

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Mecanismos envolvidos nas adaptações estruturais e funcionais das ilhotas pancreáticas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica**

Cristiana Barbosa dos Santos Salvatierra

Cuiabá-MT  
Dezembro/2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Mecanismos envolvidos nas adaptações estruturais e funcionais das ilhotas pancreáticas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso para a obtenção do título de mestre.

**Orientanda:** Cristiana Barbosa dos Santos Salvatierra

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Márcia Queiroz Latorraca

**Co-Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Vanessa Cristina Arantes

Cuiabá-MT  
Dezembro/2009

### FICHA CATALOGRÁFICA

S182m Salvatierra, Cristiana Barbosa dos Santos  
Mecanismos envolvidos nas adaptações estruturais e funcionais das ilhotas pancreáticas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica / Cristiana Barbosa dos Santos Salvatierra. – 2009.

xvii, 68 f. : il. ; color ; 30 cm.

“Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Queiroz Latorraca”.

“Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Cristina Arantes”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Ciências Médicas, Pós-graduação em Ciências da Saúde, 2009.

Bibliografia: f. 54-68.

1. Ilhotas pancreáticas. 2. Restrição protéica. 3. Ratas prenhes. 4. Mitose. I. Título.

CDU – 616.37

*A tua palavra é lâmpada para guiar os meus  
passos, é luz que ilumina o meu caminho.*

*Salmos 119: 105.*

## **Dedico**

*Ao meu esposo Alex Martins  
Salvatierra, meu companheiro e meu  
amparo. Que suportou minha ausência,  
sofreu minhas dores e me proporcionou  
grande felicidade neste período. Preto,  
basta estar com você.*

## AGRADECIMENTOS

Ao *Deus* eterno, imortal, invisível, mas real, a Ele seja dado todo louvor, toda honra e toda glória. Pois sem Ele nem o sopro de vida eu receberia, nada teria sentido, satisfação ou júbilo. Obrigada *Senhor*, por essa VITÓRIA, por tudo o que tens feito e por tudo que vais fazer em minha vida.

Aos meus pais *Ancides Morais dos Santos* (*in memoriam*) e *Luiza Barbosa dos Santos*, que me educaram, repreenderam e incentivaram nos momentos certos. Mas principalmente pelo amor e zelo incondicional, desprendidos em toda minha existência.

Às minhas irmãs *Kátia e Francielle*, por estarem ao meu lado e me oferecerem momentos maravilhosos.

Aos meus sobrinhos *Ana Beatrice, Kerlon Ângelo e Serginho*, por sempre me proporcionarem alegria apenas com um simples sorriso. Vocês são presentes que Deus me deu.

À minha orientadora *Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Queiroz Latorraca*, pela oportunidade e confiança em mim depositada. Pela constante e excelente orientação, disposição e paciência durante todo o mestrado. Pelas histórias e piadas contadas, pelo bom humor e pelas risadas. Mas

essencialmente por ser essa pessoa humana, compreensiva e amiga em todas as circunstâncias. Muito obrigada.

À minha co-orientadora **Prof.<sup>a</sup> Dra. Vanessa Cristina Arantes**, pela disposição, ensinamentos e orientação neste trabalho. Minha gratidão.

À **Prof.<sup>a</sup> Dra. Marise Auxiliadora de Barros Reis**, pela prontidão em ajudar sempre. Pelo sorriso no rosto e pela sinceridade, que nunca a mim foram negados.

À **Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Helena Gaiva Gomes da Silva**, por aceitar prontamente contribuir, de maneira brilhante, na banca de qualificação e de defesa deste trabalho.

À **Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Salete Ferreira Martins**, pela preocupação, franqueza e tranquilidade transmitida.

Ao **Prof.<sup>o</sup> Dr. Roberto Vilela Veloso**, pelos conselhos e bom humor que sempre o acompanham.

Ao **Prof.<sup>o</sup> Dr. Luís Fabrizio Stoppiglia**, pelas idéias sugeridas neste trabalho.



Ao **Profº. Dr. Edson Moleta Colodel**, por realizar a técnica de imunohistoquímica no laboratório de patologia da FAMEV e pela prontidão sempre que requisitado.

À **Profª. Dra. Nair Honda Kawashita**, por sua simpatia, palavras de incentivo e por disponibilizar o Laboratório de Bioquímica para o nosso grupo de pesquisa.

À **Profª. Dra. Carmem Lúcia Bassi**, por ensinar a base da biologia molecular e por aceitar participar da minha banca de qualificação, oferecendo sugestões importantes.

À **Profª. Dra. Maria Alice Rostom de Mello**, por aceitar prontamente participar da minha banca de defesa.

Ao **Profº. Dr. Carlos Henrique Fregadolli**, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos meus super amigos, madrinhas e padrinho de casamento **Lízia, Ingrid, Cynthia, Karine e Devaldino Jr.**, simplesmente obrigada pela amizade, que mesmo às vezes longe, oraram e torceram por mim. Vocês me cativam, são meus amigos-irmãos.

Às minhas inesquecíveis amigas, madrinhas de casamento **Fernanda, Priscila, Suzana**, minha gratidão pela amizade, carinho, apoio e oração. Vocês são amigas mais chegadas que irmãs.

Ao meu Pequeno Grupo *Geisa e Fred, Dielle e Alisson, Ananda e Gustavo, Laís e Anderson, Andréia e Márcio, Zilanda, Vanessa, Maksen, “Cizozo”*, pela amizade, desabafos e sustento espiritual.

À minha amiga *MSc. Sílvia Regina de Lima Reis*, dona de um conhecimento ímpar, tem prazer em ensinar tudo o que sabe e a ajudar nos experimentos, nas análises, nas estatísticas, nos banners, no preparo e ensaio da aula da defesa. Mas sinceramente sua amizade foi a maior recompensa que eu poderia ter conquistado neste período.

À amiga *Letícia*, que me ensinou tudo sobre as ilhotas. Instruiu-me desde como agir no biotério, até coletar ilhotas. E também a cantar músicas bregas sem medo de ser feliz! Pessoa amável, é um prazer tê-la como amiga. Let's go nananan...

Às amigas *Maristela, Denise e Drika* apenas pela alegria que a presença de vocês me traz.

Às amigas de mestrado *Maísa, Suélem e Janaína Vasconcellos*, por estarem ao meu lado no dia-a-dia das aulas e também nas noites perdidas, das listas de exercícios, das provas, dos trabalhos e dos seminários.

Aos colegas de mestrado *Ana Flávia, Léo, Paulinho, Paulinha, Samira, Ana Amélia, Renata, Simone, Albina e Bianca*, pela troca de experiência e pela convivência.

Às lelês 1ª geração, “**Rellen**”, “**Lumara**”, **Gabi’s** e principalmente as minhas meninas **Rafa e Babi** pelo auxílio nos experimentos e por trazer diversão ao LABA. A presença de vocês me trouxe alegria. Vocês são **MARA!**

Às lelês 2ª geração, **Bruna, Talitta, Faena, Jaline, Taís, Suzana, Vanessa, Laila**, e aos primeiros lelês **Felipe e André** pela agradável convivência.

Ao amigo e técnico **Celso Roberto**, pela recepção carinhosa todos os dias, apoio, amizade e presença constante.

Ao técnico **Sr. Valter**, por tornar nossa rotina no biotério mais fácil.

Aos amigos e colegas da UNEMAT, aos **Técnicos Meire, Sr. Carlos e Ellen**, e aos **Professores Dr. Alexandre Porto e MSc. Epitácio**, pelo apoio e ensinamento nas aulas de laboratório, pela assessoria administrativa, pelas dicas de como dar aula pela primeira vez, pela compreensão e boa vontade em me auxiliar sempre.

Aos meus familiares **avós, tios, tias, primos e primas** que torceram por mim, mesmo sem entender o que eu estava fazendo.

À família Penido, *Irmão Darly, Irmã Néia, Kellynha e Mércia*, minha segunda família, a família que escolhi e admiro muito.

Aos meus sogros *Cerina e Milton*, cunhadas *Ducka e Keila*, concunhado *Augusto* e a amiga *Márcia Viallogo*.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq*, pela concessão de bolsa.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso - FAPEMAT*, pelo apoio ao projeto por mim desenvolvido.

Às *Ratas*, especialmente as prenes, que perderam sua vida para a concretização deste trabalho, sem elas não seria possível.

A **todos** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito **OBRIGADA!**

## RESUMO

A restrição protéica e a prenhez são condições comumente associadas a mudanças antagônicas na estrutura e função das ilhotas pancreáticas. Essas mudanças são mediadas pelo meio hormonal que altera o equilíbrio dinâmico entre crescimento (neogênese, proliferação e tamanho) e morte celular (apoptose). Portanto, o presente estudo avaliou os mecanismos envolvidos nas adaptações estruturais e funcionais das ilhotas pancreáticas de ratas durante a prenhez na vigência de restrição protéica. Foram avaliadas ratas Wistar (90 dias) prenhes e não prenhes submetidas à dieta hipoprotéica (HPP e HPNP) ou controle (CP e CNP) do primeiro ao décimo quinto dia de prenhez. Ilhotas foram isoladas para mensurar a secreção e conteúdo de insulina, bem como o conteúdo de proteínas das vias da fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) e da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) por *immunoblotting*. A área das ilhotas foi determinada por morfometria. A prenhez ou dieta hipoprotéica não alteraram o conteúdo de insulina, mas reduziram a área das ilhotas pancreáticas bem como a liberação de insulina em alta concentração de glicose. A prenhez associada à privação protéica aumentou concentração sérica de prolactina, reduziu a concentração sérica de corticosterona, bem como os conteúdos de Akt1 e p70<sup>S6K</sup>. Independente da dieta, a prenhez aumentou o conteúdo de Shc e Erk1/2. Em ilhotas de ratas submetidas à dieta hipoprotéica a prenhez não conseguiu aumentar os conteúdos de pERK1/2. Assim, estes resultados mostram que o curto tempo de restrição protéica durante a prenhez alterou a corticosterona sérica, que possivelmente contribuiu para a redução do conteúdo e da atividade de proteínas das vias da PI3K e MAPK e conseqüentemente alterou a estrutura e a função das ilhotas pancreáticas. A alteração estrutural pode ter resultado do aumento da apoptose e/ou da redução da proliferação e crescimento celular.

