

Katia Motta

**AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS CHAVES ENVOLVIDAS NAS
VIAS INSULÍNICA E INFLAMATÓRIA E DO RECEPTOR DE
GLICOCORTICOIDE EM TECIDO ADIPOSE DE RATOS
TRATADOS COM DEXAMETASONA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho

Florianópolis
2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Rui e Solange por toda a minha criação, pelos valores que me transmitiram e por tornarem esse sonho possível.

Ao meu orientador Alex, pela confiança em mim depositada, pela sua paciência, inúmeros ensinamentos e o incentivo a pesquisa.

À professora Alessandra Beirith, por me contagiar pela sua paixão pela fisiologia durante a graduação e por ser uma das grandes responsáveis por essa conquista.

Ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas por ter aberto as portas para meu ingresso na pesquisa.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela disponibilização de suas dependências e pelo suporte financeiro para a participação em congressos científicos.

À secretaria do Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, em nome de Roberto Gonzaga Palacios pela prestação de serviços.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Aos professores Silvana Auxiliadora Bordin da Silva, Andreza Fabro de Bem, Adair Roberto Soares dos Santos, Alcir Luiz Dafre e Everson Araújo Nunes por fazerem parte da Banca Examinadora de defesa de dissertação.

A todos os membros do time LIDoC, do qual me orgulho em fazer parte, em especial Cris, Fran e Luiz por me recebem com tanto carinho e me ensinarem a dar meus primeiros passos no laboratório; Amanda, Carol, Thayz, Eduardo, Bryanne e Francielle, pela amizade e pela união que torna o nosso grupo tão forte! Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho, tanto no suporte emocional como no trabalho em equipe e nos momentos de descontração que tornaram meus dias mais felizes.

À Franciane Bobinski pelo auxílio com os Elisás e ao Prof. Adair pelo fornecimento dos kits e demais equipamentos compartilhados.

Ao Prof. Everson pelo suporte no laboratório e pela disposição em me ajudar sempre quando eu precisei.

Ao Prof. Antonio Carlos Boschero – IB/UNICAMP pelo suporte com materiais de consumo.

Aos amigos Marina, Dani, Fran, Tátilla, Holly Igor, Serginho, Fábio e Josiel, obrigada pela amizade, pelos ouvidos, inúmeros conselhos e por todas as gargalhadas compartilhadas.

Aos queridos amigos que fiz na UFSC e não tiveram envolvimento direto com este trabalho, mas que foram de extrema importância, Ana Paula Taschetto (grande amiga e conselheira), Bruna (amiga e vizinha querida), Natália (parceira de dias inesquecíveis na UFRGS) e Raphael (por ouvir meus desabafos e estar perto de mim mesmo quando eu estava insuportavelmente chata).

Por fim, agradeço as pessoas que, mesmo sem grande ideia do que eu estava fazendo, sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado, minha irmã Ariana e meus amigos Marina Lobe, Thiago Dalagnoli e Marcos Furtado, vocês me ajudaram de inúmeras outras formas.

RESUMO

É sabido que os glicocorticoides (GCs) podem diminuir a sensibilidade periférica à insulina, termo que é aplicado como resistência à insulina (RI), fato que parece ser decorrente de alterações em eventos pós-receptores de insulina. A RI está presente nos indivíduos obesos e uma possível explicação para a RI nesses indivíduos se deve a ativação subclínica de vias de sinalização inflamatórias que incluem as cinases c-jun-N-terminal (JNK) e a cinase do I κ B (IKK β). Quando ativadas, estas cinases fosforilam o IRS-1 no resíduo serina e atenuam a sinalização insulínica. A fim de verificar se há alguma similaridade entre esse processo e a RI induzida pela administração de GCs, verificamos o conteúdo e o grau de fosforilação de proteínas chaves das vias insulínica e inflamatórias no tecido adiposo branco (TAB) de ratos tratados com dexametasona (DEX). Para tal, ratos Wistar receberam injeção diária de DEX (1 mg/kg de peso corpóreo) durante 5 dias consecutivos, enquanto animais controle receberam solução salina (CTL). Foram analisados o peso corpóreo e consumo de ração, glicose sanguínea, componentes plasmáticos (triacilglicerol, insulina, lactato, TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10), conteúdo de glicogênio hepático, liberação de glicerol, tolerância à glicose, à insulina e ao piruvato. Também foram avaliados o conteúdo de proteínas envolvidas na sinalização insulínica (IRS-1 e Akt) e na sinalização inflamatória (JNK, IKK β , TLR-4 e NF κ B) além do receptor de glicocorticoide (GR) e da enzima 11 β -HSD1 no TAB. Os ratos DEX apresentaram redução do peso corpóreo (17%) e do consumo de ração (58%), aumento das concentrações de glicose (25%), insulina (500%), lactato (80%) e de triacilglicerol (190%) ($p < 0,05$). O conteúdo de glicogênio hepático bem como da liberação basal de glicerol *ex vivo* foram 250% e 50% maiores nos ratos DEX, em relação aos ratos CTL ($p < 0,05$). Os testes *in vivo* revelaram a presença de intolerância à glicose (GTT), redução da sensibilidade à insulina (ITT) bem como aumento da gliconeogênese (PTT), provavelmente de origem hepática, nos animais DEX ($p < 0,05$). Os ratos DEX tiveram redução no conteúdo total (46%) e fosforilado (44%) da Akt, aumento da fosforilação em serina do IRS-1 (63%), redução no conteúdo do GR (47%) e aumento do conteúdo da enzima 11 β -HSD1 (69%) em TAB em relação ao grupo CTL ($p < 0,05$). A fosforilação das proteínas-cinases JNK e IKK β foi 46% e 52% menor no TAB de ratos DEX, respectivamente ($p < 0,05$), enquanto das proteínas TLR-4 e NF κ Bp65 mantiveram-se similares aos do grupo CTL. As concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-1 β também estiveram diminuídas nos ratos DEX ($p < 0,05$). Com base em nossos

resultados concluímos que o tratamento com DEX por 5 dias consecutivos reproduz a atenuação da sinalização insulínica (redução da fosforilação de Akt e aumento da fosforilação do IRS-1 em serina) em TAB de ratos. Essa atenuação da sinalização insulínica parece não ser resultante de uma ativação exacerbada dos componentes da via inflamatória já que o tratamento com o GC esta associado à redução ou inalteração do conteúdo e/ou da atividade das proteínas JNK, IKK β , TNF- α , TLR-4 e NF κ Bp65.

Palavras-chave: dexametasona, glicocorticoide, receptor de glicocorticoide, sensibilidade à insulina, sinalização insulínica, sinalização inflamatória.

ABSTRACT

It is known that glucocorticoids (GCs) may decrease peripheral insulin sensitivity, which means insulin resistance (IR), and appears to be a consequence of changes in the insulin post-receptor events. IR is present in obese individuals and a possible explanation for the IR in these individuals is due to the subclinical activation of inflammatory pathways including the c-jun N-terminal (JNK) and I κ B kinase (IKK β) kinases. When activated, these kinases phosphorylate IRS-1 at serine residues attenuating the insulin signaling. To elucidate if there is a similarity between this process and the GCs induced-IR, we evaluated the content and the activity of key proteins of the insulin and inflammatory pathways in white adipose tissue (WAT) of rats treated with dexamethasone (DEX). For this purpose, Wistar rats received daily injection of DEX (1 mg / kg body weight) for 5 consecutive days, while control animals received saline (CTL). Body weight and food intake, blood glucose, plasma components (triacylglycerol, insulin, lactate, TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-10), hepatic glycogen content, glycerol release and glucose, insulin and pyruvate tolerance were analyzed. We also evaluated the content of proteins involved in the insulin pathway (Akt, and IRS-1) and in the inflammatory pathway (JNK, IKK β , NF κ B and TLR-4), as well as the glucocorticoid receptor (GR) and the enzyme 11 β -HSD1 in the WAT. DEX rats showed reduced body weight (17%) and food intake (58%), increased blood glucose values (25%) and augmented circulating insulin (500%), lactate (80%) and triacylglycerol (190%) ($p < 0.05$). The hepatic glycogen content as well as the *ex vivo* glycerol release were 250% and 50% higher in DEX, compared to CTL rat, respectively ($p < 0.05$). *In vivo* tests revealed impaired glucose tolerance (GTT), decreased insulin sensitivity (ITT) and increased hepatic gluconeogenesis (PTT), probably of hepatic origin, in DEX rats ($p < 0.05$). DEX rats showed reduced Akt content (46%) and phosphorylation (44%), increased IRS-1 serine phosphorylation (63%), reduced GR content (47%) and augmented 11 β -HSD1 content (69%) in WAT, compared to CTL group ($p < 0.05$). The JNK and IKK β phosphorylation was 46% and 52% lower in WAT from DEX rats, respectively ($p < 0.05$), whereas the TLR-4 and NF κ Bp65 protein contents remained similar between the groups. Plasma concentrations of TNF- α and IL-1 β were also reduced in DEX rats ($p < 0.05$). Based on our results we conclude that dexamethasone treatment for 5 consecutive days reproduces the attenuation of the insulin signaling (reduction of Akt phosphorylation and increase of IRS-1 serine phosphorylation) in

WAT of rats. This attenuation of insulin pathway does not seem to be a result of an exacerbation of the inflammatory pathway activation, considering the GC treatment is associated to a reduction or no change in the content and/or activity of the JNK , IKK β , TNF- α , TLR-4 and NF κ Bp65 proteins.

Keywords: Dexamethasone, glucocorticoid, glucocorticoid receptor, insulin sensitivity, insulin pathway, inflammatory pathway

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Regulação da secreção de GC pelo eixo HPA.....	22
Figura 2 - Reações catalisadas pelas enzimas 11 β -SDs.....	25
Figura 3 - Mecanismos de ação dos glicocorticoides.....	28
Figura 4 – Simplificação da via de sinalização da insulina e seu efeito em tecidos responsivos (TAB, hepático e ME).....	33
Figura 5 - Hipótese da resistência à insulina induzida por glicocorticoides.....	47
Figura 6 - Período de administração de dexametasona ou solução salina em grupos DEX e CTL, respectivamente.....	52
Figura 7 - Tratamento com dexametasona promove redução do peso corpóreo e consumo de ração.....	60
Figura 8 - Tratamento com dexametasona induz redução na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina.....	63
Figura 9 – Lipólise estimulada por isoproterenol <i>ex vivo</i> em TAB epididimário.....	65
Figura 10 - Ratos DEX possuem menor ativação da Akt no TAB em resposta ao bolus de glicose.....	67
Figura 11 - Akt total e IRS-1 fosforilado em serina em TAB de ratos DEX em TAB.....	68
Figura 12 - Redução do conteúdo de GR e conteúdo da enzima 11 β -HSD1 em TAB epididimário.....	69
Figura 13 - Conteúdo total e fosforilação das proteínas-chaves envolvidas na sinalização inflamatória.....	71
Figura 14 - Conteúdo total e/ou fosforilado de proteínas relacionadas com a sinalização pró-inflamatória.....	73
Figura 15 - Citocinas circulantes em ratos DEX e CTL.....	74
Figura 16 - Hipótese da resistência à insulina induzida por glicocorticoides.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da dexametasona sobre proteínas da sinalização insulínica em cultivos celulares e tecidos periféricos de ratos.....	38
Tabela 2 - Parâmetros sanguíneos e metabólicos em ratos CTL e tratados com DEX após jejum de 12 a 14 horas.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 β -HSD	11 β -hidroxi esteroide desidrogenase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AGL	Ácidos graxos livres
AG	Ácidos graxos saturados
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AP1	Proteína de ativação 1
ASC	Área sob a curva
CBG	Proteína ligadora de corticosteroides
CRH	Hormônio liberador de glicocorticoides
CTL	ratos tratados com salina
DEX	ratos tratados com dexametasona
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
GC	Glicocorticoide
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
GR	Receptor de glicocorticoide
GRE	Elemento responsivo ao glicocorticoide
GS	Glicogênio sintase
GSK-3	Cinase da glicogênio sintase 3
HOMA	Modelo de análise homeostática
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HSP	Proteína de choque térmico
IG	Intolerância à glicose
IKK	Cinase do I κ B
IL	Interleucina
ipGTT	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose
IpITT	Teste intraperitoneal de tolerância à insulina
IpPTT	Teste intraperitoneal de tolerância ao piruvato
IR	Receptor de insulina
IRF	Fator regulador de interferon
IRS	Substrato do receptor de insulina
JNK	Cinase c-jun N-terminal
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
ME	Músculo esquelético
MR	Receptor mineralocorticoide
MTB	Maquinaria de transcrição basal
mTORC2	Complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos
NF κ B	Fator nuclear kappa B
PDK1	Proteína cinase dependente de inositolis 1
PI	Fosfatidilinositol

PI(3,4,5)P3..... Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
Pi3K.....Fosfatidilinositol 3 cinase
PKB/Akt.....Proteína cinase B
PKC.....Proteína cinase C
RI..... Resistência à insulina
STAT..... Transdutor de sinal e ativador da transcrição
TAB.....Tecido adiposo branco
TLR-4.....receptor tipo 'toll like' 4
TNF- αFator α de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 PAPEL FISIOLÓGICO DOS GLICOCORTICOIDES.....	21
1.2 MECANISMO DE AÇÃO DOS GLICOCORTICOIDES.....	25
1.3 USO CLÍNICO DOS GLICOCORTICOIDES E EFEITOS COLATERAIS.....	29
1.4 SINALIZAÇÃO INSULÍNICA.....	31
1.4.1 Mecanismo de sinalização da insulina.....	31
1.5 EFEITOS DIABETOGÊNICOS DOS GLICOCORTICOIDES.....	33
1.6 RESISTÊNCIA À INSULINA NA CLÍNICA.....	39
1.7 JUSTIFICATIVA.....	44
2 OBJETIVOS.....	49
2.1 OBJETIVO GERAL.....	49
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1 ANIMAIS.....	51
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	51
3.3 PARÂMETROS METABÓLICOS.....	52
3.3.1 Peso corpóreo.....	52
3.3.2 Consumo de ração.....	52
3.3.3 Glicose sanguínea.....	53
3.3.4 Componentes plasmáticos.....	53
3.3.5 Avaliação da sensibilidade à insulina pelo modelo de análise homeostática (HOMA) e índice TyG.....	53
3.3.6 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT).....	54
3.3.7 Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT).....	54
3.3.8 Teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal (ipPTT).....	55

3.3.9 Glicogênio hepático.....	55
3.4 LIPÓLISE.....	56
3.5 CITOCINAS PLASMÁTICAS.....	56
3.6 EXTRAÇÃO PROTEICA E WESTERN BLOTT.....	57
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	58
4.RESULTADOS.....	59
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL.....	59
4.1.1 Peso corpóreo e consumo de ração.....	59
4.1.2 Parâmetros plasmáticos e glicogênio hepático.....	60
4.1.3 Tolerância à glicose e sensibilidade periférica à insulina.....	61
4.1.4 Secreção de glicerol estimulada por isoproterenol.....	64
4.2 SINALIZAÇÃO INSULÍNICA.....	66
4.2.1 Tratamento com dexametasona promove redução da fosforilação em serina da Akt em TAB.....	66
4.3 CONTEÚDO TOTAL DO RECEPTOR DE GLICOCORTICOIDE E DA ENZIMA 11 β -HSD1 NO TAB.....	68
4.3.1 Tratamento com GC promove redução do conteúdo de GR e aumento modesto da enzima 11β-HSD1.....	69
4.4 CONTEÚDO TOTAL E FOSFORILADO DA JNK, IKK β , NF κ Bp65 E CONTEÚDO TOTAL DO RECEPTOR TLR-4 NO TAB.....	70
4.4.1 Componentes da sinalização inflamatória parecem não estar envolvidos na atenuação da sinalização insulínica.....	70
4.4.2 Redução do conteúdo de GR não está associada a aumento do conteúdo de proteínas relacionadas com a sinalização pró-inflamatória.....	72
5 DISCUSSÃO.....	75

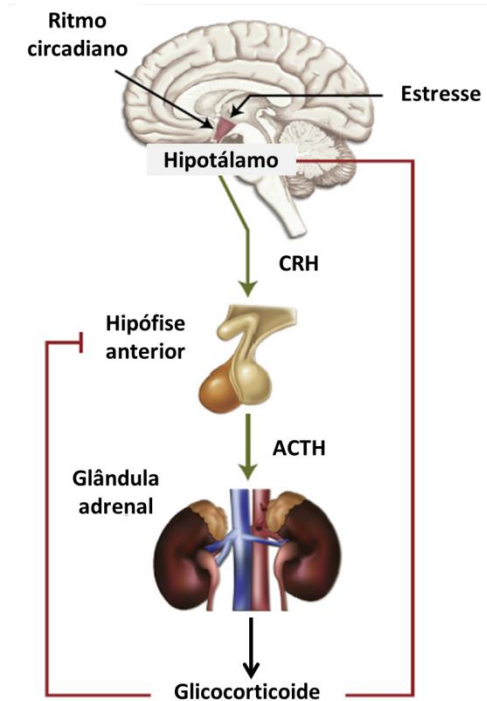
5 PERSPECTIVAS.....	87
REFERÊNCIAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 PAPEL FISIOLÓGICO DOS GLICOCORTICOIDES

Os glicocorticoides (GCs) endógenos (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) são hormônios derivados do colesterol, produzidos e secretados por células presentes na zona fasciculada do córtex adrenal e exercem papel importante em vários órgãos e sistemas, participando da regulação fisiológica e da adaptação às situações de estresse (BIDDIE; CONWAY-CAMPBELL; LIGHTMAN, 2012). A concentração de GC circulante é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (FARIA; LONGUI, 2006) e influenciada por fatores como o ritmo circadiano, (BRADBURY et al., 1991) o estresse (MAKINO; HASHIMOTO; GOLD, 2002) e a retroalimentação negativa. Este último fator é exercido pelo próprio GC que modula a síntese e secreção de hormônios liberadores hipotalâmico-hipofisários através de sinalização que envolve receptores de glicocorticoides (GR) (LAUGERO, 2004) (Figura 1).

Figura 1 - Regulação da secreção de GC pelo eixo HPA.



CRH: hormônio liberador de GC; ACTH: hormônio adrenocorticotrófico.
Adaptado de OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013.

Em condições fisiológicas, os GCs desempenham papel fundamental na regulação do metabolismo hídrico e eletrolítico, da pressão arterial sistêmica, da função imunológica e do metabolismo energético (ANDREWS; WALKER, 1999). Em períodos de estresse, esses hormônios atuam sobre o metabolismo de proteínas, lipídios e de carboidratos, promovendo disponibilização de substratos para o metabolismo oxidativo (HOMO-DELARCHE, 1991; ANDREWS; WALKER, 1999). A liberação de GC e sua atividade tecido-específica requer um controle fino para uma regulação metabólica adequada.

