

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Vanessa Aparecida Gonçalves Giozzet

**ANÁLISE DAS AÇÕES DA DEXAMETASONA SOBRE A
SECREÇÃO DE INSULINA, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS
E MOLECULARES EM RATOS SUBMETIDOS À
RESTRIÇÃO PROTÉICA.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Vanessa Aparecida Gonçalves Giozzet
por Roberto Bosqueiro
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro

Campinas, 2008

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

G439a

Giozzet, Vanessa Aparecida Gonçalves

Análise das ações da dexametasona sobre a secreção de insulina, parâmetros bioquímicos e moleculares em ratos submetidos à restrição protéica / Vanessa Aparecida Gonçalves Giozzet. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: José Roberto Bosqueiro.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ilhotas de Langerhans. 2. Dexametasona. 3. Dieta com restrição de proteínas. 4. Insulina - Secreção.
I. Bosqueiro, José Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Analysis of dexamethasone treatment effects on insulin secretion, molecular and biochemical parameters in rats submitted to protein restriction.

Palavras-chave em inglês: Islands of Langerhans; Dexamethasone; Protein-restricted diet; Insulin - Secretion.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: José Roberto Bosqueiro, Eliana Pereira de Araújo, Márcio Alberto Torsoni, Angelo Rafael Carpinelli, Silvana Auxiliadora Bordin da Silva.

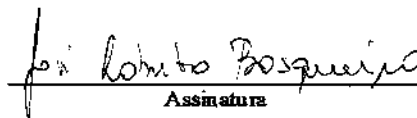
Data da defesa: 11/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 11 de fevereiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro (orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva


Assinatura

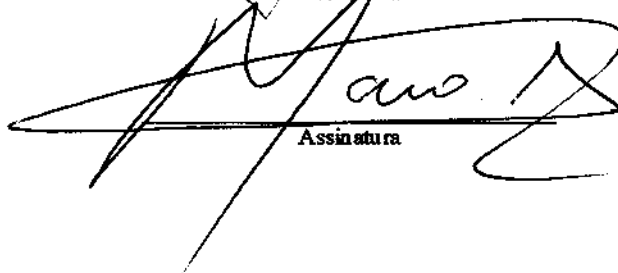
Profa. Dra. Eliana Pereira de Araújo


Assinatura

Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli


Assinatura

Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni


Assinatura

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

Assinatura

Profa. Dra. Maria Tereza Nunes

Assinatura

Prof. Dr. Lício Velloso

Assinatura

*Aos meus pais Ivan e Antonia e às
minhas irmãs Roberta e Fernanda,
Dedico esse trabalho.
AMO MUITO VOCÊS!*

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente e principalmente.

“Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei”. (Salmo 91:2)

Especialmente, a minha família por compreender minha ausência, pelo incentivo e incomparável amor.

Ao meu orientador, José Roberto Bosqueiro, pelos ensinamentos, orientação, incentivo, paciência, compreensão e por me conceder a oportunidade de realizar esta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero pela dedicação, paciência, apoio e por estar sempre pronto a nos auxiliar.

Aos Professores Everardo, Helena, Silvana e Eliana pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha grande amiga-irmã Aline que me mostrou que não importa a distância e sim quão forte e verdadeira é a amizade.

A minha amiga Eliane pelo carinho e ajuda em todos os momentos de dificuldades.

A Julia pelo afeto, dedicação e por estar sempre pronta a ajudar. Obrigada por me ouvir nos momentos de desabafos.

Ao Camis pelo companheirismo, ajuda e por sua grande e dedicada amizade.

Aos queridos amigos do laboratório: Silvana, Luciene, Flávia, Isabel, Marcelo, Denise, Matheus, Otávio, Jú, Fabiano, Vanessa, Marize, Tati, Andréa, Esméria, Janaína, Heleninha, Kelly, Morgs, Letícia, Daniel, Léli, Maria Lúcia, Fabrício, Baby, Ana Paula, Cléber, Paty, Alessandro, Gabriel, Roberto, Amon, Thierry, Pri, Rosane, Thiago, Andressa, Mauro, Nágela e Mariana. Obrigada pela amizade, bom humor, carinho e colaboração.

Em especial, agradeço ao Lék, que apesar de nossas diferenças, sempre esteve presente e atuante durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada, tatinho.

Aos grandes e eternos amigos James, Béri e Milton, obrigada pela amizade e carinho. Vocês são muito especiais para mim.

À minha amiga, conselheira e companheira de Fesbe Sandra. Obrigada pelo carinho, companheirismo, paciência e confiança!!!

À Andréia, secretária que eu tanto perturbei, mas que tenho grande estima. Obrigada pelo auxílio durante todo período de desenvolvimento desse estudo.

A todos os funcionários do departamento de biologia e da pós-graduação, em especial o Léscio pela ajuda na confecção das dietas.

Ao Lazineiro que nas horas de sufoco sempre nos ajudou.

A todos que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Doutorado.

RESUMO

A desnutrição e a resistência periférica à insulina induzida por administração de glicocorticóides induzem compensações funcionais e morfológicas em ilhotas pancreáticas a fim de manter a homeostase glicêmica. Deste modo, investigamos as alterações desenvolvidas pelo tratamento com dexametasona (Dex) em animais submetidos à restrição protéica. Foram analisados: parâmetros metabólicos, secreção de insulina em resposta a glicose e proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina em ilhotas pancreáticas isoladas. Ratos submetidos à dieta hipoprotéica (LP) apresentaram características padrões que caracterizam a desnutrição como: diminuição de ganho de massa corporal, redução dos níveis séricos de albumina, proteína total e insulina. Adicionalmente, os ratos LP exibiram aumento da sensibilidade periférica à insulina e redução da área das ilhotas pancreáticas comparadas ao grupo controle ($P < 0,05$). Todos estes parâmetros apresentaram valores similares ao grupo controle nos ratos submetidos à dieta hipoprotéica e submetidos ao tratamento com Dex (LPD), exceto para o peso corpóreo ($P < 0,05$). A secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos LPD apresentou maior responsividade à glicose, em níveis estimulatórios, comparados a secreção em ilhotas de ratos LP ($P < 0,05$). Paralelo aos resultados de secreção, os ratos LPD exibiram redução do conteúdo protéico de IRS-1, IRS-2 e aumento dos níveis protéicos de p-FoxO1, p-ERK e PKC comparados ao grupo LP ($P < 0,05$). Concomitantemente, as ilhotas dos ratos LPD mostraram-se hipertrofiadas comparadas com ilhotas de ratos LP ($P < 0,05$). Em conclusão, o tratamento com dexametasona reverte, ao menos parcialmente, os efeitos no metabolismo analisados e no funcionamento das ilhotas pancreáticas causados pela restrição protéica, confirmando a grande plasticidade das células β frente a condições adversas facultativas e/ou permanentes.

ABSTRACT

Malnutrition caused by protein restriction and dexamethasone-induced insulin resistance, in vivo treatment (Dex) are conditions associated with morphological and functional alterations in pancreatic islets. Thus, the present study evaluated the dexamethasone treatment effects on the metabolic parameters, glucose-stimulated insulin secretion and proteins involved in the insulin signalling pathway over low protein diet fed rats (LP). LP rats showed decrease in body weight, serum insulin, total serum protein, and serum albumin, patterns that characterize the LP rats. Moreover, LP rats presented improved peripheral insulin sensibility and reduced islets area ($P < 0,05$). Except for the body weight ($P < 0,05$), all these parameters were prone to be normalized in rats exposed to a low protein diet and treated with dexamethasone (LPD), whose islets showed increased glucose stimulated insulin secretion (GSIS). In addition, LPD rats showed lower protein expression of IRS-1, IRS-2 and higher in p-FoxO1, p-ERK and PKC, while presenting pancreatic islet hypertrophy compared to LP rats islet. In conclusion, dexamethasone treatment revert the effects related to metabolism and islet function caused by diet protein restriction, confirming β -cells wide plasticity, even in transient or lasting adverse conditions.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	9
ARTIGO 2	
Dexamethasone treatment in vivo counteracts the functional pancreatic islet alterations caused by malnourishment in rats	11
ABSTRACT	12
INTRODUCTION	13
MATERIALS AND METHODS	14
<i>Materials</i>	14
<i>Animals and diet</i>	14
<i>Dexamethasone treatment</i>	15
<i>Metabolic, hormonal and biochemical measurements</i>	15
<i>Liver glycogen measurements</i>	15
<i>Intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT)</i>	16
<i>Intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT)</i>	16
<i>Isolation of islets and static and dynamic secretion protocols</i>	16
<i>Histomorphometrical analysis</i>	17
<i>Statistical analysis</i>	17
RESULTS	18
DISCUSSION	20
REFERENCES	24

ARTIGO 2

Modulação da via de sinalização de insulina em ilhotas pancreáticas de animais submetidos à restrição protéica e tratados com dexametasona	37
RESUMO	38
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAIS E MÉTODOS	40
<i>2.1. Materiais</i>	<i>40</i>
<i>2.2. Animais e dieta</i>	<i>41</i>
<i>2.3. Tratamento com dexametasona</i>	<i>41</i>
<i>2.4. Dosagens metabólicas, hormonais e bioquímicas</i>	<i>41</i>
<i>2.5. Isolamento das ilhotas pancreáticas</i>	<i>41</i>
<i>2.6. Análise Histomorfométrica</i>	<i>42</i>
<i>2.7. Western Blotting</i>	<i>42</i>
<i>2.10. Análise Estatística</i>	<i>43</i>
3. RESULTADOS	43
4. DISCUSSÃO	46
5. REFERÊNCIAS	49
4. CONCLUSÕES.....	62
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXO	69

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1 - Composition of control (17% protein) and low protein (6% protein) diets (Reeves *et al.* 1993).....29

Table 2 - Body weight, serum protein, albumin, glucose, insulin and NEFA and liver glycogen of normal protein (NP), normal protein dexamethasone -treated (NPD), low protein (LP) and low protein dexamethasone -treated (LPD) rats. 29

ARTIGO 2

Tabela 1 – Composição das dietas controle (17% proteína) e hipoprotéica (6%proteína) (Reeves *et al.* 1993) 55

Tabela 2 – Peso corpóreo, glicose sanguínea, albumina e proteína séricas de ratos controles (NP), controle tratado com dexametasona (NPD), desnutrido (LP) e desnutrido tratado com dexametasona (LPD) 55

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figure 1** – *Glucose intolerance in LPD rats.* (A) Glycemic profile obtained by *ipGTT* experiments in NP (), NPD (), LP (Δ) and LPD () 32
- Figure 2** – *Adaptive hypotrophy and hypertrophy of pancreatic islet.* (A) Box Plot graphic representation of islet area values 33
- Figure 3** – *LPD islets show increased glucose-induced insulin release.* Insulin release from islets isolated from NP, NPD, LP and LPD rats. 34
- Figure 4** - *Perfused LPD islets show altered insulin-output pattern.* Glucose-stimulated insulin secretion in isolated perfused islets of NP, NPD, LP and LPD rats. 35

ARTIGO 2

- Figura 1** – Expressão protéica do receptor de insulina subunidade β (A), IRS-1 (B), IRS-2 (C), PI3K p85-subunit (D). 56
- Figura 2** – Expressão protéica da Akt (A) , conteúdo da p-Akt (B) e razão p-Akt/Akt (C) em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos. 57
- Figura 3** – Expressão protéica da FoxO1 (A) e PDX-1 (D), conteúdo da p-FoxO1 (B), e razão p-FoxO1/FoxO1 (C) 58
- Figura 4** – Expressão protéica da ERK (A), conteúdo de p-ERK (B) e razão p-ERK/ERK (C) em ilhotas pancreáticas. 59
- Figura 5** – Expressão protéica da PKC em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos NP (normoprotéico), NPD (normoprotéico tratado com dexametasona), LP (hipoprotéico) e LPD (hipoprotéico tratado com dexametasona) 60

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Secreção de insulina

A secreção de insulina é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis pelas células β pancreáticas, sendo a glicose o secretagogo mais importante. A sinalização inicia-se com o transporte da glicose para o interior da célula β por uma proteína integral de membrana denominada GLUT2. Na célula β a glicose é fosforilada e convertida a glicose-6-fosfato (G-6-P) por duas enzimas: a hexoquinase IV (glicoquinase) e hexoquinase I. A hexoquinase I é fortemente inibida pela G-6-P e em menor grau pela frutose 1-6-difosfato, que transfere para a glicoquinase, que não é inibível pela G-6-P, o papel da fosforilação da glicose na célula β . A glicoquinase é enzima fundamental que participa da regulação do fluxo glicolítico e, portanto, na secreção de insulina, atuando como sensor da glicose nas células β (Boschero, 1996; Matschinsky, 1996). A G-6-P é preferencialmente destinada à glicólise e o piruvato formado no citoplasma é transportado à mitocôndria, onde é convertido a acetil-CoA que entra no ciclo de Krebs levando ao aumento de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂). A oxidação destas coenzimas na cadeia de elétrons gera ATP e a razão ATP/ADP aumenta no citoplasma (Ashcroft, 1980), provocando o fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}). O acúmulo relativo deste cátion na célula β provoca despolarização da membrana e conseqüente ativação de permeabilidade ao Ca²⁺. Os íons Ca²⁺ penetram a célula por gradiente eletroquímico através de canais voltagem-dependente específicos (canais L). A elevação dos níveis intracelulares deste íon ativa a maquinaria secretória, ocorrendo migração dos grânulos de insulina para a membrana plasmática e posterior extrusão de seu conteúdo (para revisão consulte Boschero, 1996; Boschero et al., 1998; Gembal, 1993). Embora a molécula de glicose seja considerada o principal estimulador da secreção de insulina, o mecanismo secretório

pode ser modulado, direta ou indiretamente, por neurotransmissores, agentes farmacológicos e hormônios, que permitem as células β secretarem insulina em quantidade e tempo adequados, regulando os níveis de nutrientes no sangue em diferentes situações fisiológicas (Boschero, 1996).

1.2 Desnutrição protéica

É amplamente conhecido que influências dietéticas durante os estágios iniciais de desenvolvimento do organismo, são consideradas fatores de risco para o surgimento de doenças crônicas. Enfermidades como o diabetes, a hipertensão arterial e a doença isquêmica do coração são determinadas por fatores ambientais e são originadas *in útero* ou durante a infância, como descrita pela hipótese do “*thrifty phenotype*”, formulada por Hales & Barker (1992). Segundo esta hipótese o pâncreas endócrino pode ser particularmente suscetível aos efeitos da desnutrição intra-uterina e no primeiro ano de vida, prejudicando o desenvolvimento das células β e da maturação da função pancreática, além de causar alterações no fígado, tecido muscular e adiposo levando à insulinopenia e resistência à insulina. Quando a resistência à insulina é agravada pela obesidade, inatividade física e idade, o pâncreas não consegue suprir a demanda aumentada de insulina e o diabetes se instala (Hales & Barker, 1992).

Na classificação para o diabetes mellitus, apresentada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a desnutrição deixou de ser considerada fator diabetogênico (Gavin, 2003). Contudo, a desnutrição possui papel fundamental no desenvolvimento da síndrome metabólica como apresentado por trabalhos de nosso grupo de pesquisa e da literatura.

Alterações morfológicas e funcionais das ilhotas pancreáticas em modelos de desnutrição pré e pós-natal têm sido demonstradas (de Barros Reis *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007; Arantes *et al.*, 2006; Milanski *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2003; Arantes *et al.*, 2002;

Vieira *et al.*, 2001; Latorraca *et al.*, 1998a, b; Carneiro *et al.*, 1995). A restrição protéica prejudica a secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas (Carneiro *et al.*, 1995) e algumas alterações morfológicas estão associadas a este fenômeno, por exemplo, redução do peso absoluto, mas não do peso relativo do pâncreas (Latorraca *et al.*, 1998a), redução do número total de ilhotas por pâncreas, redução da quantidade e tamanho das células β (Koko *et al.*, 1992). De acordo com Carneiro (1996) as células β pancreáticas apresentam volume reduzido, menores número de grânulos secretores e muitos deles com aspecto de grânulos imaturos. A avaliação da capacidade funcional das ilhotas de ratos desnutridos demonstrou comprometimento da secreção de insulina estimulada por aminoácidos, perda do padrão bifásico de secreção em condição estimulatória de glicose e sensibilidade a este substrato diminuída. Mediante estímulos com diferentes concentrações de glicose, ilhotas provenientes de ratos desnutridos (LP) apresentaram redução da captação de ^{45}Ca comparada às ilhotas controle. Assim, defeito na mobilização do íon Ca^{2+} parece contribuir para as alterações secretórias verificadas em ilhotas de ratos desnutridos (Carneiro *et al.*, 1995, Latorraca *et al.*, 1998b, 1999).

Algumas anormalidades como redução do volume das ilhotas, diminuição de conteúdo de insulina das ilhotas, atrofia e perda de granulação das células β , insensibilidade das ilhotas à glicose, alteração da cinética secretória, são encontradas tanto em organismos desnutridos como no diabético tipo 2 (Gepts & Lecompt, 1981; Grodsky, 1996; Cherif *et al.*, 2001).