## ABSTRACT

Protein restriction and pregnancy are conditions commonly associated with antagonistic changes in structure and function of pancreatic islets. These changes are mediated by hormonal milieu which modify the dynamic balance between cell growth (neogenesis, proliferation and size) and cell death (apoptosis). Thus, we evaluated the mechanism involved in the structural and functional adaptations exhibited by pancreatic islets from pregnant rats submitted to low protein diet. Adult control non-pregnant (CNP) and control pregnant (CP) rats were fed a normal-protein diet (17%), whereas low-protein non-pregnant (LPNP) and low protein pregnant (LPP) rats were fed a low-protein diet (6%) for 15 d. Islets were isolated for the measurement of insulin secretion and content as well as the proteins content from PI3K and MAPK pathways by immunoblotting. The islets area was determinate by morphometry. Pregnancy or low protein diet did not alter the insulin content of pancreatic islets but reduced the islet area and impaired the insulin release in high glucose. Pregnancy associated to protein deprivation increased serum prolactin levels, reduced the serum corticosterone concentration as well as the content of both Akt1 and p70<sup>S6K</sup>. Pregnancy increased the content of Shc and Erk1/2, independently of the diet. In islets from rats submitted to low protein diet pregnancy did not provide to increase the pErk1/2 content. Thus, short term of low protein diet during pregnancy altered the serum corticosterone levels that possibly contributed to the reduction of proteins content from PI3K and MAPK pathways and consequently affected either insulin secretion or islet morphometry. Structural alteration maybe resulted of increase in the apoptosis and/or reduction of cellular proliferation and growth.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XII</b>
<b>1.0 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2.0 OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>30</b>
<b>3.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Animais.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Composição das dietas.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3 Procedimentos Experimentais.....</b>	<b>34</b>
<b>3.4 Isolamento de ilhotas pancreáticas.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5 Secreção estática de insulina.....</b>	<b>34</b>
<b>3.6 Conteúdo de insulina das ilhotas.....</b>	<b>34</b>
<b>3.7 Determinação do conteúdo protéico por Western Blotting.....</b>	<b>35</b>
<b>3.7.1 Immunoblotting.....</b>	<b>35</b>
<b>3.7.2 Imunoprecipitação.....</b>	<b>36</b>
<b>3.8 Imunohistoquímica.....</b>	<b>37</b>
<b>3.9 Determinações bioquímicas e hormonais.....</b>	<b>38</b>
<b>3.9.1 Glicose.....</b>	<b>38</b>
<b>3.9.2 Albumina.....</b>	<b>38</b>
<b>3.9.3 17<math>\beta</math> estradiol.....</b>	<b>38</b>
<b>3.9.4 Progesterona.....</b>	<b>39</b>

<b>3.9.5 Prolactina.....</b>	<b>39</b>
<b>3.9.6 Corticosterona.....</b>	<b>39</b>
<b>3.9.7 Insulina.....</b>	<b>39</b>
<b>3.10 Análise Estatística.....</b>	<b>40</b>
<b>4.0 RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>5.0 DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6.0 CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Composição das dietas (g/Kg)..... **33**

**Tabela 2** – Ganho de peso corporal, peso corporal final, concentrações séricas de albumina, glicose, insulina,  $17\beta$ -estradiol, progesterona, prolactina e corticosterona em ratas prenhes ou não prenhes submetidas à dieta controle (CNP e CP) ou dieta hipoprotéica (HPNP e HPP)..... **43**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da ligação do hormônio ao receptor, dimerização e ativação do receptor de prolactina.....	24
<b>Figura 2.</b> Via de sinalização da Jak2/Stat5.....	25
<b>Figura 3.</b> Via de sinalização da MAPK.....	26
<b>Figura 4.</b> Via de sinalização da PI3-K.....	28
<b>Figura 5.</b> Conteúdo protéico de IR- $\beta$ , IRS-1, IRS-2, subunidade p85 da PI3K, Akt1, pAkt1, razão pAkt1/Akt1, p70 <sup>S6K</sup> , pp70 <sup>S6K</sup> , razão pp70 <sup>S6K</sup> /p70 <sup>S6K</sup> em ilhotas de ratas CNP, CP, HPNP e HPP.....	45
<b>Figura 6.</b> Conteúdo protéico de SHC, Erk1, Erk-2 e pErk1/2 em ilhotas de ratas CNP, CP, HPNP e HPP.....	46
<b>Figura 7.</b> Secreção de insulina estimulada por glicose por ilhotas de ratas CNP, CP, HPNP e HPP.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIN-93	Instituto Americano de Nutrição
AMPC	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
AKT1	V-Akt Tifo Murino Homologo a Oncogene Viral 1
$\beta$ IRKO	<i>Knockout</i> para receptores de insulina em células $\beta$
BSA	Soro de Albumina Bovina
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
CNP	Controle Não Prenhe
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CP	Controle Prenhe
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
E1	Estrona
E2	Estradiol
Erk1	Quinase regulada por sinal extracelular 1
Erk2	Quinase regulada por sinal extracelular 2
g	Grama
$\gamma$	Gama
GDP	Guanina Difosfato
GH	Hormônio do Crescimento

Grb2	Proteína Ligadora de Receptores para Fatores de Crescimento
GTP	Guanina Trifosfato
h	Hora
HCl	Ácido Clorídrico
HPNP	Hipoprotéica Não Prenhe
HPP	Hipoprotéico Prenhe
IGF-1	Fator 1 de Crescimento semelhante à Insulina
IR $\beta$	Receptor de Insulina $\beta$
IRS1	Substrato 1 Receptor de Insulina
IRS2	Substrato 2 Receptor de Insulina
Jak2	Janus quinase 2
kDa	Quilodalton
KCl	Cloreto de Potássio
L	Litro
MAPK	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
MEK	Quinase ativadora de MAPK
Mg	Miligramas
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mmol	Milimol

mTOR	Proteína Alvo da Rapamicina em Células de Mamífero
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de Sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
O <sub>2</sub>	Oxigênio
°C	Graus Celsius
P	Progesterona
pAKT1	V-Akt Tifo Murino Homologo a Oncogene Viral 1 Fosforilada
pERK1/2	Quinase regulada por sinal extracelular 1/2 Fosforilada
p70 <sup>S6K</sup>	p70 Ribosomal S6 quinase
pp70 <sup>S6K</sup>	p70 Ribosomal S6 quinase fosforilada
PI3K	Fosfatidil Inositol-3 quinase
PLC $\gamma$	Fosfolipase C gama
PKA	Proteína Quinase A
PKB	Proteína Quinase B
PKC	Proteína Quinase C
Pmol	Picomol
PMSF	Fluoreto de Fenilmetil Sulfonila
PRL	Prolactina
PRL-R	Receptor de Prolactina
Raf	V-Raf-Leucemia Oncogene Viral

Ras	Resistência a Ataques Audiogênico
s	Segundos
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Ser	Serina
Shc	Homólogo a Src 2/ $\alpha$ presente no colágeno
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
Src	Proteína oncogênica quinase
Stat5	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 5
Tris	Hidroximetil aminometano
$\mu$ g	Microgramas
$\mu$ L	Microlitros
$\mu$ m	Micromêtros
V	Volts

# *Introdução*

## 1.0 INTRODUÇÃO

A população das células beta pancreáticas é dinâmica e sofre alterações compensatórias para a manutenção da normoglicemia. A massa das células beta pancreáticas resulta de um equilíbrio dinâmico entre crescimento (neogênese, proliferação e tamanho) e morte celular (apoptose)<sup>1</sup>. Esse equilíbrio é rompido em condições fisiológicas e patológicas, como a prenhez e a desnutrição, resultando em alterações opostas na massa das ilhotas pancreáticas.

Na desnutrição ocorre redução significativa da massa de células beta<sup>2</sup> devido à diminuição da taxa de proliferação e aumento da apoptose dessas células<sup>3</sup>. Também se observa redução do tamanho das células beta e do volume total das ilhotas em relação à idade e ao peso corporal, menor proporção de células beta por ilhota, perda dos grânulos de insulina e células beta contendo preponderantemente grânulos anormalmente pálidos<sup>4,5,6</sup>.