Alteração da regulação das concentrações dos hormônios esteroides, tais como hipercortisolemia ou hipocortisolemia crônicas podem resultar em condições patológicas como a síndrome de Cushing ou doença de Addison, respectivamente (ANDREWS; WALKER, 1999; KADMIEL; CIDLOWSKI, 2013). A Síndrome de Cushing é resultado da hipersecreção de GCs por adenomas hipofisários, tumores produtores de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), ou administração excessiva de GCs, apresenta sintomas como imunodeficiência, hipertensão arterial sistêmica, aumento da obesidade central e intolerância à glicose (IG) (SHIBLI-RAHHAL et al., 2006). A doença de Addison pode ser decorrente de uma resposta autoimunitária que atinge as células do córtex adrenal, da redução na síntese de GCs ou por disfunção da hipófise. Esta doença caracteriza-se por sintomas como hipertrofia de órgãos linfoides, hipotensão postural, perda de peso e hipoglicemia (NIEMAN; TURNER, 2006).

Em humanos a forma biologicamente ativa do GC é o cortisol livre (YANG; ZHANG, 2004) que circula no plasma em três estados: i) 70 a 75% ligados a globulina transportadora de corticosteroides (CBG), ii) 15 a 20% ligado à albumina e iii) 5 a 10% circulam livres. O cortisol livre pode se difundir pela membrana celular e interagir com seus receptores intracelulares (ANDREWS; WALKER, 1999; BREUNER; ORCHINIK, 2002). Desta forma, as proteínas plasmáticas, CBG e albumina, constituem um sistema tampão para as concentrações de cortisol livre. Todavia, esse sistema tampão apresenta saturação, permitindo assim, variação fisiológica nas concentrações de cortisol plasmático livre ao longo do ciclo circadiano (ANDREWS; WALKER, 1999).

Além da regulação sistêmica dos GCs pelo eixo HPA, sua biodisponibilidade pode ser modificada através de um mecanismo pré-receptor. Neste sentido, as principais enzimas envolvidas nesse processo são as 11 β -hidroxiesteroide desidrogenases (11 β -HSDs). Essas isoenzimas são proteínas intracelulares que regulam o metabolismo do GC ativo, o cortisol, com seu precursor inativo, a cortisona. Em condições fisiológicas, a isoenzima 11 β -HSD1 promove a conversão do cortisol a partir de seu precursor cortisona, aumentando as concentrações no microambiente tecidual (YANG; ZHANG, 2004; COOPER; STEWART, 2009). Por outro lado, a isoenzima 11 β -HSD2 converte o cortisol a cortisona, sua forma inativa (Figura 2). Apesar de ser amplamente utilizada como esteroide oral, a cortisona não tem habilidade de se ligar ao GR, devendo ser convertida em cortisol pela 11 β -HSD1 no fígado (COOPER et al., 2001; YANG; ZHANG, 2004). A isoforma 11 β -HSD1 é amplamente distribuída nos diversos tecidos, sendo especialmente abundante no fígado e no tecido adiposo branco (TAB) enquanto a isoforma 11 β -HSD2 é distribuída predominantemente nos rins, cólon e nas glândulas salivares, onde atenuam o efeito mineralocorticoide que pode ser exercido pelos GCs ao se acoplarem com certa afinidade aos receptores mineralocorticoide (MR) (PATERSON et al., 2004). Mutações nos genes destas enzimas modificam a biodisponibilidade e, por conseguinte, a ação dos GCs (FUNDER, 1992).

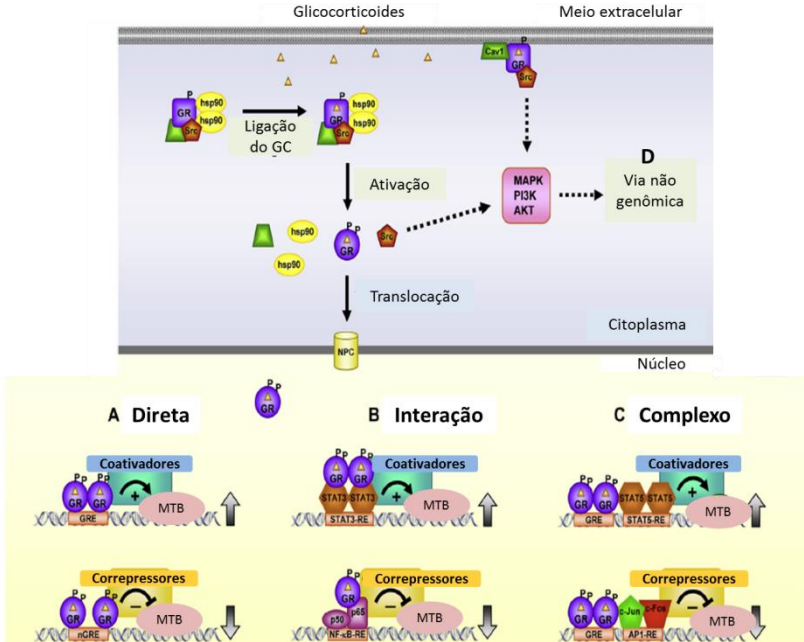
na dissociação das HSPs com a posterior translocação do GR ao núcleo (BEATO, 1995; PRATT; TOFT, 1997). As HSPs permitem que o receptor adquira conformação tridimensional adequada para a sua ligação ao hormônio (MENDEL; ORTI, 1988).

Os GCs podem desempenhar suas respostas intracelulares por pelo menos três mecanismos (Figura 3). O primeiro mecanismo, clássico, envolve ativação da transcrição de determinados genes em resposta a ativação pelo complexo GC-GR (STROMSTEDT, 1991). Este mecanismo inicia-se com a formação do complexo GC-GR no citosol que se move para o núcleo, onde se liga a elementos responsivos ao glicocorticoide (GREs) (Figura 3A). Os GREs podem modular a transcrição gênica positivamente (transativação) ou negativamente (transrepressão). Genes que são regulados positivamente por GREs, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, incluem aqueles que estão envolvidos na gliconeogênese, tais como a enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasase e a glicose-6-fosfatase (SASAKI et al., 1984; JIN et al., 2004; KOOI et al., 2005). De fato o gene da PEPCK contém GREs em sua região promotora e é considerado como um componente importante para o desenvolvimento da hiperglicemia induzida por GCs (VEGIOPOULOS; HERZIG 2007). Exemplos de genes regulados negativamente por GREs incluem o gene da pró-opiomelanocortina (precursor de ACTH) e da prolactina (SAKLATVALA, 2002). Os GRs também podem participar da regulação de outros genes responsivos aos GCs. Esta via envolve interação entre o complexo GC-GR e outros fatores de transcrição como, por exemplo, membros específicos da família do transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT) (ROGATSKY; IVASHKIV, 2006; LELLIS-SANTOS et al., 2012), o fator nuclear kappa-B (NFkB) e

a proteína de ativação 1 (AP-1) (YANG-YEN et al., 1990) (Figura 3B). Esta ação parece ocorrer em concentrações menores de cortisol do que as que são necessárias para a modulação da transcrição gênica (MCKAY; CIDLOWSKI, 1999). A interação do GR com membros da STAT parece resultar em aumento da transcrição de genes responsivos (ROGATSKY; IVASHKIV, 2006) enquanto sua interação com os fatores de transcrição AP-1 e NFkB parece antagonizar suas atividades e são de especial interesse, uma vez que se constitui um dos mecanismos que explicariam as propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras clinicamente relevantes do GC (YANG-YEN, 1990; RAY; PREFONTAINE, 1994; NISSEN; YAMAMOTO, 2000). Os GCs podem ainda atuar se ligando aos GREs na dupla fita de DNA e associar-se fisicamente a AP-1 e NFkB ligados a sítios vizinhos do DNA (CHINENOV et al., 2012) (Figura 3C).

Embora os principais efeitos dos GCs ocorram através da transcrição gênica, processo que leva de minutos a horas, inúmeras evidências sugerem que o GR pode ainda atuar de forma não genômica, promovendo respostas celulares rápidas, que ocorrem dentro de segundos a minutos e não são dependentes de alterações na transcrição gênica (GROENEWEG et al., 2012; SAMARASINGHE; WITCHELL; DEFRANCO, 2012). Diversos mecanismos têm sido propostos para estarem envolvidos nesta sinalização, como o aumento da atividade de proteínas como a fosfatidilinositol 3-cinase (Pi3K), proteína cinase C (PKC) e proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) (SOLITO et al., 2008) (Figura 3D).

Figura 3 - Mecanismos de ação dos glicocorticoides.



O complexo GC-GR regula a expressão gênica por 3 maneiras: Diretamente, ligando-se aos GREs presentes no DNA (A); interagindo com outros fatores de transcrição ligados ao DNA (B); ligando-se diretamente ao DNA e formando complexos com fatores de transcrição ligados ao DNA nas suas proximidades (C). O GR pode agir também de forma não genômica através de alterações na atividade de várias proteínas cinases (D). MTB, maquinaria de transcrição basal. Adaptado de OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013.

O gene do GR está localizado no braço longo do cromossomo cinco (5q31), que está constituído de cerca de 140.000 pares de base (pb), e é composto por 9 exons (HOLLENBERG, 1985). O GR é um produto da tradução alternativa que resulta na produção das formas GR α e GR β (YUDD; CIDLOWSKI, 2001). Um *splicing* alternativo do exon 9 α produz o RNAm do GR α que é traduzido em uma proteína com uma única sequência de 50 aminoácidos na sua extremidade carboxiterminal

e possui a forma bioativa do receptor. Outro *splicing* alternativo, no exon 9 β , produz o RNAm do GR β . Ambas as isoformas são idênticas ao longo dos primeiros 727 aminoácidos, porém se diferem na sua extremidade carboxiterminal (OAKLEY; SAR; CIDLOWSKI, 1995). O GR α pode atuar como homodímero e se ligar em sequências específicas de genes responsivos ao GC na dupla fita de DNA e sua dimerização é necessária para a ativação da expressão gênica (HECK, et al., 1994). Embora o GR β também forme homodímeros que interagem com GREs no DNA ele não é capaz de modular a transcrição gênica (HOLLENBERG, 1985; LU; CIDLOWSKI, 2004). Além disso, o GR β pode formar heterodímero com GR α e interferir com a função do GR α (PUJOLS et al., 2001). As concentrações relativas de GR α e GR β nas células podem influenciar na sensibilidade das células para o GC, com maiores concentrações de GR β levando a resistência aos GCs. As citocinas pró-inflamatórias como o fator α de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina (IL)-1 podem suprarregular as concentrações de GR β e promoverem o aumento do processo inflamatório (WEBSTER et al., 2001; TORREGO et al., 2004) .

1.3 USO CLÍNICO DOS GLICOCORTICOIDES E EFEITOS COLATERAIS

Alguns fármacos apresentam atividade GC, como por exemplo, a prednisolona, prednisona (precursor de prednisolona) e dexametasona. Esses fármacos diferem dos GCs endógenos devido a maior potência e diferenças na depuração metabólica (WEINSTEIN, 2012). Dentre os derivados sintéticos, a dexametasona está entre os compostos com

atividade GC mais utilizados, apresentando afinidade 50 vezes superior ao GR em relação ao próprio cortisol (SCHÄCKE; DOCKE; ASADULLAH, 2002). Ao contrário do cortisol, a dexametasona não está susceptível a inativação pela enzima 11β -HSD2 lhe garantindo, assim, maior biodisponibilidade. Esses fármacos também circulam livremente, sem interação com proteínas plasmáticas, que permite menor fluutuabilidade nas concentrações plasmáticas (WEINSTEIN et al., 2012).

A administração de dexametasona é indicada para diversos fins terapêuticos, como na supressão da inflamação (SCHÄCKE; DOCKE; ASADULLAH, 2002; CZOCK et al., 2005) e atenuação da êmese associada a quimioterapia (MARANZANO et al., 2005), além disso, é o fármaco mais eficaz para o tratamento das manifestações clínicas da artrite reumatoide (SCHÄCKE; DOCKE; ASADULLAH, 2002). Os GCs são em muitos casos a primeira opção não cirúrgica para tratamento de dor e inflamação musculoesquelética, inflamações oculares, dermatológicas e articulares (FUENFER et al., 1975; GARBE et al., 1997).

Os efeitos colaterais pelo uso agudo dos GCs não representam problemas significativos à saúde; porém, os efeitos adversos decorrentes de terapias de longo prazo ou por administração de doses suprafarmacológicas devem ser observados com cautela (THOMAS, 1984). Portanto, administração crônica de GC pode acarretar em atrofia muscular (PRELOVSEK et al., 2006), hiperfagia (DEBONS et al., 1986), hipertensão arterial sistêmica, osteoporose, crescimento retardado em crianças (DAVIS, 1986; RHEN et al., 2005), aumento da deposição de gordura central (DAVIS, 1986; KORACH-ANDRÉ et al., 2005)

dislipidemia (DAVIS, 1986) e distúrbios metabólicos como a resistência periférica à insulina (RI) KORACH-ANDRÉ et al., 2005; BURÉN et al., 2008; RAFACHO et al., 2008a).

1.4 SINALIZAÇÃO INSULÍNICA

A insulina é o principal hormônio que controla a homeostase glicêmica. Isso se dá através da estimulação da captação de glicose em tecidos periféricos, como por exemplo, no músculo esquelético (ME) e no TAB bem como pela supressão da gliconeogênese hepática (WHITE; KAHN, 1994). Além dos efeitos largamente conhecidos da insulina sobre tecidos periféricos insulinoresponsivos (ME, TAB e hepático) a insulina regula inúmeros processos metabólicos em praticamente todos os tecidos do organismo (WHITE; KAHN, 1994).

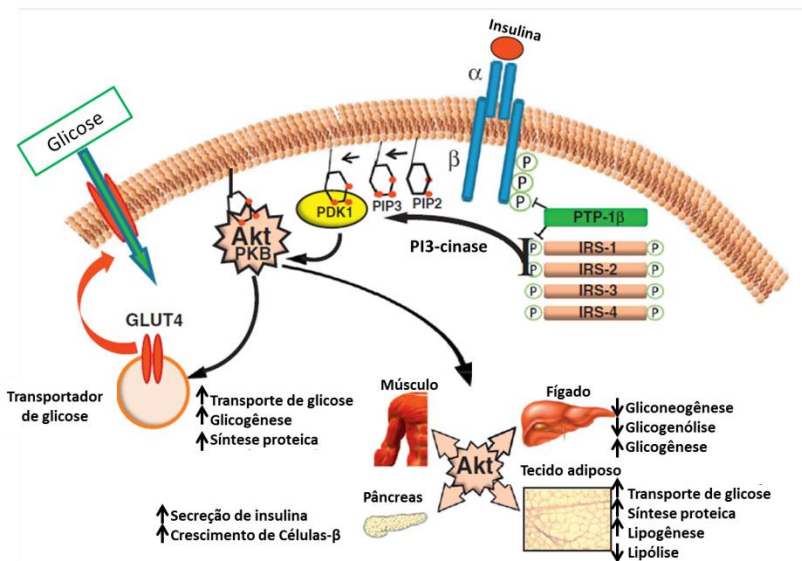
1.4.1 Mecanismo de sinalização da insulina

O receptor da insulina (IR) é uma proteína heterotetramérica com atividade cinase intrínseca, composta por duas subunidades α e duas subunidades β , unidas por pontes dissulfeto. A subunidade α contém o domínio de ligação da insulina, enquanto que a subunidade β possui uma atividade tirosina cinase estimulada quando ocorre a associação da insulina com o IR (BECKER; ROTH, 1990; CHEATHAM; KAHN, 1995). A insulina inicia seus efeitos metabólicos e anabólicos ao se ligar à subunidade α do IR (KASUGA, 1982; ROSEN, 1987). Na ausência da insulina a subunidade α do IR exerce influencia inibitória tônica sobre a porção intracelular contendo a atividade tirosina cinase da subunidade β . Quando a insulina se liga em

regiões específicas da subunidade α , ocorre rápida mudança conformacional do receptor que resulta na ativação do domínio tirosina cinase na subunidade β (SHOELSON; WHITE; KAHN, 1988; GUSTAFSON; RUTTER, 1990). Esse evento resulta na autofosforilação de pelo menos seis resíduos de tirosina da subunidade β , aumentando de forma progressiva a atividade tirosina cinase do IR para outros substratos proteicos. Ativado, o IR promove a fosforilação, em resíduos tirosina, de proteínas citoplasmáticas ancoradas ao mesmo, denominadas de substrato do receptor de insulina (IRS)-1 (WHITE; KAHN, 1994). O IRS-1 fosforilado associa-se a subunidade regulatória p85 da Pi3K (SALTIEL; PESSIN, 2002). Essa enzima possui ainda uma subunidade catalítica, p110, que catalisa a fosforilação de fosfoinosítois (PI) na posição 3 do anel de inositol, produzindo o segundo mensageiro fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PI(3,4,5)P₃), o qual recruta a proteína cinase dependente de inosítois 1 (PDK)-1 para as proximidades da membrana plasmática (WHITE; KAHN, 1994). A PDK1 fosforila o resíduo treonina 308 da Akt e ativa também isoformas atípicas da proteína cinase C (PKC), (PKC λ/ϵ) (CHOU et al., 1998; LE GOOG et al., 1998; BAYASCAS, 2008). Para se tornar completamente ativa, a Akt requer uma segunda fosforilação no resíduo serina 473, realizada pelo complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC2) (SARBASSOV; ALI; SABATINI, 2005; TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006). A Akt ativa, por sua vez, fosforila e inativa a cinase da glicogênio sintase 3 (GSK-3) levando a ativação da glicogênio sintase (GS) e consequente síntese de glicogênio (COHE; ALESSI; CROSS, 1997). Além disso, a ativação da Akt também regula o transporte da glicose estimulado pela insulina através da estimulação da incorporação

do transportador de glicose tipo 4 (GLUT)-4 na membrana celular (SALTIEL; KAHN, 2001) (Figura 4).

Figura 4 – Simplificação da via de sinalização da insulina e seu efeito em tecidos responsivos (TAB, hepático e ME).



Adaptado de CAPURSO; CAPURSO, 2012.

1.5 EFEITOS DIABETOGÊNICOS DOS GLICOCORTICÓIDES

A insulina desempenha papel chave no metabolismo da glicose no ME e no TAB por estimular a captação da glicose via translocação de GLUT-4 a partir das vesículas intracelulares para a membrana celular (BURÉN et al., 2008). Os efeitos adversos dos GCs sobre a sensibilidade periférica à insulina são conhecidos desde longa data. A hipercortisolemia está associada ao aumento da gliconeogênese

hepática, diminuição do transporte e da captação periférica de glicose, assim como redução da síntese e aumento da degradação proteica muscular (OLEFSKY; 1975; RANNELS; JEFFERSON, 1980; AMATRUDA; LIVINGSTON; LOCKWOOD, 1985).