1.3 Glicocorticóides

Produzidos pelas glândulas adrenais e regulados pelo eixo hipotálamo -hipófise-glândulas adrenais, os glicocorticóides fazem parte de uma classe de hormônios denominados

corticosteróides, caracterizada pela habilidade de se ligar com o receptor de cortisol e desencadear efeitos similares. Na clínica médica são amplamente utilizados para o tratamento de doenças inflamatórias, incluindo alergias, asma, artrite reumatóide e doenças autoimunes (Schaaf & Cidlowski, 2002). Contudo, têm sido observados inúmeros efeitos adversos desenvolvidos concomitante ao tratamento com glicocorticóide, merecendo destaque a intensa glicogenólise hepática, a lipólise (exceto no tecido adiposo visceral), a resistência à insulina e a elevação na atividade proteolítica no tecido muscular (Amatruda J.M., 1985; Kanda F., 1999; Sesti G., 2001). Dados recentemente apresentados por nosso grupo (Rafacho et al., 2007), indicaram que o tratamento com dexametasona causa hiperglicemia moderada, hiperinsulinemia, aumento da secreção de insulina estimulada por glicose, hipertrofia das ilhotas e resistência periférica à insulina.

Os glicocorticóides são tidos como diabetogênicos por causar diminuição da captação da glicose pelos tecidos periféricos e por aumentar a produção de glicose hepática (De launay et al., 1997), causando resistência periférica à insulina e, dependendo da dose e/ou tempo de tratamento levar ao diabetes tipo 2, forma de diabetes predominante nos seres humanos. A resistência a insulina imposta por tratamento com glicocorticoide é caracterizada por apresentar normoglicemia ou hiperglicemia de jejum moderada associada a hiperinsulinemia. Adicionalmente apresenta como efeito compensatório, aumento da massa de células β , do conteúdo de insulina e da secreção de insulina estimulada por glicose (Novelli et al., 1999; Ogawa et al., 1992; Bonner-Weir et al., 1981). Contudo, o diabetes tipo 2 induzido por glicocorticóide exibe hiperglicemia de jejum acentuada e secreção de insulina reduzida devido ao comprometimento da célula β , redução do conteúdo total de insulina e diminuição da secreção de insulina induzida por glicose (Toriumi & Imai, 2003; Efendic, 1984; Ohneda, 1993). Portanto,

os mecanismos de resistência à insulina e/ou diabetes tipo 2 parecem estar relacionados ao grau de injúria sofrido pelas células β .

1.4 Via de sinalização da insulina

Os efeitos fisiológicos da insulina iniciam-se após sua ligação ao receptor de membrana específico presente em praticamente todos os tecidos (Figura 1). O receptor de insulina é uma proteína com atividade cinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β , unidas por pontos de dissulfeto (Kahn, 1985). A subunidade α se localiza na porção extracelular, possui o sítio de ligação para insulina e tem função inibitória sobre a subunidade β , inibindo sua atividade tirosina cinase. A ligação da insulina na subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade tirosina cinase causando alteração conformacional e autofosforilação, aumentando a atividade cinase do receptor (Patti & Kahn, 1998).

A autofosforilação da subunidade β do receptor induzida pela insulina aumenta sua capacidade de fosforilar um ou mais substratos protéicos intracelulares, incluindo os membros da família de substratos do receptor de insulina (IRSs). As funções fisiológicas do IRS1/2 foram compreendidas através da produção de camundongos “*Knockout*” para IRS-1 e IRS-2. O camundongo que não expressa IRS-1 apresenta resistência à insulina e retardo de crescimento, mas não é hiperglicêmico (Araki E et al, 1994). Foi demonstrado que a ausência de IRS-1 poderia ser compensada, em partes, pelo IRS-2, o que explicaria a resistência à insulina sem hiperglicemia nos camundongos “*Knockout*” de IRS-1. Diferentemente do camundongo “*Knockout*” de IRS-1, o camundongo “*Knockout*” de IRS-2 apresentou hiperglicemia acentuada ocasionada por falhas na ação da insulina nos tecidos periféricos, além de redução da massa e falência das células β pancreáticas (Withers DJ, 1998). A fosforilação em tirosina do IRS cria

sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2), incluindo proteínas tais como a Grb2, a SHP2 e a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), entre outras (Saad, 1994). É sabido que a interação da enzima PI3K com a proteína IRS -1 é essencial para a ação metabólica e mitogênica da insulina (Shepherd et al, 1995). A associação da PI3K com as proteínas IRSs é importante para o processo de translocação do transportador de glicose (GLUT - 4), captação de glicose estimulada por insulina (Czech et al, 1999), ativação da glicogênio sintetase e para a inibição da lipólise estimulada pela insulina (White, 1998). A PI3K é constituída por duas subunidades, uma catalítica de 110kDa e outra regulatória de p85. A subunidade regulatória possui dois domínios SH2 que interagem com os sítios de fosforilação das proteínas IRSs (Myers et al, 1992) dando início a uma série de eventos incluindo uma cascata de reações de fosforilações e desfosforilações que regula os efeitos metabólicos e de crescimento (Sun et al, 1991; White & Kahn, 1994; White, 1997). Uma das proteínas alvo desta enzima é a Akt, foi demonstrado por Cho et al. (2001) e Downward (1998) o importante papel da Akt na homeostase da glicose, crescimento e sobrevivência celular, além de fosforilação de proteínas que regulam a síntese de lipídeos, glicogênio e proteínas (Saltiel & Kahn, 2001; Kido et al. 2001) (Figura 1).

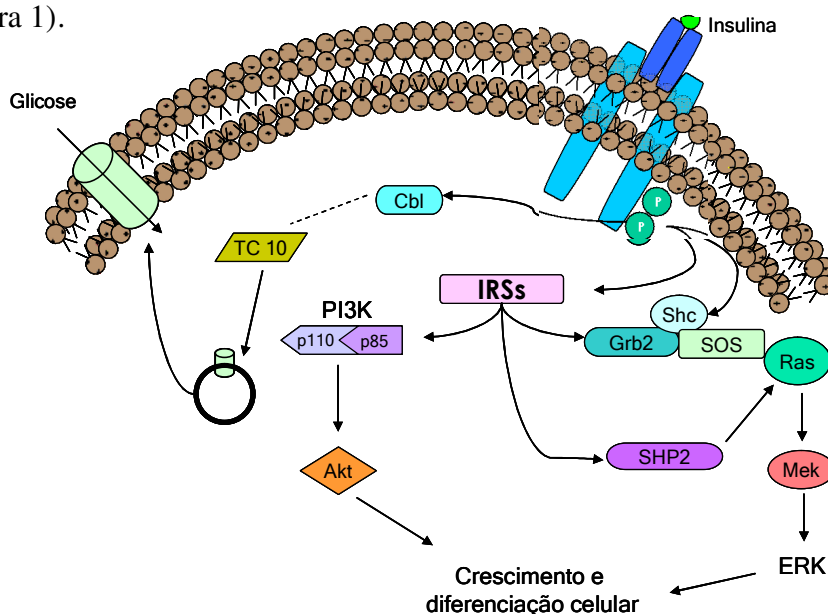


Figura 1 – Esquema ilustrativo da via de sinalização da insulina.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do tratamento com dexametasona em animais submetidos à restrição protéica.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros metabólicos: peso, níveis séricos de proteína, albumina, glicose, insulina e ácidos graxos livres e quantificar glicogênio hepático;
- Verificar a sensibilidade à glicose e à insulina *in vivo*;
- Avaliar a funcionalidade das ilhotas pancreáticas através das técnicas de secreção estática e dinâmica;
- Analisar a morfometria das ilhotas pancreáticas;
- Quantificar os níveis protéicos de IR, IRS -1, IRS-2, PI3-Kinase, Akt, FoxO1, Pdx-1, ERK, PKC e o conteúdo de p-Akt, p-FoxO1, p-ERK nas ilhotas pancreáticas.

ARTIGO 1

Dexamethasone treatment in vivo counteracts the functional pancreatic islet alterations caused by malnourishment in rats

Vanessa A.G. Giozzet, BSc

Alex Rafacho, BSc

Antonio C. Boschero, PhD

Everardo M. Carneiro, PhD

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

José R. Bosqueiro, PhD

Department of Physical Education, Faculty of Sciences, São Paulo State University (UNESP), Bauru, SP, Brazil.

Correspondence should be addressed to:

Dr. José R. Bosqueiro. Departamento de Educação Física, Faculdade de Ciências, UNESP, 17033-360, Bauru, SP, Brazil. Phone/Fax: +55 (14) 3103-6041. e-mail address:

bosqueir@fc.unesp.br

ABSTRACT

The effects of dexamethasone (Dex) on the metabolic parameters, peripheral insulin and glucose sensitivity *in vivo*, as well as on islet function *ex vivo* of rats submitted to low protein-diet were analyzed. Dex (1.0 mg/kg b.w.) was administered *ip*, daily, to adult Wistar rats fed on a normal protein-diet (NPD) or low protein-diet (LPD) for 5 days, whilst control rats fed on a normal protein-diet (NP) or low protein-diet (LP) received saline alone. At the end of the experimental period, LP rats showed a significant reduction in serum insulin, total serum protein, and serum albumin levels compared with NP rats ($P < 0.05$). All these parameters tended to be normalized in LPD rats ($P < 0.05$); furthermore, these rats exhibited increased serum glucose and NEFA levels, compared to LP rats ($P < 0.05$). Rats submitted to the low-protein diet demonstrated normal peripheral glucose sensitivity and improved peripheral insulin sensitivity, which was reversed by Dex treatment. A reduced area of islets from LP rats was partially recovered in LPD rats ($P < 0.05$). At 16.7 mM glucose, insulin secretion from LPD islets was also partially recovered and was significantly higher than in LP islets ($P < 0.05$). In conclusion, induction of insulin resistance by Dex treatment reverses the majority of the metabolic alterations in rats submitted to a low protein diet. In addition, several islet functions were also improved by Dex, confirming the plasticity of pancreatic islets in adverse conditions.

Keywords: Glucocorticoids – Glucose and Insulin sensitivity – Insulin secretion – Malnourished rats – Pancreatic islets.

INTRODUCTION

The impairment of pancreatic β -cell function is the main event that leads to the development of type 2 diabetes [1]. However, prior to the onset of diabetes, several morphological and physiological adaptations of the endocrine pancreas take place in order to maintain glucose homeostasis. These adaptations are also observed in some specific periods of life such as pregnancy, obesity, ageing, and malnutrition [2, 3, 4, 5, 6].

Rats submitted to low protein-diet (LP) exhibit reduced body weight, higher hepatic glycogen content, normoglycemia, hypoalbuminemia and lower plasma insulin levels [7]. LP rat islets show impaired glucose-stimulated insulin secretion, lack of the typical secretory biphasic pattern in response to a glucose challenge, and reduction of glucose sensitivity [5,6]. Morphological alterations such as a reduction in total pancreatic islet number are also present in this experimental model [8]. However, to compensate the failure of pancreatic islet function, the peripheral sensitivity to insulin is increased in LP rats [9].

The endocrine adaptations to malnourishment seem to be the opposite of those observed in animals where the insulin resistance is induced by treatment with glucocorticoids. It is well known that dexamethasone (Dex) treatment impairs insulin action in peripheral tissues (i. e., muscles, fat and liver), leading to insulin resistance. Rats submitted to Dex treatment *in vivo* exhibit increased plasma insulin levels and marginal hyperglycemia [4,10]. In contrast to observations in islets from malnourished rats, islets from insulin-resistant rats show increased total insulin content increased glucose-stimulated insulin secretion and higher sensitivity to glucose based on a reduced EC_{50} values. Hypertrophy of pancreatic islets is the main morphological adaptation provoked by insulin resistance [11].

The pancreatic islets exhibit morphofunctional plasticity, depending on the environment in which they evolve. However, there are no studies concerning the effects of induced insulin resistance (for example by Dex) in an animal model that exhibits increased insulin sensitivity, such as LP rats. Here, we studied the effects of Dex treatment on metabolic adaptation of LP rats, as well as the morphophysiological alterations in their islets.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Dexamethasone phosphate (Decadron[®]) was from Aché (Campinas, SP, Brazil). Sodium pentobarbital (3 % Hypnol[®]) was from Cristália (Itapira, SP, Brazil). Human recombinant insulin (Biohulin[®] N) was from Biobrás (Montes Claros, MG, Brazil). Enzymatic colorimetric assay for the quantification of non-esterified-fatty-acids (NEFA) was from Wako Chemicals USA, Inc. (Richmond, VA, USA). Total serum protein and serum albumin detection kits were from In Vitro Diagnostica (DI, MG, Brazil). Dextrose, NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, NaHCO₃, KOH and Na₂SO₄ were from Mallinckrodt Baker, Inc. (Paris, France). Collagenase, HEPES, albumin, activated charcoal and dextran were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Ethanol, methanol, chloroform and phenol were from Synth (Diadema, SP, Brazil).

Animals and diet

Male Wistar rats (21-d old) from the University of Campinas Animal Breeding Center were kept at 24°C on a 12 h light/dark cycle. The rats were randomly assigned into two groups and fed an isocaloric diet containing 6% (low protein-diet, LP) or 17% (control diet, NP) protein for 8 wk. The composition and difference between the two isocaloric diets is described in Table 1. During the experimental period, rats had access to food and water ad lib. The institutional São Paulo

State University Committee for Ethics in Animal Experimentation approved the experiments with rats.

Dexamethasone treatment

After eight weeks of treatment, malnourished and control rats were distributed into four groups with 40 animals each (NP, NPD, LP, and LPD). Rats from these groups received daily *ip* injections of dexamethasone (1 mg/kg body weight, dissolved in saline) between 7:30 – 8:30 h, for 5 consecutive days (NPD and LPD) or saline alone (NP and LP).

Metabolic, hormonal and biochemical measurements

On the day following the last DEX administration, fasted (12-14 h) rats were weighed and glucose levels were measured with a glucometer (“one touch” - Johnson & Johnson) in samples collected from the tail. The rats were then sacrificed (by exposure to CO₂ followed by decapitation) and the blood was collected. Serum insulin levels were measured by radioimmunoassay (RIA), utilizing rabbit anti-rat insulin antibody and rat insulin as standard. NEFA was determined by ELISA, according to the manufacturer’s instructions. Total serum protein and serum albumin were quantified by spectrophotometer, according to the manufacturer’s instructions.

Liver glycogen measurements

Hepatic glycogen content was measured, as previously described [12], but with some modifications. Briefly, the liver samples (300 to 500 mg) were transferred to test tubes containing 30% KOH (w/v) and boiled for 1 h until complete homogenization. Na₂SO₄ was then added and the glycogen was precipitated with ethanol. The samples were centrifuged at 800g for 10 min, the supernatants discarded and the glycogen dissolved in hot distilled water. Ethanol was added and the pellets, obtained after a second centrifugation, were dissolved in distilled water in a final

volume of 25 ml. Glycogen content was measured by treating a fixed volume of sample with phenol reagent and H₂SO₄. Absorbance was then read at 490 nm with a spectrophotometer (Spectronic® 20 Genesis™).

Intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT)

On the day following the last dexamethasone administration, fasted (12 -14 h) rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (3 % Hypnol® 1 ml/kg *bw*). After verifying the absence of corneal and pedal reflexes, unchallenged samples (time 0) were obtained from the rats' tails. Immediately, 50 % glucose (2 g/kg *bw*, *ip*) was administered and blood samples were collected at 30, 60, 90 and 120 min from the tail tip for determination of glucose and insulin concentrations.

Intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT)

Fed rats were anaesthetized as described above. A sample of blood was collected from the tail tip for glucose measurement at time 0. Human recombinant insulin, equivalent to 2 units/kg *bw*, was then injected *ip*. Further samples were collected at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min for blood glucose measurement. The constant rate for glucose disappearance (*Kitt*) was calculated from the slope of the regression line obtained with log-transformed glucose values between 0 and 30 min after insulin administration.

Isolation of islets and static and dynamic secretion protocols

Islets were hand-picked after collagenase digestion of the pancreas, following the technique previously described [13]. For static incubation, groups of five islets were first incubated for 1 h at 37°C in 1 mL of Krebs-bicarbonate buffer solution of the following composition (in mM): 115 NaCl, 5 KCl, 2.56 CaCl₂, 1 MgCl₂, 24 NaHCO₃, 15 HEPES and 5.6 glucose, supplemented with 0.5% of bovine serum albumin and equilibrated with a mixture of 95% O₂, 5% CO₂, pH 7.4. The

medium was then replaced by another 1 mL of fresh buffer containing different glucose concentrations, as indicated in the respective figure and further incubated for 1 h. At the end of the incubation, the samples were stored at -20°C for subsequent measurement of insulin content by RIA. For analysis of dynamic insulin secretion, 20 freshly isolated islets were transferred to perfusion chambers and perfused with Krebs-bicarbonate buffer solution at a flow rate of 1 mL/min for 100 min. The effluent was collected every 2 min into tubes that were stored at -20°C for insulin RIA. Perfusion consisted of three consecutive periods: 50 min with 2.8 mM glucose, 30 min with 16.7 mM glucose and finally 20 min with 2.8 mM glucose. Collection of the samples started from 30 min of perfusion.

