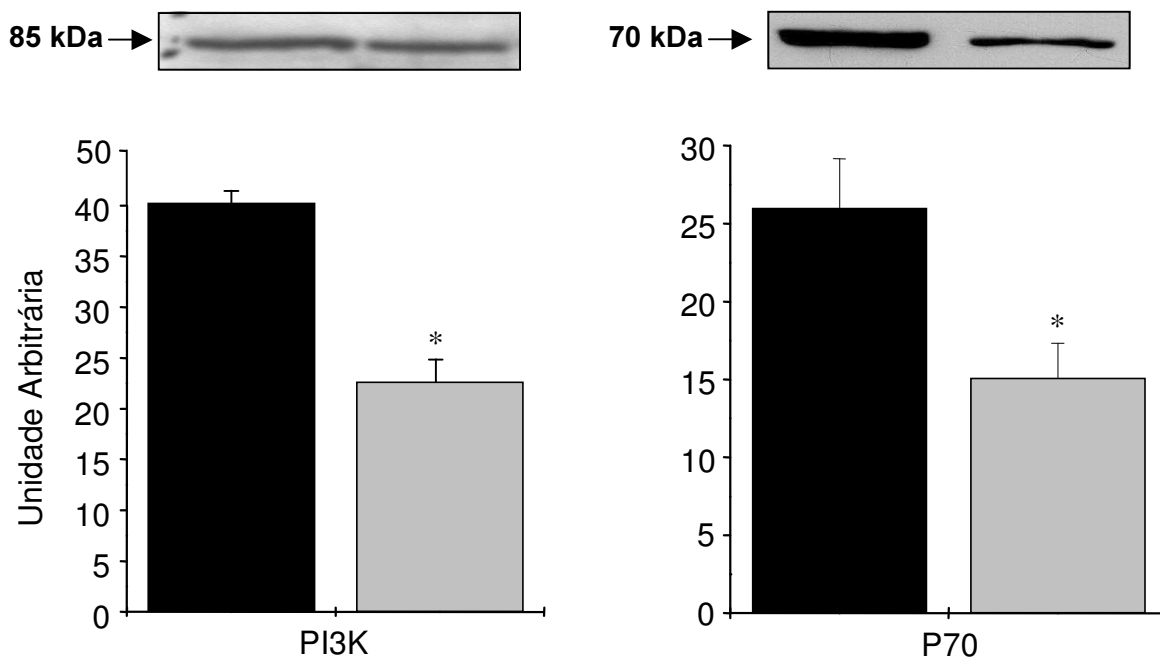


Figura 6. Expressão protéica da PI3K e P70 por ilhotas isoladas ratos controles ou (■) ou tratados com dexametasona (■) por 5 dias. Dados mostram médias $\pm$ EPM, unidades arbitrárias (UA), n = 4. * P < 0.05.

V - DISCUSSÃO

5.0 Discussão

Os glicocorticóides tem enorme aplicação na clínica médica, sendo utilizados como anti-inflamatórios e imunossupressores (Mc Ewen, 1998). Isso se deve em parte à capacidade de modular a transcrição de diversos genes envolvidos no processo inflamatório como AP-1 (Proteína Ativadora-1), NFkB (Feinman *et al*, 1999) e interleucinas inflamatórias (Rhamnsdorf *et al*, 1990). A atividade imunossupressora é confirmada por seus efeitos apoptóticos em linfócitos T e diversos tecidos não linfóides, hipocampo, eosinófilos, fibroblastos e certos tipos de células cancerígenas. Os glicocorticóides podem também estimular a sobrevivência em eritrócitos, neutrófilos e tecidos como glândula mamária, ovário e fígado (Amsterdan & Sasson, 2002). Assim, os glicocorticóides podem tanto induzir a morte ou sobrevivência celular, exercendo efeitos anti e pró-apoptóticos (Bloom *et al*, 2004). Outros genes também são modulados pela ação dos glicocorticóides, como por exemplo, genes do metabolismo energético (Mc Ewen, 1998). Alguns efeitos resultantes dessa modulação são aumento da gliconeogênese e resistência periférica o que leva a hiperglicemia tanto pela maior produção endógena de glicose, quanto pela menor captação nos tecidos periféricos (De Fronzo & Ferrannini, 1987).

No cDNA Macroarray, observamos a modulação de diversos genes em ilhotas de ratos tratados com dexametasona. Entre esses genes estão fatores de transcrição como AP-1, que teve sua expressão diminuída, além de glutations, proteínas de canais, moduladores intracelulares, entre outros. Nosso principal objetivo foi avaliar genes que estivessem envolvidos nas alterações que a dexametasona exerce sobre a ilhota pancreática. Dessa forma, enfatizamos as vias de proteção, apoptose e

crescimento celular, importantes para o funcionamento adequado da ilhota e secreção de insulina.