Por outro lado, na prenhez há aumento da massa das ilhotas<sup>7</sup>, devido à hiperplasia e hipertrofia<sup>8</sup>. Tais adaptações parecem decorrer do aumento da proliferação das células existentes e não da neogênese<sup>9</sup>. Em roedores o aumento de proliferação das células beta é inicialmente observado aos 10 dias, atinge o ápice aos 14 dias e retorna ao normal no fim da prenhez, aos 21 dias<sup>10</sup>.

Inúmeros fatores regulam a proliferação das células pancreáticas, incluindo nutrientes como a glicose e os aminoácidos, fatores de crescimento e hormônios<sup>2, 11</sup>. Entre os fatores de crescimento e hormônios associados ao aumento da proliferação celular, encontram-se o IGF-1 (*insulin-like growth factor 1* ou fator de crescimento semelhante à insulina), o hormônio do crescimento, o lactogênio placentário e a prolactina<sup>12, 13, 14</sup> e os glicocorticóides<sup>15</sup>.



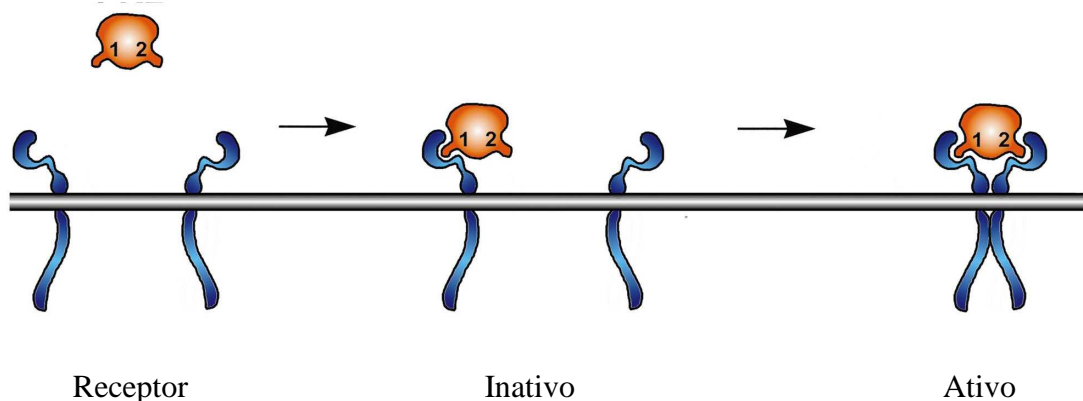
Na restrição protéica ocorre aumento da concentração sérica de corticosterona e redução da concentração plasmática do fator de crescimento IGF-1, bem como do número de receptores do hormônio de crescimento e da prolactina, pelo menos no fígado<sup>16, 17, 18</sup>.

A prenhez de roedores é caracterizada por aumento dos hormônios esteróides (E1, E2 e progesterona), dos lactogênios placentários e da prolactina<sup>19, 20, 21</sup>, bem como da expressão do RNA mensageiro de receptores de hormônio do crescimento e da prolactina<sup>22</sup>, e do conteúdo de receptores de prolactina no pâncreas<sup>23</sup>.

O aumento da proliferação das células beta pancreáticas tem sido atribuído à prolactina devido às seguintes razões: 1) o E2 (17 $\beta$ -estradiol) aumenta a biossíntese de insulina e contribui para a sobrevivência celular, mas não altera a proliferação das células beta<sup>24</sup>; 2) a progesterona diminui a massa de células beta pancreáticas<sup>25</sup>; e, 3) o aumento da proliferação celular verificada na prenhez é reproduzida em ilhotas cultivadas com prolactina<sup>14</sup>. O aumento da corticosterona observado no final da prenhez<sup>26</sup>, parece inibir a proliferação celular e aumentar a apoptose, revertendo portanto os efeitos da prolactina de aumentar a massa das ilhotas pancreáticas<sup>27</sup>. No entanto, o efeito da corticosterona é ambíguo, uma vez que os glicocorticóides potencializam a ativação da STAT5 induzida por prolactina através de mecanismos que envolvem o receptor de glicocorticóides<sup>28, 29, 30</sup>.

A prolactina, assim como o hormônio do crescimento, age nas células-alvo após se ligar a receptores específicos, pertencentes à superfamília dos receptores das citocinas classe 1<sup>31</sup>. A ativação dos receptores de prolactina e de hormônio do crescimento requer a sua dimerização induzida pelo hormônio. Inicialmente ocorre a interação do sítio 1 da prolactina com um receptor, levando a formação de um complexo inativo (um hormônio e um receptor). A formação deste complexo é um pré-requisito para que o sítio 2 da prolactina interaja com um outro receptor desse hormônio formando um complexo trimérico ativo, composto por um hormônio e um receptor homodímero<sup>32, 33, 34</sup> (Figura 1).

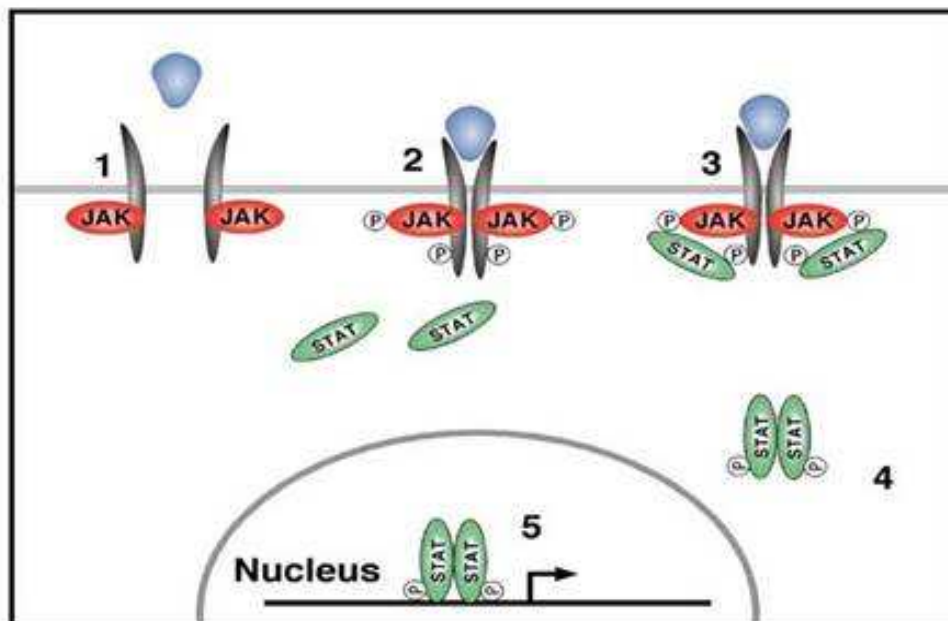
PRL/GH



**Figura 1.** Representação esquemática da ligação do hormônio ao receptor, dimerização e ativação do receptor de prolactina<sup>35</sup>.

Por não apresentarem atividade tirosina quinase intrínseca, esses receptores recrutam e/ou ativam tirosinas quinases citoplasmáticas para desencadear o sinal celular<sup>36</sup>. Tanto o hormônio do crescimento quanto a prolactina requerem a Jak2 (*Janus kinase* ou Janus quinase 2) para iniciar a transdução do sinal após a ligação ao receptor<sup>37, 38</sup>. Entretanto, a Jak2 está constitutivamente associada com o receptor da prolactina<sup>39, 40</sup>, isto é, a associação da Jak2 ao receptor não requer a ligação hormônio-receptor, como ocorre com o hormônio do crescimento<sup>41</sup>.

Em células secretoras de insulina a prolactina ativa Jak2 ao se ligar ao seu receptor, que fosforila o receptor e a Stat5 (*Signal transducer and activator transcription* ou transdutor de sinal e ativador de transcrição 5)<sup>42, 43, 44</sup>. Uma vez fosforilada, a Stat5 dimeriza, migra para o núcleo e ativa fatores de transcrição promovendo a expressão de diversos genes<sup>45, 43, 46</sup> (Figura 2). A ativação dessa via resulta no aumento da expressão de vários genes, incluindo o do receptor de prolactina e da insulina, bem como daqueles que resultam no aumento da divisão celular<sup>47</sup>.



**Figura 2.** Via de sinalização da Jak2/Stat5<sup>48</sup>.

Embora a cascata Jak2/Stat5 seja presumivelmente a mais importante via de sinalização da prolactina e do hormônio do crescimento, outras vias estão igualmente envolvidas na transdução de sinais desses hormônios, incluindo a cascata da Ras/Raf/MAPK (*mitogen-activated protein kinase* ou proteína quinase ativada por mitógeno), IRS-1 (*insulin receptor substrate 1* ou primeiro substrato do receptor de insulina), PI-3K (*phosphatidylinositol-3-kinase* ou fosfatidil inisitol 3 quinase), PKC (*protein kinase-C* ou proteína quinase C), PLCγ (*phospholipase-C* gama ou fosfolipase C gama), íons cálcio.

A sinalização pela via da MAPK envolve a cascata Shc/Grb2/SOS/Ras/Raf/ MAPK. Após a ativação do receptor de prolactina ou do hormônio de crescimento, Jak2 fosforila Shc (*Src homology 2/α-collagen related* ou Homólogo a Src 2/α presente no colágeno), que ativa a proteína Ras através da molécula adaptadora Grb2 e um fator de troca do nucleotídeo guanina (SOS), induzindo Ras a trocar seu GDP por um GTP. Este evento é seguido por uma estimulação seqüencial de diversas proteínas quinases citoplasmáticas, como a Raf (ou

quinase específica para Ser/Thr), a MEK (ou quinase ativadora da MAPK) e as MAPK. As MAPK abrangem grande número de proteínas tais como Erk1/2 (*extracellular-signal regulated kinase 1/2* ou quinase regulada por sinal extracelular 1/2), também denominadas p44/p42, que requerem a fosforilação de resíduos de tirosina e treonina<sup>49</sup>. A Erk 1/2, por sua vez, migra para o núcleo celular, onde fosforila um conjunto de moléculas responsáveis pela transcrição, iniciando, assim, a proliferação e diferenciação celular<sup>50</sup> (Figura 3).