Histomorphometrical analysis

To determine the area, pools of 700 islets from each group were submitted to Feulgen's DNA method "*in bloc*". The islet images were then registered by a CCD camera and area (μm^2) values were automatically obtained by the Image-Pro-Plus® Media, Cybernetics program, coupled to a BX-60 Olympus photomicroscope.

Statistical analysis

All numerical results are expressed as the means $\pm$ SEM of the indicated number (n) of experiments. Analysis of variance (one way - ANOVA), for unpaired groups, followed by Tukey *post test* was utilized for multiple comparisons of parametric data. The significance level adopted was $P < 0.05$.

RESULTS

Characteristics of the rats

LP rats showed a significant reduction in body weight, total serum protein, albumin and insulin serum levels, compared to NP rats ($n = 10$, $P < 0.05$). The liver glycogen content of LP rats increased significantly and serum glucose levels were similar to those of NP rats ($n = 10$, $P < 0.05$) (Table 2). After Dex treatment, however, total serum protein, serum albumin and NEFA levels of LPD rats increased significantly, compared with LP rats ($n = 10$, $P < 0.05$). Blood glucose and insulin in LPD rats were significantly higher compared to LP rats ($n = 10$, $P < 0.05$). The liver glycogen content was similar between LPD and LP rats (Table 2). The data for NPD rats were similar to those previously reported by others [14, 15, 16].

LPD rats exhibit decreased glucose and insulin sensitivity

The mean glucose blood levels during *ipGTT*, except for 30 min, in LPD rats were significantly higher than those of LP rats ($n = 10$, $P < 0.05$), but similar to those found in NPD rats. No differences were observed between LP and NP rats (Figure 1A). Blood insulin levels were significantly increased at all times in LPD rats, compared with LP rats, suggesting glucose intolerance in this group ($n = 10$, $P < 0.05$) (Figure 1). During the *ipITT*, LP rats were more sensitive to insulin than NP rats, as judged by the constant rate for glucose disappearance values (*Kitt*) (Figure 1C; $P < 0.05$). Although LPD rats showed a higher sensitivity to insulin than NP and NPD groups, this sensitivity was significantly lower than that of LP rats ($P < 0.05$). The *Kitt* values were 0.45-fold, 1.67-fold and 1.31-fold altered compared to the NP value for the NPD, LP and LPD groups, respectively (Figure 1C; $n = 10$, $P < 0.05$ for LP vs. NP; NPD vs. NP and LPD vs. LP groups).

Morphological islet adaptation in LP and LPD rats

LP islets showed a marked hypotrophy compared to NP islets. However, Dex treatment caused a significant increase in islet area in NPD and LPD rats compared with NP and LP rats, respectively (Figure 2). The islet area values were 15.700 ± 320 ; 26.800 ± 530 ; 7.500 ± 180 and $10.900 \pm 250 \mu\text{m}^2$ for the NP, NPD, LP and LPD groups, respectively ($n = 700$ islets, $P < 0.001$). This may reflect an adaptation imposed by the increased sensitivity and decreased sensitivity to insulin action at the periphery in LP and LPD animals, respectively.

Glucose-Stimulated Insulin Secretion (GSIS) is increased in LPD rats

As depicted in figure 3, after normalization by the total islet insulin content, at a sub-threshold glucose concentration (2.8 mM), insulin secretion was significantly decreased in LP and LPD (0.57-fold and 0.5-fold compared to NP and LP, respectively). At 16.7 mM glucose, the insulin secretion was significantly decreased in LP islets (0.17-fold compared with NP islets; $n = 12$, $P < 0.05$). Whereas, the insulin secretion was significantly increased in NPD and LPD islets (2.4-fold and 1.7-fold higher compared with NP and LP islets, respectively; $n = 12$, $P < 0.05$) (Figure 3A). The dose-response curve to glucose (2.8 – 22 mM) was significantly shifted to the right in LP compared to NP islets. Nevertheless, the dose-response curve to glucose was shifted to the left in islets derived from the NPD and LPD groups, compared with their respective controls (Figure 3B). The EC_{50} values were 9.08 ± 0.10 ; 6.84 ± 0.32 ; 9.78 ± 0.19 and 7.11 ± 0.46 mM for NP, NPD, LP and LPD, respectively ($P < 0.05$ for LP vs. NP; NPD vs. NP and LPD vs. LP).

Kinetics of glucose-induced insulin secretion in LPD islets

In the presence of non-stimulatory glucose concentrations (min 0-20), the islets from the NPD and LPD groups released more insulin than their respective controls (Figure 4). A typical biphasic pattern of insulin secretion was observed in NP islets after the introduction of 16.7 mM glucose (min 20-50) (see inset). The insulin secretion in LP islets did not show a characteristic first-phase release, but despite a lower release than NP islets, the second phase exhibited a sustained increase in insulin release. LPD islets showed a biphasic response to glucose with a first peak followed by a sustained and progressive increased second phase. Insulin secretion in both phases was significantly higher in LPD than LP islets. As expected, NPD islets secreted significantly more insulin during stimulation with 16.7 mM glucose than NP islets. Finally, the insulin secretion in all groups of islets returned to basal values when the glucose concentration was reduced to 2.8 mM glucose (min 50-70).

DISCUSSION

In this study, several physiological parameters were assessed in adult Wistar rats submitted to a low-protein diet (28 to 90-d of life) and turned resistant to insulin by the administration of Dex. Morphometrical adaptations, provoked by these treatments, were also investigated as well as alterations in insulin secretion in isolated pancreatic islets.

Rats fed on a low-protein diet (LP) had similar characteristics to those observed in experimental malnourishment models, such as a reduction of body weight and serum protein levels, and increased hepatic glycogen content [5, 7]. These biochemical parameters were modified by the treatment of NP and LP rats with Dex and are in agreement with data reported in the literature concerning glucocorticoid-induced insulin resistance, *i.e.*, body weight reduction

[10, 15, 17, 18, 19], increase in plasma protein levels [16], non-esterified fatty acids (NEFA) [14, 20, 21], and hepatic glucose output [10, 22]. The body weight reduction is usually accompanied by muscle atrophy [16, 17, 19], probably due to an increase in cathepsin L expression, one of the main mediators of muscle proteolysis [17]. The proteolysis caused by glucocorticoid treatment [23] might justify the elevated serum protein in our NPD and LPD rats. Glucocorticoids also stimulate lipolysis and potentiate the lipolytic effect of other hormones, leading to an increase in serum NEFA concentrations [24], in accordance with the increased serum NEFA concentration in LPD rats. Higher NEFA plasma levels could increase hepatic glycogen synthesis, since the increase in NEFA may suppress hepatic glycolysis and favor hepatic glycogen synthesis [25].

The data regarding islet area, reported herein, are also in agreement with previous data suggesting a reduction in islet area in malnourished animal models [8] and increased islet area in glucocorticoid-treated animals [10, 11, 26, 27]. The islet hypotrophy is probably an adaptation, in the protein-restricted rats, to a lower *bw* associated with an increased sensitivity to insulin in periphery tissues. The effects on islet morphology, imposed by malnutrition, in LPD rats were counteracted by an adaptive response to the development of peripheral insulin resistance induced by the Dex treatment. This increase in islet size seems to be a result of increased β cell number and/or size [28].

The post-absorptive insulin levels are another interesting finding of our study. LP rats showed a significant reduction in insulin serum levels and, according to previous results, this may be explained by a decreased β cell mass, associated with functional alterations, such as impairment of nutrient metabolism and calcium uptake [5, 6, 8]. Moreover, these reduced insulin levels could reflect a response to the increased sensitivity to glucose peripherally, which in turn, would demand less insulin to maintain glucose homeostasis. Despite low insulin levels, LP rats

showed normal blood glucose and normal glucose tolerance together with an improvement in the peripheral insulin sensitivity, as judged by the Kitt, in agreement with a previous study [29]. The improvement in insulin sensitivity might be a consequence of an increase in the phosphorylation of insulin receptor (IR) and insulin receptor substrate 1 (IRS -1), favoring a greater association of IRS-1 with phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3K) [9]. In contrast, LPD rats exhibited increased blood glucose and insulin levels, associated with decreased peripheral insulin and glucose sensitivity. Increased insulin secretion is an adaptive response of β cells, imposed by the Dex - induced peripheral insulin resistance [27] and mediated by concomitant elevation of blood glucose levels [30]. The hyperglycemic effect of glucocorticoids is explained, at least in part, by their gluconeogenic action on hepatic tissue. In addition, glucocorticoids induce muscle and fat tissue insulin resistance, which contributes to aggravate hyperglycemia [31, 32].

We also demonstrated alterations in lipid metabolism, particularly increases in NEFA levels in NPD and LPD groups. Evidence exists to suggest that glucocorticoids may increase serum NEFA levels by the activation of hormone-sensitive lipase [33]. The increases in serum insulin concentrations, observed in NPD and LPD rats, however, were not sufficient to avoid hypertriglyceridemia and increased NEFA concentrations in this group. It has been proposed [34] that the increase in plasma NEFA concentrations, while contributing to the induction or aggravation of peripheral insulin resistance could, in parallel, mediate insulin hypersecretion either directly [35, 36] or by favoring TG synthesis in β -cells and subsequent generation of lipid signaling molecules through lipolysis [37]. Elevated serum NEFA levels have been implicated in the pathogenesis of glucocorticoid-induced peripheral insulin resistance [14, 20, 21].

We also studied insulin release in isolated islets *ex vivo* in these rats. In agreement with a previous study [5], LP islets showed an impairment of glucose -induced insulin release, probably

as a consequence of a reduction in islet number per pancreas, as well as reduction in quantity, size and the volume of β cells [8]. In addition, the lower ability of glucose to induce Ca^{2+} uptake and/or to reduce Ca^{2+} efflux from β cells could play an important role in this process [5]. However, LPD islets showed augmented glucose-induced insulin secretion in stimulatory (16.7mM) glucose concentrations associated with lower EC_{50} values for glucose. Thus, β cells from LPD rats are more responsive to glucose. Controversies exist concerning the secretion of insulin from perfused pancreas and isolated islets of rodents after *in vivo* glucocorticoid treatment. Enhanced [38, 39] or unaltered [40] insulin secretion has been described in both preparations. These heterogeneous results are linked to the countless protocols used (strain, dose, time, glucose concentration, etc). Our results suggest that the increase in insulin secretion observed in the LPD group, in response to supra-threshold glucose concentrations, implies some degree of islet adaptation (i.e., decrease in EC_{50} values for glucose), which could be a reflection of the impairment of insulin action at the periphery.

Finally, we demonstrated that LP rats exhibit an improvement in insulin sensitivity, normal glucose tolerance, a diminished islet area and the impairment of islet function, reflecting an adaptation imposed by the protein deficiency in the diet. However, when insulin resistance is induced by Dex treatment in LP rats, several adaptations occur at the periphery as well as in the islets to counteract these common features induced by the malnourishment. The classical metabolic and islet alterations observed in rodents submitted to Dex-induced insulin resistance include the decrease of insulin and glucose sensitivity, islet hypertrophy and enhanced glucose-stimulated insulin secretion. All of these parameters are also observed in LPD rats even after well-established alterations imposed by the protein restriction in the diet. Thus, Dex reverts the main features related to metabolism and islet function caused by protein restriction in the diet. These

observations may exemplify and reinforce the wide plasticity of pancreatic β cells in adverse conditions. Understanding these adaptations is of relevance since they may lead us to classify the degrees of these pathophysiological conditions, providing directions for future studies.

REFERENCES

1. Cerf ME. High fat diet modulation of glucose sensing in the beta-cell. *Medical Science Monitor* 2007; 13:RA12-7.
2. Nieuwenhuizen AG, Schuiling GA, Moes H, Koiter TR. Role of increased insulin demand in the adaptation of the endocrine pancreas to pregnancy. *Acta Physiol Scandinavica* 1997; 159:303-12.
3. Matschinsky FM, Rujanavech C, Pagliara A, Norfleet WT. Adaptations of alpha2- and beta-cells of rat and mouse pancreatic islets to starvation, to refeeding after starvation, and to obesity. *J Clin Invest.* 1980; 65:207-18.
4. Novelli M, De Tata V, Bombara M, et al. Insufficient adaptative capability of pancreatic endocrine function in dexamethasone-treated ageing rats. *J Endocrinol* 1999; 162:425-432.
5. Carneiro EM, Mello MAR, Gobatto CA, Boschero AC. Low protein diet impairs glucose-induced insulin secretion from and ^{45}Ca uptake by pancreatic rat islets. *J Nutr Biochem* 1995; 6:314-8.
6. Latorraca MQ, Reis MAB, Carneiro EM, et al. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. *J Nutr* 1998; 128:1643-9.
7. Ferreira F, Filiputti E, Stoppiglia F, et al. Decreased colinergic stimulation of insulin secretion by islet from rats fed a low protein diet is associated with reduced PKC α expression. *Journal Nutrition* 2003; 133:695-9.

8. Koko V, Pavlovic M, Laban A, et al. A stereological investigation of rat endocrine pancreas after a long-term low-protein diet. *Pancreas* 1992; 7:672-9.
9. Reis MA, Carneiro EM, Mello MA, et al. Glucose-induced insulin secretion is impaired and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate -1 are increased in protein-deficient rats. *J Nutr.* 1997; 127:403-10.
10. Rafacho A, Roma LP, Taboga SR, Boschero AC, Bosqueiro JR. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexins 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85:536-45.
11. Ogawa A, Jonson JH, Ohneda M, et al. Roles of insulin resistance and β -cell dysfunction in dexamethasone-induced diabetes. *J Clin Invest* 1992; 90:497-504.
12. Lo S, Russel JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 1970; 28:234-6.
13. Boschero AC, Szpak-Glasman M, Carneiro EM et al Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol.* 1995; 268:336-42.
14. Mokuda O, Sakamoto Y. Peripheral insulin sensitivity is decreased by elevated nonesterified fatty acid level in dexamethasone-treated rats. *Diab Nut Metab* 1999; 12:252-5.
15. De Vries WB, Van Der Leij FR, Bakker JM, et al. Alterations in adult rat heart after neonatal dexamethasone therapy. *Pediatr Res* 2002; 52:900-6.
16. Ruzzin J, Wagman AS & Jensen J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signaling and the effects of a selective glycogen synthase kinase -3 inhibitor. *Diabetologia* 2005; 48:2119-30.

17. Komamura K, Shirotani-Ikejima H, Tatsumi R, et al. Differential gene expression in the rat skeletal and heart muscle in glucocorticoid-induced myopathy: analysis by microarray. *Cardiovasc Drugs Ther* 2003; 17:303-10.
18. Rhee MS, Perianayagam A, Chen P, et al. Dexamethasone treatment causes resistance to insulin-stimulated cellular potassium uptake in the rat. *American Journal of Physiology* 2004; 287:C1229-37.
19. Ahtikoski AM, Riso EM, Koskinen SOA, et al. Regulation of type IV collagen gene expression and degradation in fast and slow muscles during dexamethasone treatment and exercise. *Eur J Physiol* 2004; 448:123-30.
20. Dimidriadis G, Leighton B, Parry-Billings M, et al. Effects of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. *Biochem J* 1997; 321:707-12.
21. Guillaume-Gentil C, Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B. Involvement of non-esterified fatty acid oxidation in glucocorticoid-induced peripheral insulin resistance in vivo in rats. *Diabetologia* 1993; 36:899-906.
22. Mokuda O, Sakamoto Y, Ikeda T, et al. Sensitivity and responsiveness of glucose output to insulin in isolated perfused liver from dexamethasone treated rats. *Horm Metab Res* 1991; 23:53-5.
23. Kayali AC, Young VR & Goodman MN. Sensitivity of myofibrillar proteins to glucocorticoid-induced muscle proteolysis. *American journal of physiology* 1987 ; 252:E621-6.
24. Tappy L. Metabolic effects of glucocorticoids: the unfinished story. *Eur J Clinical Investigation* 1999; 29:814-5.