As ciclinas tipo D, são proteínas essenciais para controlar o ciclo celular na fase de transição G1/S (Pestell *et al*, 1999). Em vertebrados, as ciclinas do tipo D governam o ciclo celular interagindo com proteínas cinases CDK4 e CDK6 (cinases dependentes de ciclinas 4 e 6) (Martin *et al*, 2003). Duas famílias de proteínas, inibidores CDK e CKIs, se associam com o complexo ciclina/CDK para inibir sua atividade. As proteínas p15, p16, p18 e p19 inibem a atividade do complexo ciclina D/CDK4 ou 6, e impedem a entrada na fase S do ciclo celular (Baldin *et al*, 1993). As proteínas p21, p27, e p57 têm a função de inibir o complexo ciclina/CDK em todas as fases do ciclo celular, e particularmente inibem a atividade da ciclina E/CDK2 (Didenko *et al*, 1996). Os glicocorticóides são conhecidos por seus efeitos antiproliferativos em diferentes tecidos e tipos de células, incluindo os de origem linfóide, fibroblástica e epitelial, resultando na parada da progressão do ciclo celular e /ou apoptose. (Distelhorst, 2002). Os resultados obtidos no cDNA Macroarray mostraram que os animais tratados com dexametasona tiveram menor expressão de ciclinas D1, D2 e CDK4, e aumento na expressão do inibidor de CDK, p21. Esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que demonstraram efeito inibitório sobre o ciclo celular induzido por dexametasona em diversos tipos de células e tecidos, porém não há trabalhos relacionando ciclo celular em ilhotas pancreáticas e glicocorticóides. Greenberg *et al* demonstraram que o tratamento *in vitro* com dexametasona diminui atividade de CDK2 e 4, os níveis de ciclina D, E2F e Myc, e aumenta a atividade do inibidor de CDK p21 em células cancerígenas de pulmão (A549 e Calu-1). Desta forma, as alterações na expressão

desses genes, importantes na fase G1 do ciclo celular, sugerem que o tratamento com dexametasona pode inibir a progressão do ciclo celular.

Observamos também que a expressão de genes que codificam proteínas de receptores de morte como TNFR1 e Fas estavam aumentadas pelo tratamento com dexametasona. O aumento da Fas foi confirmado pela PCR. Suarez-Pinzon *et al* (1999) observaram que a morte de células B estavam correlacionadas com o aumento de expressão de Fas e de citocinas pró-inflamatórias em ilhotas em camundongos NOD. Além disso, camundongos NOD lpr/lpr (limfoproliferação) Fas “knockout”, são resistentes ao desenvolvimento espontâneo de diabetes, mostrando que o desenvolvimento de diabetes autoimune nesses animais requer a expressão de Fas (Itoh *et al*, 1997). Estudos in vitro de células B, sugerem que a expressão de Fas marca as células B para serem mortas por células do sistema imune (linfócitos TCD8 ou TCD4), as quais expressam Fas Ligante (FasL) (Moriwaki *et al*, 1999). O aumento da expressão desse receptor de morte em ilhotas tratadas com dexametasona sugere que a via extrínseca da apoptose está sendo ativada.

Em nossos resultados, não houve alteração de expressão gênica de proteínas pró-apoptóticas com domínio BH3 único (Bad, Bim, Bid) porém houve aumento na expressão gênica e protéica da Bax α e diminuição na expressão protéica de Bcl-2 em ilhotas pancreáticas de ratos tratados com dexametasona. Diversos trabalhos mostram a importância dessas proteínas na morte celular e utilizam a razão Bax/Bcl2 como parâmetro de apoptose, pois é o aumento ou a diminuição entre elas que resulta na formação do poro na mitocôndria (Van de Castele *et al*, 2002). Um exemplo é a apoptose induzida pela privação de fatores de crescimento, desencadeada pela baixa expressão de Bcl-2 em ilhotas de Langerhans (Mizuno *et al*, 1998) que pode ser