Para doses farmacológicas e/ou exposição aguda de GC, a elevação na secreção de insulina é suficiente para impedir qualquer desarranjo na homeostase da glicose, porém, diversos estudos demonstram a incapacidade das células β de compensarem as demandas metabólicas ao longo de tratamentos prolongados e/ou com dose elevadas de GC (SAAD et al., 1993; BURÉN et al., 2008; RAFACHO et al., 2008a).

Burén et al., (2002) em estudos realizados com adipócitos isolados de ratos e incubados por 24 h na presença de glicose (5 ou 15mM) e/ou insulina com ou sem adição de GC (300 nM dexametasona), demonstraram que a ligação da insulina ao seu receptor ficou reduzida por cerca de 40% após o tratamento com dexametasona, independente das concentrações de glicose. Porém, este e outros estudos *in vitro* demonstram que eventos pós-receptores são os principais responsáveis pela RI induzida pela dexametasona. Neste mesmo estudo foi observado que o GC reduziu de forma marcante a captação de glicose pelas células após estímulo com insulina em ambas as concentrações de glicose (BURÉN et al., 2002). Em relação às proteínas envolvidas na sinalização insulínica, o tratamento com GC promoveu redução significativa do conteúdo total de IRS-1. O estudo também revelou redução do conteúdo da Pi3K bem como redução marcante do conteúdo de Akt fosforilada após estímulo com insulina (BURÉN et al., 2002). No mesmo sentido, mioblastos C2C12 incubados na presença de

1 μ M de dexametasona por 72 h tiveram redução da fosforilação no resíduo serina 473 da Akt, no resíduo treonina 389 da S6K e aumento da fosforilação no resíduo serina 307 do IRS-1 (KUO et al. 2012)

Através de estudos *in vivo* foi demonstrado que a administração de 1 mg de dexametasona por 5 dias (SAAD et al., 1993), 11 dias (BURÉN et al., 2008) ou 12 dias (RUZZIN; WAGMAN; JENSEN 2005) em ratos resulta em desenvolvimento de RI associada a hiperinsulinemia e dislipidemia, acompanhada ou não por hiperglicemia. O impacto da dexametasona sobre a sinalização insulínica foi diversificado sobre os tecidos insulino-responsivos.

Em TAB foi observado redução da captação de glicose basal e estimulada pela insulina e aumento na lipólise estimulada por 8-bromo adenosina monofosfato cíclico (AMPC) em adipócitos de ratos tratados com dexametasona onde a insulina foi menos eficaz em inibir tal efeito (BURÉN et al., 2008). Estes autores também encontraram redução no conteúdo total e fosforilado (serina 473 e treonina 308) da Akt bem como redução do conteúdo total da GS. A redução da fosforilação do IRS-1 e do IRS-2, bem como da proteína cinase Akt após estímulo com insulina *in vivo* também foi demonstrada em TAB de ratos tratados com dexametasona por outro grupo de pesquisa (CAPERUTO et al. 2006). Saad et al. (1999) mostraram redução no conteúdo proteico de IRS-1 e Pi3K em ME de ratos após tratamento com dexametasona. Este estudo não revelou alterações na fosforilação do IRS-1, mas demonstrou redução significativa na associação entre IRS-1 e Pi3K estimulada pela insulina. No mesmo sentido, tratamento com dexametasona resultou em redução da captação da glicose estimulada por insulina em ME de ratos (RUZZIN; WAGMAN; JENSEN 2005; BURÉN et al., 2008). Esses

achados ocorreram em paralelo com a redução da fosforilação da Akt e da GSK-3 estimuladas pela insulina. Em tecido hepático é sabido que o tratamento com dexametasona está associado à redução da fosforilação do IRS-1 e da atividade da Pi3K (SAAD et al., 1993). Em resumo, os efeitos diretos e indiretos da dexametasona sobre a sinalização insulínica em tecidos insulino-sensíveis estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Efeitos *in vitro* e *in vivo* da dexametasona sobre proteínas da sinalização insulínica em cultivos celulares e tecidos periféricos de ratos.

GC	Condição	Dose	Evento pós-receptor	Referência
DEX	<i>ip</i> <i>in vivo</i>	1 mg/kg p.c 5 dias consecutivos	Redução da fosforilação em tirosina do IRS-1 e da associação do complexo IRS-1/Pi3K	SAAD et al., 1993
DEX	adipócitos <i>in vitro</i>	300µM 24 horas	Redução do conteúdo total do IRS-1, aumento do IRS-2, redução da Pi3K e da fosforilação em serina da Akt	BURÉN et al., 2002
DEX	<i>ip</i> <i>in vivo</i>	1 mg/kg p.c 12 dias consecutivos	Redução da fosforilação em serina/treonina da Akt e do conteúdo de GSK-3 e aumento da p85α em ME	RUZZIN; WAGMAN; JENSEN, 2005
DEX	<i>ip</i> <i>in vivo</i>	1 mg/kg p.c 5 dias consecutivos	Redução do conteúdo total e a fosforilado em tirosina do IRS-1 e IRS-2 e da Akt	CAPERUTO et al., 2006
DEX	<i>ip</i> <i>in vivo</i>	1 mg/kg p.c 11 dias consecutivos	Redução do conteúdo total e fosforilado em serina/treonina da Akt estimulado por insulina em ME	BURÉN et al., 2008
DEX	<i>células</i> <i>C2C12</i> <i>in vitro</i>	1µM 24 horas	Redução do conteúdo total do IRS-1, aumento da fosforilação em serina do IRS-1 e Redução da fosforilação em serina da Akt	MORGAN et al., 2009
DEX	<i>células</i> <i>C2C12</i> <i>in vitro</i>	1µM 72 horas	Redução da fosforilação em serina da Akt em treonina da S6K e aumento da fosforilação em serina do IRS-1 e do conteúdo de p85α	KUO et al., 2012

p.c. peso corpóreo; ip. intraperitoneal.

1.6 RESISTÊNCIA À INSULINA NA CLÍNICA

A RI é um estado clínico no qual uma dada concentração de insulina produz uma resposta biológica atenuada (HUNTER; GARVEY, 1998). Tal anormalidade ocorre por uma redução na ação da insulina em tecidos periféricos sensíveis à insulina como o tecido hepático, muscular e adiposo (REAVEN, 1988). Em condições de RI, a captação da glicose estimulada pela insulina nos tecidos muscular e adiposo encontra-se diminuída (FORMIGUEIRA; CANTON, 2004). Por mecanismos não totalmente esclarecidos, o pâncreas aumenta sua capacidade secretória a fim de manter a homeostase glicêmica. Dessa forma, instala-se um quadro de normoglicemia associada à hiperinsulinemia (SALTIEL; KAHN, 2001).

Embora os mecanismos responsáveis pela RI ainda não sejam completamente compreendidos, alguns estudos relacionam a obesidade com respostas inflamatórias sistêmicas de baixo grau, também conhecida como inflamação metabólica ou metainflamação, que é diferente de uma resposta inflamatória aguda (KALUPAHANA; MOUSTAID-MOUSSA; CLAYCOMBE, 2012; ROMEO; LEE; SHOELSON, 2012). Algumas evidências têm mostrado que o aumento na atividade de vias pró-inflamatórias intracelulares podem levar a RI na obesidade. Quimiocinas e citocinas como a CCL2, IL-6, IL-1 β e TNF- α podem ser secretadas por adipócitos e macrófagos (HALBERG; WERNSTEDT-ASTERHOLM; SCHERE, 2008; OLEFSKY; GLASS, 2010). Nesse sentido, concentrações aumentadas de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 têm sido observadas em indivíduos com RI e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (TAJIRI; MIMURA; UMEDA, 2005). Os efeitos negativos desencadeados pela elevação das

concentrações circulantes de TNF- α podem ser comprovados a partir da neutralização de TNF- α em roedores obesos, acarretando em melhora da sensibilidade à insulina nesses animais (HOTAMISLIGIL et al., 2005).

Já existem evidências de que as citocinas como TNF- α , IL-6, IL-1 β entre outras, exercem efeitos parácrinos no microambiente do TAB que resulta na ativação de vias de transdução de sinais pró-inflamatórias nos adipócitos. Isto resulta na ativação das cinases c-jun N-terminal (JNK) e a cinase do I κ B (IKK β) entre outras serinas-cinases. Em condições de RI, a sinalização da JNK1 (HIROSUMI, 2002; BANDYOPADHYAY; 2005) e IKK β (HOTAMISLIGIL et al., 2005; ITANI, 2002) são suprarreguladas no tecido muscular esquelético, no TAB, além de outros tecidos em humanos e roedores (HOTAMISLIGIL, 2003). Essas serinas-cinases ativam fatores de transcrição alvos como o AP1, c-Jun/Fos e o complexo NF- κ B, que então estimulam a transcrição de um conjunto de genes envolvidos com respostas inflamatórias (NGUYEN et al., 2007). A JNK e a IKK β também podem fosforilar o IRS-1 em serina e possivelmente outras moléculas da via insulínica levando à atenuação dos efeitos da insulina para o tecido acometido e, dependendo da cronicidade do evento, interferem continuamente na sensibilidade à insulina (KANETY et al., 1995; SETHI; HOTAMISLIGIL, 1999; YUAN et al., 2001; TUNCMAN et al., 2006).

De fato, modelos experimentais de obesidade induzida por dieta ou por alterações genéticas (camundongo *ob/ob*) demonstram associação entre obesidade e elevação do conteúdo de JNK1 em TAB, ME e fígado. Ausência da JNK1 protege estes animais da RI induzida pela obesidade evidenciando o papel crucial JNK1 neste processo (HIROSUMI et al.,

2002). Ablação da enzima Ikbkb, que codifica o IKK β em hepatócitos, resulta em manutenção parcial da sensibilidade à insulina no fígado, mas não em ME e TAB, em resposta a dieta hiperlipídica, obesidade e envelhecimento. Esses achados demonstram o papel importante da IKK β hepática na sensibilidade à insulina (ARKAN et al., 2005).

Dentre os possíveis fatores causais da ativação da via inflamatória destacam-se ainda, os ácidos graxos saturados (AGS) (SOLINAS et al, 2006). Evidências sugerem que ácidos graxos, que normalmente estão com concentrações circulantes elevadas na obesidade e doenças associadas, podem exercer um papel no desenvolvimento da RI no ME, (HIRABARA; CURI; MAECHLER, 2010) e TAB (SHI et al., 2006). Os ácidos graxos podem se acumular no citosol de miócitos, denominado gordura intramiocelular. Os ácidos graxos acumulam-se principalmente na forma de acil-CoA de cadeia longa, monoacilglicerol, diacilglicerol, ácido fosfatídico, triacilglicerol e ceramidas e em algumas condições parecem estar diretamente relacionado com a RI (SCHMITZ-PEIFFER, 2000; COONEY et al., 2002; NAGLE; KLETT; COLEMAN, 2009). Especificamente os ácidos graxos de cadeia longa palmítico e esteárico parecem desempenhar efeitos negativos sobre a sensibilidade muscular à insulina (YUZEFOVYCH; WILSON; RACHEK, 2010).

Diversos mecanismos têm sido propostos como responsáveis pela inibição da sinalização insulínica induzida por AGS, incluindo a ativação de várias cinases, como PKCs, IKK β , JNK, e MAPK (PAZ et al., 1997; ZHANDE et al., 2002). Evidências recentes sugerem que tanto AGS provenientes da dieta, como os endógenos ativam a sinalização inflamatória diretamente através da interação com membros da família

do receptor do tipo *toll like* (TLR), como o TLR-4 (HUANG et al., 2012). Neste sentido, o TLR-4 pode estar envolvido no desenvolvimento da RI induzida por dieta hiperlipídica (SHI et al., 2006). Adicionalmente, os AGS podem agir indiretamente na instalação da RI através da mediação da secreção de citocinas, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (HOTAMISLIGIL, 2006; WEN et al., 2011), mostrando que demais vias estão envolvidas na RI induzida por AGS. Quando ativado, o TLR-4 promove a ativação de proteínas cinases intracelulares como a JNK e IKK β que estão associadas com a atenuação da sinalização insulínica devido a fosforilação em resíduos de serina do IRS-1 e inibição da sua fosforilação em tirosina pelo receptor de insulina como descrito anteriormente (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; HOTAMISLIGIL, 2008).

1.7 JUSTIFICATIVA

É sabido que a atenuação dos sinais pós-receptores que ocorrem na sinalização insulínica em indivíduos obesos e/ou DM2 são similares, em diversos aspectos, aos que ocorre após tratamentos crônicos e/ou a exposição a doses elevadas de GC. Por exemplo, redução da fosforilação em tirosina do IRS-1, da fosforilação em serina/treonina da Akt e do acoplamento IRS-1/Pi3K estão entre as principais modificações moleculares na RI, seja na condição de obesidade ou após administração crônica de dexametasona (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; SAAD et al., 1993; SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006; BURÉN et al., 2008). Também são bem conhecidos, como descritos anteriormente, os efeitos negativos que a via inflamatória pode exercer sobre o grau de fosforilação das proteínas chaves da via insulínica na condição de obesidade (ITANI, 2002; HIROSUMI, 2002; BANDYOPADHYAY, 2005; HOTAMISLIGIL et al., 2005). Partindo deste pressuposto buscamos, dentre outras questões que serão apresentadas a seguir, verificar se haveriam alterações significantes no conteúdo e no grau de fosforilação de proteínas pró-inflamatórias chaves em TAB de ratos tratados com dexametasona.

Ao passo que a administração/exposição à dexametasona possa promover atenuação da sensibilidade periférica à insulina, também está bem estabelecido que seus efeitos anti-inflamatórios inclui a inibição da transcrição gênica de componentes pró-inflamatórios e, por conseguinte, redução na secreção de citocinas pró-inflamatórias para os tecidos responsivos aos GCS, como, por exemplo, o TAB (BARNES, 1998; KREINER; GALBO, 2010). Assim, pelo julgamento óbvio, se esperaria uma redução nas concentrações circulantes de citocinas pró-

inflamatórias em indivíduos submetidos à terapia a base de GCs. Esse aspecto, contudo, ainda não está completamente estabelecido em nosso modelo. Não há nenhuma associação entre citocinas circulantes e sensibilidade periférica à insulina em ratos tratados com dexametasona; aspecto que tentaremos elucidar.

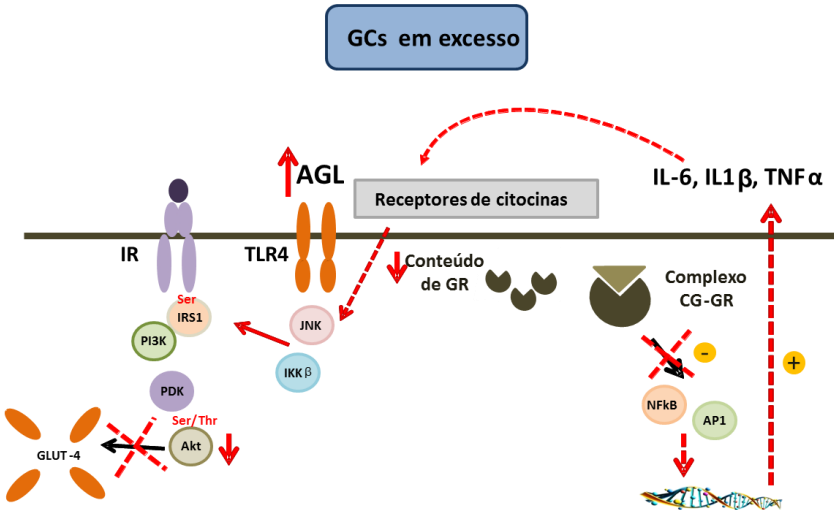
Ademais, não sabemos se o tratamento prolongado com GCs pode resultar de fato em redução do conteúdo de GR em tecidos periféricos, mecanismo fisiológico denominado de infra-regulação e que regula a responsividade a um dado hormônio de acordo com a concentração circulante deste. Algumas evidências apontam para a redução do conteúdo de GR após exposição a concentrações elevadas de GCs em várias linhagens celulares (CIDLOWSKI; CIDLOWSKI, 1981; SVEC; RUDIS, 1981) em ratos saudáveis (TORNELLO et al., 1982) e células sanguíneas de voluntários humanos (SCHLECHTE; GINSBERG; SHERMAN, 1982; SHIPMAN et al., 1983). Dependendo da intensidade da infra-regulação é possível observar diminuição do efeito biológico ao dado hormônio (SEIGLER; SVEC, 1984; MCINTYRE; SAMUELS, 1985). Deste modo hipotetizamos que os animais tratados com dexametasona poderiam apresentar redução do conteúdo de GR e, por sua vez, atenuação de seus efeitos inibitórios sobre os fatores de transcrição pró-inflamatórios, que levariam ao aumento da transativação dos genes regulados por esses fatores na circulação, como a JNK e o IKK β além das interleucinas IL-6, IL1 β e TNF α . Se isto se confirmar, teriam estes últimos alguma influência sobre a sinalização insulínica? Teria também, a concentração elevada de ácidos graxos livres (AGLs) nestes ratos submetidos ao tratamento com dexametasona, algum efeito

sobre a via pró-inflamatória, dada a regulação dos TLR-4 pelos AGLs (HUSSEY et al., 2012)?

Também cabe ressaltar que em algumas condições de RI, como observado na obesidade e na síndrome metabólica, há aumento dos efeitos dos GCs sem que haja aumento das concentrações circulantes destes (MORGAN et al., 2009). Isso pode ser explicado pelo aumento da atividade da enzima 11β -HSD1, uma vez que a insulina é um importante inibidor da sua expressão (HAMMAMI; SIITERI, 1991). O aumento da atividade desta enzima pode influenciar nos efeitos negativos dos GCs sobre a ação da insulina (PATERSON, 2004) e sua quantificação ainda não foi verificada no TAB do presente modelo experimental.

Em suma, propomos um esquema com base em nossas hipóteses como pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 - Hipótese da resistência à insulina induzida por glicocorticoides.