25. Proietto J, Filippis A, Nakhla C, Clark S. Nutrient -induced insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 151:143-9.
26. Visser PA, Pierce GE, Tomita T, et al. Stimulation of pancreatic islet hypertrophy and beta - cell hyperplasia in syrian hamsters. *Surgical Forum* 1979; 30:310-1.
27. Bonner-Weir S, Trent DF, Zimachinski CJ, Clore ET & Weir GC. Limited beta cell regeneration in a beta cell deficient rat model: studies with dexamethasone. *Metabolism* 1981; 9:914-8.
28. Pick A, Clark J, Kubstrup C et al. Role of apoptosis in failure of β -cell mass compensation for insulin resistance and β -cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 1998; 47:358-64.
29. Crace CJ, Swenne I, Kohn PG, et al. Protein -energy malnutrition induces changes in insulin sensitivity. *Diabete Metab* 1990; 16:484 -91.
30. Larsson H, Ahrén B. Insulin resistant subjects lack islet adaptation to short -term dexamethasone-induced reduction in insulin sensitivity. *Diabetologia* 1999; 42:936-43.
31. McMahon M, Gerich J, Rizza R. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes Metab Rev* 1988; 4:17-30.
32. Saad, MJA. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Brazilian J. Med. Biol. Res* 1994; 27:941-57.
33. Slavin BG, Ong JM, Kern PA. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J Lip Res* 1994; 35:1535-41.
34. Barbera M, Fierabracci V, Novelli M, et al. Dexamethasone-induced insulin resistance and pancreatic adaptive response in aging rats are not modified by oral vanadyl sulfate treatment. *Eur J Endocrinol* 2001; 145:799-806.

35. Lee Y, Hirose H, Ohneda M, et al. Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte -beta-cell relationships. *PNAS* 1994; 91:10878-82.
36. Milburn JL Jr, Hirose H, Lee YH, et al. Pancreatic beta-cells in obesity. Evidence for induction of functional, morphologic and metabolic abnormalities by increased long chain fatty acids. *J Biol Chem* 1995; 270:1295-9.
37. McGarry JD, Dobbins RL. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 1999; 42:128-38.
38. Kawai A, Kuzuya N. On the role of glucocorticoid in glucose-induced insulin secretion. *Horm Metab Res*. 1977; 9:361-5.
39. Wang ZL, Bennet WM, Wang RM, et al. Evidence of a paracrine role of neuropeptide Y in the regulation of insulin release from pancreatic islets of normal and dexamethasone-treated rats. *Endocrinology*. 1994;135:200-6.
40. O'Brien TD, Westermark P, Johnson KH. Islet amyloid polypeptide and insulin secretion from isolated perfused pancreas of fed, fasted, glucose-treated, and dexamethasone-treated rats. *Diabetes*. 1991; 40:1701-6.

TABLES

Table 1 - Composition of control (17% protein) and low protein (6% protein) diets (Reeves *et al.* 1993).

Ingredient	Control (17% protein)	Low protein (6% protein)
g/kg		
Casein (84% protein)	202.0	71.5
Cornstarch	397.0	480.0
Dextrinized cornstarch	130.5	159.0
Sucrose	100.0	121.0
Soybean oil	70.0	70.0
Fiber	50.0	50.0
Mineral mix (AIN-93G)	35.0	35.0
Vitamin mix (AIN-93G)	10.0	10.0
L-Cystine	3.0	1.0
Choline chlorhydrate	2.5	2.5

Table 2 - Body weight, serum protein, albumin, glucose, insulin and NEFA and liver glycogen of normal protein (NP), normal protein dexamethasone-treated (NPD), low protein (LP) and low protein dexamethasone-treated (LPD) rats.

Parameters	NP	NPD	LP	LPD
Body weight, g	409 ± 13	360 ± 12 ^a	282 ± 4 ^a	254 ± 10 ^{bc}
Protein, g/dL	6.3 ± 0.15	9.1 ± 0.14 ^a	4.9 ± 0.16 ^a	7.8 ± 0.09 ^{bc}
Albumin, g/dL	3.5 ± 0.02	4.0 ± 0.09 ^a	3.2 ± 0.09 ^a	4.3 ± 0.09 ^b
Glucose, mg/dL	67.3 ± 4.5	135.3 ± 10.0 ^a	67.6 ± 5.9	131.3 ± 18.3 ^b
Insulin, ng/mL	0.45 ± 0.02	1.76 ± 0.06 ^a	0.23 ± 0.02 ^a	1.70 ± 0.03 ^{bc}
NEFA, mM	1.05 ± 0.15	2.04 ± 0.13 ^a	0.73 ± 0.03	1.60 ± 0.37 ^b
Liver glycogen, mg/100mg tissue	4.26 ± 0.3	6.68 ± 0.4 ^a	8.79 ± 0.6 ^a	9.65 ± 0.6 ^c

Values are the means ± SEM. ^a significantly different vs NP; ^b vs LP; ^c vs NPD. *n* = 10. *P* < 0.05.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 – *Glucose intolerance in LPD rats.* (A) Glycemic profile obtained by *ipGTT* experiments in NP (), NPD (), LP (Δ) and LPD (). Even after 120 min of glucose load LPD rats showed elevation of blood glucose levels compared to LP. Note increment of AUC data from LPD group compared to LP group (see inset). (B) Insulinemia obtained during *ipGTT* experiments. Blood insulin levels from LPD rats continue higher than those of LP rats. (C) Glucose disappearance rate, measured through the blood glucose levels during the *ipITT* in NP, NPD, LP and LPD rats. The insert depicts the increment in AUC data for LPD rats compared to LP rats. Data are means $\pm$ S.E.M. ^a significantly different vs NP; ^b vs LP and ^c vs NPD. $P < 0.05$; $n = 10$. ANOVA with Tukey *post test*.

Figure 2 – *Adaptive hypotrophy and hypertrophy of pancreatic islet.* (A) Box Plot graphic representation of islet area values. Each plot is the mean of at least 700 islets per group. (B) Representative images obtained from a CCD camera. ^a Significantly different vs NP; ^b vs LP and ^c vs NPD. $P < 0.001$. ANOVA with Tukey *post test*. $\times 100$ Magnification. The bar corresponds to 100 μm .

Figure 3 – *LPD islets show increased glucose-induced insulin release.* Insulin release from islets isolated from NP, NPD, LP and LPD rats. (A) At a concentration of 2.8 mM glucose insulin secretion was not different between NP vs. LP and LP vs. LPD. At a stimulatory glucose concentration (16.7mM), the insulin secretion in LP islets was diminished compared to NP islets; however, in LPD islets the insulin secretion was 150% higher than that of LP islets. The absolute values for insulin secretion at 2.8 mM glucose were 0.5 ± 0.04 ; 0.9 ± 0.04 ; 0.2 ± 0.02 and 0.2 ± 0.01 ng/islet.mL⁻¹.h⁻¹ for NP, NPD, LP and LPD, respectively ($P < 0.05$ for LP vs. NP and NPD

vs. NP). At 16.7 mM glucose, insulin secretion was 8.4 ± 0.3 ; 29.3 ± 1.2 ; 1.2 ± 0.2 and 2.9 ± 0.6 ng/islet.mL⁻¹.h⁻¹ for NP, NPD, LP and LPD, respectively ($P < 0.05$ for LP vs. NP and NPD vs. NP). (B) Dose-response curve to glucose (2.8 – 22 mM) obtained from insulin release by static incubation of the islets. EC₅₀ value was significantly shifted to the right in LP islets compared with NP islets and significantly shifted to the left in LPD islets compared with LP islets. Data are means $\pm$ S.E.M. ^a Significantly different vs NP; ^b vs LP and ^c vs NPD. $P < 0.05$; $n = 12$. ANOVA with Tukey *post test*.

Figure 4 - *Perifused LPD islets show altered insulin-output pattern.* Glucose-stimulated insulin secretion in isolated perfused islets of NP, NPD, LP and LPD rats. The typical biphasic insulin pattern was observed in NP islets (*insert*). LP islets showed no characteristic first phase and a second phase of insulin release that was lower than that in NP islets. LPD islets showed both phases of insulin release with a marked and sustained second phase, compared to LP islets. Insert shows the insulin secretion from NP and LP islets. (B) AUC data revealed an increased insulin response to glucose in NPD and LPD. (A) Each point represents the mean $\pm$ SEM of four different experiments. (B) Data are means $\pm$ S.E.M. ^a Significantly different vs NP; ^b vs LP and ^c vs NPD. $P < 0.05$; $n = 12$. ANOVA with Tukey *post test*.

FIGURE 1

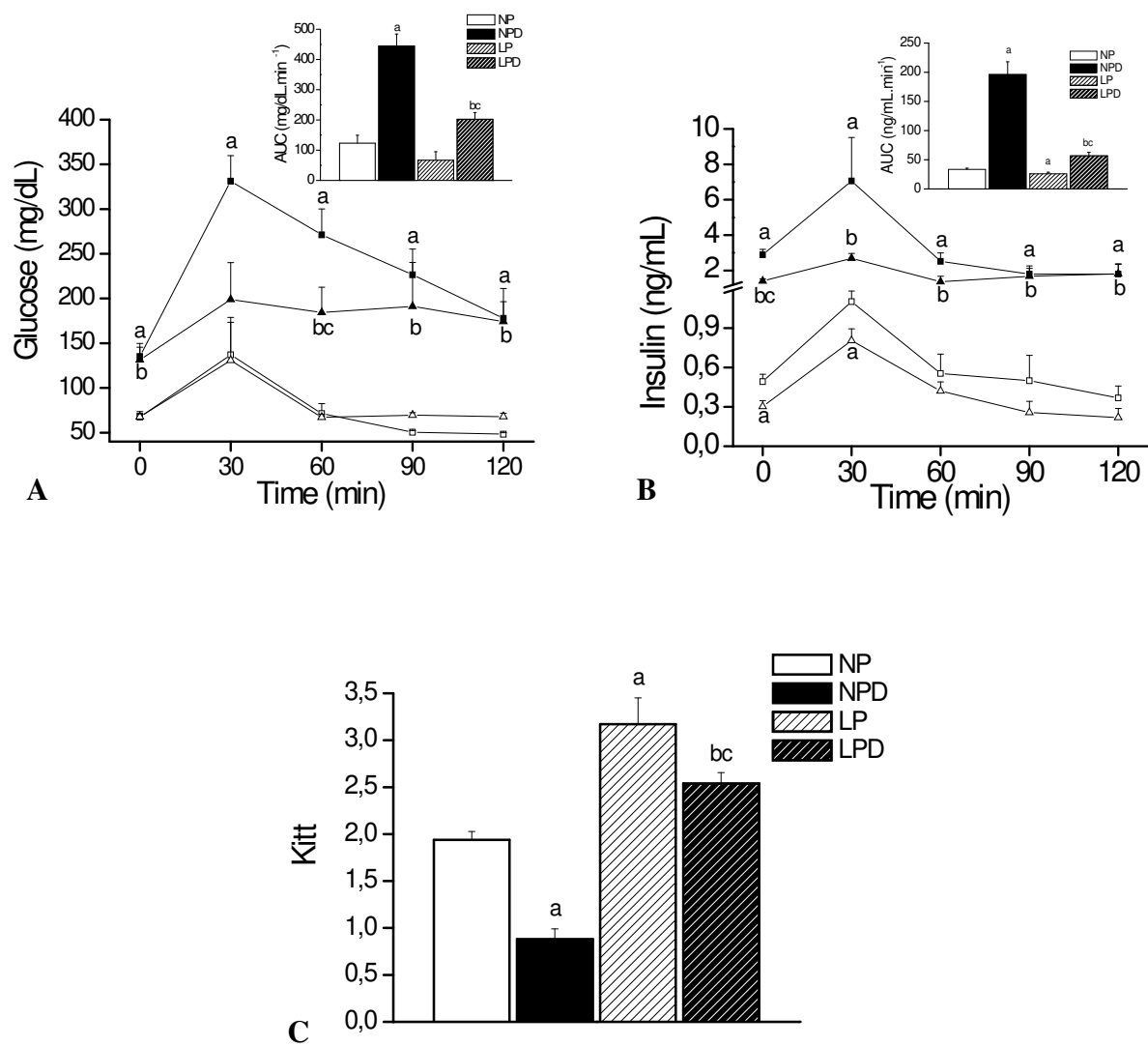


FIGURE 2

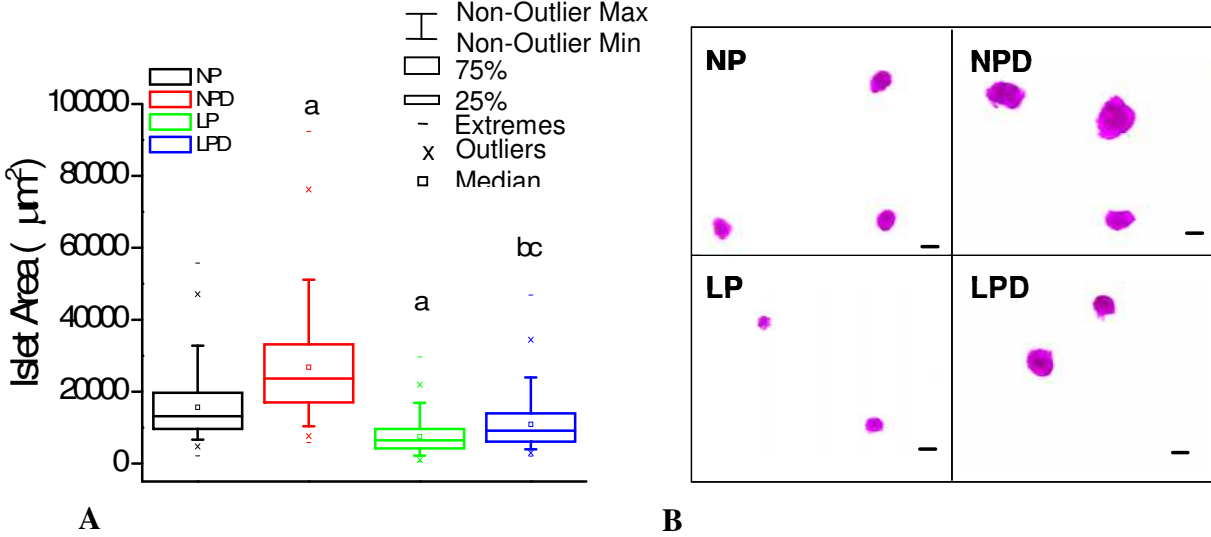


FIGURE 3

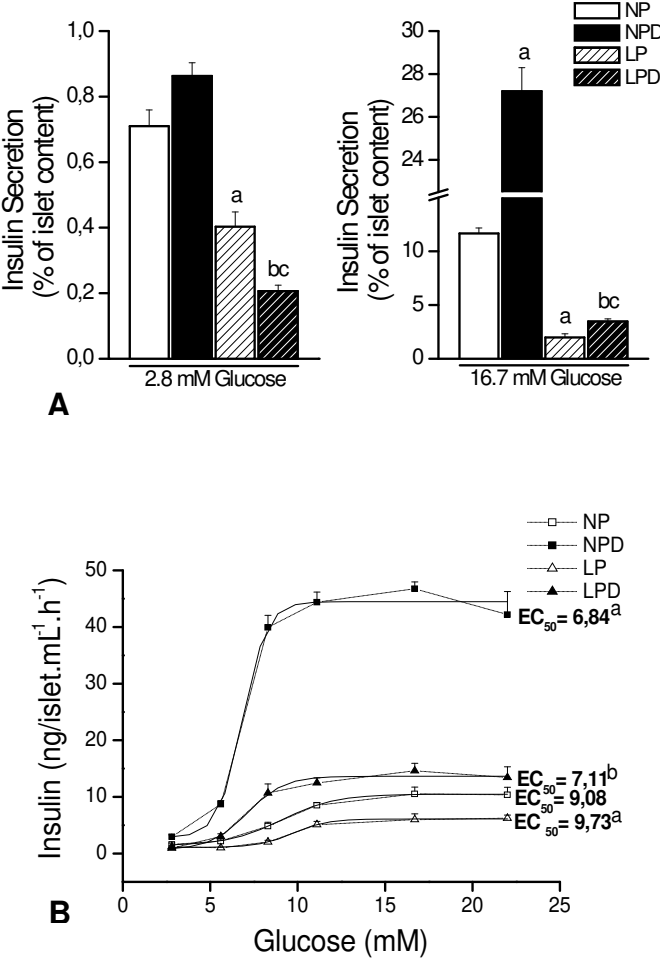
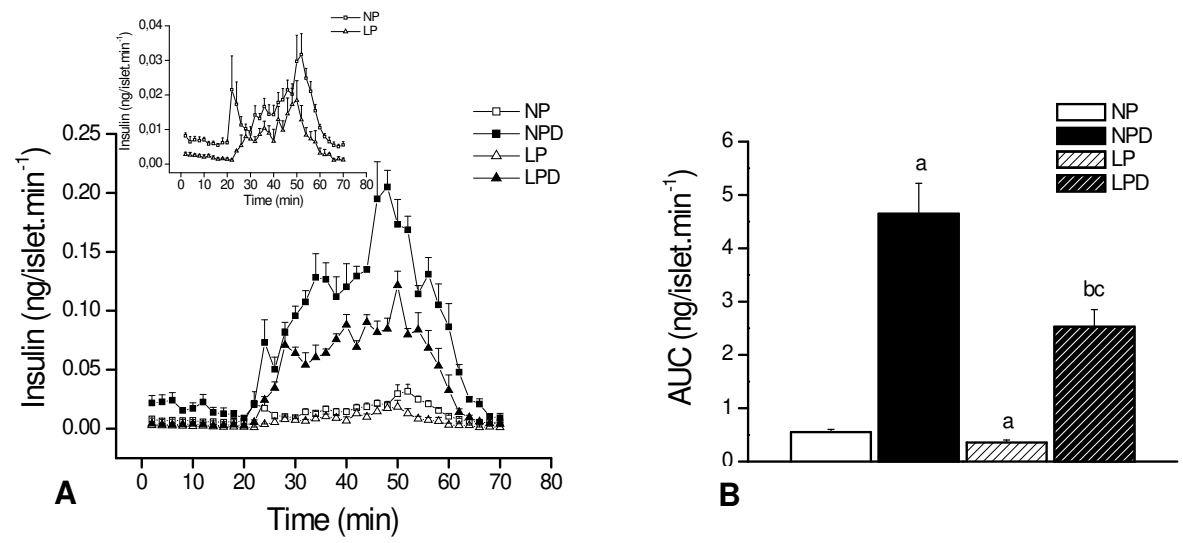


FIGURE 4



ARTIGO 2

Modulação da via de sinalização de insulina em ilhotas pancreáticas de animais submetidos à restrição protéica e tratados com dexametasona

Vanessa A.G. Giozzet ^a

Alex Rafacho ^a

Antonio C. Boschero ^a

Everardo M. Carneiro ^a

^a Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

José R. Bosqueiro ^b

^b Department of Physical Education, Faculty of Sciences, São Paulo State University (UNESP), Bauru, SP, Brazil.