prevenida pela superexpressão da mesma (Iwahashi *et al*, 1996). A função das proteínas da família Bcl-2 na apoptose induzida por dexametasona é incerta (DisterlHORTS, 2002). A indução de proteínas pró-apoptóticas e a repressão de anti-apoptóticas tem sido observado em células tratadas com glicocorticóides (Schmidt *et al*, 2004). Entre as proteínas alteradas pela a dexametasona está a Bax, ocorrendo ativação e translocação dessa proteína até a mitocôndria e formação do poro na membrana mitocondrial que posteriormente permite o extravasamento de moléculas apoptóticas (caspases, smac/diablo) para o citosol da célula. Além de ativar a Bax, a dexametasona também aumenta os níveis dessa proteína em timócitos (Mok *et al*, 1999). Assim, Bax pode ser importante na apoptose induzida por glicocorticóides (DisterlHORTS, 2002). Nossos resultados estão de acordo com a literatura, que mostram que a apoptose desencadeada por glicocorticóides ocorre através da via extrínseca, ativação de Bax e inibição de Bcl-2. Outros trabalhos mostram que esses genes não são os principais responsáveis pelo desencadeamento do processo apoptótico, pois aparecem apenas em estágios tardios da apoptose (Eizirik & Mandrup-Poulsen, 2001). Assim, o exato papel das proteínas anti e pró-apoptóticas em células B pancreáticas e na apoptose induzida por glicocorticóides não está bem esclarecido.

A disfunção da mitocôndria pode não ser o passo inicial ou principal na ativação da via de morte desencadeada por glicocorticóides, porém alterações na expressão dos genes mitocondriais são decisivos para sua disfunção e conseqüente apoptose. A literatura é escassa em trabalhos que relacionam apoptose, glicocorticóides e ilhotas pancreáticas. Weinhaus *et al* (2000), mostraram que os glicocorticóides seriam responsáveis por contrariar os efeitos da prolactina ao final da gestação, aumentando a apoptose, e revertendo a hiperplasia e hipertrofia que ocorrem nas ilhotas pancreáticas

durante a prenhez. Em nosso trabalho o aumento na expressão gênica do receptor de morte Fas, aumento da expressão gênica e protéica da Bax α e diminuição na expressão protéica de Bcl-2, sugerem que a ilhota do animal tratado com dexametasona está em processo apoptótico.

A via da PI3K/AKT é vista como peça-chave para a sobrevivência em diferentes tipos de células. Inibição da via da PI3K e subsequente inibição da fosforilação da AKT são mecanismos importantes na apoptose induzida por dexametasona (Leis *et al*, 2004). Chrysis *et al* (2005), demonstraram que a dexametasona inibe a via da PI3K/AKT, resultando em apoptose em células HCS de condrócitos. Isso se deve em parte porque a AKT é responsável pela fosforilação da Bad, mantendo-a inativa no citosol e impedindo suas ações apoptóticas. Além disso, a ativação da AKT inibe a via das proteínas cinases ativadas por estresse (SAPK) através da fosforilação de cinases anteriores a SAPK (Chrysis *et al*, 2005). A AKT também possui efeitos proliferativos inibindo a glicogênio sintase cinase 3 (GSK3), que por sua vez fosforila e inibe diversos substratos na células como β -catenina. A β -catenina, desfosforilada, pode então ativar fatores de transcrição de proteínas do ciclo celular como ciclinas D1 que induzem a progressão do ciclo celular (Vara *et al*, 2004). AKT também é responsável por fosforilar e inativar p21(Zhou *et al*. 2001), que é responsável pela parada do ciclo celular. A proteína P70/S6 cinase faz parte da via PI3K sendo ativada pela AKT. É responsável por ativar a transcrição e tradução de proteínas, aumentando a síntese protéica e conseqüente crescimento celular (Fingar & Blenis, 2004).

Nossos resultados demonstraram diminuição na expressão gênica e protéica de PI3K e P70, além de diminuição de expressão gênica da AKT, que pode acarretar

inúmeros efeitos na célula B, como diminuição da síntese protéica, crescimento celular e das vias protetoras da ilhota, desfosforilação da Bad, ativação das vias de estresse celular (JNK) e parada da progressão do ciclo celular, que juntas podem levar a indução da apoptose. Alguns desses eventos foram encontrados em ilhotas dos nossos animais tratados com dexametasona, indicando que outras vias podem ser reguladas diretamente pela diminuição de expressão da PI3K/AKT/P70.

SAPKs (proteínas cinases ativadas por estresse) respondem a estresse celular ou citocinas, resultando na ativação de genes ligados a apoptose (Song *et al*, 2005). As SAPKs são classificadas em dois grupos, JNK (c-jun NH₂ –terminal kinase) e p38 (Kim *et al*, 2001). A ativação da via P38 é tecido-específica, podendo levar a apoptose induzida por citocinas (IL-1 β e INF- γ) em ilhotas de ratos (Saldeen *et al*, 2001) ou proteção celular quando estimulada por fatores de crescimento (IGF-1) em linhagens de células PC12 (Pugazhenthii *et al*, 1999). A via JNK é conhecida por induzir a apoptose em ilhotas pancreáticas humanas logo após o processo de isolamento, sendo alvo importante durante transplantes (Aikin *et al*, 2004). Ativação da via PI3K leva a ativação da AKT que fosforila a JNK, inibindo sua atividade e impedindo a apoptose induzida por esta via (Aikin *et al*, 2004). O aumento de expressão gênica da JNK observada em nosso estudo indica que além de a dexametasona exercer seus efeitos apoptóticos pela via mitocondrial, extrínseca (ligantes de morte) e através da diminuição da via PI3K/AKT/P70 pode ocorrer ativação da via JNK.