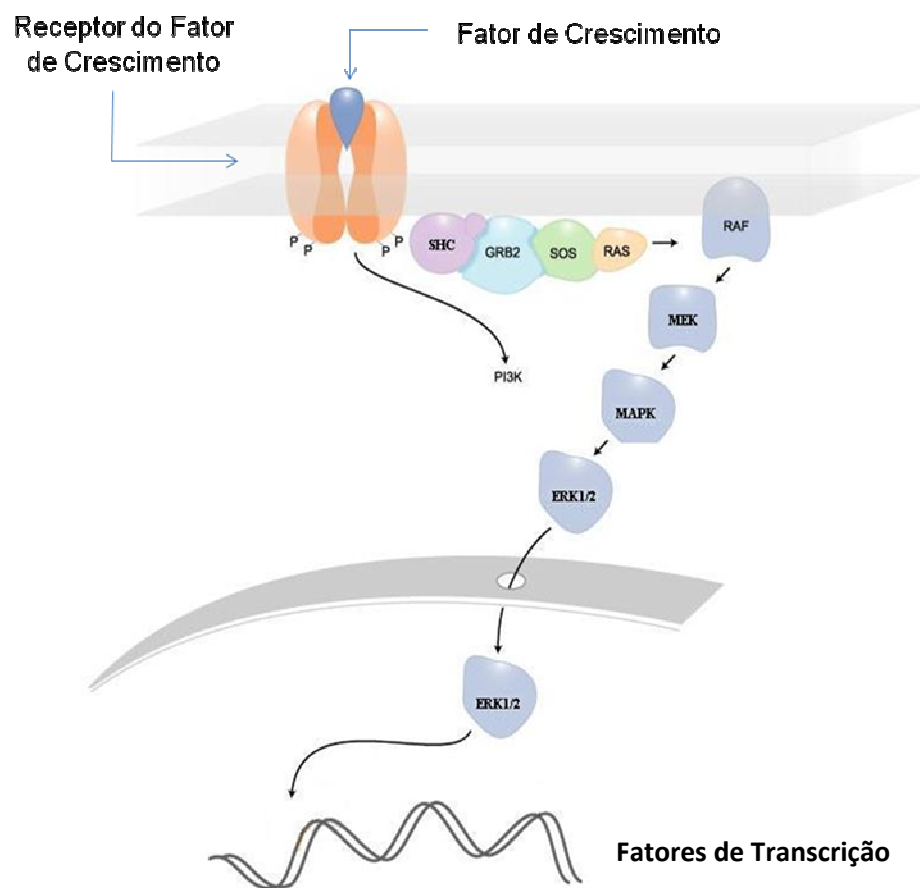


Figura 3. Via de sinalização da MAPK<sup>51</sup>.

O lactogênio placentário exerce seus efeitos após se ligar ao receptor de prolactina, ativando as vias de sinalização Jak2/Stat5, PI3K/Akt, Erk1/2, adenilato ciclase /AMPC e cálcio intracelular<sup>52, 53, 54</sup>.

A insulina e o IGF-1, assim como a prolactina e o hormônio do crescimento, estimulam a proliferação das células beta pancreáticas utilizando componentes comuns da via IRSs/PI3K<sup>52, 55, 56, 13</sup>. A insulina e o IGF-1 estimulam a proliferação das células beta principalmente via autofosforilação dos seus receptores, que fosforilam Shc com conseqüente ativação da via da MAPK, ou fosforilam o IRS2 que se associa e ativa a subunidade regulatória (p85) da PI3-K, que por sua vez medeia a ativação da PKB/Akt (*protein kinase B* ou proteína quinase B).

A Akt tem numerosos substratos, incluindo uma serina/treonina quinase denominada mTOR (*mammalian target of rapamycin* ou proteína alvo da rapamicina em células de mamíferos), que quando ativada fosforila a p70<sup>S6k</sup> (70 kDa S6 kinase ou 70 kDa S6 quinase)<sup>13, 57, 58</sup> resultando em hipertrofia celular e proliferação celular. Tanto a Akt quanto a p70<sup>S6k</sup> podem fosforilar Bad que posteriormente se liga ao complexo protéico 14-3-3 impedindo a formação do heterodímero Bad/Bcl-X<sub>L</sub>, promovendo a sobrevivência celular. Esse mesmo efeito é obtido quando a Akt fosforila a FoxO1, um membro da família FoxO (Fatores de transcrição da família *forkhead*)<sup>59</sup> (Figura 4). O efeito do GH e da prolactina é iniciado pela ativação da Jak2/Stat5 que também estimula essas vias<sup>60, 61</sup>.

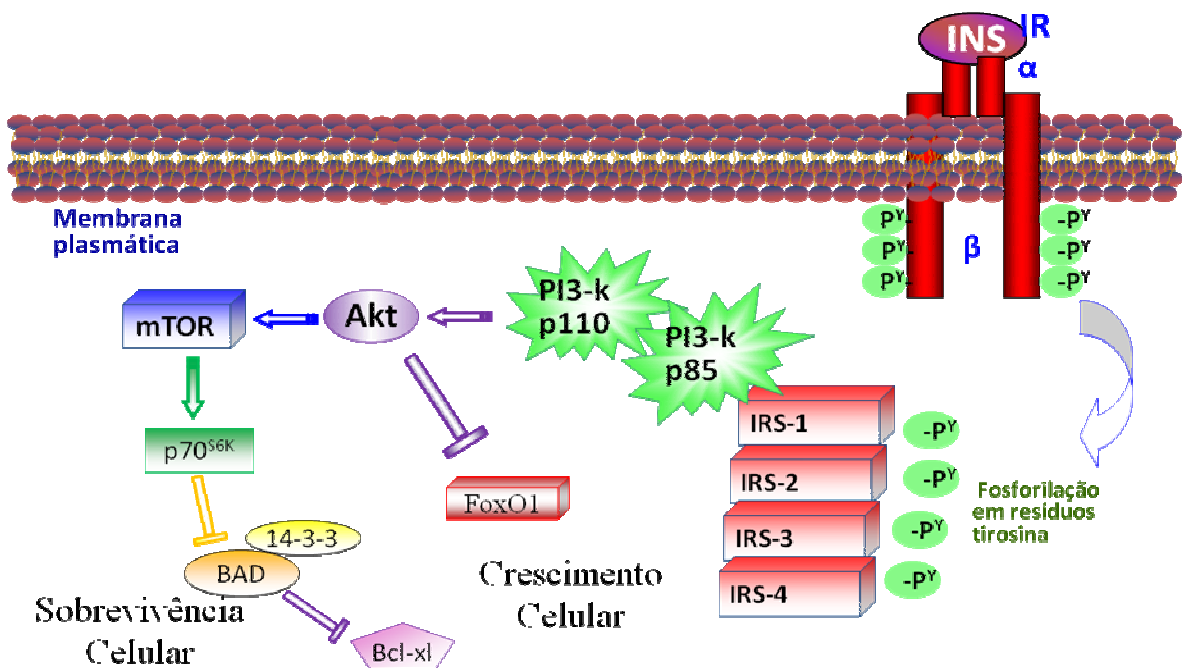


Figura 4 - Via de sinalização da PI3-K.

As vias intracelulares da sinalização dos hormônios cujos receptores possuem atividade tirosina quinase podem se cruzar (*cross-talk*) em diferentes níveis, e com a prolactina e o hormônio de crescimento não é diferente. Ademais, mudanças na expressão de proteínas comuns a essas vias e/ou na ativação/fosforilação de tais proteínas pode resultar em alteração da proliferação e da apoptose, dois eventos associados à expansão/redução da massa de ilhotas pancreáticas verificados na prenhez e na desnutrição, respectivamente.

*Objetivos*

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Avaliar os mecanismos envolvidos nas adaptações estruturais e funcionais das ilhotas pancreáticas de ratas durante a prenhez na vigência de restrição protéica.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar o perfil nutricional, bioquímico e hormonal de ratas prenhes submetidas à restrição protéica.
- Verificar a secreção de insulina em resposta a concentração basal, fisiológica e suprafisiológica de glicose em ilhotas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica.
- Verificar o conteúdo de insulina em ilhotas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica.
- Determinar a área das ilhotas pancreáticas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica.
- Determinar o conteúdo de proteínas da via MAPK em ilhotas pancreáticas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica.
- Determinar o conteúdo de proteínas da via da PI3-quinase em ilhotas pancreáticas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica.



# *Material e Métodos*

### 3.0 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Avaliação Biológica de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso (DAN/FANUT/UFMT).

#### 3.1 Animais

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade Albinos, ordem Rodentia Mammalia, família Muridae), adultas, com 90 dias de idade provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso.