Correspondence should be addressed to:

Dr. José R. Bosqueiro. Departamento de Educação Física, Faculdade de Ciências, UNESP, 17033-360, Bauru, SP, Brazil. Phone/Fax.: +55 (14) 3103 -6041. e-mail address: bosqueir@fc.unesp.br

RESUMO

A via de sinalização de insulina está envolvida em várias respostas adaptativas nas ilhotas pancreáticas. No presente estudo foi avaliada a expressão protéica de IR- β , IRS-1, IRS-2, p85-PI3K (PI3-K), Akt, FoxO1, Pdx-1, ERK, PKC e o conteúdo de p-Akt, p-FoxO1 e p-ERK, além do estudo histomorfométrico em ilhotas pancreáticas de animais submetidos à restrição protéica e tratados com dexametasona (LPD). Ratos LPD não apresentaram alterações significativas na expressão protéica de PI3-K, Akt, ERK e no conteúdo de p-Akt comparadas com ratos desnutridos (LP). Porém, exibiram redução na expressão protéica de IRS-1, IRS-2, Pdx-1 e aumento no conteúdo de p-FoxO1, p-ERK e PKC, além de apresentar hipertrofia das ilhotas pancreáticas quando comparados com ratos desnutridos (LP). A proteína IRS-2 é conhecida por atuar no desenvolvimento, diferenciação e sobrevivência das células β pancreáticas, assim como a proteína ERK possui seu papel na proliferação e diferenciação celular bem documentado. A proteína FoxO1, que também possui papel importante no crescimento e proliferação celular, ao ser fosforilada é exportada do núcleo para o citoplasma perdendo sua atividade supressora sobre a Pdx1, permitindo o crescimento celular. Diante destes resultados podemos concluir que os efeitos compensatórios observados nos ratos LPD podem estar ocorrendo através da p-FoxO1 e da via da ERK.

Keywords: Ilhota; desnutrição; Dexametasona; sinalização da insulina; proteínas IRS's; ERK.

1. INTRODUÇÃO

Mudanças na sensibilidade à insulina são compensadas por alterações recíprocas na síntese e secreção de insulina estimulada por glicose (SIEG), morfologia das ilhotas e massa das células β . (1, 2, 3)

A desnutrição e o tratamento com glicocorticóides são condições associadas a alterações morfológicas e funcionais do pâncreas endócrino. Estudos realizados por nosso grupo demonstraram que a desnutrição causada por dieta hipoprotéica está relacionada a defeito na secreção de insulina por células β pancreáticas com variável grau de melhora na sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina, funções que são, geralmente, contrabalanceadas para manter a homeostase glicêmica (4). Porém, humanos e animais mantidos por longo período com dieta hipoprotéica podem sofrer desequilíbrio na homeostase da glicose levando ao diabetes ou a intolerância à glicose (5). É sabido que o tratamento com glicocorticóides induz resistência periférica à insulina associada ao aumento da SIEG (6), resultando em aumento da insulinemia plasmática (hiperinsulinemia) e tendência à hiperglicemia. O aumento da SIEG ocorre como adaptação das células β à resistência periférica à insulina imposta pelo tratamento com glicocorticóide (7). Adicionalmente, alterações morfológicas como hipertrofia das ilhotas e aumento da massa de célula β ocorrem em modelos experimentais de resistência à insulina (8, 9).

As respostas adaptativas observadas em ambos os modelos experimentais podem envolver a via de sinalização da insulina nas ilhotas pancreáticas. A insulina exerce seus efeitos biológicos após se ligar a seu respectivo receptor de membrana, que é uma proteína heterotetramérica com atividade tirosina quinase (10, 11). Os substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) são proteínas de alto peso molecular que depois de estimuladas se autofosforilam rapidamente em múltiplos resíduos de tirosina. Estes substratos se ligam a proteínas

contendo domínios com homologia à Scr 2 (SH2), como a subunidade regulatória p85 da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) (12), proteínas Grb-2/SOS e SHP-2, entre outras (13). A ativação da SHP-2 e da Grb-2/SOS desencadeia a cascata de sinalização da MAP cinase por fosforilação e ativação sequencial de proto-oncogenes Ras e Raf levando a ativação da ERK -1 e ERK-2. A ativação da via de sinalização da insulina leva a múltiplos efeitos que regulam a diferenciação, crescimento e sobrevivência celular (14).

Não há relatos na literatura correlacionando desnutrição e tratamento com dexametasona com mecanismos adaptativos da secreção de insulina e alterações morfológicas das ilhotas pancreáticas. O presente estudo avaliou o efeito do tratamento com dexametasona em ratos submetidos à restrição protéica sobre a via de sinalização da insulina e a morfologia de ilhotas pancreáticas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Dexametasona (Decadron ®) foi adquirida da Aché Laboratórios Farmacêuticos (Campinas, SP, Brazil). Colagenase, albumina (BSA, fração V), imidazol, EDTA, EGTA, pepstaina, aprotinina, PMSF, leupeptina, inibidor de tripsina e Triton X -100 foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Western blotting foi realizado utilizando sistema Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Todos reagentes químicos para Western blotting foram da Sigma (St. Louis, MO, USA). Anticorpo contra p-85 subunidade regulatória do fosfatidilinositol 3-cinase (PI 3-Kinase) foi obtido da Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Anticorpos contra subunidade β do receptor de insulina (IR), IRS-1, IRS-2, AKT, p-AKT, ERK, p-ERK e PKC foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anticorpo contra FoxO1 e p-FoxO1 foi adquirido da Cell

Signaling Technology (Beverly, MA). Anticorpo contra Pdx-1 foi obtido da Chemicon International, Inc. (Temecula, CA, USA)

2.2. Animais e dieta

Ratos Wistar machos (21 dias) do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade de Campinas foram mantidos a 24°C com ciclo de 12 h claro/escuro. Os ratos foram separados, aleatoriamente, em 2 grupos e alimentados com dieta isocalórica contendo 6% de proteína (dieta hipoprotéica, LP) ou 17% de proteína (dieta controle, NP) por 8 semanas. A composição e diferença entre as dietas estão descritas na Tabela 1. Durante o período experimental os ratos tiveram livre acesso a alimentação e água. Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) -IB-UNICAMP.

2.3. Tratamento com dexametasona

Após o período de desnutrição, os ratos controles (NP) e desnutridos (LP) foram distribuídos em quatro grupos. Dois grupos (NPD e LPD) receberam injeções diárias de dexametasona (1 mg/kg peso corpóreo, dissolvido em salina), entre 7:30 – 8:30 h, por 5 dias consecutivos ou somente salina (NP e LP - 1mL/kg peso corpóreo) também por 5 dias consecutivos.

2.4. Dosagens metabólicas, hormonais e bioquímicas

Após o último dia de tratamento com dexametasona, os ratos foram mantidos em jejum (12-14 h) e sacrificados por exposição ao CO₂, seguida de decapitação. A concentração da glicose sanguínea foi medida por glicosímetro (“One Touch” - Johnson & Johnson, Milpitas, CA, USA). Os níveis de insulina sérica foram medidos por radioimunoensaio (RIE) e albumina sérica foi quantificada por kit.

2.5. Isolamento das ilhotas pancreáticas

As ilhotas pancreáticas foram isoladas por digestão com collagenase, técnica previamente descrita (15). Em resumo, o pâncreas foi inflado com solução de Hanks contendo 0,8 g/L de collagenase, retirado e mantido a 37°C por 23 min. Após digestão do tecido as ilhotas foram coletadas manualmente, sob lupa, com o auxílio de pipeta Pasteur estirada e siliconada..

2.6. Análise Histomorfométrica

Para determinação da área, foram coletadas 400 ilhotas de cada grupo e fixadas em paraformaldeído 4%. Posteriormente foram coradas pela reação de Feulgen para DNA (16). As imagens das ilhotas foram registradas por câmera CCD e os valores das áreas (μm^2) foram automaticamente obtidos pelo programa Image-Pro-Plus® Media, Cybernetics, acoplado a fotomicroscópio Olympus BX-60.

2.7. Western Blotting

Aproximadamente 1000 ilhotas foram coletadas para cada grupo experimental e então sonicadas em 0,1 mL de tampão de extração (10 mM EDTA, 100 mM Trisma, 10 mM Pirofosfato de Sódio, 100 mM Fluoreto de Sódio, 10 mM Ortovanadato de Sódio, SDS 10% e água deionizada) a 4°C. As amostras foram centrifugadas em 12000 rpm a 4°C por 20 minutos. A dosagem protéica dos sobrenadantes foi obtida utilizando o reagente de Bradford (Bio-Rad). As amostras foram fervidas por 5 minutos em 25% do volume em tampão Laemmli (fosfato de Na 1M pH 7,0, 10% SDS, 10% β -mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol). As amostras foram fracionadas no sistema de eletroforese (Mini Protean II – Bio-Rad) em gel de poliacrilamida 10%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) na presença de 20% metanol e 0,02% SDS em voltagem constante de 120 Volts por 90 minutos. A membrana foi então saturada com solução bloqueadora contendo leite

desnatado a 5% em solução basal (10mM Trisma base, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20) por 2 horas em temperatura ambiente (TA). A membrana foi incubada com anticorpo primário específico diluído em solução basal contendo albumina sérica bovina 3%, “overnight”. Após este período a membrana foi lavada 3x de 5 minutos em solução basal a temperatura ambiente (TA) e incubada por 1h e 30 minutos com anticorpo secundário conjugado com peroxidase -HRP diluído em solução basal contendo leite desnatado 1% a TA. As membranas então foram novamente lavadas com solução basal e incubadas em sala escura com substrato luminol quimioluminescente (Pierce) por 5 minutos e expostas ao filme autoradiográfico (Kodak T -Mat G/RA). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria.

2.10. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para avaliar a ocorrência de diferença estatística foi utilizado análise de variância de uma via (ANOVA – 1 way) seguido de *post test* Tukey. O nível de significância utilizado foi de $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1. Peso corpóreo, glicose sanguínea e níveis séricos de albumina e insulina.

Ratos LP apresentaram significante redução do peso corpóreo e dos níveis séricos de albumina e insulina comparados aos ratos NP ($n = 10$, $P < 0.05$). Os níveis de glicose e insulina nos ratos LPD foram significativamente maiores comparados aos ratos LP ($n = 10$, $P < 0.05$) (Tabela 2). Os valores obtidos para os ratos NPD foram similares aos previamente relatados (17, 18, 19).

3.2. Hipotrofia e Hipertrofia das ilhotas como mecanismos adaptativos em ratos LP e LPD.

Ilhotas LP demonstraram redução da área comparada às ilhotas NP. Contudo, o tratamento com glicocorticóide causou hipertrofia das ilhotas nos grupos NPD e LPD comparadas aos grupos

NP e LP, respectivamente. Os valores da área das ilhotas foram 15.703 ± 452 ; 25.881 ± 672 ; 7.392 ± 231 e $10.843 \pm 329 \mu\text{m}^2$ para os grupos NP, NPD, LP e LPD, respectivamente ($n = 400$ ilhotas, $P < 0.001$).

3.3. Redução dos níveis protéicos de IRS-1 e IRS2 em ilhotas de ratos LPD.

Os dados apresentados na Figura 1 mostram aumento significativo na expressão de IR- β (3 e 2,7 vezes para NPD e LP, respectivamente), IRS-2 (1,6 e 1,7 vezes para NPD e LP, respectivamente) e PI3-K (1,3 e 1,4 vezes para NPD e LP, respectivamente), e redução na expressão de IRS-1 (1,6 e 1,5 vezes para NPD e LP, respectivamente) comparado com ilhotas pancreáticas de ratos NP ($P < 0.05$). A redução da expressão de IRS-1, nos grupos NPD e LP, parecem ser compensadas por aumento de IRS-2. Contudo, esse efeito compensatório não é observado no grupo LPD que apresenta redução tanto de IRS-1 quanto de IRS-2 (2,5 e 2,7 vezes, respectivamente) quando comparado com o grupo LP ($P < 0.05$).

3.4. Expressão inalterada de AKT e do conteúdo de p-AKT em ilhotas de ratos LPD.

Ilhotas de ratos NPD apresentaram aumento significativo de p-AKT (1,3 vezes) comparado com ilhotas de ratos NP (Figura 2). Redução da expressão de AKT e do conteúdo de p-AKT (1,2 e 1,4 vezes, respectivamente) foi observado em ilhotas de ratos LP comparado com ilhotas de ratos NP ($P < 0.05$; Figura 2). Não foi observada alteração significativa na expressão protéica da Akt e no conteúdo de p-Akt no grupo LPD quanto comparado com o grupo LP (Figura 2; $P < 0.05$). A razão p-Akt/Akt apresentou aumento no grupo NPD comparado ao grupo NP (Figura 2; $P < 0.05$).

3.5. Aumento na expressão de FoxO1 e do conteúdo de p-FoxO1 com redução na expressão de Pdx-1 em ilhotas ratos LPD.

Ilhotas dos grupos NPD e LP apresentaram redução significativa de FoxO1 (1,61 e 1,33 vezes, respectivamente) e de p-FoxO1 (4,6 e 2,2 vezes, respectivamente) comparados com ilhotas do grupo NP (Figura 3). Contudo, ilhotas do grupo LPD apresentaram aumento na expressão de FoxO1 e no conteúdo de p-FoxO1 (1,44 e 2,2 vezes, respectivamente) quando comparado com ilhotas de ratos LP (Figura 3; $P < 0.05$). A razão p-FoxO1/FoxO1 foi reduzida nos grupos NPD e LP (2,5 e 1,8 vezes, respectivamente) comparados com o grupo NP e aumentada no grupo LPD (1,5 vezes) comparado ao grupo LP (Figura 3; $P < 0.05$). A expressão de Pdx-1 foi aumentada nas ilhotas de ratos NPD (1,4 vezes) comparado com ilhotas de ratos NP e reduzida nas ilhotas do grupo LPD (1,36 vezes) comparado as ilhotas do grupo LP (Figura 3; $P < 0.05$).

3.6. Aumento no conteúdo de p-ERK e na expressão de PKC em ilhotas de ratos LPD.

Não houve alteração significativa na expressão protéica de ERK nos diferentes grupos experimentais (Figura 4). Contudo, o conteúdo de p-ERK e a expressão de PKC no grupo LP foi reduzida (4,1 e 1,4 vezes, respectivamente) comparado com o grupo NP (Figura 4 e 5) e no grupo LPD o conteúdo de p-ERK e a expressão da PKC foi aumentada (2,3 e 2,2 vezes, respectivamente) comparado com o grupo LP (Figura 4 e 5). No grupo NPD ocorreu significativo aumento de PKC (1,4 vezes) comparado com o grupo NP (Figura 5). A razão p-ERK/ERK apresentou redução no grupo LP comparado ao grupo NP e aumento no grupo LPD comparado ao grupo LP (Figura 4; $P < 0.05$).

4. DISCUSSÃO

Recentemente demonstramos que o tratamento com glicocorticóide causa aumento da SIEG, hiperinsulinemia e resistência periférica à insulina (3, 20). Contrariamente, animais submetidos à restrição protéica apresentam hipoinsulinemia, SIEG reduzida e sensibilidade periférica à insulina aumentada (4, 20, 21). Contudo, após tratamento com glicocorticóide animais LP apresentam características semelhantes às observadas no modelo de resistência à insulina induzida por glicocorticóide (20).