Outras vias podem ser reguladas pelo tratamento com dexametasona, como a via da MAPK, que teve diminuição na expressão gênica de ERK2 e MAP cinases cinases como MEK1. Fatores de crescimento IGF-1, NGF e varredores de radicais

livres também tiveram sua expressão diminuída pelo tratamento, porém, nosso estudo limitou-se às vias de stress e proteção celular, sendo necessários mais experimentos para compreender quais conseqüências à ilhota pancreática são decorrentes da alteração na expressão desses genes .

Em situações de resistência periférica as células B precisam compensar a maior demanda por insulina. O aumento da secreção de insulina ocorre para manter a normoglicemia frente à nova situação imposta ao organismo. Durante esse período, as ilhotas se adaptam aumentando a massa de células B e tornando-se hipertrofiadas (Bonner-Weir, 2000). Porém, durante o desenvolvimento do diabetes, essa adaptação não é suficiente para vencer a resistência periférica, ocorrendo posteriormente, perda da massa de células B e conseqüente diminuição na secreção de insulina (Butler *et al*, 2003). Algumas hipóteses foram sugeridas para este mecanismo: aumento na taxa de apoptose, diminuição na taxa de neogênese (Pick *et al*, 1998), lipotoxicidade (Prentki *et al*, 2002) e efeitos tóxicos da hiperglicemia (Mandrup-Poulsen, 2003; Jonas *et al*, 1999). Animais Zucker obesos (ZF) possuem células B hipertrofiadas devido ao aumento na resistência periférica. Animais Zucker obesos que se tornaram diabéticos (ZDF), também possuem maior massa de células B quando comparado aos animais Zucker controles, porém a massa de células B é 50% menor que nos animais obesos, mostrando que no desenvolvimento do diabetes ocorre a perda de massa de células B (Pick *et al*, 1998).

Em nosso modelo, o tratamento durante 5 dias com dexametasona (1mg/kg) leva ao aumento na secreção de insulina estimulada por glicose. Os animais tratados apresentam valores de glicemia e insulina plasmática de jejum significativamente maiores que os animais controle. Isso se deve ao fato de que os glicocorticóides

aumentam a produção endógena de glicose e a resistência periférica, que se reflete no aumento da secreção de insulina. Em trabalhos realizados no nosso laboratório, IGTT (teste de tolerância a glicose intraperitoneal) dos animais tratados com dexametasona mostrou aumento da resistência periférica à insulina e conseqüente menor captação de glicose e aminoácidos no tecido muscular, além de diminuição da lipogênese nos adipócitos. Esses dados são semelhantes aos encontrados em outros trabalhos, que utilizam o tratamento com dexametasona como modelo de resistência periférica (Saad et al, 1993). Dados morfológicos realizados por nosso grupo de pesquisa, mostram que ilhotas tratadas com dexametasona por 5 dias apresentaram características de hipertrofia e hiperplasia, quando comparadas ao controle. Diversos trabalhos mostram ação inibitória dos glicocorticóides sobre a secreção de insulina (Kim *et al*, 2001), porém são trabalhos “in vitro” e com doses menores do que a que utilizamos.

Além disso, o tratamento com dexametasona durante 10 dias mostrou que a secreção de insulina permanece maior que o controle, porém menor que os animais tratados por 5 dias, o que sugere uma falha na ilhota pancreática para compensar a resistência periférica que se reflete na diminuição da secreção de insulina e aumento da glicemia plasmática como mostrados nesse trabalho. Isso pode ser reflexo do aumento na apoptose, sugerido pelas alterações ocorridas na expressão gênica e protéica de proteínas pró e anti apoptóticas ocorridas nas ilhotas de animais tratados com dexametasona por 5 dias. Da mesma forma, Pick *et al*, demonstraram que ratas ZDF possuem ilhotas hipertrofiadas e secretam insulina em quantidades adequadas para vencer a resistência periférica, porém, quando tratadas 48 horas com dexametasona ocorre diminuição na secreção e aumento na taxa de apoptose. A apoptose das células B dos animais ZDF é seguida de diminuição na expressão de Bcl-2, aumento de ácidos

graxos livres no plasma, aumento de triglicérides na ilhota e acúmulo de ceramida (Shimabukuru *et al*, 1998). Nossos animais também apresentaram aumento de ácidos graxos plasmáticos, provavelmente efeitos da dexametasona sobre catabolismo de proteínas e tecido adiposo, ou ainda efeitos diretos da dexametasona sobre a lipase hormônio sensível, responsável por aumentar a concentração de ácidos graxos do plasma. A diminuição da expressão protéica de Bcl-2, também encontrada nos nossos animais, pode ser o fator desencadeador da apoptose.