O excesso de GCs promoveria o aumento de AGL na circulação por consequência do aumento da atividade lipolítica no tecido adiposo. Os AGLs, por sua vez, se ligariam a receptores que incluiriam os TLR-4 e interfeririam negativamente sobre a sinalização insulínica por ativação das cinases JNK e IKK β que poderiam resultar na fosforilação em serina de proteínas como IRS-1, Akt, entre outras. Como resultado, por exemplo, poderia ser observada redução na captação de glicose acoplada a insulina por esta célula. Além disso, o excesso de GC poderia promover a infra-regulação do conteúdo de GR, que reduziria o efeito supressor do complexo GC-GR sobre os fatores de transcrição NF κ B e AP1 e causaria aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL1 β e TNF- α . Estas citocinas se ligariam em seus receptores específicos e contribuiriam para o desenvolvimento da resistência à insulina periférica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o conteúdo total e fosforilado de proteínas chaves envolvidas nas vias de sinalização insulínica e inflamatória, bem como o conteúdo do receptor de glicocorticoide em tecido adiposo epididimário de ratos tratados com dexametasona.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinação de parâmetros metabólicos para caracterização do modelo experimental tais como:

- 1- peso corpóreo e consumo de ração;
- 2- concentração de glicose sanguínea e de insulina, triacilglicerol e lactato plasmáticos de jejum;
- 3- tolerância à glicose, insulina e ao piruvato;

Determinação de parâmetros moleculares para avaliação de possíveis fatores envolvidos na RI induzida pelo tratamento com a dexametasona:

- 4- concentrações de adipocitocinas envolvidas com respostas anti- ou pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10) em jejum;
- 5- conteúdo total das proteínas GR, TLR-4 e 11 β -HSD1 em TAB;
- 6- conteúdo total e fosforilado das proteínas IRS-1, PKB/Akt, IKK β , JNK e NF κ B em TAB.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos desse estudo foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e devidamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – protocolo n° PP00782.

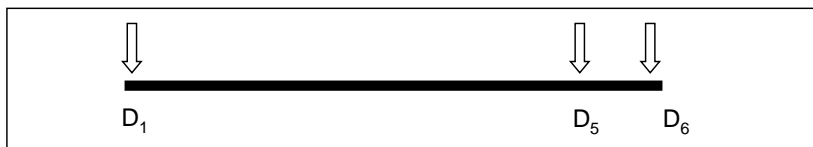
3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar com 3 meses de idade, provenientes do Biotério Central da UFSC, localizado no Campus Trindade, Florianópolis, SC. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com 5 animais em cada caixa e em ambiente com temperatura controlada ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) em ciclo de iluminação claro-escuro (iluminado entre 06:00:18:00), com livre acesso à comida e água.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em grupo controle (CTL) - ratos tratados com solução NaCl 0,9% (1ml/kg, peso corpóreo, i.p.) e grupo dexametasona (DEX) - ratos tratados com fosfato de dexametasona (Decadron[®], Aché, Campinas, SP, Brasil; 1 mg/kg peso corpóreo (p.c), intraperitonealmente (i.p) por cinco dias consecutivos entre 07:30-08:30 (Figura 6), sendo que cada grupo experimental contou com “n” de 6-7 animais.

Figura 6 - Período de administração de dexametasona ou solução salina em grupos DEX e CTL, respectivamente.



D₁: Início do tratamento, D₅: Fim do tratamento, D₆: Eutanásia. Início do tratamento ocorreu por volta dos 90 dias de vida.

3.3 PARÂMETROS METABÓLICOS

3.3.1 Peso corpóreo

A verificação do peso corpóreo foi acompanhada diariamente a partir de 2 dias antecedentes ao início das injeções intraperitoneais até o dia posterior ao quinto dia de tratamento (dia da eutanásia) em balança eletrônica digital (TECNAL; Piracicaba, SP, Brasil).

3.3.2 Consumo de ração

O consumo de ração foi acompanhado diariamente como descrito para o peso corpóreo. A determinação foi realizada através da pesagem da ração remanescente (não ingerida) descontada do total daquela depositada no dia anterior. A diferença representa a quantidade ingerida por gaiola diariamente. A quantidade média de ração ingerida por animal foi obtida através da divisão da massa total de ração ingerida pelo número de animais contidos por gaiola. Os resultados foram expressos em gramas de ração ingeridos por quilo de peso corpóreo.

3.3.3 Glicose sanguínea

A glicemia foi quantificada após jejum (12-14 h) através do sistema de fitas (monitor digital) “Accu-CheckPerforma” (ROCHE; Jaguaré, SP, Brasil). Após pequena secção da ponta da cauda, foi descartada a primeira gota de sangue e a segunda gota de sangue obtida foi utilizada para determinação da glicemia.

3.3.4 Componentes plasmáticos

Imediatamente após a eutanásia dos animais (jejum de 12–14 h), que se procedeu por exposição à CO₂, seguido por decapitação, o sangue do tronco foi coletado em tubo de ensaio de vidro, previamente lavado em solução salina, contendo anticoagulante NaF (Glistab – Labtest; Lagoa Santa, MG, Brasil). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 400 x g por 10 min a 21°C (Eppendorf 5804R) e o plasma foi aliquoteado e armazenado a -20°C ou -80°C para posterior quantificação da insulina (Sistema de micro esferas, Alpha Technology – PerkinElmer), triacilglicerol e lactato (espectrofotometria em leitor de placas) de acordo com instruções dos fabricantes (Biotécnica[®]; Varginha, MG, Brasil).

3.3.5 Avaliação da sensibilidade à insulina pelo modelo de análise homeostática (HOMA) e índice TyG

O HOMA foi calculado a partir da fórmula: [glicemia de jejum (mM) x insulinemia de jejum (μIU/mL)]/22.5 (MATTHEWS et al., 1985). O TyG, cálculo alternativo recentemente proposto para verificação da sensibilidade periférica à insulina, foi definido a partir da

fórmula $\text{Ln}[(\text{triacilgliceridemia de jejum (mg/dL)} \times \text{glicemia de jejum (mg/dL)})/2]$ (GUERRERO-ROMERO et al., 2010).

3.3.6 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT)

O ipGTT foi realizado em grupo separado de ratos em jejum (12-14 h) sem uso de anestesia. Os animais tiveram a ponta da cauda seccionada para a coleta de 2 gotas de sangue. A primeira gota foi descartada e a segunda utilizada para determinação da glicemia no tempo 0. Imediatamente, foi injetada solução de D -glicose 50% a 36°C (2g/kg de peso corpóreo) e amostras de sangue foram posteriormente coletadas aos 30, 60 e 90 minutos para determinação das concentrações de glicose sanguínea. (RAFACHO et al., 2008).

3.3.7 Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT)

O ipITT foi realizado em grupo separado de ratos alimentados. A glicemia basal (min 0) foi obtida como descrito previamente no ipGTT. Imediatamente, receberam injeção intraperitoneal de insulina humana recombinante (Biohulin®; Contagem, MG, Brasil) equivalente a 2 IU/kg de peso corpóreo. Amostras de sangue foram coletadas para determinação da glicemia nos tempos 10, 20, 30 e 45 min. A constante de decaimento da glicose sanguínea (K_{ITT}) foi calculada a partir do “slope” da linha de regressão obtida com valores de glicose log-transformados entre 0 e 45min.

3.3.8 Teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal (ipPTT)

O ipGTT foi realizado em grupo separado de ratos em jejum (12-14 h) sem uso de anestesia. A glicemia basal (min 0) foi obtida como descrito previamente. Imediatamente, foi injetada solução de piruvato 25% a 36°C (1,5g/kg de peso corpóreo) e amostras de sangue foram posteriormente coletadas aos 30, 60, 120 e 150 minutos para determinação das concentrações de glicose sanguínea.

3.3.9 Glicogênio hepático

Para determinação do glicogênio hepático, amostras de fígado (300 a 500mg) foram transferidas para tubos de centrífuga contendo KOH 30% e fervidas por 1 h para completa digestão. Em seguida, foi adicionado Na₂SO₄ e o glicogênio foi precipitado com etanol submetido ao banho-maria por aproximadamente 15 seg. As amostras foram centrifugadas a 800 x g por 10 min, o sobrenadante contendo lípides saponificados, aminoácidos, etc, foi descartado e o 'pellet' ressuspenso em água destilada quente. Etanol foi adicionado em seguida, o material foi homogeneizado e levado rapidamente ao banho-maria, e as amostras foram conduzidas novamente a centrifugação. Após diluição do precipitado em 25 ml de água destilada quente o conteúdo do glicogênio foi quantificado por espectrofotometria em reação com reagente fenol e H₂SO₄. A absorbância foi determinada a 490 nm (RAFACHO et al. 2008b).

3.4 LIPÓLISE

Optou-se por utilizar TAB epididimário no presente estudo em função da demonstração de que o TAB epididimário em roedores é mais sensível aos efeitos lipolíticos das catecolaminas em comparação ao TAB subcutâneo (HARTMAN; CHRIST, 1978; PORTILLO et al., 2000). A taxa de lipólise do tecido adiposo foi analisada por incubação de fragmentos deste tecido e avaliação da liberação do glicerol ao meio de incubação (VAUGHAN; 1962). Fragmentos de tecido adiposo epididimário (100mg) foram incubados em tampão de Krebs aerado com carbogênio (5% CO₂ e 95% O₂) pH 7.4, contendo albumina de soro bovino (1%) e glicose a 5,6 mM por 1 h a 37°C na presença ou não de 20 µM de isoproterenol. Ao final da incubação, amostras do meio de incubação foram coletadas e mantidas a 4°C. O glicerol foi determinado por um ensaio colorimétrico enzimático de acordo com Bucolo; David, (1973). Resultados foram expressos como microgramas por miligrama de tecido por hora (µg/mg/1h).

3.5 CITOCINAS PLASMÁTICAS

As amostras de plasma foram obtidas como descrito previamente. Aliquotas de 100 µL foram utilizadas para mensurar as concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 através do método de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) de acordo com instruções do fabricante. O comprimento de onda utilizada para quantificação das citocinas foi de 450nm com correção em 540nm.

3.6 EXTRAÇÃO PROTEICA E WESTERN BLOTT

Um terceiro grupo de ratos em jejum recebeu um bolus de glicose 50% a 36°C (2g/kg de peso corpóreo) ou solução salina, 20 minutos antes da eutanásia e os fragmentos dos tecidos (hepático, muscular e adiposo) foram removidos e homogeneizados em solução de lise celular a 4°C (CellSignaling, MA, USA) em ultraturrax (IKA®; Campinas, SP, Brasil) por 3 séries de 15 segundos cada. Posteriormente foram centrifugados a 13.000 x g por 50 min a 4°C (Eppendorf 5804R). A determinação da concentração proteica total do lisado foi realizada pelo método de Bradford, de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad, CA, USA). Alíquotas de proteína total (50 µg) foram fervidas a 100 °C por 4 minutos em 25% do volume em tampão Laemmli (fosfato de sódio 1M pH 7,0, 10% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol). As amostras foram submetidas à eletroforese (Mini Protean II - Bio-Rad) em gel de poliacrilamida 6,5-15%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Santa Cruz Biotechnology) na presença de 20% metanol e 1% SDS em voltagem constante de 120 V por 2 h. O fragmento lisado por cada animal foi considerado como $n=1$. Depois de 2 h de bloqueio em temperatura ambiente, membranas contendo lisado dos tecidos foram lavadas em TBST (solução basal) e incubadas por 14 h com anticorpos primários apropriados a 4°C. As membranas foram incubadas com anticorpos policlonais GR α / β (1:1000), anti-Akt (serina 473) (1:500), anti-Akt total (1:1000), anti-IRS-1 total (1:200), anti-JNK (treonina 183/tirosina 185) (1:750), anti-JNK total (1:200), anti-IKK β α / β (serina 180/181)

(1:100), anti-IKK β α / β total (1:100), anti-TLR-4 (1:200), anti-11 β HSD-1 (1:500), anti-NF κ B total (1:1000) e anti- α -tubulina (1:500) (Santa Cruz Biotechnology). Anti-NF κ Bp65 (serina 536) (1:500) (Cell Signaling) e anti-IRS-1 (serina 307) (1:2000) e anti- β -actina (1:4000) (Abcam). Depois de lavadas em TBST as membranas foram incubadas com anticorpo secundário apropriado em temperatura ambiente. O anticorpo ligado foi detectado por quimioluminescência pelo sistema de fotodocumentação Chemidoc MP (BioRad, CA, USA), como descrito pelo fabricante.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os dados foram organizados e registrados em banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2007[®]. A análise estatística dos dados foi realizada no programa estatístico Graphpadprism v.5.01 (Graphpad Inc.; La Jolla, USA). As variáveis dependentes descritivas foram apresentadas como média e erro padrão da média (E.P.M). O teste “*t*” de Student ou ANOVA de uma via (one-way ANOVA) e ANOVA para medidas repetidas, seguido de post test Tukey, foram aplicados para dados não emparelhados quando os valores passaram pelo teste de normalidade e de homocedasticidade. Em casos de heterocedasticidade, teste “*t*” de Student não emparelhado com correção de Welch ou Mann-Whitney, ou Kruskal-Wallis seguido de post test Dunn foi aplicado para avaliação de dados não paramétricos. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

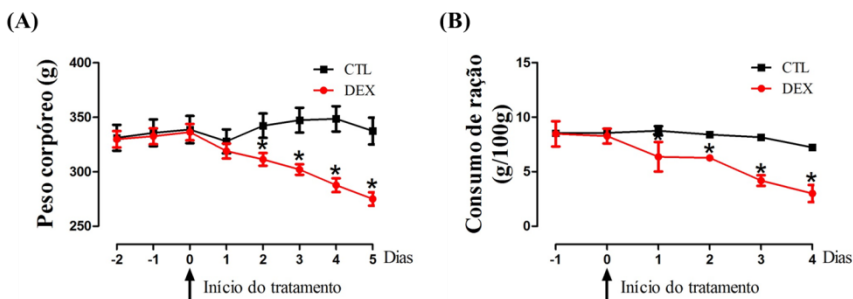
4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

4.1.1 Peso corpóreo e consumo de ração

O peso inicial (identificado como -2 na Figura 7A) dos ratos dos grupos CTL e DEX foram 327 ± 10 g vs. 319 ± 7 g, respectivamente [não significativo (NS)]. Ao final do tratamento (dia 4 na Figura 7A) os pesos corpóreos nos grupos CTL e DEX foram 348 ± 11 g vs. 287 ± 6 g, respectivamente ($p < 0,05$, $n=6$). Ratos tratados com DEX apresentaram redução significativa de 9% da massa corpórea após 48 h de tratamento em comparação ao grupo CTL ($p < 0,05$, $n=6$). Reduções de 13%, 17% e 17% foram observadas nos dias 3, 4 e 5; respectivamente, no grupo DEX em relação ao grupo CTL ($p < 0,05$, $n=6$). Também foi observada redução significativa de 27% no consumo de ração pelo grupo DEX a partir de 24 h do tratamento (Figura 7B; $p < 0,05$, $n=6$). Reduções de 25%, 49% e 58% foram observadas nos dias 2, 3 e 4 respectivamente, em relação aos valores do grupo CTL ($p < 0,05$, $n=6$).

Figura 7 - Tratamento com dexametasona promove redução do peso corpóreo e consumo de ração.



Os ratos DEX tiveram redução significativa do peso corpóreo a partir do terceiro dia de tratamento (A). Do mesmo modo, os ratos DEX apresentaram redução significativa do consumo de ração a partir do segundo dia de tratamento (B). Dados são média \pm EPM. Asterísco (*) indica diferença significativa em relação ao CTL. Teste “*t*” de student foi utilizado, $p < 0,05$, $n = 6$.

4.1.2 Parâmetros plasmáticos e glicogênio hepático

A fim de verificar se o tratamento com dexametasona promoveu alguma alteração na homeostase glicêmica e lipídica, quantificamos os valores de glicose sanguínea bem como de outros parâmetros metabólicos. As concentrações de glicose sanguínea e insulina plasmática em jejum aumentaram significativamente nos ratos DEX em relação ao grupo CTL (Tabela 2; $p < 0,05$, $n = 6$). Os ratos DEX também apresentaram aumento das concentrações plasmáticas de triacilglicerol e de lactato, bem como do conteúdo de glicogênio hepático. A redução da sensibilidade periférica à insulina foi constatada através do cálculo de índice HOMA e TyG (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros sanguíneos e metabólicos em ratos CTL e tratados com DEX após jejum de 12 a 14 horas.

	CTL	DEX	DEX/CTL
Glicemia (mg/dL)	97 ± 5	122 ± 7*	1,25
Insulinemia (ng/mL)	2,0 ± 0,4	12,0 ± 3,0*	6,0
Triacilgliceridemia (mg/dL)	62 ± 7	179 ± 15*	2,9
Lactatemia (mg/dL)	12 ± 1	22 ± 1*	1,8
Glicogênio hepático (mg/100g)	2,0 ± 0,5	7,0 ± 1,0*	3,5
HOMA-IR	11 ± 4	63 ± 21*	9,3
TYG	8,1 ± 0,4	9,1 ± 0,2*	1,1

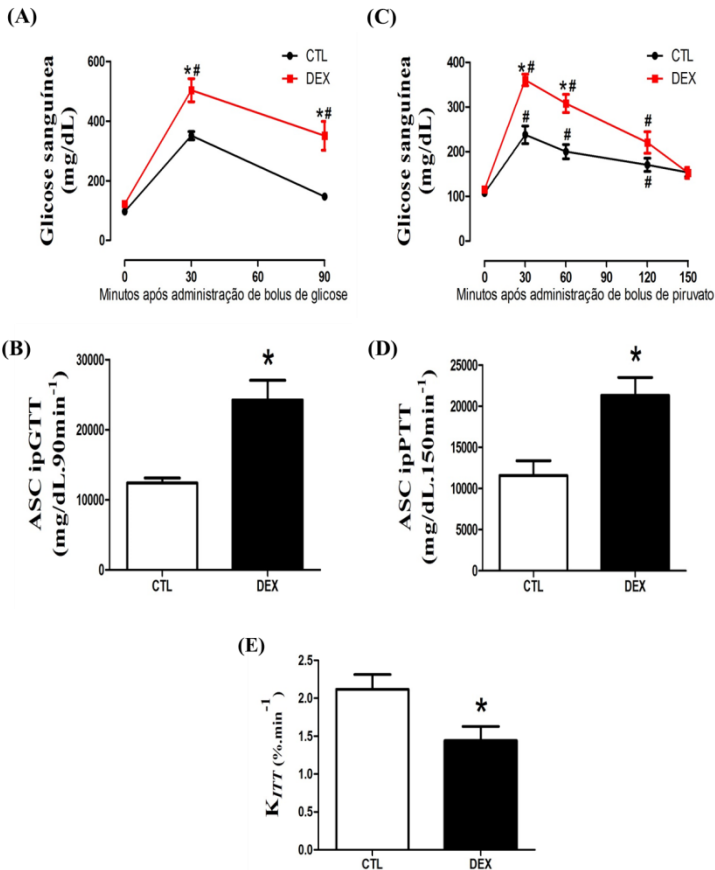
Dados são média ± EPM. Asterísco (*) indica diferença significativa em relação ao CTL. Teste “*t*” de student foi utilizado, $p < 0,05$, $n = 6$.