Para compensar a resistência à insulina o pâncreas endócrino sofre adaptações morfofuncionais. Demonstramos que animais tratados com dexametasona exibem hiperinsulinemia e hipertrofia das ilhotas pancreáticas, indicando processos adaptativos a nova condição. O aumento de insulinemia plasmática e alterações morfológicas das ilhotas pancreáticas foram previamente descritos (3, 6, 8, 22).

A via de sinalização da insulina possui importante papel no controle funcional e morfológico das células β , regulando a proliferação, sobrevivência e secreção de insulina (23, 24, 25, 26). Assim, o presente trabalho avaliou a expressão protéica de IR- β , IRS-1, IRS-2, PI3-K, Akt, FoxO1, Pdx-1, ERK, PKC e o conteúdo de p-Akt, p-FoxO1 e p-ERK em animais submetidos à restrição protéica e tratados com dexametasona.

O IRS-1 possui importante papel na regulação da secreção de insulina em células β pancreáticas. Superexpressão de IRS-1 em células RIN resulta em aumento da resposta secretória estimulada por glicose (27, 28). Porém, ilhotas de camundongos *knockout* para IRS-1 exibem falhas na SIEG, reduzido conteúdo de insulina (29), retardo no crescimento, hiperinsulinemia, defeito na resposta secretória de insulina por diversos estímulos e hiperplasia da ilhota (23, 30). Em contraste, animais *knockout* para IRS-2 apresentam resistência hepática à insulina e

hipoplasia da ilhota. Estes dados indicam importante papel do IRS -1 na função das células β e do IRS-2 no desenvolvimento, diferenciação e sobrevivência das células β pancreáticas (14). Além disso, deficiência de IRS-1 está associada com aumento compensatório da expressão de IRS -2 (30). Dados exibidos no presente trabalho mostram que animais NPD e LP exibem redução da expressão de IRS-1 associada ao aumento da expressão de IRS-2. Acreditamos que o aumento da expressão de IRS-2 em ilhotas de ratos LP participe dos processos que levam ao crescimento da massa das ilhotas pancreáticas que é prejudicada pela falta de proteína induzida pela dieta hipoprotéica. Porém, nos ratos NPD, o aumento da expressão de IRS-2 é considerado processo adaptativo à resistência periférica à insulina para manter a homeostase glicêmica. Correlação entre aumento da secreção de insulina e redução dos níveis protéicos de IRS -1 e IRS-2 em ilhotas pancreáticas foi previamente descrito (31, 32), corroborando com evidências presentes neste trabalho, em que animais LPD apresentam redução da expressão protéica de IRS -1 e IRS-2 e concomitante melhora da secreção de insulina. Porém, esses animais demonstraram hipertrofia das ilhotas pancreáticas.

A via da PI3-K é responsável por ativar várias proteínas, e, dentre elas, destaca-se a serina-treonina quinase AKT. Foi demonstrado o importante papel da proteína AKT na homeostase da glicose, crescimento e sobrevivência celular (33, 34), além de fosforilação de proteínas que regulam a síntese de lipídeos, glicogênio e proteínas (24, 25). A diminuição do conteúdo de p-AKT exibida no nosso modelo experimental LP pode ser responsável pela redução do crescimento e do peso corpóreo destes animais, fato que está de acordo com a literatura (33), bem como pela alteração da secreção de insulina e diminuição da massa da célula β (35). Contudo, aumento da expressão protéica de AKT em ilhotas pancreáticas resulta em aumento da massa, tamanho, proliferação e neogênese das células, com positiva correlação entre hipertrofia

das ilhotas e secreção de insulina (36, 37, 38). No presente trabalho, ilhotas de ratos LPD apresentam hipertrofia, porém sem alteração significativa da expressão protéica e da fosforilação de AKT. Este resultado pode nos indicar que, neste modelo experimental, a proteína AKT não interfere sobre os efeitos compensatórios das ilhotas pancreáticas do grupo LPD.

Proteínas FoxO, dentre elas FoxO1, que são fatores de transcrição da família forkhead, regulam proliferação celular, apoptose e senescência. Fatores de crescimento e insulina regulam negativamente a atividade transcricional da FoxO, resultando em exclusão nuclear dependente de fosforilação mediada por PI3K e Akt (39). Portanto, quando fosforilada a FoxO1 fica inativa e presente no citoplasma sem exercer sua atividade transcricional. Embora seja sabido que a Akt fosforila a FoxO1, encontramos aumento da fosforilação da FoxO1 com inalterada fosforilação da Akt no grupo LPD, sugerindo que a translocação da FoxO1 pode estar ocorrendo independentemente da via da Akt. Tem sido demonstrado em hepatócitos que o controle da FoxO pode ocorrer independentemente da Akt (40). O aumento da razão p-FoxO1/FoxO1 observado no grupo LPD pode promover proliferação e crescimento celular. Isto parece ser mediado pela Pdx1. A haploinsuficiência para FoxO1 restaura a expressão de Pdx1 em camundongos IRS2 ^{-/-} (41). A FoxO1 é um regulador negativo da Pdx1 e, portanto inibe o crescimento (proliferação) da célula β por suprimir a Pdx1. Porém, a expressão de Pdx1 nas ilhotas de ratos LPD foi reduzida, apesar deste grupo apresentar aumento da fosforilação da FoxO1.

Há relatos na literatura (42, 43) em que a fosforilação da FoxO1 pela Akt cria sítios de reconhecimento para proteínas que degradam a p-FoxO1, o que explicaria o aumento da p-Akt, a redução da razão p-FoxO1/FoxO1 e o aumento da Pdx-1 observadas no grupo NPD.

Adicionalmente, a via das MAPKs (ERKs) é estimulada por fatores mitogênicos e de crescimento e seu papel na proliferação e diferenciação celular está bem documentado (44, 45). O sinal insulínico pode ativar a ERK1/2 através da fosforilação e ativação do receptor de insulina

provocando a interação com e subsequente fosforilação em tirosina da proteína Shc. Uma vez fosforilada, a Shc recruta outra proteína denominada Grb2 e induz a ativação da via Ras-Raf-MEK-ERK (46, 47, 48). Ratos LPD apresentaram aumento na expressão de p-ERK. Este resultado pode nos indicar o envolvimento desta via no crescimento e/ou proliferação das células pancreáticas, como observado através da hipertrofia das ilhotas pancreáticas deste grupo. O aumento da expressão de p-ERK e sua relação com aumento da proliferação e crescimento celular tem sido demonstrado em diversos tipos celulares (49, 50, 51). Além disso, há relatos de que a PKC estimula a fosforilação e ativação da via da MAPK em vários tipos celulares (52, 53, 54). No presente trabalho, o grupo LPD exibiu aumento da expressão da PKC associado ao aumento da fosforilação da ERK. Assim, a ativação da ERK pode ocorrer tanto pelo sinal insulínico quanto pela PKC, promovendo o efeito compensatório das células β frente à resistência periférica à insulina imposta pelo tratamento com dexametasona.

O presente trabalho elucidou alguns dos mecanismos associados com a hipertrofia das ilhotas pancreáticas em animais submetidos à restrição protéica e tratados com dexametasona. Com os resultados obtidos em que se observa redução da expressão protéica de IRS -1 e IRS-2 concomitante aumento da razão p-ERK/ERK em ilhotas LPD podemos concluir que os efeitos compensatórios observados nos ratos LPD podem estar ocorrendo através da via da ERK.

5. REFERÊNCIAS

1. Liu, Y.Q., Jetton, T.L., Leahy, J.L. (2002) β -Cell adaptation to insulin resistance: increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. *J Biol Chem* 277, 39163–39168.
2. Prentki M., Nolan C.J. (2006) Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 116, 1802-1812.

3. Rafacho A., Giozzet V.A.G., Boschero A.C., Bosqueiro J.R. (2007) Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone -induced insulin resistance. *Pancreas* (in press).
4. Reis M.A., Carneiro E.M., Mello M.A., Boschero A.C., Saad M.J., Vello so L.A. Glucose-induced insulin secretion is impaired and insulin -induced phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1 are increased in protein-deficient rats. *J Nutr.* 127, 403-410.
5. Hales CN & Barker D.J. (2001) The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin* 60, 5–20.
6. Novelli M., De Tata V., Bombara M., Lorenzini A., Masini M., Pollera M., Bergamini E., Masiello P. (1999) Insufficient adaptative capability of pancreatic endocrine function in dexamethasone-treated ageing rats. *J Endocrinol* 162, 425-432.
7. Larsson, H.; Ahrén, B. (1999) Insulin resistant subjects lack islet adaptation to short -term dexamethasone-induced reduction in insulin sensitivity. *Diabetologia*, 42, 936-943.
8. Ogawa A., Jonson J.H., Ohneda M., et al. (1992) Roles of insulin resistance and β -cell dysfunction in dexamethasone-induced diabetes. *J. Clin. Invest.* 90, 497-504.
9. Visser PA, Pierce GE, Tomita T, et al. (1979) Stimulation of pancreatic islet hypertrophy and beta-cell hyperplasia in syrian hamsters. *Surgical Forum* 30, 310-311.
10. Kasuga, M., F. A. Karlsson, and C. R. Kahn. (1982) Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* 215,185–187.
11. Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, et al. (1985) Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313, 756-761.
12. Backer, J. M., M. G. Myers, Jr., S. E. Shoelson, D. J. Chin, X. J. Sun, M. Miralpeix, P. Hu, B. Margolis, E. Y. Skolnik, J. Schlessinger, and M. F. White. (1992) The phosphatidylinositol 39-kinase is activated by association with IRS -1 during insulin stimulation. *EMBO J.* 11, 3469–3479.
13. Saad, M.J. (1994) Molecular mechanisms of insulin resistance. *Braz J Med Biol Res.* 27, 941-957. Review.

14. Sesti G., Federici M., Hribal M.L., Lauro D., Sbraccia P., Lauro R. (2001) Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J.* 15, 2099-2111. Review.
15. Boschero A.C., Szpak-Glasman M., Carneiro E.M. et al (1995) Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol.* 268, 336-342.
16. Mello, M.L.S. (1997). Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Braz J Genet* 20, 257-264.
17. Mokuda O, Sakamoto Y. (1999) Peripheral insulin sensitivity is decreased by elevated nonesterified fatty acid level in dexamethasone-treated rats. *Diab Nut Metab* 12, 252-255.
18. De Vries WB, Van Der Leij FR, Bakker JM, et al. (2002) Alterations in adult rat heart after neonatal dexamethasone therapy. *Pediatr Res* 52, 900-906.
19. Ruzzin J, Wagman AS & Jensen J. (2005) Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signaling and the effects of a selective glyco gen synthase kinase-3 inhibitor. *Diabetologia* 48, 2119-2130.
20. Giozzet V.A.G., Rafacho A., Boschero A.C., Carneiro E.M., Bosqueiro J.R. Dexamethasone treatment in vivo counteracts the functional pancreatic islet alterations caused by malnourishment in rats. *Metabol. Clin. Exper.* Submitted.
21. Ferreira F, Filiputti E, Stoppiglia F, et al. (2003) Decreased colinergic stimulation of insulin secretion by islet from rats fed a low protein diet is associated with reduced PKC α expression. *Journal Nutrition* 133, 695-699.
22. Barbera M., Fierabracci V., Novelli M., Bombara M., Masiello P., Bergamini E., De Tata V. (2001) Dexamethasone-induced insulin resistance and pancreatic adaptive response in aging rats are not modified by oral vanadyl sulfate treatment. *Eur J Endocrinol* 145, 799-806.
23. Kulkarni, R.N. (2002) Receptors for insulin and insulin-like growth factor-1 and insulin receptor substrate-1 mediate pathways that regulate islet function. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 317-322.
24. Saltiel A.R., Kahn C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
25. Kido Y., Nakae J., Accili D. (2001) Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 972-979.

26. Okada T., Liew C.W., Hu J., Hinault C., Michael M.D., Krtzfeldt J., Yin C., Holzenberger M., Stoffel M., Kulkarni R.N. (2007) Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 8977-8982.
27. Xu, G. G., Gao, Z., Borge, P. D., and Wolf, B. A. (1999) Insulin receptor substrate 1-induced inhibition of endoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake in beta-cells. Autocrine regulation of intracellular Ca²⁺ homeostasis and insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 18, 18067–18074.
28. Porzio, O., Federici, M., Hribal, M. L., Lauro, D., Accili, D., Lauro, R., Borboni, P., and Sesti, G. (1999) The Gly9723Arg amino acid polymorphism in IRS -1 impairs insulin secretion in pancreatic b-cells. *J. Clin. Invest.* 104, 357–364.
29. Kulkarni RN, Winnay JN, Daniels M, Brüning JC, Flier SN, Hanahan D, Kahn CR. (1999) Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. *J Clin Invest.* 104, 69-75.
30. Hennige AM, Ozcan U, Okada T, Jhala US, Schubert M, White MF, Kulkarni RN. (2005) Alterations in growth and apoptosis of insulin receptor substrate-1-deficient beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, 337-346.
31. Araujo E.P., Amaral M.E.C., Filiputti E., de Souza C.T., Laurito T.L., Augusto V.D., Saad M.J.A., Boschero A.C., Velloso L.A. and Carneiro E.M. (2004) Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *Journal of Endocrinology* 181, 25–38.
32. Medina MC, Souza LC, Caperuto LC, Anhe GF, Amanso AM, Teixeira VP, Bordin S, Carpinelli AR, Britto LR, Barbieri RL, Borella MI, Carvalho CR. (2006) Dehydroepiandrosterone increases beta-cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. *FEBS Lett.* 580, 285-290.
33. Cho H., Thorvaldsen J.L., Chu Q., Feng F., Birnbaum M.J. (2001) Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem.* 276, 38349-38352.
34. Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. (1998) *Curr Opin Cell Biol.* 10, 262-267.

35. Bernal-Mizrachi E, Fatrai S, Johnson JD, Ohsugi M, Otani K, Han Z, Polonsky KS, Permutt MA. (2004) Defective insulin secretion and increased susceptibility to experimental diabetes are induced by reduced Akt activity in pancreatic islet beta cells. *J Clin Invest.* 114, 928-936.
36. Fatrai S., Elghazi L., Balcazar N., Cras-Méneur C., Krits I., Kiyokawa H., Bernal-Mizrachi E. (2006) Akt induces beta-cell proliferation by regulating cyclin D1, cyclin D2, and p21 levels and cyclin-dependent kinase-4 activity. *Diabetes* 55, 318-325.
37. Tuttle, R.L., Gill, N.S., Pugh, W., Lee, J.P., Koeberlein, B., Furth, E.E., Polonsky, K.S., Naji, A. and Birnbaum, M.J. (2001) Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by serine/threonine protein AKT1/PKB α . *Nat. Med.* 7, 1133-1137.
38. Bernal-Mizrachi, E., Wen, W., Stahlut, S., Welling, C.M. and Permutt, M.A. (2001) Islet β cell expression of constitutively active Akt1/PKB α induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *J. Clin. Invest.* 108, 1631-1638.
39. Buteau J., Accili D. (2007) Regulation of pancreatic beta-cell function by the forkhead protein FoxO1. *Diabetes Obes Metab.* 9, 140-146.
40. Nakae J, Kitamura T, Ogawa W, Kasuga M, Accili D. (2001) Insulin regulation of gene expression through the forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) requires kinases distinct from Akt. *Biochemistry* 40, 11768–11776.
41. Kitamura T., Nakae J., Kitamura Y., Kido Y., Biggs W.H. 3rd, Wright C.V., White M.F., Arden K.C., Accili D. (2002) The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest.* 110, 1839-1847.
42. Vogt P.K., Jiang H., Aoki M. (2005) Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell Cycle* 4, 908-913.
43. Huang H., Tindall D.J. (2007) Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci.* 120, 2479-2487.
44. Mordret, G. (1993) MAP kinase kinase: a node connecting multiple pathways. *Biol Cell.* 79, 193-207.
45. Marshall, C. J. (1994) MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Devel.* 4, 82-89.
46. Giorgetti S., Pelicci P.G., Pelicci G., Van Obberghen E. (1994) Involvement of Src-homology/collagen (SHC) proteins in signaling through the insulin receptor and the insulin-like-growth-factor- I-receptor. *Eur J Biochem* 223, 195-202.