Glicocorticóides exercem importantes efeitos sobre fisiologia da célula B e secreção de insulina, seja por mecanismos indiretos (agindo no metabolismo, aumentando a resistência periférica e a glicemia plasmática) ou por mecanismos diretos (através do receptor intracelular). Apesar disso, não existem trabalhos que correlacionam tratamento *in vivo* com glicocorticóides e análise da expressão gênica de ilhotas pancreáticas. A literatura também é escassa quando se trata de doses elevadas (imunossupressoras) como a que utilizamos, pois a maioria dos trabalhos utiliza o tratamento *in vitro* de células B isoladas ou linhagens de células. Assim, não podemos descartar os efeitos sistêmicos que os glicocorticóides causam *in vivo* e que se refletem na modulação da expressão gênica nas ilhotas. De forma geral, a administração de dexametasona em ratos, modula a expressão de genes na ilhota pancreática, aumentando a expressão de genes relacionados a apoptose como JNK e Bax α , e diminuindo a expressão genes que codificam proteínas envolvidas no ciclo celular (ciclinas D1 e D2, CDK4), proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e via PI3k/AKT/P70 importante para a crescimento e sobrevivência das células. A secreção aumentada de insulina aos 5 dias de tratamento, sugere que a taxa de morte das células B ainda não é superior à hipertrofia sofrida pela mesma e induzida pela resistência periférica,

permitindo que a ilhota secrete insulina em quantidades maiores, mantendo a glicemia moderadamente aumentada. Porém, o tratamento durante 10 dias mostra que a secreção diminui e ocorre aumento da glicemia plasmática de jejum, podendo ser consequência do aumento progressivo da apoptose e resultando no desenvolvimento do diabetes.

VI – CONCLUSÃO

6.0 - Conclusões

Nossos resultados demonstram que a dexametasona modula (direta ou indiretamente) a expressão de diversos genes e proteínas que participam da proteção e crescimento da ilhota.

1) Ilhotas de ratos tratados com dexametasona mostraram aumento da expressão de genes pró-apoptóticos Bax α , JNK, Fas e redução da expressão de genes da via PI3K/AKT/P70 e anti-apoptóticos Bcl-2.

2) Ilhotas de ratos tratados com dexametasona aumentam a expressão protéica da Bax α e diminuem a expressão da PI3K, P70 e Bcl-2.

3) Animais tratados com dexametasona por 5 dias, possuem maior secreção de insulina em relação ao controle. Porém, animais tratados por 10 dias, secretam mais insulina em relação ao controle e menos insulina em relação aos animais tratados por 5 dias.

4) Outros genes, relacionados ao ciclo celular, proteção contra radicais livres, cinases intracelulares, entre outros, são modulados pelo tratamento com dexametasona.

VI – BIBLIOGRAFIA

6.0 – BIBLIOGRAFIA

Adams, J.M.; Cory, S. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science** 281, 1322-1326. 1998.

Aikin, R; Maysinger , D; Rosenberg, L. **Endocrinology** 145(10):4522–4531, 2004.

Alessi , D.R.; Andjelkovic, M.; Cauwell, B.; Cron, P.; Morrice, N.; Cohen, P.; Hemmings, B.A. mechanisms of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. **EMBO J**; 15:6541-6551. 1996.

Amsterdam, A. & Sasson, R. The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. Mol. Cell. **Endocrinol.** 189: 1-9. 2002

Ashcroft, F.M.; Harrison, D.E.; Ashcroft, S.J.H. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat β - cells. **Nature (London)**, 312: 446-6, 1984.

Baldin, V., J. Lukas, M. J. Marcote, M. Pagano, and G. Draetta.. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. **Genes Dev.** 7: 812–821. 1993.

Baraniuk, J.N. Molecular actions of glucocorticoids: an introduction. **J. Allergy and Clin Immunol**, 97(1): 141-146. 1996.

Bloom, J.W.; Chacko, J.; Lohman, I.C.; Halonen, M.; Martinez, F.D. & Miesfeld, R.L.. Differential control of eosinophil survival by glucocorticoids. **Apoptosis** 9: 97-104. 2004

Budhardjo et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.** 15, 269-290. 1999.