4.1.3 Tolerância à glicose e sensibilidade periférica à insulina

Com o objetivo de verificar se a hiperglicemia e, especialmente a hiperinsulinemia estão associadas a alguma alteração da tolerância à glicose e sensibilidade periférica à insulina, realizamos os testes de tolerância à glicose, piruvato e insulina, respectivamente. O teste de tolerância à glicose revelou incremento nos valores de glicose sanguínea após desafio de glicose no grupo DEX em relação ao grupo CTL (Figura 8A; $p < 0,05$, $n = 6$). A elevação dos valores glicêmicos persistiu por 90 min após a sobrecarga de glicose intraperitoneal. O grupo DEX apresentou habilidade reduzida para lidar com a glicose em relação ao grupo CTL, como pode ser observado no minuto 90 (146 ± 7 vs. 350 ± 4 mg/dL para CTL e DEX, respectivamente). Os valores da área sob a curva (ASC) da glicose durante o ipGTT foram significativamente maiores no grupo DEX (1,95 vezes) em relação ao grupo CTL (Figura

8B; $p < 0,05$, $n=6$). O teste de tolerância ao piruvato, que prediz o grau de sensibilidade hepática à insulina, revelou aumento expressivo dos valores da glicose sanguínea após a administração de piruvato no grupo DEX em relação ao grupo CTL (Figura 8C; $p < 0,05$, $n=6$). Os valores de ASC da glicose durante o ipPTT foram significativamente maiores no grupo DEX (1,83 vezes) em relação ao grupo CTL (Figura 8D; $p < 0,05$, $n=6$). O teste de tolerância à insulina revelou redução significativa da sensibilidade à insulina, a julgar pela constante de decaimento da glicose. Os valores do K_{ITT} foram $2,1 \pm 0,2$ vs. $1,4 \pm 0,2$ $\% \cdot \text{min}^{-1}$ para CTL e DEX respectivamente) (Figura 8E; $p < 0,05$, $n=6$). Estes dados corroboram os resultados obtidos pelos índices HOMA e TYG.

Figura 8 - Tratamento com dexametasona induz redução na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina.

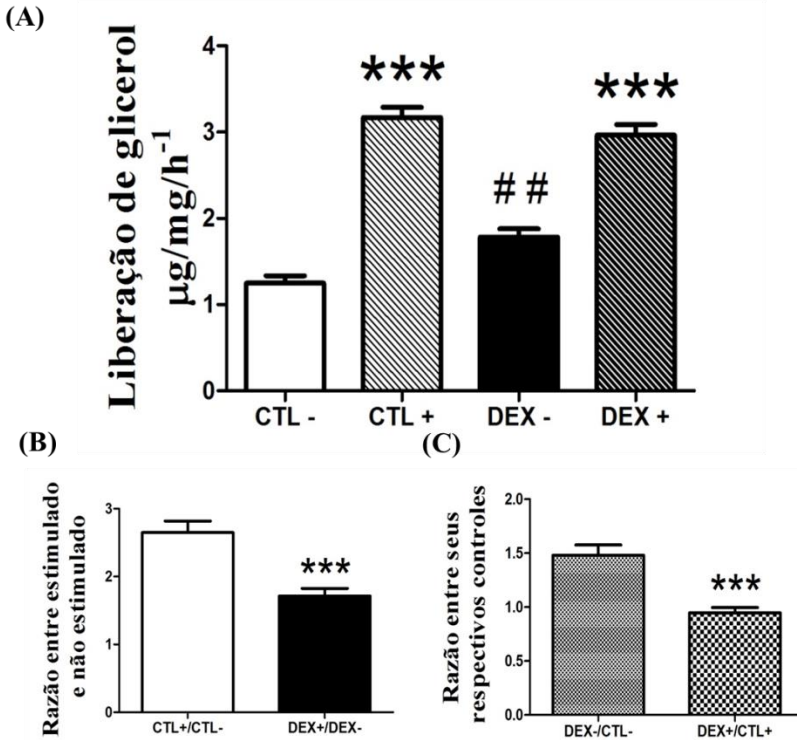


Os ratos DEX apresentaram redução da tolerância à glicose (A). Os valores obtidos pela ASC confirmam a IG nos ratos tratados com DEX (B). Os ratos DEX também apresentaram aumento significativo dos valores de glicose sanguínea após a administração i.p. de piruvato (C). Os valores obtidos pela ASC confirmam o aumento da produção endógena de glicose nos ratos DEX (D). A constante de decaimento glicose sanguínea durante o ipITT (K_{ITT}) mostra redução da sensibilidade periférica à insulina no grupo DEX comparado ao grupo CTL. (E). Dados são média \pm EPM. Asterísco (*) indica diferença significativa em relação ao CTL; Cerquilha (#) indica diferença significativa em relação ao minuto 0. Teste “*p*” de Student foi utilizado, $p < 0,05$, $n = 7$.

4.1.4 Secreção de glicerol estimulada por isoproterenol

A lipólise é um processo exacerbado na condição de RI; assim, para verificar se o TAB está mais ou menos lipolítico, realizamos um ensaio funcional para verificar esse processo *ex vivo*. A Lipólise no TAB (epididimário) foi determinada na presença ou ausência do agonista adrenérgico isoproterenol. A taxa de lipólise basal foi significativamente maior no grupo DEX após 1 h de incubação em relação ao grupo CTL ($1,2 \pm 0,08$ vs. $1,8 \pm 0,09$ $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}$ para CTL e DEX respectivamente) (Figura 9A; $p < 0,05$, $n=12$ fragmentos). Ambos os grupos apresentaram aumento significativo na liberação de glicerol quando estimulados com isoproterenol em relação ao seu estado basal ($p < 0,05$, $n=12$), porém, não houve diferença entre os grupos após estímulo com isoproterenol (Figura 9A; NS). Os valores obtidos a partir da razão entre as condições estimulado e não estimulado foram significativamente menores no grupo DEX em relação ao CTL (Figura 9B, $p < 0,05$, $n=12$), assim como a razão entre o grupo tratado com DEX (estimulado e não estimulado) para os seus respectivos controles (Figura 9C, $p < 0,05$, $n=12$). Estes dados apontam para maior atividade lipolítica no TAB dos ratos DEX durante situações basais.

Figura 9 – Lipólise estimulada por isoproterenol ex vivo em TAB epididimário.



Não foram observadas diferenças na liberação de glicerol entre os grupos quando expostos ao estímulo com isoproterenol; porém, os ratos DEX apresentaram maior liberação de glicerol na condição basal comparado ao CTL (A). A razão obtida entre as condições estimulada pela basal (intragrupo) (B), bem como estimulada/estimulada e basal/basal (entregrupos) (C) mostram redução significativa para o grupo DEX comparado ao grupo CTL. Dados são média \pm EPM. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao CTL, cerquilha (#) indica diferença significativa em relação ao estado basal. Teste “*t*” de Student foi utilizado. $p < 0,05$, $n = 12$.

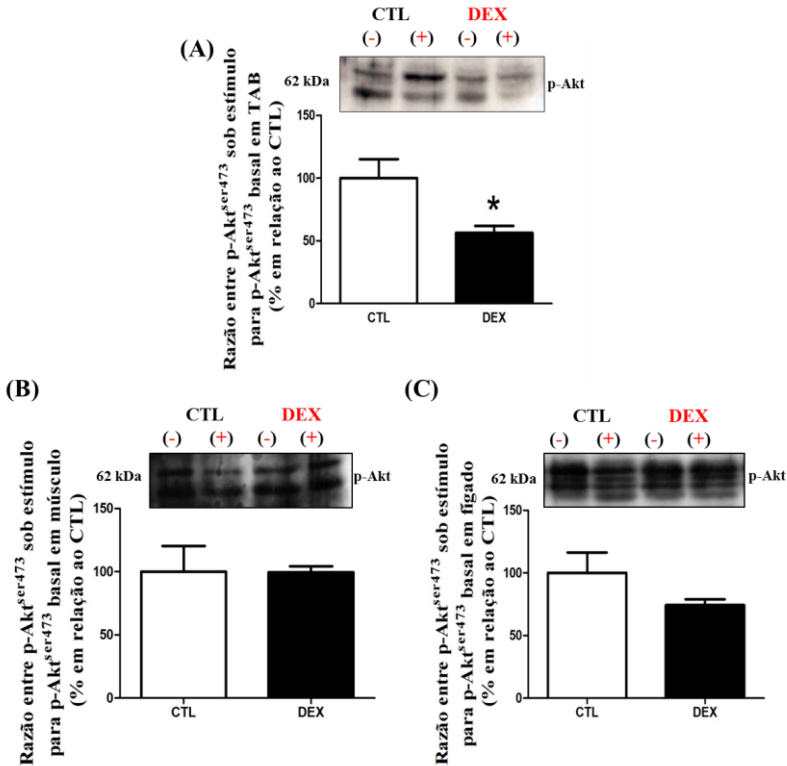
4.2 SINALIZAÇÃO INSULÍNICA

4.2.1 Tratamento com dexametasona promove redução da fosforilação em serina da Akt em TAB epididimário

Constatada as alterações metabólicas, seguimos para a avaliação da sinalização insulínica nos três principais tecidos periféricos insulinosensíveis (TAB, ME e hepático). Consideramos a Akt como a proteína norteadora para a avaliação da integridade da sinalização insulínica em acordo com trabalhos prévios (BURÉN et al., 2008). Nossos experimentos de immunoblotting para a Akt mostraram que a sinalização insulínica está atenuada apenas no TAB. Ambos o conteúdo total e a razão entre a Akt fosforilada após bolus oral de glicose pela Akt fosforilada em condição basal estiveram reduzidos (Figura 10A-C). Os valores referente à razão da Akt fosforilada após bolus oral de glicose pela fosforilação basal foram menores no TAB dos ratos DEX quando comparados aos valores do grupo CTL ($100 \pm 15\%$ vs. $56 \pm 5\%$ para CTL e DEX, respectivamente) (Figura 10A; $p < 0,05$, $n=6$). Além disso, o conteúdo total da Akt foi significativamente menor no grupo DEX em relação ao grupo CTL (100 ± 13 vs 54 ± 4 , para CTL e DEX respectivamente, Figura 11A), ($p < 0,05$, $n=6$).

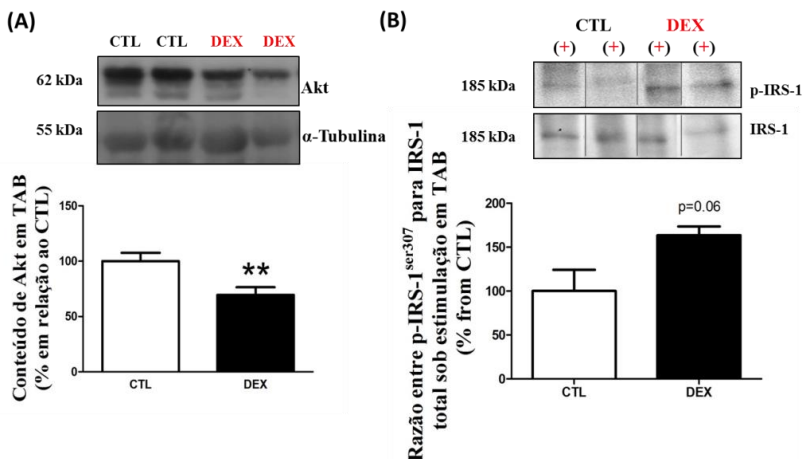
Considerando que foi observada atenuação da fosforilação da Akt após estímulo com bolus de glicose, seguimos com a avaliação do status da fosforilação do IRS-1. A razão entre o IRS-1 fosforilado em resíduos de serina 307 para o seu conteúdo total após bolus oral de glicose aumentou no grupo tratado com DEX em relação ao grupo CTL ($100 \pm 24\%$ vs $163 \pm 10\%$ para CTL e DEX respectivamente) (Figura 11B; $p=0,06$, $n=3$).

Figura 10 - Ratos DEX possuem menor ativação da Akt no TAB em resposta ao bolus de glicose.



Razão entre Akt fosforilada após bolus oral de glicose pela fosforilação basal em TAB (A), ME (B) e fígado (C). Note a redução da fosforilação da Akt em TAB de ratos DEX. A fosforilação da Akt em ME e fígado foi similar entre os grupos DEX e CTL. Dados são média \pm EPM. Asterísco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo CTL. Teste “*t*” de Student foi utilizado. $p < 0,05$, $n = 6$.

Figura 11 - Akt total e IRS-1 fosforilado em serina em TAB de ratos DEX em TAB.



O conteúdo total da Akt foi menor no TAB do grupo DEX em comparação ao grupo CTL (A). A razão entre p-IRS-1 fosforilado em serina para o IRS-1 total após bolus oral de glicose foi maior no grupo DEX em relação ao CTL (B). A imagem representativa do IRS-1 teve as bandas selecionadas na mesma membrana (não são sequenciais) a fim de compor a imagem. Dados são média \pm EPM.

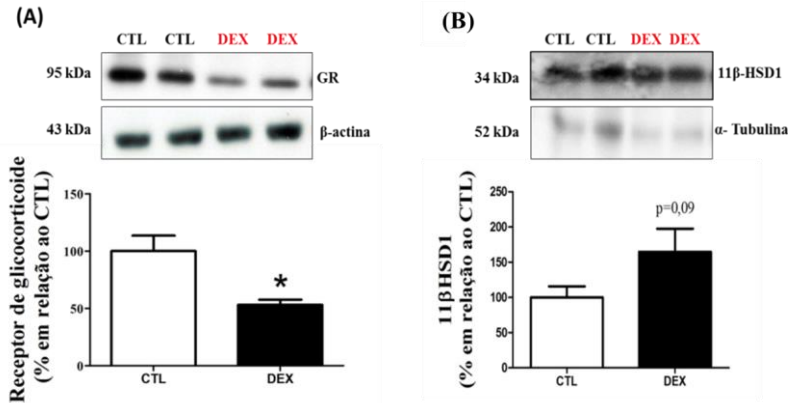
4.3 CONTEÚDO TOTAL DO RECEPTOR DE GLICOCORTICOIDE E DA ENZIMA 11 β -HSD1 NO TAB

4.3.1 Tratamento com GC promove redução do conteúdo de GR e aumento modesto da enzima 11 β -HSD1 em TAB epididimário

A fim de verificar se o excesso de GC pode alterar o conteúdo de GR no TAB, este foi avaliado em ambos os grupos experimentais. Como esperado, o tratamento com dexametasona resultou em redução significativa (47%) do conteúdo total do GR ($100 \pm 13\%$ vs. $53 \pm 4\%$ para CTL e DEX, respectivamente) (Figura 12A; $p < 0,05$, $n = 6$). Além

disso, estudos mostram aumento do conteúdo da enzima 11 β -HSD1 em quadro de RI (MORGAN et al., 2009). Assim, esta também foi verificada no TAB, e constatou-se aumento, porém não significativo no conteúdo da enzima no TAB dos animais tratados com DEX ($100 \pm 15\%$ vs. $164 \pm 32\%$ para CTL e DEX, respectivamente) (Figura 12B; $p=0,09$, $n=6$).

Figura 12 - Redução do conteúdo de GR e conteúdo da enzima 11 β -HSD1 em TAB epididimário.



O grupo tratado com dexametasona apresentou redução significativa do conteúdo de GR no TAB em comparação ao grupo CTL (A). O conteúdo da enzima 11 β -HSD1 aumentou no grupo DEX, porém sem significância estatística (B). Dados são média \pm EPM. Asterísco (*) indica diferença significativa em relação ao CTL. Teste “*t*” de Student foi utilizado. $p < 0,05$, $n = 6$.

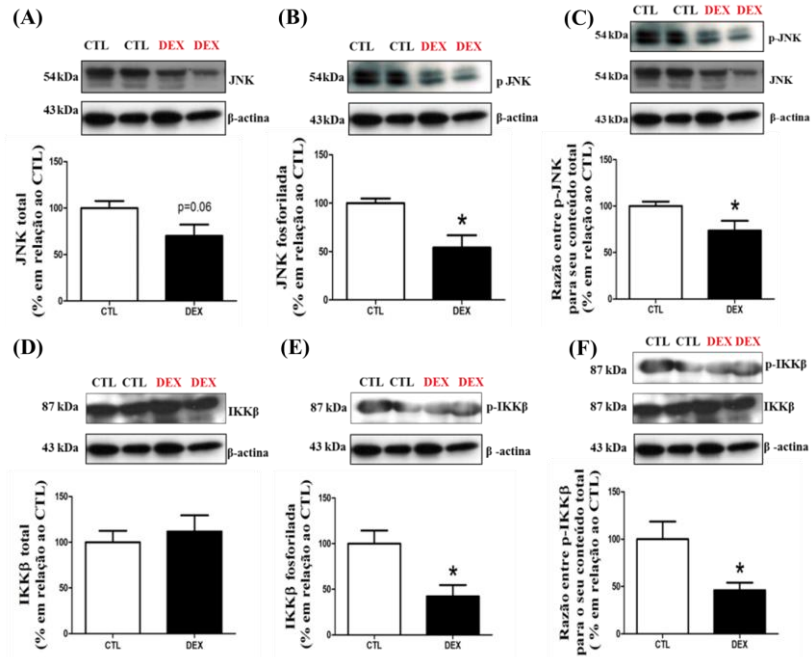
4.4 CONTEÚDO TOTAL E FOSFORILADO DA JNK, IKK β , NF κ Bp65 E CONTEÚDO TOTAL DO RECEPTOR TLR-4 NO TAB

4.4.1 Componentes da sinalização inflamatória parecem não estar envolvidos na atenuação da sinalização insulínica em TAB epididimário

Para verificar se há um possível impacto negativo da sinalização inflamatória sobre a atenuação da sinalização insulínica em TAB de ratos DEX, avaliamos o conteúdo total e o grau de fosforilação das proteínas cinases JNK e IKK β . O conteúdo total da JNK foi menor no grupo DEX em relação ao grupo CTL ($100 \pm 7\%$ vs. $70 \pm 12\%$ para CTL e DEX, respectivamente) (Figura 13A; $p=0,06$, $n=6$). O conteúdo da JNK fosforilada também foi menor no grupo DEX em relação ao grupo CTL ($100 \pm 5\%$ vs. $54 \pm 12\%$ para CTL e DEX, respectivamente) (Figura 13B; $p<0,05$, $n=6$). A relação entre a JNK fosforilada para seu conteúdo total também foi menor no grupo DEX em relação ao grupo CTL ($100 \pm 5\%$ vs. $73 \pm 10\%$, para CTL e DEX, respectivamente) (Figura 13C; $p<0,05$, $n=6$).