47. Holt K.H., Kasson B.G., Pessin J.E. (1996) Insulin stimulation of a MEK dependent but ERK - independent SOS protein kinase. *Mol Cell Biol* 16, 577-583.
48. Lingohr M.K., Dickson L.M., McCuaig J.F., Hugl S.R., Twardzik D.R., Rhodes C.J. (2002) Activation of IRS-2-mediated signal transduction by IGF-1, but not TGF α or EGF, augments pancreatic beta cell proliferation. *Diabetes* 51, 966-976.
49. Jeon S.H., Lee M.Y., Kim S.J., Joe S.G., Kim G.B., Kim I.S., Kim N.S., Hong C.U., Kim S.Z., Kim J.S., Kang H.S. (2007) Taurine increases cell proliferation and generates an increase in [Mg(2+)]_i accompanied by ERK 1/2 activation in human osteoblast cells. *FEBS Lett.* Nov 20 (Epub ahead of print).
50. Borasio G.D., John J., Wittinghofer A., Barde Y.-A., Sendtner M., and Heumann R. (1989) ras p21 protein promotes survival and fiber outgrowth of cultures embryonic neurons. *Neuron* 2, 1087-1096.
51. Nobes C. and Tolkovsky A. (1995) Neutralizing anti-p21 Ras Fabs suppress rat sympathetic neuron survival induced by NGF, LIF, CNTF and cAMP. *Eur. J. Neurosci.* 7, 344-350.
52. Young S.W., Dickens M., Tavaré J.M. (1994) Differentiation of PC12 cells in response to a cAMP analogue is accompanied by sustained activation of mitogen-activated protein kinase. Comparison with the effects of insulin, growth factors and phorbol esters. *FEBS Lett.* 338, 212-216.
53. Kribben A., Wieder E.D., Li X., van Putten V., Granot Y., Schrier R.W., Nemenoff R.A. (1993) AVP-induced activation of MAP kinase in vascular smooth muscle cells is mediated through protein kinase C. *Am J Physiol.* 265, 939-945.
54. Ohmichi M., Sawada T., Kanda Y., Koike K., Hirota K., Miyake A., Saltiel A.R. (1994) Thyrotropin-releasing hormone stimulates MAP kinase activity in GH3 cells by divergent pathways. Evidence of a role for early tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 269, 3783-3788.

TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas controle (17% proteína) e hipoprotéica (6%proteína) (Reeves *et al.* 1993).

Ingredientes	Controle (17% proteína)	Hipoprotéica (6% proteína)
	g/kg	
Caseína (84% proteína)	202.0	71.5
Amido	397.0	480.0
Dextrina	130.5	159.0
Sacarose	100.0	121.0
Óleo de soja	70.0	70.0
Fibra	50.0	50.0
Mistura de sais (AIN-93G)	35.0	35.0
Mistura de vitaminas (AIN-93G)	10.0	10.0
L.Cystina	3.0	1.0
Cloridrato de Colina	2.5	2.5

Tabela 2 – Peso corpóreo, glicose sanguínea, albumina e proteína séricas de ratos controles (NP), controle tratado com dexametasona (NPD), desnutrido (LP) e desnutrido tratado com dexametasona (LPD).

Grupos	Peso Corpóreo (g)	Albumina (g/dL)	Glicose (mg/dL)	Insulina (ng/mL)
NP	406.7 ± 12.9	3.56 ± 0.02	67.1 ± 4.3	0.49 ± 0.01
NPD	338.9 ± 12.2 ^a	4.09 ± 0.12 ^a	139.7 ± 10.3 ^a	1.81 ± 0.05 ^a
LP	210.7 ± 1.8 ^a	3.19 ± 0.06 ^a	62.2 ± 3.5	0.26 ± 0.02 ^a
LPD	192.8 ± 3.5 ^{bc}	4.35 ± 0.07 ^b	121.3 ± 16.3 ^b	1.73 ± 0.02 ^b

Valores expressos em média ± EPM. ^a diferença significativa vs NP; ^b vs LP; ^c vs NPD. *n* = 10. *P* < 0.05.

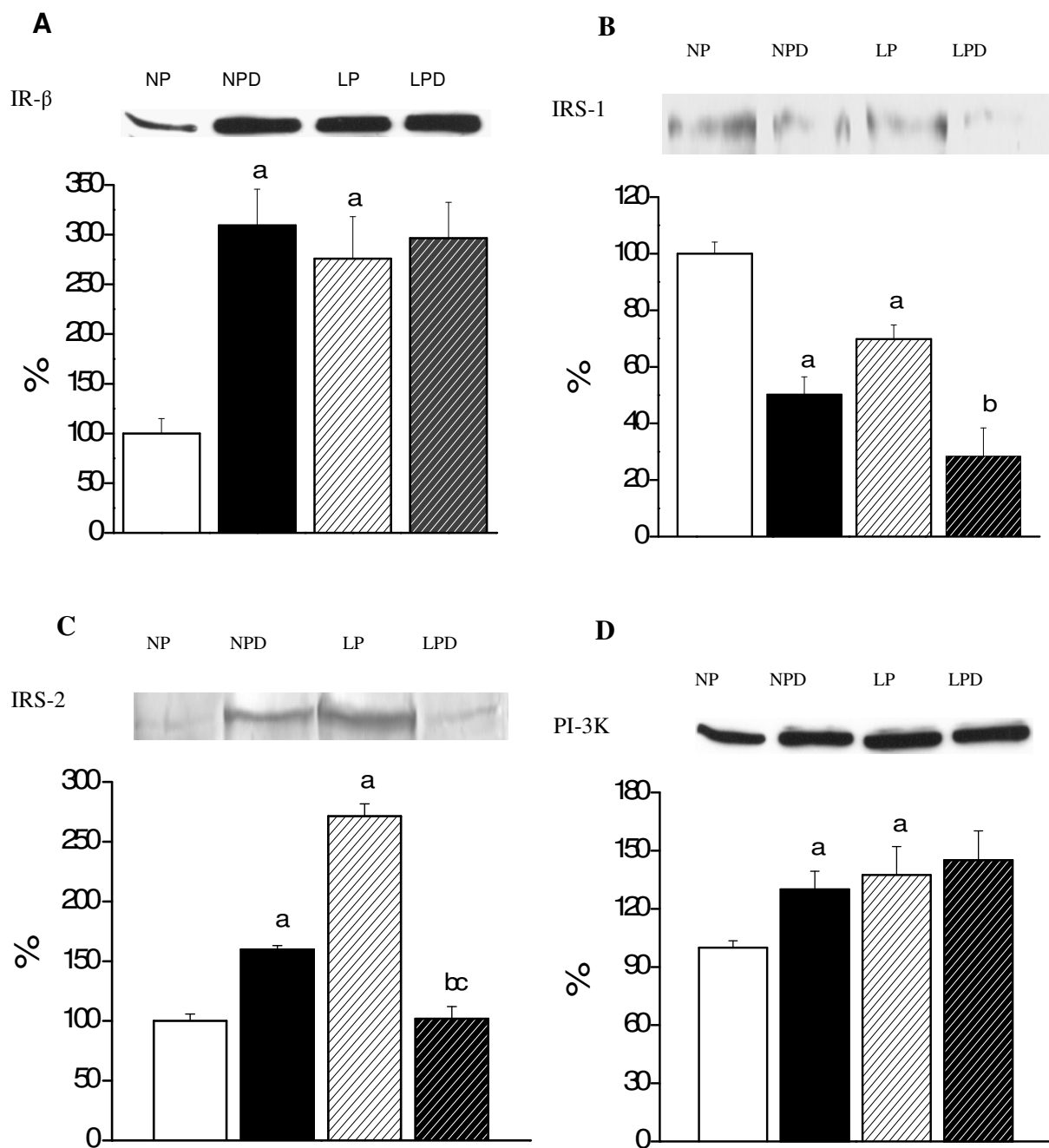


Figura 1 – Expressão protéica do receptor de insulina subunidade β (A), IRS-1 (B), IRS-2 (C), PI3K p85-subunit (D) em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos NP (normoprotéico), NPD (normoprotéico tratado com dexametasona), LP (hipoprotéico) e LPD (hipoprotéico tratado com dexametasona). As barras representam níveis protéicos determinados por densitometria óptica. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. ^a diferença significativa vs NP; ^b vs LP; ^c vs NPD. $n = 4$. $P < 0.05$.

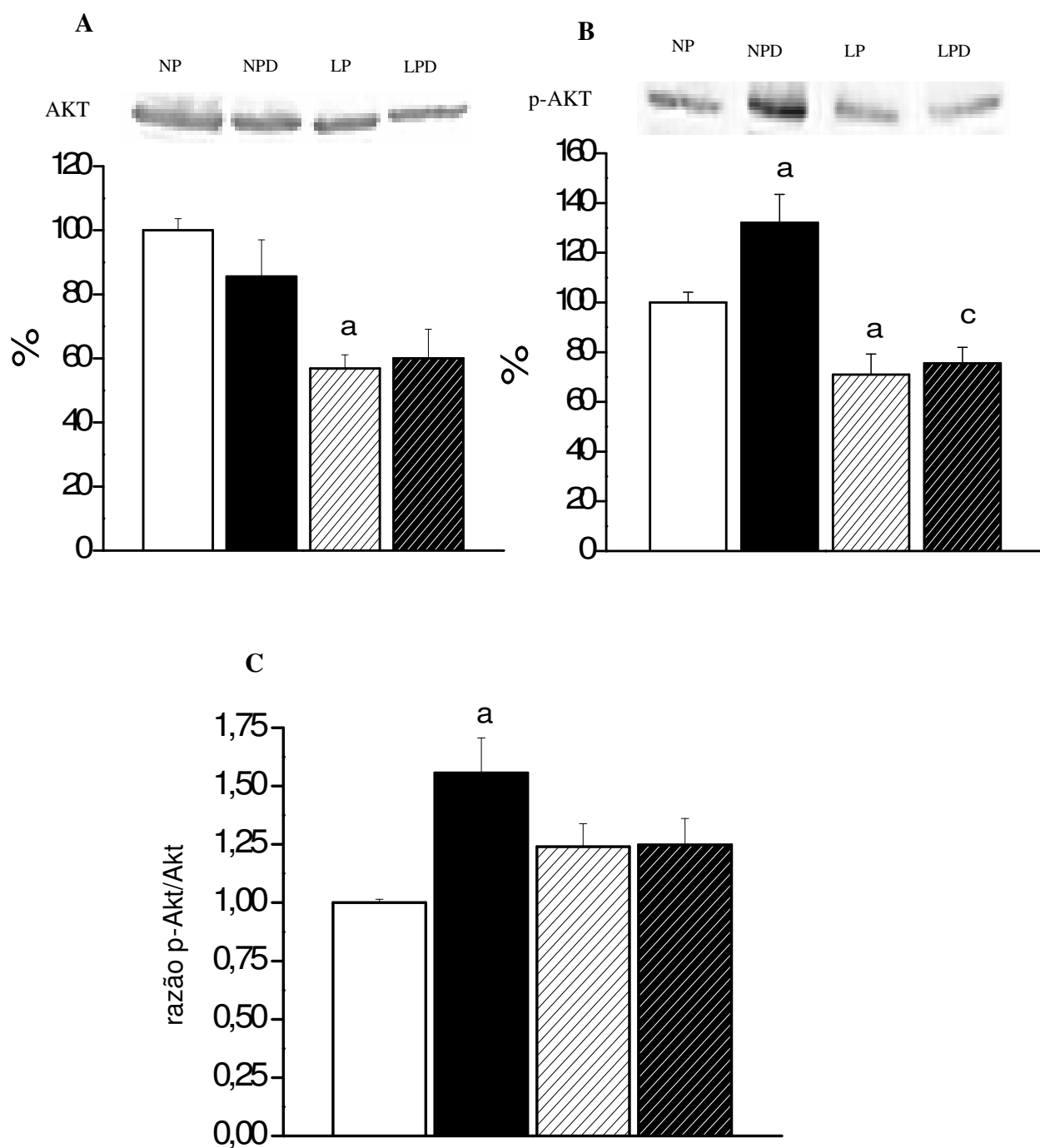


Figura 2 – Expressão protéica da Akt (A) , conteúdo da p-Akt (B) e razão p-Akt/Akt (C) em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos NP (normoprotéico), NPD (normoprotéico tratado com dexametasona), LP (hipoprotéico) e LPD (hipoprotéico tratado com dexametasona). As barras representam níveis protéicos determinados por densitometria óptica. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. ^a diferença significativa vs NP; ^b vs LP; ^c vs NPD. $n = 4$. $P < 0.05$.

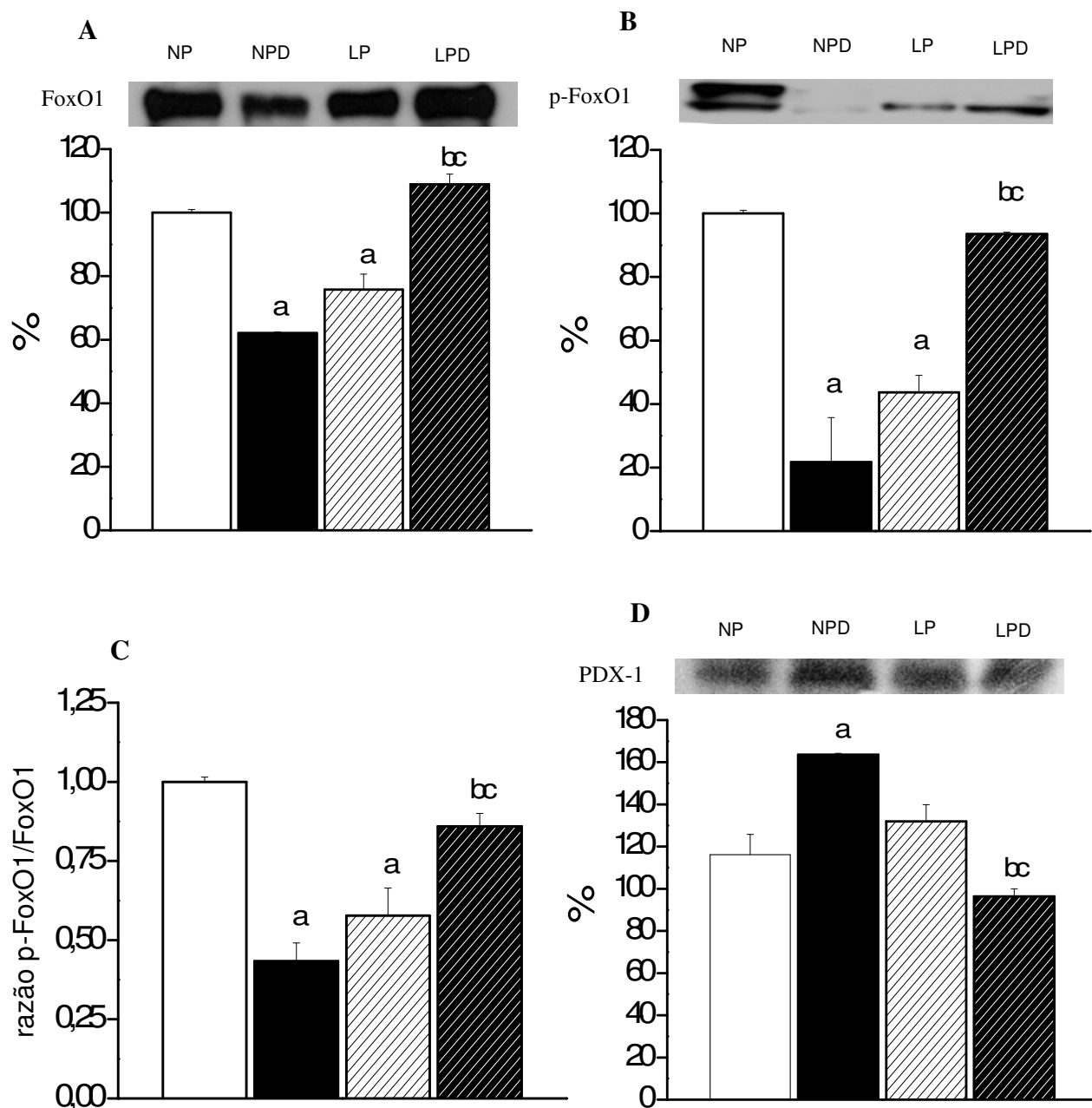


Figura 3 – Expressão protéica da FoxO1 (A) e PDX-1 (D), conteúdo da p-FoxO1 (B), e razão p-FoxO1/FoxO1 (C) em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos NP (normoprotéico), NPD (normoprotéico tratado com dexametasona), LP (hipoprotéico) e LPD (hipoprotéico tratado com dexametasona). As barras representam níveis protéicos determinados por densitometria óptica. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. ^a diferença significativa vs NP; ^b vs LP; ^c vs NPD. $n = 4$. $P < 0.05$.