Butler, A.E.; Janson, J.; Bonner-Weir, S.; Ritzel, R.; Rizza, R.A.; Butler, P.C. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. **Diabetes** 52: 102-110. 2003.

Buttgereit, F., Wehling, M.; Burmester, G.R. A new hypothesis of modular glucocorticoids actions. **Arthritis Rheum.** , 41(5): 61-767.1998.

Buttgereit F. Rapid Glucocorticoids effects on immune cells. **Steroids** 67: 529-534. 2002.

Bonner-Weir, S. Islet growth and development in the adult. **J. Mol Endocrinol** 24: 297-302. 2000.

Boschero, A. C. Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células β pancreáticas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**, v. 40, n. 3, p. 149-155, 1996.

Cato, A.C.; Nestl, A.; Mink, S. Rapid actions of steroids receptors in cellular signalling pathways. **Sci. STRE.** 2002.

Chrysis, D.; Zaman, F.; Chagin, A.S.; Takigawa, M.; Savendahl, L.. Dexamethasone induces apoptosis in proliferative chondrocytes through activation of caspases and suppression of the AKT-PI3K signaling pathway. **Endocrinology** 146: 1391-1397. 2005.

Cidlowski, J.A., King, K.L., Evans-Storms, R.B.; Montague, J.W.; Bortner, C.D.; Hughes, Jr. F.M. The biochemistry and molecular biology of glucocorticoid-induced apoptosis in the immune system. **Recent. Prog. Horm. Res.** 51:457-490. 1996.

Cook, D.L.; Hales, C.N. Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic β -cells. **Nature (London)**, 311: 271-3. 1984.

Cory, S. & Adams, J.. The Bcl-2 family: Regulators of the cellular life or death switch. **Nature reviews, Cancer**. 2: 647-656. 2002.

Curtin, J.F.; Cotter, T.H. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. **Cell. Sig.** 15: 983-992. 2003.

Deeney, J. T.; Prentky, M.; Corkey, B. E. Metabolic control of β -cell function. **Semin. Cell & Developmental Biology**, v. 11, n. 4, p. 267-275, 2000.

Didenko, V.V., Wang, X., Yang, L. and J, H.P. **J. Clin. Invest.** 97, 1723-1731. 1996.

De Fronzo, R.A.; Ferrannini, E. Regulation of hepatic glucose metabolism in humans. **Diabetes Metab. Rev.** 3: 415-59. 1987.

Distelhorst, C.W. **Cell Death and Diff.** 9: 6-19. 2002.

Eizirick, D.L.; Mandrup-Poulsen, T. A choice of death- the signal- transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. **Diabetologia** 44 : 2115-2133. 2001.

Feinman, R., Koury, J., Thames, M., Barlogie, B., Epstein, J., Siegel, D.S.. Role of NF- κ B in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoid-induced apoptosis by Bcl-2. **Blood**- 93: 3044-3052. 1999.

Fingar, D.C., Blenis, J. Target of rapamycin (mTOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. **Oncogene**. 23: 3151-3171. 2004

Fronzo, R.A.; Ferrannini, E. Regulation of hepatic glucose metabolism in humans. **Diabetes Metab. Rev.**; 3: 415-59. 1987.

Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. **Annu Rev Biochem**; 67:481–507. 1998.

Gaynon P.S. Carrel, A &L. Glucocorticosteroid therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Adv. Exp. Med. Biol.** 457: 593-605. 1999

Gilon, P.; Sheperd R.M.; Henquin, J.C. Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca^{+2} as evidences in single pancreatic islets. **J. Biol. Chem** 268: 22265- 22268. 1993.

Greenberg ,Alissa K. Greenberg, Jing Hu, Sharmila Basu, John Hay, Joan Reibman, Ting-an Yie, Kam Meng Tchou-Wong,William N. Rom, and Theodore C. Lee. Glucocorticoids Inhibit Lung Cancer Cell Growth through Both the extracellular Signal-Related Kinase Pathway and Cell Cycle Regulators. **Am J Respir Cell Mol Biol.** Sep;27(3):320-8. 2002.

Hunter T. Signaling–2000 and beyond. **Cell**:100:113–27..2000.

Hollenberg, S.M.; Weinberg, C.; Ong, E.S.; Cerelli, G.H.; Oro, A.; Lebo, R.; Thompson, E.B.; Rosenfeld, M.G.; Evans, R.M. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. **Nature** 318:635-641. 1985.

Itoh, N.; Imagawa, A.; Hanafusa, T. *et al.* Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in non obese diabetic mice. **J Exp. Med.** 186: 613-618. 1997.