O conteúdo total da IKK β foi similar entre os grupos ($100 \pm 12\%$ vs. $111 \pm 17\%$ para CTL e DEX, respectivamente) (Figura 13D; $p=0,06$, $n=6$). Entretanto, houve redução significativa da fosforilação da IKK β no grupo DEX em relação ao grupo CTL ($100 \pm 20\%$ vs. $48 \pm 14\%$ para CTL e DEX, respectivamente) (Figura 13E; $p<0,05$, $n=6$). A relação entre a IKK β fosforilada para seu conteúdo total também revelou tendência à redução no grupo DEX em relação ao grupo CTL ($100 \pm 22\%$ vs. $52 \pm 9\%$) (Figura 13F; $p=0,07$, $n=6$).

Figura 13 - Conteúdo total e fosforilação das proteínas-chaves envolvidas na sinalização inflamatória.



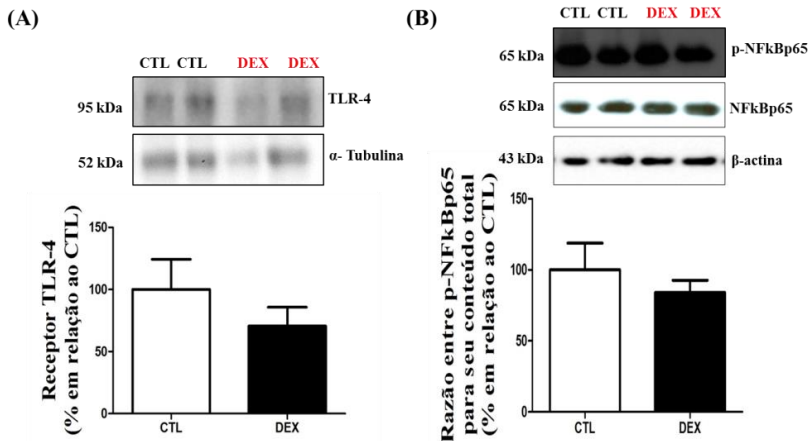
Conteúdo total (A) e fosforilado da JNK (B) e razão entre JNK fosforilada para JNK total (C). Conteúdo total (D) e fosforilado da IKKβ (E) e razão entre IKKβ fosforilada para IKKβ total (F). Note que o conteúdo total da JNK apresentou tendência à redução, enquanto sua fosforilação e razão entre JNK fosforilada para seu conteúdo total foram menores no grupo DEX em relação ao CTL. Em relação ao IKKβ, o seu conteúdo total foi similar em ambos os grupos; no entanto, sua fosforilação e razão entre IKKβ fosforilada para seu conteúdo total foram menores no grupo DEX em relação ao grupo CTL. Dados são média ± EPM. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao CTL. Teste “*t*” de Student foi utilizado. $p < 0,05$, $n = 6$.

4.4.2 Redução do conteúdo de GR não está associada a aumento do conteúdo de proteínas relacionadas com a sinalização pró-inflamatória em TAB epididimário e no plasma

Para analisar se a redução do conteúdo do GR poderia resultar em aumento do conteúdo de proteínas envolvidas com a sinalização pró-inflamatória, seguimos com a avaliação do conteúdo do receptor TLR-4, do fator de transcrição NFkBp65 bem como das concentrações circulantes das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α e IL-10.

Não houve diferença entre os conteúdos totais do TLR-4 em ambos os grupos ($100 \pm 14\%$ vs. $83 \pm 9\%$ para CTL e DEX, respectivamente) (Figura 14A; $p < 0,05$, $n=6$). O conteúdo total ($100 \pm 8\%$ vs. $93 \pm 1\%$; CTL e DEX respectivamente) e fosforilado ($100 \pm 12\%$ vs. $83 \pm 9\%$; CTL e DEX respectivamente) de NFkBp65 não apresentaram diferenças entre os grupos DEX e CTL (NS, $n=6$; dados não apresentados). A relação entre o NFkBp65 fosforilado para o seu conteúdo total ($100 \pm 18\%$ vs. $84 \pm 8\%$ para CTL e DEX, respectivamente) também não apresentou diferença entre os grupos (Figura 14B, $n=6$).

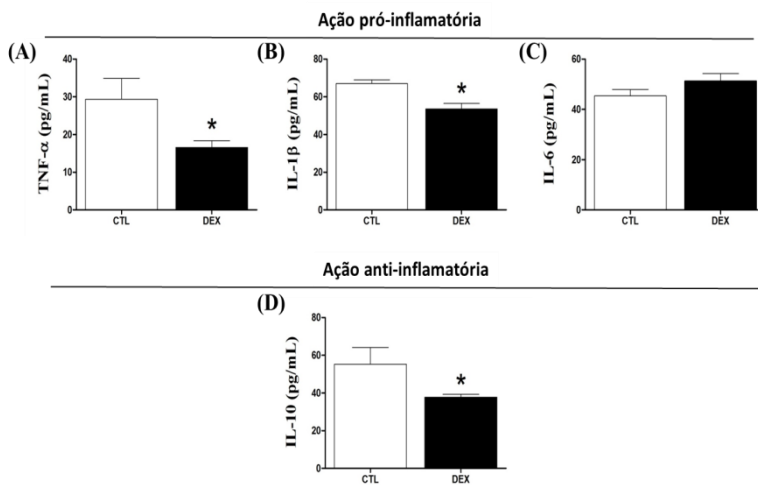
Figura 14 - Conteúdo total e/ou fosforilado de proteínas relacionadas com a sinalização pró-inflamatória.



Conteúdo total do receptor TLR-4 (A) e razão entre NFkBp65 fosforilada para seu conteúdo total (B). Observa-se que conteúdo de TLR-4 e a razão entre NFkBp65 fosforilada para seu conteúdo total foram similares entre os grupos. Dados são média \pm EPM. Asterísco (*) indica diferença significante em relação ao CTL. Teste “*t*” de Student foi utilizado. $p < 0,05$, $n = 6$.

Em relação às citocinas pró-inflamatórias, as concentrações de IL-1 β (67 ± 2 vs. 53 ± 3 pg/mL) e de TNF- α (29 ± 5 vs. 16 ± 2 pg/mL) foram menores no grupo DEX em relação ao grupo CTL (Figura 15 A,B, respectivamente; $p < 0,05$, $n = 7$). As concentrações de IL-6 foram similares entre os grupos (45 ± 2 vs. 51 ± 3 pg/mL para CTL e DEX, respectivamente), enquanto as concentrações da citocina anti-inflamatória IL-10 foram menores em ratos DEX comparado aos ratos CTL (55 ± 8 vs. 37 ± 1 pg/mL) (Figuras 15C,D, respectivamente; $p < 0,05$ para 15D, $n = 7$).

Figura 15 - Citocinas circulantes em ratos DEX e CTL. IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-10 (D).



Houve redução significativa das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10 nos grupos DEX. As concentrações de IL-6 foram similares entre os grupos. Dados são média \pm EPM. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao CTL. Teste “*t*” de Student foi utilizado. $p < 0,05$, $n = 7$.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que a administração de dexametasona em ratos adultos promoveu 1) redução no peso corpóreo, 2) hipofagia, 3) hiperglicemia, 4) hiperinsulinemia, 5) hipertriacilgliceridemia, 6) aumento do conteúdo de glicogênio hepático, 7) maior atividade lipolítica no TAB epididimal, 8) redução da sensibilidade periférica à insulina e 9) intolerância à glicose. Esses resultados estão de acordo com dados do nosso grupo e de outros grupos de pesquisa que vêm demonstrando essas alterações em trabalhos anteriores (SAAD et al., 1993; CAPERUTO et al., 2006; BURÉN et al., 2008; RAFACHO et al., 2008a; RAFACHO et al., 2011). Os ratos DEX também reproduziram alterações na sinalização insulínica similares aos demonstrados previamente por outros grupos de pesquisa (CAPERUTO et al., 2006; BURÉN et al., 2008) como a redução do conteúdo total e fosforilado da Akt em TAB. Ainda, observamos marcante redução do conteúdo proteico do GR em TAB dos ratos DEX. Contudo, apesar da redução do conteúdo do GR, as proteínas envolvidas em vias pró-inflamatórias, como as proteínas-quinases JNK e IKK β e as concentrações circulantes de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) foram menores nos animais tratados com dexametasona. Em suma, demonstramos pela primeira vez um paralelo entre os principais componentes proteicos da via insulínica e da via pró-inflamatória no TAB de ratos insulinoresistentes, por meio da administração de dexametasona.

A redução do peso corpóreo, bem como redução do consumo de ração ao longo do tratamento com dexametasona esta de acordo com

estudos anteriores (RAFACHO et al., 2008a; COSTA et al., 2012). É sabido que a insulina exerce efeitos anorexígenos no hipotálamo (WOOD et al., 1979), uma vez que nossos ratos DEX apresentam concentrações de insulina elevadas, sugerimos que este pode ser um dos fatores responsáveis pela hipofagia nesses animais. A perda de peso observada nos ratos DEX pode ser devida, em partes, ao aumento da excreção de água (THUNHORST et al., 2007) e ao aumento da atividade catabólica (CARPUSO; CARPUSO, 2012). O aumento do conteúdo total de glicogênio hepático encontrado no grupo DEX também corrobora os dados publicados previamente (MOKUDA et al., 1991; NUNES et al., 2013). Os efeitos dos GCs sobre o metabolismo de glicose incluem redução na captação de glicose estimulada pela insulina em tecidos periféricos e aumento da gliconeogênese hepática (RIZZA; MANDARINO; GERICH, 1982; ROONEY et al. 1994). Sob a ação da dexametasona o fígado aumenta a produção de glicose hepática pela inversão da via glicolítica a partir de substratos resultantes dos processos de lipólise, proteólise e cetogênese. Durante esse processo, parte da glicose pode ser desviada para a glicogênese. Assim, mesmo em jejum, os animais tratados com dexametasona apresentam maior conteúdo de glicogênio hepático (MARCHESINI et al., 2001; NUNES et al., 2013). Ainda, é possível que ocorra uma preferência pela gliconeogênese em detrimento da glicogenólise que favoreça a manutenção do conteúdo de glicogênio hepático nos ratos DEX.

Dependendo da dose e período de administração, os GCs podem induzir aumento das concentrações plasmáticas de insulina e de triacilglicerol associado a nenhum efeito ou ao aumento nas concentrações de glicose sanguínea em jejum (RUZZIN; WAGMANN;

JENSEN, 2005; BURÉN et al., 2008). Nossos dados mostraram que administração de dexametasona (1 mg/Kg de peso corpóreo) resultou em marcante aumento das concentrações plasmáticas de insulina e de triacilglicerol que esteve acompanhado de elevação dos valores glicêmicos de jejum. A hiperinsulinemia é normalmente decorrente da compensação pancreática exercida pelas células β que elevam a síntese e a secreção de insulina contrapondo-se à redução da ação da insulina decorrente dos efeitos diabetogênicos dos GCs (BONNER-WEIR et al., 1981; RAFACHO et al., 2008a). A elevação dos valores de glicose sanguínea pode ser explicada, pelo menos em partes, pela possível combinação da 1) redução da captação de glicose em decorrência da diminuição do recrutamento de vesículas contendo GLUT-4 para a superfície da membrana celular (WEINSTEIN et al., 1998; MORGAN et al., 2009), 2) da gliconeogênese, provavelmente de origem hepática, exacerbada neste modelo, como prova nossos experimentos de ipPTT e 3) do aumento das concentrações circulantes de glucagon após exposição a GCs (BEAUDRY et al., 2013; CUMMINGS et al., 2013).

Os ratos DEX também apresentaram alterações funcionais no TAB, a julgar pelo aumento na liberação de glicerol em estado basal, em comparação com o grupo CTL. O aumento da lipólise em ratos tratados com dexametasona também foi demonstrado por outros autores (BURÉN et al., 2008, NUNES et al., 2013). Contudo, estes autores mostraram um aumento da lipólise após estímulo, mas não em condições basais. Por uma análise relativa, avaliando a razão da lipólise entre a condição estimulada pela basal, demonstramos que os ratos DEX apresentam uma resposta incremental maior do que aquela vista no TAB dos ratos CTL. Isto poderia ser explicado, pelo menos em partes, pelo

aumento da expressão da lipase hormônio sensível e da lipase de triacilglicerol do TAB (VILLENNA et al., 2004) ou até mesmo pela resistência ao efeito antilipolítico da insulina (BURÉN et al., 2008).

Existem inúmeras evidências experimentais de que os GCs promovem redução da sensibilidade à insulina em ratos (SAAD et al., 1993; BURÉN et al., 2008; NICASTRO et al., 2012) e em humanos (ROSMOND, 2005). O teste de tolerância à insulina realizado em nosso estudo corrobora estes achados nos DEX. O ITT consiste na administração de dose supra fisiológica de insulina e a diminuição dos valores glicêmicos depende da inibição da produção endógena de glicose e do estímulo de sua captação pelos tecidos periféricos. O K_{ITT} representa essencialmente a medida da utilização da glicose pelos tecidos, principalmente o ME (WAJCHENBERG et al., 1999). Os ratos DEX apresentaram redução da sensibilidade à insulina, a julgar pelos valores obtidos pelo K_{ITT} e pelos índices HOMA e TyG. HOMA e TyG são cálculos matemáticos que predizem alteração da sensibilidade à insulina. O HOMA-IR é calculado a partir dos valores de glicemia e insulinemia de jejum em estudos epidemiológicos, além de ser utilizado na prática clínica (WALLACE; LEVY; MATTHEWS; 2004). O TyG foi recentemente proposto como cálculo alternativo ao HOMA, uma vez que substitui os valores de insulinemia pelos de triacilgliceridemia tornando o método mais acessível nos casos em que a quantificação da insulinemia não seja viável (SIMENTAL-MENDÍA et al., 2008; GUERRERO-ROMERO et al., 2010). Também foi constatada a presença de IG no grupo DEX, uma vez que após o desafio com glicose a secreção de insulina provavelmente não foi suficiente para contrapor-se ao incremento da glicemia nesses animais. Sabe-se que a exposição

das células β pancreáticas a glicose resulta em padrão bifásico da secreção de insulina. A resposta inicial à glicose é caracterizada pelo aumento na secreção de insulina seguida do declínio próximo da concentração basal (PRATLEY; WEYER, 2001). Dados prévios de nosso grupo (RAFACHO et al., 2010) e de outros grupos de pesquisa (KARLSSON et al., 2001; NOVELLI et al., 1999) têm demonstrado uma hipersecreção de insulina em resposta à glicose em ilhotas isoladas de ratos tratados com DEX. Contudo, essa hipersecreção que também é observada *in vivo* após estímulo com glicose (RAFACHO et al., 2008a; RAFACHO et al., 2011) parece não ser suficiente para contrapor o impacto negativo dos GCs sobre a sensibilidade periférica à insulina, como por exemplo na supressão da produção hepática de glicose. Nesse sentido, avaliamos a resposta hepática ao piruvato. O aumento na produção endógena de glicose nos ratos tratados com dexametasona foi constatado pelo PTT que revelou maior incremento nas concentrações de glicose sanguínea após o desafio com piruvato. Esses resultados confirmam nossa hipótese de que o fígado dos ratos tratados com DEX são menos responsivos ao efeito supressor da insulina corroborando para a IG e o desequilíbrio da homeostase glicêmica (RIZZA; MANDARINO; GERICH, 1982; ROONEY et al. 1994).

A redução da ação da insulina em tecidos periféricos parece ser mediada principalmente por eventos pós-receptores (Tabela 1). Neste estudo mostramos redução no conteúdo total de Akt em estado basal, além de redução da razão entre Akt fosforilada em serina 473 pela fosforilação em estado basal após bolus oral de glicose no TAB dos ratos DEX. Esses achados são consistentes com outros estudos, Burén et al (2008) mostrou redução do conteúdo da Akt em TAB após 11 dias de

tratamento com dexametasona (1 mg/Kg de peso corpóreo). A Akt é uma das proteínas chaves da sinalização insulínica, uma vez que após ativada (fosforilada em seus dois resíduos –serina 473 e treonina 308) promove, dentre inúmeros processos, por exemplo, a translocação de vesículas contendo GLUT-4 para a membrana celular de TAB e ME para posterior captação da glicose. A Akt também pode participar da estimulação da síntese de glicogênio através da ativação da GS. Esses e outros efeitos da Akt contribuem para a regulação das concentrações de glicose sanguínea. Quando sua atividade está diminuída, como na exposição prolongada ou quando há GCs em excesso, as ações da Akt encontram-se atenuadas podendo contribuir tanto para o desenvolvimento da RI quanto para o desenvolvimento de hiperglicemia (MCMANUS et al., 2005; RAMM et al., 2006). A redução da atividade da Akt está associada a redução de seu conteúdo total e/ou ao aumento da fosforilação em serina do IRS-1 (MORGAN et al., 2009). Apesar de não mostrarmos alterações estatísticas significantes em relação a fosforilação do IRS-1 em serina 307, não podemos descartar os efeitos biológicos do aumento de 63% observados no TAB dos ratos DEX. Nosso “*n*” experimental é insuficiente para lançarmos conclusões (*n*=3) e acreditamos que ao obtermos um “*n*” suficiente confirmaremos essa tendência que estaria em acordo com dados demonstrados por outros grupos (MORGAN et al., 2009; KUO et al., 2012).

Os efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios dos GCs ocorrem predominantemente através de suas ações transrepressoras sobre a transcrição gênica (MCEWAN et al., 1993). Vários trabalhos demonstram redução no conteúdo do GR após exposição prolongada ao GC (CIDLOWSKI; CIDLOWSKI, 1981; SVEC; RUDIS, 1981;

SAPOLSKY; KREY; MCEWEN, et al., 1984). Corroborando esses estudos, nossos ratos DEX apresentaram redução significativa do conteúdo de GR, porém, apesar desta redução, o GR aparentemente manteve suas propriedades imunossupressora e anti-inflamatória, como pôde ser evidenciado pela redução no conteúdo da maioria dos componentes pró-inflamatórios avaliados neste estudo. Uma das deficiências de nosso trabalho está no fato de não termos avaliado a distribuição do GR, se está presente predominantemente no citosol ou no núcleo. Presumimos que mesmo que tenhamos uma redução marcante no conteúdo do GR no TAB dos ratos DEX, sua atividade continue presente. No mesmo sentido, a biodisponibilidade dos GCs pode ser modulada pela ação da enzima 11β -HSD1. O produto da ativação desta enzima reside no aumento das concentrações teciduais de GCs (cortisol em humano e corticosterona em roedores) e é sabido que o aumento de sua atividade ocorre em modelos de obesidade (ENGELI et al., 2004; MORGAN et al., 2009). As repercussões de sua atividade exacerbada incluem, além de obesidade e RI, doenças como osteoporose e glaucoma (GATHERCOLE, et al., 2013). Considerando que os ratos tratados com dexametasona tiveram um aumento relativo (sem significância estatística) no conteúdo da 11β -HSD1, não podemos desconsiderar o possível impacto negativo sobre a sinalização insulínica no TAB destes animais. Essa suposição está apoiada em um estudo recente onde foi demonstrado que o tratamento de voluntários com prednisolona por 6 dias consecutivos parece resultar em aumento da atividade da 11β -HSD1 (DIEDERICH et al., 2011). Os autores demonstraram neste estudo que os voluntários tiveram aumento nas concentrações do cortisol sérico após receberem uma dose de cortisona.