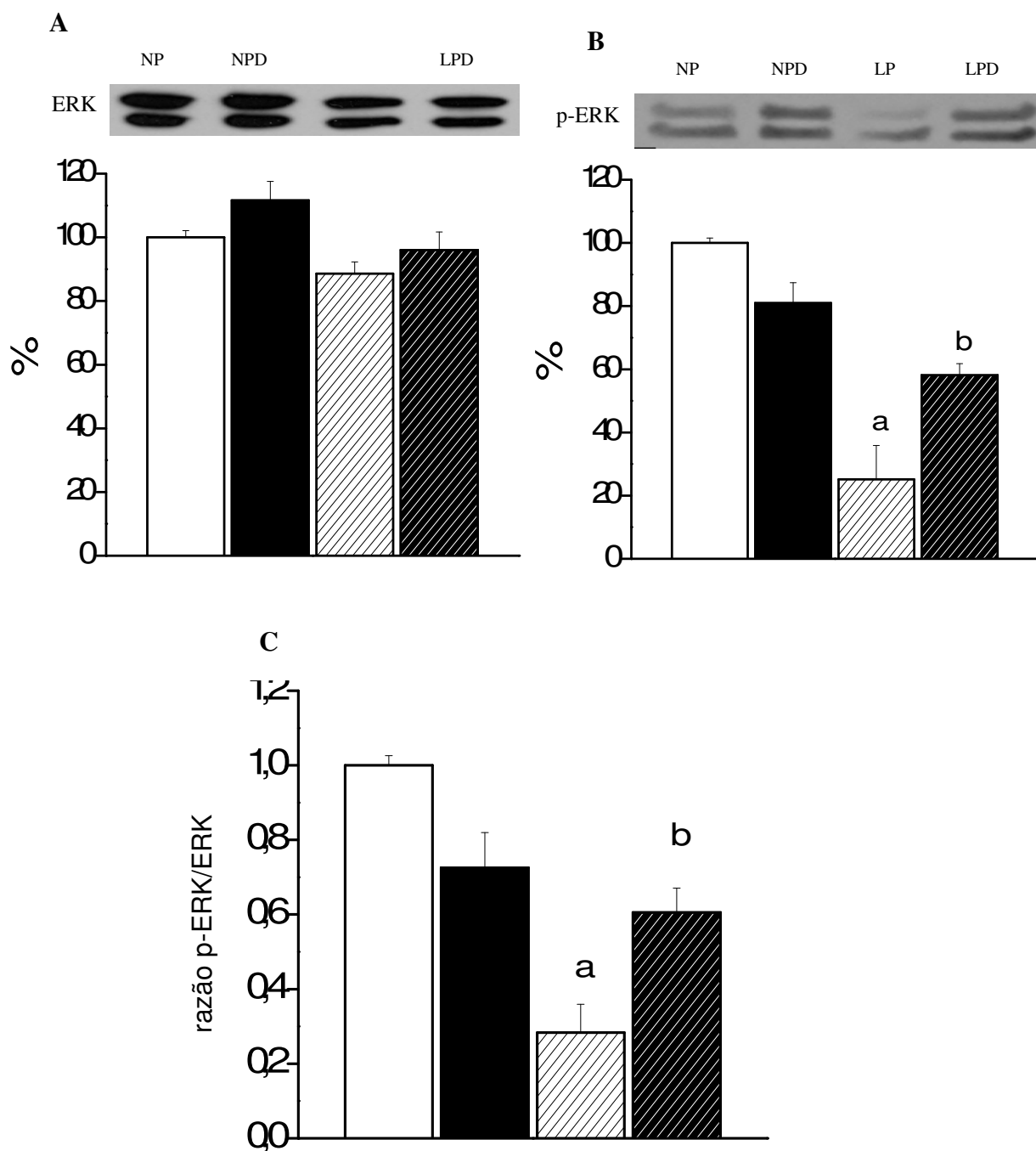


Figura 4 – Expressão protéica da ERK (A), conteúdo de p-ERK (B) e razão p-ERK/ERK (C) em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos NP (normoprotéico), NPD (normoprotéico tratado com dexametasona), LP (hipoprotéico) e LPD (hipoprotéico tratado com dexametasona). As barras representam níveis protéicos determinados por densitometria óptica. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. ^a diferença significativa vs NP; ^b vs LP; ^c vs NPD. $n = 4$. $P < 0.05$.

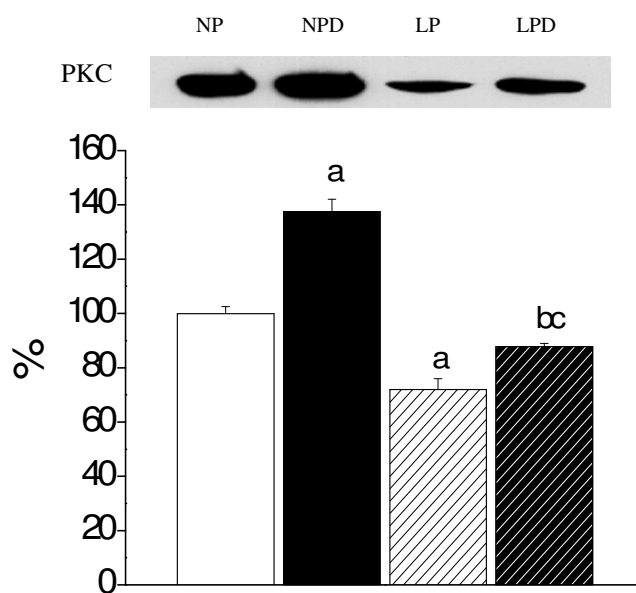


Figura 5 – Expressão protéica da PKC em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos NP (normoprotéico), NPD (normoprotéico tratado com dexametasona), LP (hipoprotéico) e LPD (hipoprotéico tratado com dexametasona). As barras representam níveis protéicos determinados por densitometria óptica. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. ^a diferença significativa vs NP; ^b vs LP; ^c vs NPD. $n = 4$. $P < 0.05$.

CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, o tratamento com dexametasona reverte a maioria das alterações metabólicas aqui estudadas em ratos submetidos à restrição protéica, além de melhorar a função das ilhotas pancreáticas. Estes resultados podem confirmar a plasticidade das ilhotas pancreáticas frente a condições adversas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amatruda JM, Livingston JN, Lockwood DH. (1985) Cellular mechanisms in selected states of insulin resistance: human obesity, glucocorticoid excess and chronic renal failure. *Diabetes Metab. Rev.* 3:296-317.

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS -1 gene. *Nature* 372:186-90.

Arantes V.C., Reis M.A., Latorraca M.Q., Ferreira F., Stoppiglia L.F., Carneiro E.M., Boschero A.C. (2006) Palmitic acid increase levels of pancreatic duodenal homeobox -1 and p38/stress-activated protein kinase in islets from rats maintained on a low protein diet. *Br J Nutr.* 96:1006 - 12.

Arantes V.C., Teixeira V.P., Reis M.A., Latorraca M.Q., Leite A.R., Carneiro E.M., Yamada A.T., Boschero A.C. (2002) Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation. *J Nutr.* 132:3030 -5.

Ashcroft S.J. (1980) Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis. *Diabetologia.* 18:5-15.

Bonner-Weir S, Trent DF, Zimachinski CJ, Clore ET & Weir GC. (1981) Limited beta cell regeneration in a beta cell deficient rat model: studies with dexamethasone. *Metabolism* 9:914-8.

Boschero, A. C. (1996) Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células β pancreáticas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 40:149-55.

Carneiro, E. M., Mello, M. A. R., Gobatto, C. A., Boschero, A. C. (1995) Low protein diet impairs glucose-induced insulin secretion from and ^{45}Ca uptake by pancreatic rat islets. *J Nutr Biochem.* 6: 314-8.

Carneiro, E. M. Participação dos íons Ca^{2+} e K^{+} no processo de acoplamento estímulo/secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos submetidos à dieta deficiente em proteína. Tese de Doutorado. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 1996.

Cherif H., Reusens B., Dahri S., Remacle C. (2001) A protein-restricted diet during pregnancy alters in vitro insulin secretion from islet of fetal wistar rats. J Nutrition 131, 1555-9.

Czech M.P., Corvera S. (1999) Signaling mechanisms that regulate glucose transport. J Biol Chem. 274: 1865-8.

Cho H., Thorvaldsen J.L., Chu Q., Feng F., Birnbaum M.J. (2001) Akt1/PKB alpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. J Biol Chem. 276: 38349-52.

de Barros Reis M.A., Arantes V.C., Cunha D.A., Latorraca M.Q., Toyama M.H., Carneiro E.M., Boschero A.C. (2007) Increased L-CPT-1 activity and altered gene expression in pancreatic islets of malnourished adult rats: a possible relationship between elevated free fatty acid levels and impaired insulin secretion. Nutr Biochem. May 23; [Epub ahead of print]

Delaunay, F.; Khan, A.; Cintra, A.; Davani, B.; Ling, Z-C.; Andersson, A.; Östenson, C-G.; Gustafsson, J-A.; Efendic, S.; Okret, S. (1997) Pancreatic β cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. J. Clin. Invest., 100:2094 -8.

Downward J. (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. Curr Opin Cell Biol. 10: 262-7.

Efendic, S.; Luft, R.; Wajngot, A. (1984) Aspects of the patogénese of type 2 diabetes. Endocr . Rev. 5: 395-410.

Ferreira C.L., Macedo G.M., Latorraca M.Q., Arantes V.C., Veloso R.V., Carneiro E.M., Boschero A.C., Nascimento C.M., Gaiva M.H. (2007) Serum leptin and insulin levels in lactating protein-restricted rats: implications for energy balance. Br J Nutr. 97:27-34.

Ferreira F., Barbosa H.C., Stoppiglia L.F., Delghingaro -Augusto V., Pereira E.A., Boschero A.C., Carneiro E.M. (2004) Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKA α expression. J Nutr. 134:63 -7.

Ferreira F., Filiputti E., Arantes V.C., Stoppiglia L.F., Araujo E.P., Delghingaro -Augusto V., Latorraca M.Q., Toyama M.H., Boschero A.C., Carneiro E.M. (2003) Decreased cholinergic stimulation of insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet is associated with reduced protein kinase α expression. J Nutr. 133:695 -9.

Gavin J.R. 3rd. (2003) Insulin resistance syndrome: implications for the African American population. Endocr Pract. 9:28-30.

Gembal M, Detimary P, Gilon P, Gao ZY, Henquin JC. (1993) Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate -sensitive K⁺ channels in mouse B cells. J Clin Invest. 91:871 -80.

Gepts, W., Lecompt, P. M. (1981) The pancreatic islets in diabetes. Am J Med 70: 105-9.

Grodsky, G. M. Kinetics of insulin secretion: current implications. (1996) In: Diabetes Mellitus, pp.12-20 [Le Roith, D., Taylor, S.I & Olefsky, J.M. eds.]. Philadelphia: Lippincott -Raven.

Hales CN, Barker DJ. (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia 35: 595-601. Review.

Kahn C.R. (1985) The molecular mechanism of insulin action. Annu Rev Med. 36:429 -51. Review.

Kanda F, Takatani K, Okuda S, Matsushita T, Chihara K. (1999) Preventive effects of insulin -like growth factor on steroid-induced muscle atrophy. Muscle Nerve 22:213 -7.

Kanno, T., Gopel SO, Rorsman P, Wakui M. et al. (2002) Cellular function in multicellular system for hormone-secretion: electrophysiological aspect of studies on α -, β - and δ -cells of the pancreatic islet. Neuroscience Research 42: 79 -90.

Kido Y., Nakae J., Accili D. (2001) Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. Clin Endocrinol Metab. 86:972-9.

Koko V, Pavlovic M, Laban A, Radovanovic J, Nikolic A, Petronijevic L, Ristic M. (1992) A stereological investigation of rat endocrine pancreas after a long-term low-protein diet. Pancreas 7:672-9.

Kulkarni R.N. (2004) The islet beta-cell. Int J Biochem Cell Biol. 2004 Mar;36(3):365-71. Review

Latorraca M.Q., Carneiro E.M., Mello M.A., Boschero A.C. (1999) Reduced insulin secretion in response to nutrients in islets from malnourished young rats is associated with a diminished calcium uptake. J Nutr Biochem. 10:37-43.

Latorraca, M. Q., Carneiro, E. M., Boschero, A. C., Mello, M.A R. (1998a) Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in weaned rats. Br J Nutr 80: 291-7.

Latorraca, M. Q., Reis, M. A. B., Carneiro, E. M., Mello, M. A. R., Velloso, L. A , Saad, M. J. A., Boschero, A. C. (1998b) Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. J Nutr. 128: 1643-49.

Matschinsky F.M. (1996) Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. Diabetes 45:223-41.

Milanski M., Arantes V.C., Ferreira F., de Barros Reis M.A., Carneiro E.M., Boschero A.C., Collares-Buzato C.B., Latorraca M.Q. (2005) Low-protein diets reduce PKA α expression in islets from pregnant rats. J Nutr. 135:1873-8.

Myers M.G. Jr., Backer J.M., Sun X.J., Shoelson S., Hu P., Schlessinger J., Yoakim M. , Schaffhausen B., White M.F. (1992) IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. Proc Natl Acad Sci U S A. 89:10350-4.

Novelli M., De Tata V., Bombara M., Lorenzini A., Masini M., Pollera M., Bergamini E., Masiello P. (1999) Insufficient adaptative capability of pancreatic endocrine function in dexamethasone - treated ageing rats. *J Endocrinol* 162: 425-32.

Ogawa A., Jonson J.H., Ohneda M., McAllister C.T., Inman L., Alam T., Unger RH. (1992) Roles of insulin resistance and β -cell dysfunction in dexamethasone-induced diabetes. *J Clin Invest* 90:497-504.

Ohneda M., Johnson J.H., Inman L.R., Unger R.H. (1993) Glut -2 function in glucosa-unresponsive β -cells of dexamethasone-induced diabetes in rats. *J. Clin. Invest.* 92:1950-6.

Patti ME, Kahn CR. (1998) The insulin receptor --a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 9: 89-109.

Porksen, N., Hollingdal M., Juhl C., Butler P., Veldhuis J.D., Schmitz O. (2002) Pulsatile insulin secretion: detection, regulation, and role in diabetes. *Diabetes* 51:245-54.

Rafacho A., Roma L.P., Taboga S.R., Boschero A.C., Bosqueiro J.R. (2007) Dexamethasone - induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and p protein expression in pancreatic rat islets. *Can J Physiol Pharmacol.* 85:536-45

Saad, M.J.A. (1994) Molecular mechanisms of insulin resistance. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27:941-57.

Saltiel A.R., Kahn C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.

Schaaf M.J., Cidlowski J.A. (2002) Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 83:37-48.

Sesti G., Federici M., Hribal M.L., Lauro D., Sbraccia P., Lauro R. (2001) Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J.* 15:2099 -111.

Shepherd P.R., Nave B.T., Siddle K. (1995) Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J.* 305: 25-8.

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-7.

Toriumi, C.; Imai, K. (2003) Altered expression of insulins I and II and their mRNAs in the islets of Langerhans in dexamethasone-induced diabetic rats. *Biomed. Chromatogr.* 17: 26-32.

Vieira E.C., Carneiro E.M., Latorraca M.Q., Delguingaro-Augusto V., Amaral M.E., Bosqueiro J.R., Boschero A.C. (2001) Low protein diet confers resistance to the inhibitory effects of interleukin 1beta on insulin secretion in pancreatic islets. *J Nutr Biochem.* 12:285-291.

White M.F. (1998) The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent Prog Horm Res.* 53:119-38.

White M.F. (1997) The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40: S2-17.

White M.F., Kahn C.R. (1994) The insulin signaling system. *J Biol Chem.* 269: 1-4.

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391: 900-4.

ANEXO



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEa-IB-UNICAMP

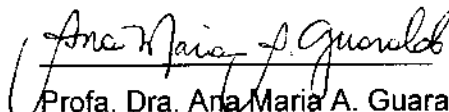
CERTIFICADO

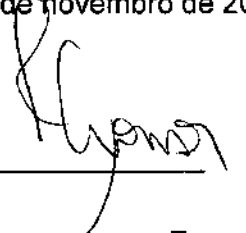
Certificamos que o Protocolo nº 1139-1, sobre "Análise dos efeitos do tratamento com dexametasona sobre a secreção de insulina, parâmetros bioquímicos e moleculares em ratos submetidos à restrição proteica", sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro / Vanessa Aparecida G. Giozzet, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa)-IB-UNICAMP em reunião de 29 de novembro de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1139-1, entitled "Analysis of dexamethasone treatment effects on insulin secretion, molecular and biochemical parameters in rats submitted to protein restriction", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on November 29, 2006.

Campinas, 29 de novembro de 2006.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária

Executiva

Metabolism

Clinical and Experimental

Editor in Chief:

James B. Field, M.D.

8 Windmill Point Road
Hampton, VA 23664-2129

Telephone: 757-850-2826
Fax: 757-850-2826

December 5, 2007

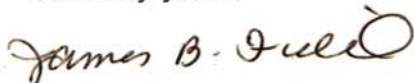
Dr. Jose R. Bosqueiro
Departamento de Ciências Biológicas
Faculdade de Ciências
UNESP
17033-360 Bauru, SP BRAZIL

RE: Manuscript #245-07

Dear Dr. Bosqueiro:

I am pleased to inform you that the revision of your manuscript entitled "Dexamethasone treatment in vivo counteracts the functional pancreatic islet alterations caused by malnourishment in rats" now makes it acceptable for publication in *Metabolism*. I appreciate very much your making the suggested revisions and will let you know at a later date in which issue of the journal the paper will appear.

Sincerely yours,



JAMES B. FIELD, M.D.
Editor-in-Chief

JBF/bw
Dictated but not read

W. B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, PA
An Elsevier Science Company