Iwahashi, H., Itoh, K. Yamagata, A. Imagawa, H., Nakajima, K., Moriwaki, M. Waguri, K., Matsuzawa, Y. Cytokines-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic b-cell line: inhibition of bcl-2. **Diabetologia** 39: 530-536. 1998.

Jeong, In- Kyung.; Oh, Seung-Hoon.; Kim, Byung-Joon.; Chung, Jae-Hoon.; Min, Yong-Ki.; Lee, Myung-Shik.; Lee, Moon-Kyu.; Kim, Kwang-Wong. The effects of dexamethasone on insulin release and biosynthesis are dependent on the dose and duration of treatment. **Diab. Reserc. Clin. Pract.** 51 163-171. 2001

Jonas , J.C., Sharma, A., Hasenkamp, W., Ilkova, H., Patané, G., Laybutt, R., Bonner-Weir, S., Weir, C.G. Chronic Hyperglycemia Triggers Loss Of Pancreatic B cell Differentiation in an Animal Model of Diabetes. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol: 274. 14112-14121. 1999.

Takey, A.; Kelly, R.P.; Ashcroft, S.J.H.; Ashcroft, F.M. The ATP-sensitivity of K⁺ channels in rat pancreatic β -cells is modulated by ADP. **FEBS Lett**. 208: 63-6.1986.

Karin, M. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: Is DNA binding dispensable? *Cell* 93 487-490. 1998.

Kim, A.H, Khursigara, G.; Sun, X.; Franke, T.F.; Chao, M.V. Akt fosforilates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. **Mol. Cell. Biol**. 21: 893-901. 2001.

Kofler, R. The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells. **Histochem. Cell, Biol**. 114 : 1-7. 2000.

Kousteni S.; Che, J.R.; Bellindo, T.; Han, L.; Manolagas, S.C. Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signalling of sex steroids. **Science** 298: 843-846. 2002.

Laybutt, D.R.; Kaneto, H., Hasenkamp, W., Grey, S., Jonas, J.C., Sgroi, D.C.; Groff, A., Ferran, C.; Bonner-Weir, S., Sharma, A., Weir, G. Increased Expression of Antioxidant and Antiapoptotic Genes in Islets that May Contribute to B-cell Survival During Chronic Hyperglycemia. **Diabetes**, 51- 4113-423. 2002.

Leis H., Page A., Ramirez A., Bravo A., Segrelles C., Paramio J., Baretino D., Jorcano J.L., Perez P. Glucocorticoid receptor counteracts tumorigenic activity of AKT in skin through interference with the phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathway. **Mol. Endocrinol** 18:303-311. 2004.

Lenzen, S.; Bailey, C.J. Thyroid hormones, gonadal and adrenocortical steroids and the function of the islets of Langerhans. **Endocr. Rev.** 5 411-434. 1984.

Limbourg, F.P; Liao, J.K. Nontranscriptional actions of the glucocorticoid receptor. **J. Mol. Med.** 81: 168-174. 2003.

Mandrup-Poulsen, T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. **Bioch Pharm** 66: 1433-1440. 2003.

Martin, J., Hunt, S.L., Dubus, P., Sotillo, R., Nehme-Pelluard, F., Magnuson, M.A., Parlow, A.F., Malumbres, M., Ortega, S., Barbacid, M. Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic beta-cell proliferation but not homeostatic cell number. **Oncogene** 22, 5261–5269. 2003.

Mauricio, D.; Mandrup-Poulsen, T. Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. **Diabetes** 47 :1537-1543. 1998.

Mc Ewen, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators. **N. Engl. J. Med.** 338: 171-179. 1998.

Meier R, Hemmings BA. Regulation of protein kinase B. **J Recept Signal Transduct Res**;19:121–8. 1999.

Mizuno N., Yoshitomi H., Ishida H., Kuromi H., Seino S. Altered bcl-2 and bax expression and intracellular Ca signalling in apoptosis of pancreatic cells and the impairment of glucose-induced insulin secretion. **Endocrinology** 139: 1429-1439. 1998.

Mok, C.L.; Gil- Gomes , G.; Willians, O.; Coles, M.; Taga, S.; Tolaini, M.; Norton, T.; Kioussis, D.; Brady, H.J. Bad can act as a key regulator of T cell apoptosis and T cell development. **J. Exp. Med.** 189; 575-586. 1999.

Moriwaki, M.; Itoh, N.; Miyagawa, J . Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset Type I diabetes mellitus.

Diabetologia 42:1332-1340. 1999.

Pawson T, Nash P. Protein–protein interactions define specificity in signal transduction. **Genes Dev**:14: 1027–47. 2000.