Todos os experimentos foram dirigidos por princípios de boas práticas de laboratório e procedimentos científicos, seguindo o guia prático de material de biotério do *International Committee on Laboratory Animals (ICLA)*<sup>62</sup>.

Um grupo de ratas foi acasalado com machos adultos da mesma linhagem (4 fêmeas e 1 macho) em gaiolas de criação de polipropileno, medindo 37,0 x 31,0 x 16,0 cm com tampa de aço inoxidável, enquanto outro grupo não foi submetido ao acasalamento. A cópula foi confirmada pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal.

Após o acasalamento, ratas virgens e prenhes foram mantidas individualmente e passaram a receber dieta normoprotéica com 17% de proteína (CNP e CP, respectivamente) ou hipoprotéica com 6% de proteína (HPNP e HPP, respectivamente) durante 15 dias. Todos os animais tiveram livre acesso à água e à dieta, e foram mantidos sob condições padrão de luminosidade (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura de 23°C.

Foi adotado o experimento fatorial  $2 \times 2$ , testando os fatores estado nutricional e estado fisiológico. Assim, foram avaliados 4 grupos: Controle Não Prenhe (CNP); Controle Prenhe (CP); Hipoprotéico Não Prenhe (HPNP) e Hipoprotéico Prenhe (HPP).

### 3.2 Composição das dietas

A dieta normoprotéica cuja composição encontra-se descrita na Tabela 1, seguiu as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93) para roedores nas fases de crescimento, prenhez e lactação. A dieta hipoprotéica teve a proteína substituída por carboidratos, sendo mantidas as devidas proporções de amido, dextrina e sacarose, bem como a de L-cistina, em relação ao teor de caseína e às concentrações dos demais nutrientes. Portanto as dietas eram isocalóricas (3,76 Kcal/g).

**Tabela 1 – Composição das dietas (g/Kg)**

Ingredientes	Normoprotéica (17% de proteína)	Hipoprotéica (6% de proteína)
Caseína (84% de proteína)**	202,2	71,5
Amido	397,0	480,0
Dextrina	130,5	159,0
Sacarose	100,0	121,0
L-cistina	3,0	1,0
Fibra (microcelulose)	50,0	50,0
Óleo de soja	70,0	70,0
Mistura de sais AIN93G***	35,0	35,0
Mistura de vitaminas AIN93G***	10,0	10,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5

\*\*Valores corrigidos em função do conteúdo de proteína da caseína.

\*\*\*Composição detalhada <sup>63</sup>.

### **3.3 Procedimentos Experimentais**

O peso corporal foi monitorado três vezes, iniciando no primeiro dia de tratamento, depois aos sete dias, e o último aos quinze dias. O ganho de peso foi calculado pela diferença obtida entre o peso final e o peso inicial.

No décimo quinto dia de prenhez foram realizados todos os procedimentos experimentais, que tiveram início às 8:00 horas e se estenderam por toda a manhã. Em todos os casos, as ratas foram anestesiadas com CO<sub>2</sub>, e em seguida decapitadas, sendo o sangue coletado para as dosagens bioquímicas e hormonais.

### **3.4 Isolamento de ilhotas pancreáticas**

Após eutanásia realizaram-se a remoção e a digestão do pâncreas pelo método da colagenase, como previamente descrito<sup>64</sup>.

### **3.5 Secreção estática de insulina**

Após o isolamento, grupos de quatro ilhotas foram incubados por 90 min a 37°C em tampão de Krebs-bicarbonato contendo glicose (2,8; 8,3 e 16,7 mmol/L) equilibrado com uma mistura de 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> para garantir um pH de 7,4. O meio de incubação continha (mmol/L): NaCl 115, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2,56, MgCl<sub>2</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 24 e albumina bovina (3 g/L). A insulina secretada foi determinada por radioimunoensaio.

### **3.6 Conteúdo de insulina das ilhotas**

Grupo de 20 ilhotas isoladas foram sonicadas em 1ml de água deionizada. Em seguida, o material foi centrifugado e estocado a -85°C para determinação do conteúdo de insulina por radioimunoensaio.

### 3.7 Determinação do conteúdo protéico por Western Blotting

#### 3.7.1 Immunoblotting

Após o isolamento, grupos de ilhotas foram depositadas em *ependorf* e acrescentado 50-200  $\mu$ L de tampão de homogeneização contendo inibidor de proteases e anti-fosfatases<sup>65</sup>.<sup>52</sup>. As ilhotas foram sonicadas e foi determinada a quantidade total de proteínas<sup>66</sup>. Amostras contendo 50 $\mu$ g de proteína foram incubadas por 5 min a 85°C com tampão Laemmli 4X concentrado (1 mmol/L de fosfato de sódio, pH 7,8, 0,1% azul de bromofenol, 50% glicerol, 10% SDS, 2% mercaptoetanol) (4:1, v/v) e a corrida realizada em géis de poliacrilamida a 12% (Erk1, Erk2 e pErk1/2) ou 10% (Akt, pAkt, SHC) a 120 V por 30 min. A eletrotransferência das proteínas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) foi realizada por 2 h a 200 V em tampão contendo metanol e SDS. Depois de checada a eficiência da transferência pela coloração da membrana com Ponceau, as mesmas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em solução basal (10 mmol de Tris/L, 30 mmol de NaCl/L, 0,5% Tween 20) por duas horas em temperatura ambiente. A expressão das proteínas Akt, pAkt, SHC, Erk1, Erk2 e pErk1/2 foram detectadas nas membranas após incubação *overnight* a 4°C com anti-Akt1 (*mouse polyclonal* sc-5298), anti-phospho[Ser<sup>473</sup>]Akt (*rabbit polyclonal*, sc 7985), anti-SHC (*rabbit polyclonal*, sc-288), anti-Erk1 (*rabbit polyclonal*, sc-94), anti-Erk2 (*rabbit polyclonal*, sc-154), da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA), e anti-Erk1/2 (p44/42 MAPK *mouse monoclonal*, E10) da Biolabs Inc (Beverly, MA, USA), diluídos 1:500 em solução basal contendo 3% de albumina. A detecção foi feita por quimioluminescência (SuperSignal West Pico, Pierce) após incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (*horseradish peroxidase-conjugated*). A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das autoradiografias reveladas, por densitometria ótica, utilizando um scanner (HP 3400) e o programa Scion Image (Scion Corporation). Os dados numéricos

obtidos, correspondentes às bandas protéicas foram comparados estatisticamente como descrito no item 4.9.

### 3.7.2 Imunoprecipitação

Aproximadamente 1000 ilhotas foram homogeneizadas em tampão de extração para imunoprecipitado contendo Tris-HCl (pH 7.4), 100 mmol/L pirofosfato de sódio, 100 mmol/L fluoreto de sódio, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L ortovanadato de sódio, 2.0 mmol/L PMSF, e 0,1 mg aprotinina/ml e homogeneizado durante 20 segundos, a 4 °C, utilizando sonicador. Foi adicionado ao homogeneizado Triton X-100 a 1%, sendo agitado manualmente e mantidos no gelo por 40 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000G por 15 minutos a 4°C. O “*pellet*” foi desprezado e alíquotas do sobrenadante foram usadas para medida da concentração protéica<sup>66</sup>. As amostras contendo 60µg de proteína foram incubadas “*overnight*” a 4°C, sob agitação constante com 10µl de anticorpos específicos: anti-IRβ (*rabbit polyclonal*, sc-711), anti-IRS1 (*rabbit polyclonal*, sc-559), anti-IRS2 (*goat polyclonal*, sc-1556), anti-p70<sup>S6K</sup> (*rabbit polyclonal*, sc-8418), anti-phospho p70<sup>S6K</sup> (*mouse monoclonal*, sc-8416) da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA), e anti-p85 da PI3K (*rabbit polyclonal* 06-195) da UBI (Lake Placid, NY, USA). No dia seguinte, foram adicionados às amostras 40 µl de proteína A Sepharose, sendo estas mantidas sob agitação constante a 4 °C por 2 horas. Os imunocomplexos foram lavados por três vezes com tampão de lavagem para imunoprecipitado, contendo ortovanadato de sódio 2mM, Trisma 100mM, EDTA 1mM, Triton 0,5%. O “*pellet*” foi ressuspenso com 20 µl de tampão de Laemmili diluído (1:2) contendo 100 mM de DTT e fervido por 5 minutos e a corrida realizada em gel de poliacrilamida (8% para IRS1/2, 10% para IRβ, p85 da PI3K, p70<sup>S6K</sup> e p70<sup>S6K</sup> fosforilada). A transferência para a membrana de nitrocelulose e a detecção por quimiluminescência foram realizadas conforme descrito anteriormente.

### 3.8 Imunohistoquímica

Para análise morfológica, o pâncreas de ratas foi coletado e mantido por aproximadamente 8 horas em solução de formaldeído tamponado a 10% e posteriormente processada em métodos rotineiros para análise histológica<sup>67</sup>.