Inúmeros estudos têm mostrado correlação entre a ativação crônica das vias pró-inflamatórias com a presença de RI (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; CAI et al., 2005; SHOELSON; LEE; YUAN, 2003). As proteínas-cinases JNK e IKK β estão relacionadas de forma negativa com a sinalização insulínica em modelos de RI induzida por obesidade e DM2 (AGUIRRE et al., 2002; ITANI, 2002; BANDYOPADHYAY; 2005; HOTAMISLIGIL et al., 2005). Contrariando nossa hipótese de que a RI induzida pela administração de dexametasona poderia resultar em aumento da atividade das vias pró-inflamatórias, constatamos, de fato, redução no conteúdo da JNK e da IKK β fosforiladas no TAB dos ratos DEX. Esses resultados primeiro: mostram que a dexametasona, nas condições aplicadas no presente modelo, está exercendo seus efeitos atenuadores sobre a via pró-inflamatória periférica. Segundo, não podemos afirmar que exista um ‘*cross-talk*’ significativo entre a JNK e/ou IKK β que impacte negativamente sobre a atividade (grau de fosforilação) das proteínas centrais da via insulínica - Akt e do IRS-1 - como mostram outros estudos de modelos de RI (AGUIRRE et al., 2000; ITANI, 2002). Para responder a essa questão, a ablação gênica (*knock-out*) ou silenciamento (*knock-down*) das cinases como a JNK e IKK β de maneira tecido-específica nos permitiriam compreender os efeitos da dexametasona sobre este quadro. De toda maneira, outras vias e/ou agentes podem estar impactando sobre a sinalização insulínica que não seja mediada diretamente por receptores que sejam exclusivos de citocinas.

A ativação do receptor TLR-4 pode modular a atividade e a expressão de diversos fatores de transcrição sinais-dependentes, principalmente os fatores de transcrição pró-inflamatórios NF κ B e AP1

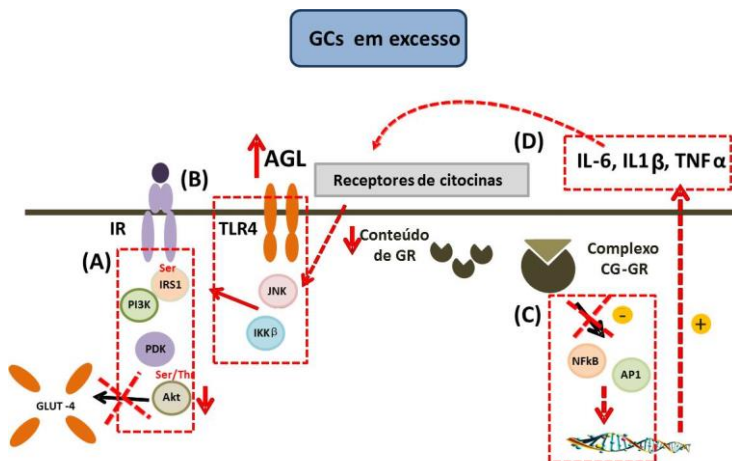
(TAKEDA; AKIRA, 2004). Dentre os ligantes do TLR-4 pode ser destacado alguns tipos de AGLs (LEE et al., 2001; HUSSEY et al., 2012). Dados prévios de nosso grupo mostram que os ratos DEX apresentam aumento das concentrações séricas prandiais e pós-prandiais de AGLs (RAFACHO et al., 2008a). Verificamos se a redução no conteúdo do GR poderia resultar em aumento do conteúdo do TLR-4 bem como de fatores de transcrição que são sabidamente suprimidos pelo complexo GC-GR como o NFkB. Nenhuma alteração no conteúdo total e fosforilado destas proteínas foram observadas. Estes dados sugerem que o GR parece não ser indispensável para o controle da expressão regular destes fatores já que a redução de ~50% no conteúdo proteico de GR no TAB dos ratos DEX não causou nenhuma alteração no conteúdo do TLR-4 e NFkB. Além disso, o aumento da liberação de AGL observado nos ratos DEX (RAFACHO et al., 2008a; FRANSSON et al, 2014) parece não explicar a atenuação da via insulínica por um ‘*cross-talk*’ que seria desencadeado pela ativação dos TLR-4 e seus mensageiros intracelulares como a JNK e IKK β . Neste sentido, o tratamento com dexametasona está sendo eficaz em suprimir esta via, ou sinais alternativos poderiam estar modulando a fosforilação da Akt e do IRS-1 no TAB destes animais. Sabe-se que a ativação do TLR-4 resulta na ativação de inúmeras proteínas intracelulares que incluem, além da JNK e IKK β , o fator regulador de interferon 3 (IRF-3) e 7 (IRF-7). WANG et al., (2013) demonstraram que a expressão de IRF-7 aumenta em TAB, fígado e músculo de camundongos obesos, sugerindo o envolvimento da IRF-7 nas anormalidades metabólicas presentes neste modelo experimental. Assim, não descartamos a possibilidade das IRFs exercerem alguma modulação sobre a atenuação da sinalização

insulínica observada no TAB dos ratos DEX. No mesmo sentido, têm-se sugerido que PKCs atípicas sejam possíveis proteínas mediadoras da RI induzida por obesidade (HAASCH et al., 2006; CHANGHUA et al., 2009) ou pela administração de GCs (KAJITA et al., 2001). Em especial a PKC θ , cuja ativação está associada com RI induzida por aumento das concentrações plasmáticas de AGL além de estar associada à redução do conteúdo de IRS-1, PKD1 e da Akt (HAASCH et al., 2006; CHANGHUA et al., 2009). Assim, especulamos que as PKCs atípicas, como a PKC θ , possam ser alvos de investigação no desenvolvimento da RI induzida pela dexametasona em nosso modelo animal.

Outro ponto interessante de nossos dados é que o tratamento com dexametasona interferiu nas concentrações de citocinas plasmáticas. Diferente do que é observado em condições como obesidade e DMT2 (TAJIRI; MIMURA; UMEDA, 2005), onde as concentrações dessas citocinas encontram-se elevadas, observou-se redução das concentrações circulantes das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e de TNF- α , além de redução da citocina anti-inflamatória IL-10. As citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β podem promover ativação das vias intracelulares pró-inflamatórias e impactar sobre a fosforilação em serina do IRS-1 em quadros de RI como a obesidade, SM e DM2 (REAVEN, 1988; OLEFSKY; GLASS, 2010; HUSSEY et al., 2012). Considerando que os ratos DEX não apresentaram aumento das concentrações de IL-1 β e de TNF- α , podemos concluir, pelo menos em parte, e pelo raciocínio linear, que essas citocinas não compõem nenhuma retroalimentação positiva expressiva que contribuiria para a atenuação da sinalização insulínica como hipotetizamos neste trabalho.

Em resumo, nossos dados nos permitem concluir que o tratamento com dexametasona por 5 dias consecutivos reproduz a atenuação da sinalização insulínica (redução do conteúdo total e fosforilação de Akt e aumento da fosforilação do IRS-1 em serina) em TAB epididimário de ratos como demonstrado previamente (SAAD et al., 1993; CAPERUTO et al., 2006; BURÉN et al., 2008) (Figura 16A). Essa atenuação da sinalização insulínica parece não ser resultante de uma ativação exacerbada dos componentes da via inflamatória já que o tratamento com o GC esta associado a redução ou inalteração do conteúdo e/ou atividade das proteínas JNK, IKK β , TLR-4 (Figura 16B), e NF κ Bp65 (Figura 16C) no TAB epididimário e das citocinas circulantes TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Figura 16D).

Figura 16 - Hipótese da resistência à insulina induzida por glicocorticoides.



O tratamento com GC promove atenuação da via insulínica (A) que parece não estar relacionada com aumento do conteúdo e/ou da atividade das proteínas-quinases JNK e IKKβ e do receptor TLR-4 (B). A redução do conteúdo de GR observada no TAB epididimário após tratamento dos ratos com dexametasona não resultou em aumento do conteúdo proteico e da fosforilação do fator de transcrição NFκBp65 (C). As concentrações plasmáticas das citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α, além da citocina anti-inflamatória IL-10 foram menores nos ratos DEX em relação ao grupo CTL (D).

6 PERSPECTIVAS

Os mecanismos responsáveis pela RI induzida por GCs não estão completamente esclarecidos. Neste sentido, inúmeros estudos serão necessários para o esclarecimento desta questão. Estudos que envolvam nocaute gênico ou silenciamento de componentes inflamatórios envolvidos diretamente com a RI; avaliação do envolvimento de PKCs atípicas bem como dos efeitos diretos do GR sobre as proteínas envolvidas na cascata de sinalização insulínica são algumas das possibilidades que poderiam contribuir para tal elucidação.

7 AGRADECIMENTO ESPECIAL

Este trabalho foi realizado com apoio do CNPq, processo n°: 471397/2011-3.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, V.; et al. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. **J Biol Chem**, v.277, p.1531-1537, 2002.
- AGUIRRE, V.; et al. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). **J Biol Chem**, v.275, p.9047-9054, 2000.
- AMATRUDA, J. M., LIVINGSTON, J.N.; LOCKWOOD, D.H. Cellular mechanisms in selected states of insulin resistance: human obesity glucocorticoid excess and chronic renal failure. **Diab. Metab. Rev**, v.3, p.293-317, 1985.
- ANDREWS, R.C.; WALKER, B.R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clin. Science**, v.96, p.513-523, 1999.
- ARKAN, M.C.; et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nat Med**, v.11, n.2, p.191-198, 2005.
- BANDYOPADHYAY, G.K.; et al. Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. **Diabetes**, v.54, n.8, p.2351-2359, 2005.
- BARNES, PJ. Anti-leukotrienes: a new treatment for asthma. **Practitioner**, v.242, n.1586, p.395-399, 1998.
- BAYASCAS, J.R. Dissecting the role of the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) signalling pathways. **Cell Cycle**, v.7, n.19, p.2978-2982, 2008.
- BEATO, M., HERRLICH, P.; SCHÜTZ, G. Steroid hormone receptors: Many actors in search of a plot. **Cell**, v.83, p.851-857, 1995.
- BEAUDRY, J.L.; et al. Exogenous glucocorticoids and a high-fat diet cause severe hyperglycemia and hyperinsulinemia and limit glucose responsiveness in young male Sprague-Dawley rats. **Endocrinology**, v.154, p.3197-3208, 2013.

BECKER, A. B.; ROTH, R. A. Insulin receptor structure and function in normal and pathological conditions. **Annu. Rev. Med.**, v.41, p. 99-115, 1990.

BIDDIE, S.C.; CONWAY-CAMPBELL, B.L.; LIGHTMAN, S.L. Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. **Rheumatology (Oxford)**, v.51, n.3, p.403-12, 2012.

BONNER-WEIR, S.; et al. Limited beta cell regeneration in a beta cell deficient rat model: studies with dexamethasone. **Metabolism**, v.9, p.914-918, 1981.

BRADBURY, MJ.; et al. Regulation of basal ACTH secretion by corticosterone is mediated by both type I (MR) and type II (GR) receptors in rat brain. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.40, p.133-142, 1991.

BREUNER, CW.; ORCHINIK, M. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. **J Endocrinol**, v.175, p.99-112, 2002.

BUCOLO, G.; DAVID, H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. **Clin. Chem**, v.19, n.5, p.476-482, 1973.

BURÉN, J. et al. Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. **Eur J Endocrinol**, v.146, n.3, p.419-429, 2002.

BURÉN, J. et al. Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. **Arch Biochem Biophys**. v. 474, n. 1, p. 91-101, 2008.

CAI, D.; et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. **Nat. Med**, v.11, p.183-90, 2005.

CAPERUTO, L.C.; et al. Distinct Regulation of IRS Proteins in Adipose Tissue from Obese Aged and Dexamethasone-Treated Rats. **Endocrine**, v.29, n.3, p.391-398, 2006.

CAPURSO, C.; CAPURSO, A. From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids. **Vascular Pharmacology**, v. 57, p. 91-97, 2012.

CHANGHUA, W.; et al. Protein Kinase C η (PKC η)-dependent Phosphorylation of PDK1 at Ser 504 and Ser 532 Contributes to Palmitate-induced Insulin Resistance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 4, p. 2038-2044, 2009.

CHAPMAN, K.; HOLMES, M.; SECKL, J. 11β -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 1139-1206, 2013.

CHEATHAM, B.; KAHN, C. R. Insulin action and the insulin signaling network. **Endocr Rev**, v.16, n.2, p.117-142. 1995.

CHINENOV, Y.; et al. Role of transcriptional coregulator GRIP1 in the anti-inflammatory actions of glucocorticoids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.109, p.11776-81, 2012.

CHOU, et al. Regulation of protein kinase C ζ by PI 3-kinase and PDK-1. **Curr. Biol.**, v.8, n.19, p. 1069-1077, 1998.

CIDLOWSKI, J.A.; CIDLOWSKY, N.B. Regulation of glucocorticoid receptors by glucocorticoids in cultured HeLa S3 cells. **Endocrinology**, v.109, n.6, p.1975-1982, 1981.

COHEN, P.; ALESSI, D.R.; CROSS, D.A.E. PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? **FEBS Letters**, v. 410, p.3-10, 1997.

COONEY, G.J. Muscle long-chain acyl CoA esters and insulin resistance. **Ann N Y Acad Sci**, v.967, p.196-207, 2002.

COOPER, M.S.; et al. Modulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation. **J Bone Miner Res**, v.16, n.6, p.1037-1044, 2001.

COOPER, M.S.; STEWART, P.M. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and its role in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, metabolic syndrome, and inflammation. **J Clin Endocrinol Metab**, v.94, n.12, p.4645-4654, 2009.

COSTA, M, M.; et al. Reduction of insulin signalling pathway IRS-1/IRS-2/AKT/mTOR and decrease of epithelial cell proliferation in the prostate of glucocorticoid-treated rats. **Int. J. Exp. Path**, v. 93, p.188-195, 2012.

CZOCK, D.; et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Systemically Administered Glucocorticoids. **Clin Pharmacokinet**, v.44, n.1, p. 61-98, 2005.

CUMMINGS, B.P.; et al. Investigation of the mechanisms contributing to the compensatory increase in insulin secretion during dexamethasone-induced insulin resistance in rhesus macaques. **J Endocrinol**, v.216, :207-215, 2013.

DAVIS, G.F. Adverse Effects of Corticosteroids: II. Systemic. **Clinics in dermatology**, v.4, n.1, p.161-169, 1986.

DEBONS, A.F.; et al. Central nervous system control of hyperphagia in hypothalamic obesity: dependence on adrenal glucocorticoids. **Endocrinology**, v.118, n.4, p.1678-1681, 1986.

DIEDERICH, S.; et al. In vivo activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in man: effects of prednisolone and chenodesoxycholic acid. **Horm Metab Res**, v.43, p.66-71, 2011.

ENGELI S.; et al. Regulation of 11 β -HSD genes in human adipose tissue: influence of central obesity and weight loss. **Obes Res**.; v.12, p.:9-17, 2004.

EVANS, RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, v. 240, p.889-895, 1988.

FARIA, C.D.C; LONGUI, C.A. Aspectos Moleculares da Sensibilidade aos Glicocorticoides. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v 50, n. 6, 2006.

FORMIGUEIRA, X.; CANTON, A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v.18, p.1125-1146, 2004.

FRANSSON et al. Liraglutide counteracts obesity and glucose intolerance in a mouse model of glucocorticoid-induced metabolic syndrome. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v.6, n.3, p. 1-13 , 2014.

FUENFER, M.M.; OLSON, G.E.; POLK, H.C. Effect of various corticosteroids upon the phagocytic bactericidal activity of neutrophils. **Surgery**, v.78, n.1, p.27-33, 1975.

FUNDER, JW. Glucocorticoid receptors. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 43, n.5, p.389-394, 1992.

GARBE, E.; et al. Risk of ocular hypertension or open-angle glaucoma in elderly patients on oral glucocorticoids. **Lancet**, v.4, p.979-982, 1997.

GATHERCOLE, G.G, et al. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1: Translational and Therapeutic Aspects. **Endocrine Reviews**, v. 34, n.4, p.525–555, 2013.

GROENEWEG, F.L.; et al. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. **Mol Cell Endocrinol**, v.350, p.299-309, 2012.

GUERRERO-ROMERO F.; et al. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic hyperinsulinemic clamp. **J Clin Endocrinol Metab**, v.95, p.3347-3351, 2010.

GUSTAFSON T, A.; RUTTER W. J. The cysteine-rich domains of the insulin and insulin-like growth factor I receptors are primary

determinants of hormone binding specificity. Evidence from receptor chimeras. **J. Biol. Chem.** v.265, p.18663-18667, 1990.

HALBERG, N.; WERNSTEDT-ASTERHOLM; SCHERER, P.E. The adipocyte as an endocrine cell. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v.37, n.3, p.753-768, 2008.

HAMMAMI, M. M.; SIITERI, P. K. Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in human skin fibroblasts: enzymatic modulation of glucocorticoid action. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v.73, p. 326-334, 1991.

HARTMAN, A.D.; CHRIST, D.W. Effect of cell size, age and anatomical location on the lipolytic response of adipocytes. **Life Sci.** v. 22, p. 1087-1096, 1978.

HAASCH, D, et al. PKC θ is a key player in the development of insulin resistance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, p.361-368, 2006.

HECK S, et al. A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription of AP-1. **EMBO J**, v.13, p.4087-4095, 1994.

HIRABARA, S.M.; CURI, R.; MAECHLER, P. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. **J Cell Physiol**, v.222, p.187-194, 2010.

HIROSUMI, J. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **NATURE**, v.420, p. 333-336, 2002.

HOLLENBERG, SM, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. **Nature**, v.318, n.6047, p.635-41, 1985.

HOMO-DELARCHE, F. ; et al. Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol**, v.40, n.4-6, p. 619-637, 1991.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v.444, p.860-867, 2006.