Pick, A.; Clark, J., Kubstrup, C., Levisetti, M., Pugh, W., Bonner-Weir, S., Polonski, K. Role of Apoptosis In Failure of B-cell Mass Compensation for Insulin Resistance and B-cell Defects in the Male Zucker Diabetic Fatty Rat. **Diabetes**, vol 47. 1998.

Pick, A.; Levisetti, M., Pugh, W., Bonner-Weir, S. Failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance in dexamethasone induced diabetes in female Zucker diabetic fatty (ZDF) rats (abstract). **Diabetes** 47 (suppl. 1): A 258. 1998.

Pestell, R. G.; Albanese, C.; Reutens, A. T.; Segall, J. E.; Lee, R. J.; Arnold, A. The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. **Endocrine Rev.**v.20n.4,p-501-534.1999.

Prentki, M.; Joly, E.; Assaad, W.; Roduit, R. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity- role in b-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. **Diabetes** 51: s405-13. 2002.

Pugazhenth S, Miller E, Sable C, Young P, Heidenreich KA, Boxer LM, Reusch JE. Insulin-like growth factor-I induces bcl-2 promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein. **J Biol Chem** 274:27529–27535. 1999.

Rahmsdorf, J.C; Park, H.J.; Cato, K.K.; Gebel, A.C.; Ponta, S.; Herrlich, H. Antitumor promotion and antiinflammation down-modulation of AP-1 (fos-jun) activity by glucocorticoid hormone. **Cell** 62:1189-1204. 1990.

Ricardi, C.; Cifone, M.G.; Migliorati, G. Glucocorticoid Hormone-induced Modulation of gene expression and regulation of T-cell death: role of GTR and GILZ, two dexamethasone induce genes . **Cell Death Differ.** 6 : 1182-1189. 1999.

Saad, M.J.; Folli, F.; Kahn, J.A.; Kahn, R. Modulation of Insulin Receptor Substrate-1, and Phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J.Clin. Invest.* 1993.

Saldeen J, Lee JC, Welsh N. Role of p38 mitogen-activated protein kinase(p38 MAPK) in cytokine-induced rat islet cell apoptosis. **Biochem Pharmacol** 61:1561–1569. 2001.

Scott, H.K; Hengartner, M.O. **Trends in Cell Biol.** 11: 526-534. 2001.

Schmidt, S., Rainer, J., Ploner, C., Presul, E., Riml, S., Kofler, R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. **Cell death and Differentiation**, 11- 345-358. 2004.

Shimabukuru M., Wang M.Y., Zhou, Y.T., Newgard, C.B., Unger, R.H. Protection against lipapoptosis of beta cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.** 95:9558-9561.1998.

Song, G.; Ouyang, G.; Bao, S. The activation of AKT/PKB signaling pathway and cell survival. **J. Cell. Mol. Med.** 9: 59-71. 2005.

Stoecklin, E.; Wissler, M.; Moriggl, R.; Groner, B. Specific DNA binding of STAT 5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. **Mol. Cell. Biol.** 17 6708-6716. 1997.

Strack, A.M.; Sebastian, R.J.; Schwartz, M.W.; Dallman, M.F. Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. **Am J. Physiol.**, 268: R142-9. 1995.

Suarez-Pinzon, W.L.; Sorensen, W.; Bleackley, R.C.; Elliott, J.F.; Rajotte, R.V.; Rabinovitch, A. B- cell destruction in NOD mice correlates with Fas (CD95) expression on B-cells and proinflammatory cytokine expression in islets. **Diabetes** 43: 1149-1156. 1999.

Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science** 267, 1456-1462. 1995.

Trueba, M; Ibarolla, I; Ogiza, K; Marino, A; Macarulla, J.M. Specific binding sites for corticosterone in isolated cells and plasma membranes from rat liver. **J. Membr. Biol**, 120: 115-124, 1991.

Van de Casteele, M., Kefas, B., Ling, Z., Heimberg, H. Pipeleers. Specific expression of Bax-W in Pancreatic B-cells is Down-regulated by Cytokines before the onset of Apoptosis. **Endocrinology**. 143(1): 320-326. 2002.

Vara, J. A.F., Casado, E., Castro, Cejas, P., Baron-González. PI3K/AKT signalling pathway and Cancer. **Cancer Treat. Reviews**. 30: 193-204. 2004.

Weinhaus, A.J.; Bhagroo, V.; Brelje, T.C.; Sorenson, R.L. Dexamethasone counteracts the effects of prolactin on islet function: implications for islet regulation in late pregnancy. **Endocrinology** 141: 1384-1383. 2000.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, et al. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/ new-overexpressing cells. **Nat Cell Biol**; 3:245–52. 2001.