A técnica de imunohistoquímica anti-insulina foi realizada após cortes histológicos de 5µm de espessura, e aplicados sobre lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath®). Os cortes foram desparafinados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool até a água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada por 15 minutos em temperatura ambiente. Para a recuperação antigênica foi utilizado tampão citrato pH 6,0 em forno microondas por 2 minutos. As ligações inespecíficas foram minimizadas com uso de leite desnatado (Molico®) 5% diluído em água destilada durante 15 minutos. Os cortes foram cobertos com solução contendo o anticorpo policlonal anti-insulina suíno (*guinea pig anti-swine insulin polyclonal antibody*) (A0564 – Dako, Corp., Carpinteria, CA., diluição 1:150), incubados em câmara úmida a 37°C por 60 minutos. Posteriormente, foram lavados em água destilada e tratados com anticorpo secundário biotinalado anti IgG de cobaia (61-4620, ZYMED, Invitrogen USA) por 30 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente. Em seguida os cortes foram lavados em água destilada e tratados com o conjugado streptavidina-peroxidase (DAKO Corp., Carpinteria, CA) por 30 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente. Posteriormente, as secções foram submetidas à revelação com o cromógeno vermelho (VECTOR®NovaRED) por 5 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada e contra-corados com hematoxilina de Harris por 30 segundos, em seguida lavadas em água corrente por 1-2 minutos e desidratados em graduações de álcool, clarificadas em xilol e montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany Sigma Chemical Co., Saint Louis,

USA). Foram selecionadas todas as ilhotas, aproximadamente 20, de um campo da lâmina. Em seguida as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico. Imagens foram capturadas em câmera digital (Sony Cyber-shot DSC-H5) e mensuradas usando Software Motic® Images Plus 2.0 ML.

### **3.9 Determinações Bioquímicas e Hormonais**

#### **3.9.1 Glicose**

A glicemia foi determinada pelo método da glicose oxidase-peroxidase<sup>68</sup>. As absorvâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro modelo 395, marca Micronal, em comprimento de onda de 505nm. Os resultados foram expressos em mmol/L.

#### **3.9.2 Albumina**

Foi determinada pelo método colorimétrico do verde de bromocresol<sup>69</sup>. Foram adicionados 0,01 ml de soro, 1ml do reativo de cor. As absorvâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro modelo 395, marca Micronal, em comprimento de onda de 630 nm. Os valores foram expressos em g/dL.

#### **3.9.3 17 $\beta$ -estradiol**

Foi determinado por imunensaio enzimático de fase sólida para dosagem do estradiol em soro ou plasma humano, usando kit comercial (BioChem ImmunoSystems, Itália). Os valores foram expressos em pmol/L.



### **3.9.4 Progesterona**

Foi determinado por imunoensaio enzimático de fase sólida para dosagem de progesterona em soro ou plasma humano, usando kit comercial (BioChem ImmunoSystems, Itália). Os valores foram expressos em nmol/L.

### **3.9.5 Prolactina**

Foi determinado por imunoensaio enzimático para dosagem de prolactina em soro, usando kit comercial (ALPCO Diagnostics, USA). Os valores foram expressos em ng/mL.

### **3.9.6 Corticosterona**

Foi determinado por ensaio imunoabsorvente enzimático para dosagem de corticosterona em soro de rato, usando kit comercial (Assay Design, Michigan, USA). Os valores foram expressos em µg/dL.

### **3.9.7 Insulina**

A insulina secretada e o conteúdo de insulina em ilhotas isoladas foram determinadas por radioimunoensaio de acordo com o método descrito<sup>70</sup>.

Foram transferidas alíquotas de 0,1 ml das amostras desconhecidas (em duplicata) as quais receberam, a seguir, 0,2 ml de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina marcada com <sup>125</sup>I (traçador) em tampão fosfato pH 7,4, acrescido de NaCl 0,9% e albumina 0,5%. Em seguida, foram preparados os seguintes controles:

- a) Três tubos (Totais) que receberam somente 0,2 ml do tampão fosfato contendo insulina marcada <sup>125</sup>I para averiguação da radiação máxima.

b) Três tubos (Ligação não específica) contendo 0,2 ml do tampão fosfato contendo insulina marcada  $^{125}\text{I}$  e 0,1 ml de tampão fosfato, para determinar possíveis interferências no ensaio pelos componentes do tampão.

c) Três tubos (Referência) contendo 0,2 ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada com  $^{125}\text{I}$  e anticorpo anti-insulina e 0,1 ml de tampão fosfato, constituindo assim o zero de insulina da curva padrão.

Em seguida, preparou-se também em triplicata, uma série de tubos (curva padrão), contendo 0,1 ml de insulina nas seguintes concentrações: 0,02; 0,039; 0,078; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5; e 5,0 ng/ml. Cada tubo dessa série recebeu também 0,2 ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada  $^{125}\text{I}$  e anticorpo anti-insulina. Em seguida, amostras, controle e curva padrão foram agitados em vórtex e estocados a 4 °C, durante 48 horas. Após este período de incubação, com exceção dos totais para análise da radiação máxima, todos os outros tubos receberam 0,2 ml de uma solução contendo 2,5% de carvão (Norit A), 0,5% de albumina e 0,25% de dextran T 70. Os tubos foram deixados em repouso durante 20 min e a seguir centrifugados durante 20 min (800 g) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade contida em cada tubo foi avaliada em contador de radiação gama. Os três tubos elaborados para análise da radiação máxima não tiveram o sobrenadante descartado, sendo as radiações dos mesmos avaliadas diretamente. Com base nos valores obtidos nos tubos contendo insulina conhecida elaborou-se a curva padrão que foi utilizada para a avaliação dos valores desconhecidos das amostras. Os resultados foram expressos em pmol/L.

### **3.10 Análise Estatística**

Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão do número de animais ou experimentos. Para ilhotas, o *n* se refere ao número de experimentos realizados. A magnitude do aumento do conteúdo das proteínas das vias da MAPK e PI3K, bem como da área das

ilhotas pancreáticas foi obtida pela divisão dos valores médios dos grupos comparados. Inicialmente foi aplicado o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. Os resultados com variâncias heterogêneas e sem distribuição normal foram transformados (logarítmica-  $\text{Log}_{10}$  ou  $\text{Ln}$  da variável) para correção da heterogeneidade ou anormalidade<sup>71</sup>. Em seguida os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) a dois fatores (estado nutricional e estado fisiológico). Quando necessário estas análises foram complementadas pelo teste de comparação múltipla de média LSD (*least square difference*). O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

Para análise dos resultados utilizou-se o programa "Statistic for Windows", versão 4.3, 1993 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

*Resultados*

#### 4.0 RESULTADOS

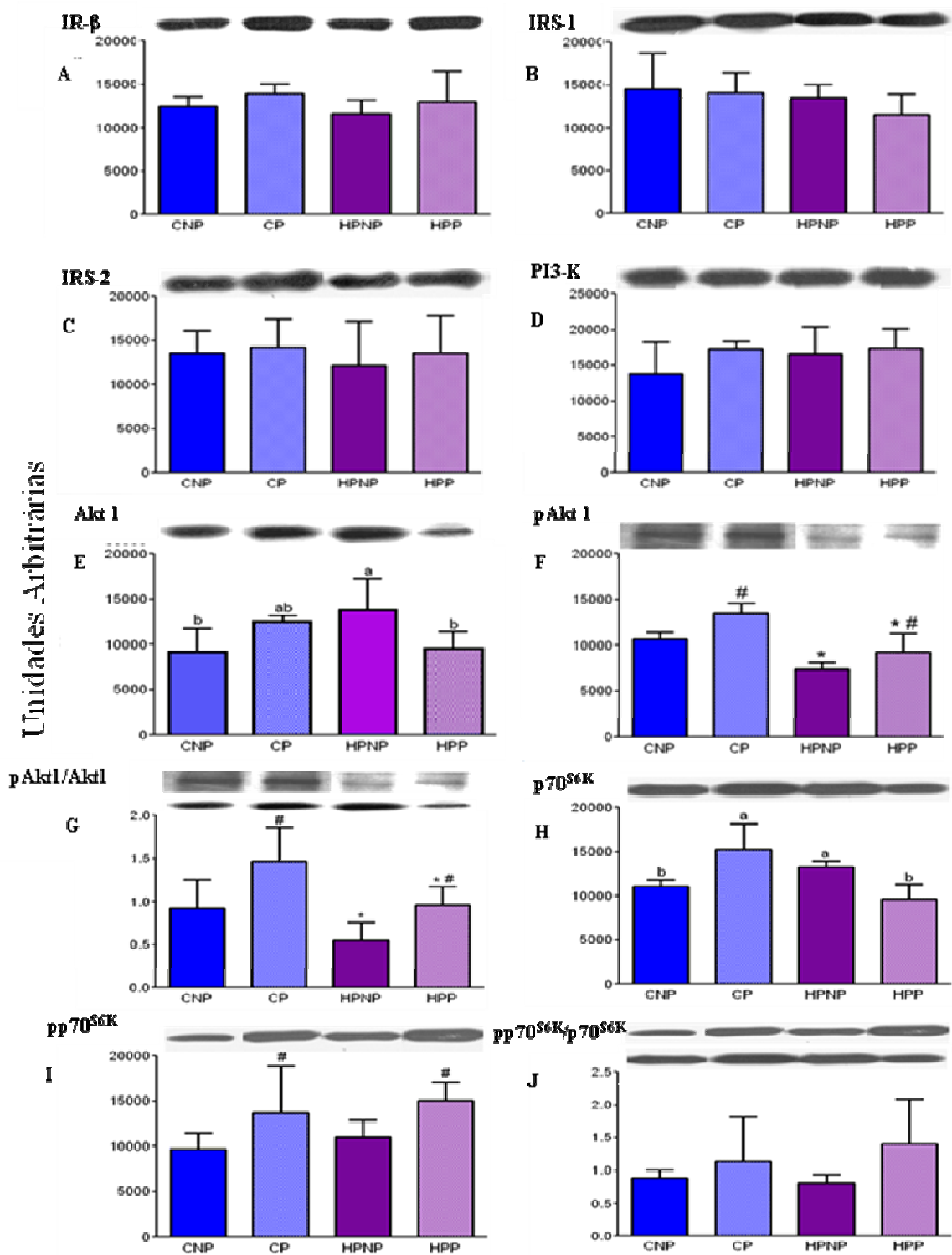
Independente do estado nutricional, ratas prenhes apresentaram ganho de peso e conseqüentemente peso corporal final maior ( $F_{1,83}= 236,3; p<0,0001$  e  $F_{1,83}= 67,7; p<0,0001$ , respectivamente). As ratas prenhes também tiveram concentrações séricas de E2 ( $F_{1,23}= 102,4, p<0,0001$ ) e P ( $F_{1,22}= 85,8, p<0,0001$ ) maior e glicemia menor ( $F_{1,15}= 29,9, p<0,0001$ ) em comparação às ratas não prenhes. A prolactinemia de ratas do grupo HPP foi maior em relação às ratas dos grupos HNP, CP e CNP. Em contraste, a concentração sérica de corticosterona foi menor em ratas do grupo HPP do que em ratas dos grupos CP, HPNP e CNP. A insulinemia e a albuminemia não diferiram entre os grupos (Tabela 2).