HOTAMISLIGIL GS. Inflammatory pathways and insulin action. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.27, p.53-55, 2003.

HOTAMISLIGIL, GS. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v.271, p.665-668, 1996.

HOTAMISLIGIL, G.S. Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. **Diabetes**, n.5, p.73-78, 2005.

HOTAMISLIGIL, G.S.; SHARGILL, N.S.; SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v.259, p.87-91, 1993.

HUANG, S.; et al. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. **J Lipid Res**, v.53, n.9, p.2002-2013, 2012.

HUNTER; S. J.; GARVEY, W. T. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. **Am J Med**, v.105, n.4, p.331-345. 1998.

HUSSEY, S.E.; et al. TAK-242, a Small Molecule Inhibitor of Toll-like Receptor-4 signaling, unveils similarities and differences in Lipopolysaccharide- and Lipid-induced Inflammation and Insulin Resistance in Muscle Cells. **Bioscience Reports**, Published on 10 Oct 2012 as manuscript BSR20120098.

ITANI, S.I.; et al. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkkappaB-alpha. **Diabetes**, v.51, n.7, p.2005-2011, 2002.

JIN, J.Y.; et al Receptor/gene-mediated pharmacodynamic effects of methylprednisolone on phosphoenolpyruvate carboxykinase regulation in rat liver. **J Pharmacol Exp Ther**, v.309, p.328-39, 2004.

KADMIEL, M.; CIDLOWSKI, J.A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends Pharmacol Sci**, v.34, n.9, p.518-530, 2013.

KAJITA, K.; et al. Glucocorticoid-induced insulin resistance associates with activation of protein kinase C isoforms. **Cellular Signalling**, v.13, p.169-175, 2001.

KALUPAHANA, NS.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CLAYCOMBE, KJ. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. **Mol Aspects Med**. V.33, p.26-34, 2012.

KANETY, H. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. **J Biol Chem**, v.270, p.23780-23784, 1995.

KARLSSON, S.; et al. Beta cell adaptation to dexamethasone-induced insulin resistance in rats involves increased glucose responsiveness but not glucose effectiveness. **Pancreas**. v.22, n.2, p.148-156, 2001.

KASUGA, M. F.; KARLSSON, A.; KAHN, C.R. Insulin Stimulation of Phosphorylation of the Subunit of the Insulin Receptor: formation of both phosphoserine and phosphotyrosine. **The Journal of Biological Chemistry**, v.257, p.9891-9894, 1982.

KORACH-ANDRE, M. Relationship between visceral adiposity and intramyocellular lipid content in two rat models of insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.288, p.106-116, 2005.

KREINER, F.; GALBO, H. Insulin sensitivity and related cytokines, chemokines, and adipokines in polymyalgia rheumatica. **Scand J Rheumatol.**, v.39, n.5, p.402-408, 2010.

KUO, T.; et al. Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling. **PNAS**, v. 109, n. 28, p. 11160-11165, 2012.

LAUDET, V, et al. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. **EMBO J**, v.11, p.1003-1013, 1992.

LAUGERO, K.D. Reinterpretation of basal glucocorticoid feedback: implications to behavioral and metabolic disease. **Vitam Horm**, v.69, p.1-29, 2004.

LE GOOD, et al. Protein kinase C isotypes controlled by hosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. **Science**, v.281, n.5385, p.:2042-2045, 1998.

LEE, J. Y. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. **J Biol Chem**, v.276, p.16683-16689, 2001.

LELLIS-SANTOS, C et al. The regulation of Rasd1 expression by glucocorticoids and prolactin controls peripartum maternal insulin secretion. **Endocrinology**, v.153, n.8, p.3668-78, 2012.

LU, NZ.; CIDLOWSKI, JA. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1024, p.102-123, 2004.

MAKINO, S.; HASHIMOTO, K.; GOLD, PW. Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. **Pharmacol Biochem Behav**; v.73, n.1, p.147-158, 2002.

MARANZANO, E.; et al. Evidence-based recommendations for the use of antiemetics in radiotherapy. **Radiotherapy and Oncology**, v. 76, p.227-233, 2005.

MARCHESINI, G.; et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 50, n.8, p.1844-1850, 2001.

MATTHEWS, D.R.; et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v.28, p.412-419, 1985.

- MCEWAN, I.J.; et al. Direct interaction of the tau 1 transactivation domain of the human glucocorticoid receptor with the basal transcriptional machinery. **Mol Cell Biol**, v.13, n.1, p.399-407, 1993.
- MCINTYRE, W.R.; SAMUELS, H.H. Triamcinolone acetone regulates glucocorticoid-receptor levels by decreasing the half-life of the activated nuclear-receptor form. **J Biol Chem**, v.10, p.418-427, 1985.
- MCKAY, LI.; CIDLOWSKI, JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. **Endocr Rev**, v.20, p.435-459, 1999.
- MCMANUS, E.J.; et al. Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. **EMBO J.** , v.24, n.8, p.1571-1583, 2005.
- MENDEL, DB.; ORTI, E. Isoform composition and stoichiometry of the approximately 90-kDa heat shock protein associated with glucocorticoid receptors. **J Biol Chem**; v.263, n.14, p.6695-6702, 1988.
- MOKUDA, O.; et al. Sensitivity and responsiveness of glucose output to insulin in isolated perfused liver from dexamethasone treated rats. **Horm. Metab. Res**, v. 23, n. 2, p. 53-55, 1991.
- MORGAN, S.A. et al. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Regulates Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle. **Diabetes**, v. 58, p.2506-2515, 2009.
- NAGLE, C.A.; KLETT, E.L.; COLEMAN, R.A. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. **J Lipid Res**, v.50, p.74-79, 2009.
- NGUYEN, M.T.; et al A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. **J Biol Chem**, v.282, n.48, p.35279-92, 2007.
- NICASTRO, H.; et al. Effects of creatine supplementation on muscle wasting and glucose homeostasis in rats treated with dexamethasone. **Amino Acids**, v.42, n.5, p.1695-1701, 2012.

- NIEMAN, L.K., CHANCO TURNER, M.L. Addison's disease. **Clin. Dermatol**, v.24, p.276-280, 2006.
- NISSEN, R.M.; YAMAMOTO, K.R. The glucocorticoid receptor inhibits NF κ B by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyterminal domain. **Genes Dev**, v.14, p.2314-29, 2000.
- NOVELLI M.; et al. Insufficient adaptive capability of pancreatic endocrine function in dexamethasone-treated ageing rats. **J Endocrinol**, v.162, n.3, p.425-432, 1999.
- NUNES, E.A.; et al. Glucose intolerance induced by glucocorticoid excess is further impaired by co-administration with β -hydroxy- β -methylbutyrate in rats. **Appl. Physiol. Nutr. Metab**, v.38, p.1137-1146, 2013.
- OLEFSKY, J. M., et al. The effects of acute and chronic dexamethasone administration on insulin binding to isolated rat hepatocytes and adipocytes. **Metabolism**, v.24, p.517-527, 1975.
- OLEFSKY, J.M.; GLASS, C.K.; Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **Annu Rev Physiol.**; v.72, p.:219-246, 2010.
- OAKLEY, R.H.; SAR, M.; CIDLOWSKI, J.A. Nucleic acids, protein synthesis, and molecular genetics: the human glucocorticoid receptor isoform: expression, biochemical properties, and putative function. **J. Biol. Chem**, v. 271, p.9550-9559, 1995.
- OAKLEY, R.H.; CIDLOWSKI, J.A. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. **J Allergy Clin Immunol**, v.132, n.5, p.1033-1044,2013.
- PATERSON, JM, et al. Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci**, v.1, n.18, p.7088-7093, 2004.
- PAZ, K.; et al. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs

their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. **J Biol Chem**, v.272, p.29911-29918, 1997.

PORTILLO, M.P. *In vivo* lipolysis in adipose tissue from two anatomical locations measured by microdialysis. **Life Sciences** v. 67, p. 437-445, 2000.

PRATT W.B.; TOFT, D.O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. **Endocr Rev**, v.18, p.306-360, 1997.

PRATLEY, R.E.; WEYER, C. The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus. **Diabetologia**, v.44, n.8, p.929-945, 2001.

PRELOVSEK, et al. High dexamethasone concentration prevents stimulatory effects of TNF- α and LPS on IL-6 secretion from the precursors of human muscle regeneration. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.29, p.1651-1656, 2006.

PUJOLS, L, et al. Expression of the human glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in human respiratory epithelial cells and their regulation by dexamethasone. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.24, p.49-57, 2001.

RAFACHO, A.; et al. Functional Alterations in Endocrine Pancreas of Rats With Different Degrees of Dexamethasone-Induced Insulin Resistance. **PANCREAS**, v.36, n.3, p.284-293, 2008a.

RAFACHO, A. et al. Increased pancreatic islet mass is accompanied by activation of the insulin receptor substrate-2/serine-threonine kinase pathway and augmented cyclin D2 protein levels in insulin-resistant rats. **Int. J. Exp. Path.**, v.89, p.264-275, 2008b.

RAFACHO, A.; et al. Morphofunctional Alterations in Endocrine Pancreas of Short- and Long-term Dexamethasone-treated Rats. **Horm Metab Res**, v.43, p. 275- 281, 2011.

RAFACHO A.; et al. The adaptive compensations in endocrine pancreas from glucocorticoid-treated rats are reversible after the interruption of treatment. **Acta Physiol**, v.200, p. 223–235, 2010.

RAMM, G.; et al. A role for 14-3-3 in insulin-stimulated GLUT4 translocation through its interaction with the RabGAP AS160. **J Biol Chem**, v.29, p.29174-80, 2006.

RANNELS, S. R., JEFFERSON, L.S. Effects of glucocorticoids on muscle protein turnover in perfused rat hemicorpus. **Am. J. Physiol**, v.238, p.564-572, 1980.

RAY, A.; PREFONTAINE, K.E. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor, **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.91, p.752-756, 1994.

REAVEN, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v.37, n.12, p.1595-1607. 1988.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J.A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids - New Mechanisms for Old Drugs. **N Engl J Med**, v.353, p.1711-1723, 2005.

RIZZA, R. A.; MANDARINO, L. J; GERICH, J. Cortisol-induced insulin resistance in man: impaired suppression of glucose production and stimulation of glucose utilization due to a postreceptor defect of insulin action. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 54, p.131-138, 1982.

ROGATSKY, I.; IVASHKIV, L.B. Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. **Tissue. Antigens**, v.68, p.1-12, 2006.

ROMEO, GR.; LEE, J.; SHOELSON, SE. Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation—mechanisms and therapeutic targets. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.32, p. 1771-1776, 2012.

ROONEY, D. P., et al. The effect of cortisol on glucose }glucose-6-phosphate cycle activity and insulin action. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v.77, p. 1180-1183, 1994.

ROSEN, O. After insulin binds. **Science**, v. 237, p.1452-1458, 1987.

ROSMOND, R. Role of stress in the pathogenesis of the metabolic syndrome.

Psychoneuroendocrinology, v.30, p.1-10, 2005.

RUZZIN, J.; WAGMAN, A.S.; JENSEN, J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor.

Diabetologia, v. 48, p.2119–2130, 2005.

SAAD, M.J.A.; et al. Modulation of Insulin Receptor, Insulin Receptor Substrate-1, and Phosphatidylinositol 3-Kinase in Liver and Muscle of Dexamethasone-treated Rats. **Clin. Invest**, v.92, p.2065-2072, 1993.

SAKLATVALA, J. Glucocorticoids: do we know how they work?

Arthritis Res, v.4, p.146-150, 2002. SALTIEL, AR.; KAHN, CR.

Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, p.799-806, 2001.

SALTIEL, A.R; PESSIN, J. E. Insulin signaling pathways in time and space. **Trends Cell. Biol.**, v. 12 n.2 p.65-71, 2002.

SAMARASINGHE, R.A.; WITCHELL, S.F.; DEFRANCO, D.B.

Cooperativity and complementarity: synergies in non-classical and classical glucocorticoid signaling. **Cell Cycle**, v.11, p.2819-2827, 2012.

SAPOLSKY, R.M.; KREY, L.C.; MCEWEN, B.S. Stress down-regulates corticosterone receptors in a site-specific manner in the brain.

Endocrinology, v.114, n.1, p.287-292, 1984.

SARBASSOV, D.; ALI, S.M.; SABATINI, D.M. Growing roles for the mTOR pathway **Current Opinion in Cell Biology**, v.17, p.596-603, 2005.

SCHACKE, H.; DOCKE, W.D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther**, v. 96, n. 1, p. 23-43, 2002.

SCHLECHTE, J.A.; GINSBERG, B.H.; SHERMAN, B.M. Regulation of the glucocorticoid receptor in human lymphocytes. **J Steroid Biochem**, v.16, n.1, p.69-74, 1982.

SCHMITZ-PEIFFER, C. Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. **Cell Signal**, v.12, p.583-594, 2000.

SASAKI, K.; et al. Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. The dominant role of insulin. **J Biol Chem**, v.259, p.15242-51, 1984.

SEIGLER, L.; SVEC, F. The physico-chemical properties of the AtT-20 cell's glucocorticoid receptor during depletion. **J Steroid Biochem**, v.21, n.1, p.21-27, 1984.

SETHI, J.K.; HOTAMISLIGIL, G. The role of TNF- α in adipocyte metabolism. **Cell & Developmental Biology**, vol 10, p. 19-29, 1999;

SHI, H.; et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **J Clin Invest**, v.116, n.11, p.3015-3025, 2006.

SHIBLI-RAHHAL, A., VAN BEEK, M., SCHLECHTE, J.A., Cushing's syndrome. **Clin. Dermatol**, v.24, p.260-265, 2006.

SHIPMAN, G.F.; et al. Glucocorticoids and lymphocytes. III. Effects of glucocorticoid administration on lymphocyte glucocorticoid receptors. **Blood**, v.61, n.6, p.1086-1090, 1983.

SHOELSON, S.E.; LEE, GOLDFINE. Inflammation and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p.7, 2006.

SHOELSON; S.E.; LEE, J.; YUAN, M. Inflammation and the IKK β /I κ B/NF- κ B axis in obesity and diet induced insulin resistance. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord**, v.27, p.49-52, 2003.

SHOELSON S. E., WHITE M. F.; KAHN C. R. Tryptic Activation of the Insulin Receptor **J. Biol. Chem.**, v.263, p.4852-4860, 1988.

SIMENTAL-MENDIA, L.E.; RODRIGUEZ-MORAN, M.; GUERRERO-ROMERO, F. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. **Metab Syndr Relat Disord**, v.6, p.299-304, 2008.

SOLINAS, G.; et al. Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.103, p.16454-16459, 2006.

SOLITO, E.; et al. Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase. **Endocrinology**, v.144, p.1164-1174, 2003.

STROMSTEDT, et al. The glucocorticoid receptor binds to a sequence overlapping the TATA box of the human osteocalcin promoter: a potential mechanism for negative regulation. **Mol Cell Biol**, v.11, p.3379-3383, 1991.

SVEC, F.; RUDIS, M. Glucocorticoids regulate the glucocorticoid receptor in the AtT-20 Cell*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.256, n.12, p. 5984-5987, 1981.

TAJIRI, Y.; MIMURA, K.; UMEDA, F. High-sensitivity C-reactive protein in Japanese patients with type 2 diabetes. **Obes. Res**, v.13, p.1810-1816, 2005.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Microbial recognition by Toll-like receptors. **J Dermatol Sci**, v.34, n.2, p.73-82, 2004.

TANIGUCHI, C.M.; EMANUELLI, B; KAHN, C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **NATURE**, v. 7, p.85-96, 2006.

TATA JR. Signalling through nuclear receptors. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.3, p.702-710, 2002.

THOMAS, TP. The complications of systemic corticosteroid therapy in the elderly. A retrospective study. **Gerontology**, v.30, p.60-65, 1984.

THUNHORST, R.L.; BELTZ, T.G.; JOHNSON, A.K. Glucocorticoids increase salt appetite by promoting water and sodium excretion. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.293, n.3, p.1444-1451, 2007.

TORREGO, A, et al. Glucocorticoid receptor isoforms alpha and beta in in vitro cytokine-induced glucocorticoid insensitivity. **Am J Respir Crit Care Med**, v.170, p.420-405, 2004.

TORNELLO, S.; et al. Regulation of glucocorticoid receptor in brain by corticosterone treatment of adrenalectomized rats. **Neuroendocrinology**, v.35, n.6, p.411-417, 1992.

TUNCMAN, G.; et al. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. **PNAS**, v. 103, n.28, p.10741-10746, 2006.

VANDER KOOI, B.T.; et al. The glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter contains both positive and negative glucocorticoid response elements. **Mol Endocrinol**, v.19, p.3001-22, 2005.

VEGIOPOULOS, A; HERZIG, S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol*, v.275, n.1-2, p.:43-61, 2007.

VILLENA J. A.; et al. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. **J Biol Chem**, v.279, p.47066-47075, 2004.

WAJCHENBERG, B.I.; et al. Resistência à Insulina: Métodos Diagnósticos e Fatores que Influenciam a Ação da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.43, n.2, p.76-85, 1999.

WALLACE TM, LEVY JC, MATTHEWS DR. Use and abuse of HOMA modeling. **Diabetes Care**, v.27, p.1487-95, 2004.

WANG, X.A.; et al.; Interferon regulatory factor 7 deficiency prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.15, n.305, p.485-95, 2013.

WEBSTER, J.C et al., Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of

the dominant negative β isoform: A mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. **PNAS**, v. 98, p.865-6870, 2001.

WEINSTEIN, S. P.; et al. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. **Metabolism**, v.47, n.1, p.3-6, 1998.

WEN H.; et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. **Nat Immunol**, v.12, p.408-415, 2011.

WHITE, M.F.; KAHN, C.R. Insulin signaling system. **J Biol Chem**, v. 269, p.1-4, 1994.

WOOD S.C.; et al. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. **Nature**, v.282, p.:503-505, 1979.

YANG, S.; ZHANG, L. Glucocorticoids and vascular reactivity. **Curr Vasc Pharmacol**, v.2, p.1-12, 2004.

YANG-YEN, H.F.; et al. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. **Cell**, v.62, p.1205-1215, 1990.

YUAN M. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . **Science**, v.293, p.1673-1677, 2001.

YUDD, MR.; CIDLOWSKI JA. Molecular identification and characterization of A e B forms of the glucocorticoid receptor. **Mol Endocrinol**, v.15, n.7, p.1093-1103, 2001.

YUZEFOVYCH, L.; WILSON, G.; RACHEK, L. Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.299, p.1096-1105, 2010.

ZHANDE R.; et al. Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1. **Mol Cell Biol**, v.22, p.1016-1026, 2002.