**Tabela 2** – Variáveis somática, bioquímicas e hormonais de ratas não prenhes e prenhes mantidas com dieta controle (CNP e CP) ou hipoprotéica (HPNP e HPP).

Variáveis	Grupos			
	CNP	CP	HPNP	HPP
Ganho de peso corporal (g)	35±16 (17)	78±13 <sup>#</sup> (22)	29±12 (20)	79±15 <sup>#</sup> (28)
Peso corporal final (g)	258±23 (17)	309±24 <sup>#</sup> (22)	270±18 (20)	306±29 <sup>#</sup> (28)
Albumina sérica (g/dl)	4,4±0,7 (6)	3,9±0,4 (7)	4,3±0,4 (10)	4,3±0,8 (6)
Glicose sérica (mmol/L)	5,89±0,7 (7)	3,9±0,1 <sup>#</sup> (6)	5,4±1,1 (6)	4,1±0,4 <sup>#</sup> (8)
Insulina sérica (pmol/L)	423±114 (7)	336±100 (6)	357±175 (6)	438±100 (8)
17β-estradiol (pmol/L)	89±15 (6)	198±48 <sup>#</sup> (7)	81±18 (6)	206±44 <sup>#</sup> (8)
Progesterona (nmol/L)	51±22 (5)	232±35 <sup>#</sup> (7)	54±19 (5)	188±60 <sup>#</sup> (9)
Prolactina (ng/ml)	5,5±1,1 <sup>b</sup> (3)	4,0±0,6 <sup>b</sup> (4)	5,6±1,3 <sup>b</sup> (4)	12,6±6,6 <sup>a</sup> (3)
Corticosterona ((µg/dl)	15,8±1,1 <sup>a</sup> (7)	14,9 ±0,6 <sup>a</sup> (6)	15,3±0,3 <sup>a</sup> (5)	10,8±1,1 <sup>b</sup> (4)

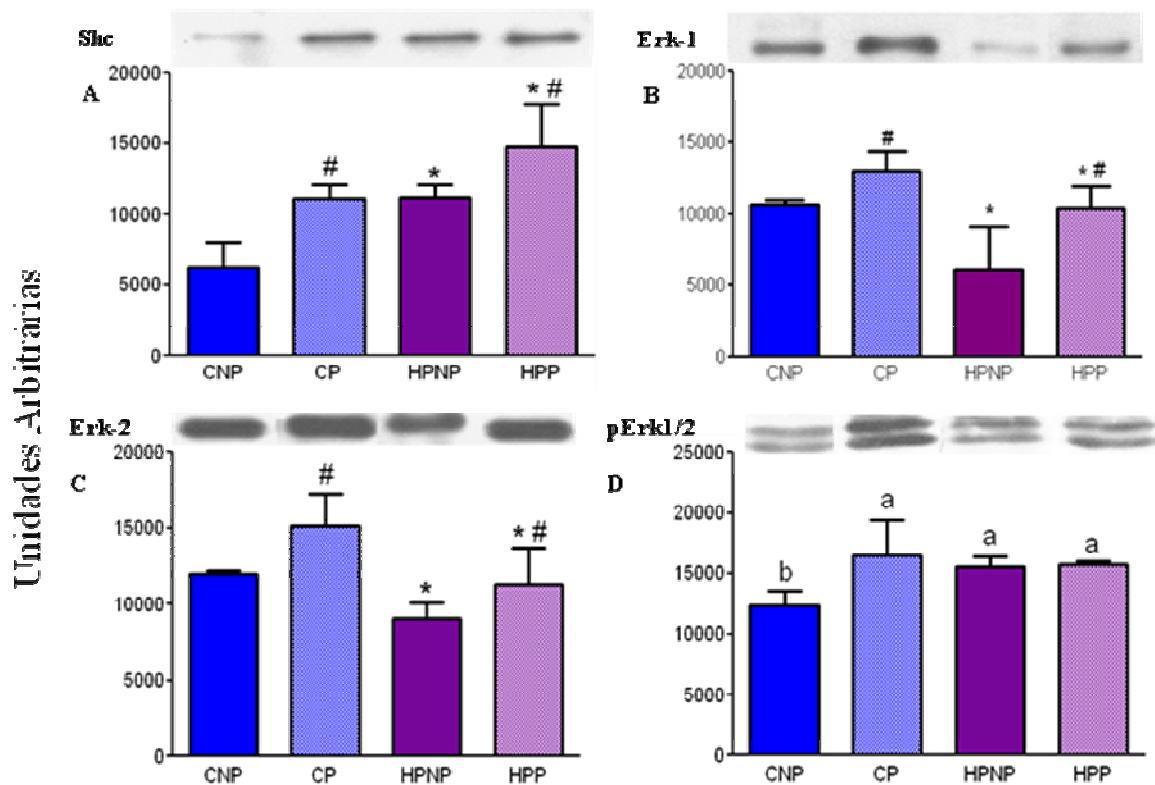
Valores expressos em média ± desvio padrão do número de ratas entre parêntese.<sup>#</sup>Indica diferença em relação às ratas não prenhes (ANOVA *Two-way*,  $P<0,05$ ). Letras diferentes indicam diferenças significativas (teste LSD,  $P<0,05$ ).

O conteúdo de IR- $\beta$ , IRS-1, IRS-2 e da subunidade p85 da PI3K não diferiu entre os grupos (Figuras 4A a 4D). Conforme ilustrado na Figura 4E, o conteúdo protéico de Akt1 foi 1,5 vezes maior no grupo HPNP em relação ao grupo CNP. As ilhotas pancreáticas das ratas HPP expressaram menor quantidade de Akt1 quando comparadas com ilhotas das ratas HPNP. Não houve diferença estatística na expressão da Akt1 em ilhotas dos grupos CP e CNP. O conteúdo de Akt1 fosforilada nos resíduos de Se<sup>473</sup> (Figura 4F) e a razão <sup>[Se473]</sup>Akt1/contéudo total de Akt1 (Figura 4G) foi menor em ilhotas de ratas mantidas com dieta hipoprotéica (HPP e HPNP) do que em ilhotas de ratas mantidas com dieta controle (CNP e CP) ( $F_{1,8}=25,9$ ;  $p<0,001$  e  $F_{1,8}=6,4$ ;  $p<0,05$ , respectivamente). Entretanto, essas variáveis foram, respectivamente, 1,3 e 1,7 vezes maiores em ilhotas dos grupos prenhes (HPP e CP) em relação as ilhotas dos grupos não prenhes (HPNP e CNP) ( $F_{1,8}=10,24$ ;  $p<0,02$  e  $F_{1,8}=7,7$ ;  $p<0,05$ , respectivamente). Como demonstrado na Figura 4H, ilhotas pancreáticas das ratas HPP expressaram menor quantidade da p70<sup>S6K</sup> do que ilhotas dos grupos HPNP, enquanto ilhotas do grupo CP tiveram contéudo maior de p70<sup>S6K</sup> do que ilhotas do grupo CNP. O contéudo fosforilado de p70<sup>S6K</sup> foi 1,4 vezes maior em ilhotas de ratas prenhes (HPP e CP) em relação as não prenhes (HPNP e CNP) ( $F_{1,8}=5,32$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 4I). A razão pp70<sup>S6K</sup>/p70<sup>S6K</sup> não diferiu entre os grupos (Figura 4J).



**Figura 5.** Conteúdo protéico de IR- $\beta$  (A), IRS-1 (B), IRS-2 (C), subunidade p85 da PI3K (D), Akt1 (E), pAkt1 (F), e razão pAkt1/Akt1 (G), p70<sup>S6K</sup> (H), pp70<sup>S6K</sup> (I), razão pp70<sup>S6K</sup>/p70<sup>S6K</sup> (J) em ilhotas de ratas CNP, CP, HPNP e HPP. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3-6 experimentos independentes. # Indica diferença em relação às ratas não prenhes (ANOVA *Two-way*,  $P < 0,05$ ). \*Indica diferença em relação às ratas mantidas com dieta controle (ANOVA *Two-way*,  $P < 0,05$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (teste LSD,  $P < 0,05$ ).

A expressão da Shc em ilhotas de ratas mantidas com dieta hipoprotéica e em ilhotas de ratas prenhes foi 1,5 vezes maior ( $F_{1,8}= 16,25$ ;  $p<0,01$  e  $F_{1,8}=15,63$ ;  $p<0,01$ , respectivamente) em relação às ilhotas de ratas controles e ratas não prenhes, respectivamente (Figura 5A). Os conteúdos das proteínas Erk1 (Figura 5B) e Erk2 (Figura 5C) foi reduzido nas ilhotas das ratas mantidas com dieta hipoprotéica ( $F_{1,10}=11,64$ ;  $p<0,01$  e  $F_{1,8}= 11,97$ ;  $p<0,01$ , respectivamente). A Erk1 e Erk2 foram 1,4 e 1,3 vezes maiores em ilhotas de ratas prenhes em comparação as não prenhes ( $F_{1,10}=10,18$ ;  $p<0,01$  e  $F_{1,8}= 7,91$ ;  $p<0,05$ , respectivamente). O conteúdo de Erk1/2 fosforilada foi similar nas ilhotas dos grupos HPNP, HPP e CP e significativamente maior nesses grupos em relação as ilhotas do grupo CNP (Figure 5D).



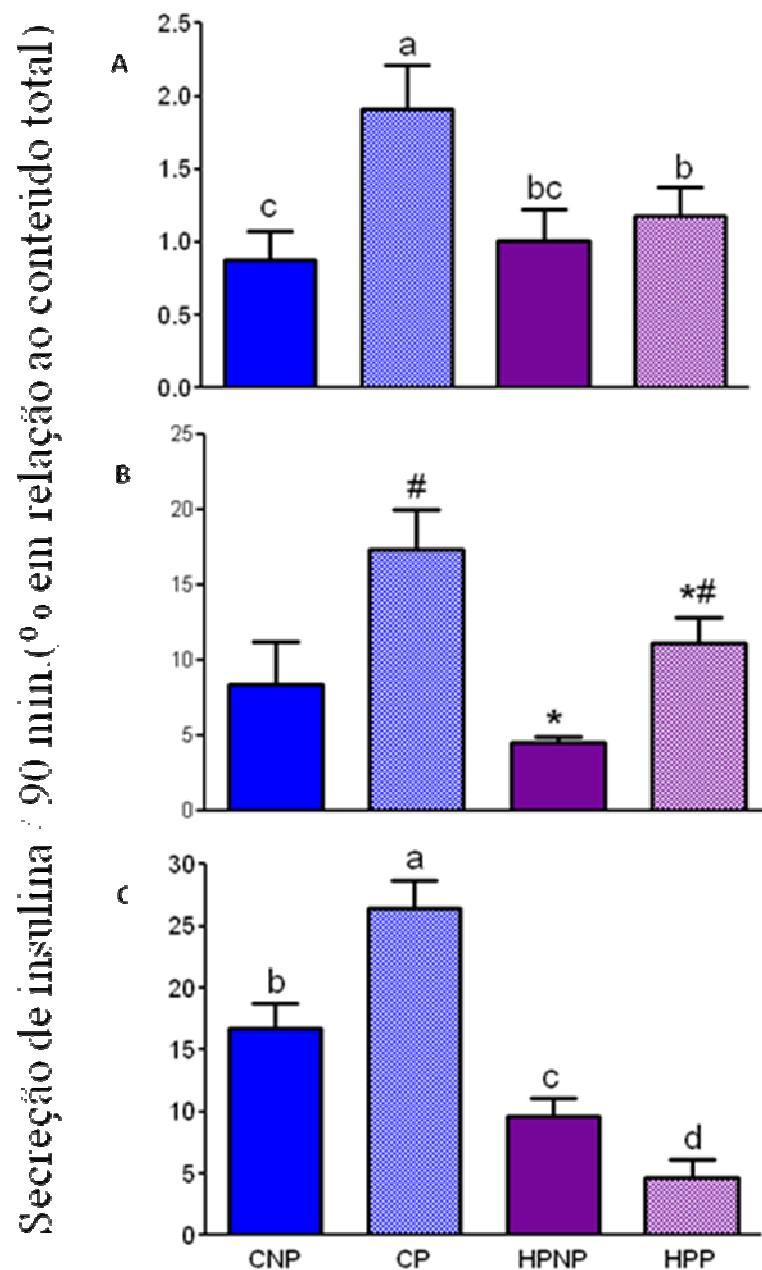
**Figura 6.** Conteúdo protéico de Shc (A), Erk1 (B) e Erk2 (C), pErk1/2 (D) em ilhotas de ratas CNP, CP, HPNP e HPP. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3-4 experimentos independentes. # Indica diferença em relação às ratas não prenhes (ANOVA *Two-way*,  $P<0,05$ ). \*Indica diferença em relação às ratas mantidas com dieta controle (ANOVA *Two-way*,  $P<0,05$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (teste LSD,  $P<0,05$ ).



A secreção de insulina em resposta a baixa concentração de glicose (2,8 mmol/L) foi similar nos grupo HPNP e CNP, significativamente maior em ilhotas do grupo CP comparado ao grupo CNP, mas igual entre os grupos HPNP e HPP (Figura 6A). Em concentração fisiológica de glicose (8,3 mmol/L), a secreção de insulina por ilhotas de ratas HPNP e HPP foi menor do que por ilhotas de ratas CNP e CP ( $F_{1,18}=29,67$ ;  $p<0,0001$ ). A prenhez aumentou a resposta secretória em ambos os grupos ( $F_{1,18}=71,94$ ;  $p<0,0001$ ). Assim, ilhotas de ratas HPP e CP secretaram a mesma quantidade de insulina (Figura 6B). Em alta concentração de glicose (16,7 mmol/L), as ilhotas dos grupos HPP secretaram menos insulina do que as ilhotas do grupo HPNP. Em contraste, a secreção de insulina por ilhotas de ratas CP foi significativamente maior em relação às ilhotas das ratas CNP (Figura 6C).

O conteúdo de insulina em ilhotas pancreáticas não diferiu entre os grupos (CNP= $26\pm 8$  ng/ilhota,  $n=4$ ; CP= $28\pm 8$ ng/ilhota,  $n=4$ ; HPNP=  $34\pm 8$ ng/ilhota,  $n=3$ ; HPP= $44\pm 18$ ng/ilhota,  $n=4$ ).

A área das ilhotas do grupo HPP foi menor em relação às ilhotas do grupo HPNP, enquanto as ilhotas do grupo CP tiveram área similar às ilhotas do grupo CNP embora o valor médio do grupo CP tenha sido cerca de 1,4 vezes maior em relação ao grupo CNP. Não houve diferença significativa entre a área das ilhotas dos grupos HPNP, CNP e CP (CNP= $1869\pm 2615\mu m^2$ ,  $n=91$ ; CP=  $2613\pm 4360\mu m^2$ ,  $n=137$ ; HPNP= $2585 \pm 3892 \mu m^2$ ,  $n=138$ ; HPP= $1502\pm 2000 \mu m^2$ ,  $n=91$ ).



**Figura 7.** Secreção de insulina estimulada por glicose por ilhotas de ratas CNP, CP, HPNP e HPP. Grupos de 4 ilhotas foram incubadas por 90 minutos em meio Krebs-bicarbonato contendo 2,8 (A), 8,3 (B) e 16,7 (C) mM de glicose. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão de 5-7 experimentos independentes. # Indica diferença em relação às ratas não prenhes (ANOVA *Two-way*,  $P < 0.05$ ). \* Indica diferença em relação às ratas mantidas com dieta controle (ANOVA *Two-way*,  $P < 0.05$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (teste LSD,  $P < 0.05$ ).

*Discussão*

## 5.0 DISCUSSÃO

Após consumo de dieta hipoprotéica por um curto período de tempo (15 dias), não foram observadas as alterações clássicas comumente vistas em animais desnutridos (baixo peso e hipoalbuminemia). O aumento de E2 e P observados na prenhez normal<sup>24</sup> foi verificado em ratas CP e HPP. Em desacordo com os relatos de que concentrações de corticosterona total e livre no plasma materno estão aumentados no 15º dia de prenhez<sup>26, 72</sup>, e na restrição protéica<sup>16</sup>, no presente estudo a corticosterona sérica não aumentou nas ratas do grupo CP e diminuiu naquelas do grupo HPP. Curiosamente a inesperada diminuição da concentração sérica de corticosterona em ratas HPP foi acompanhado por aumento antecipado da concentração sérica de prolactina, cuja elevação é comumente observada no estágio tardio da prenhez<sup>24</sup> e sugere o papel inibitório da corticosterona sobre a secreção de prolactina<sup>73</sup>.

A prenhez e a restrição protéica não alteraram o conteúdo de insulina das ilhotas pancreáticas. Contudo, o curto tempo de exposição à dieta hipoprotéica diminuiu a secreção de insulina, especialmente em concentrações fisiológica e suprafisiológica. Corroborando estudos prévios, exposição à dieta restrita em proteína durante a prenhez melhorou a responsividade das células beta na presença de concentração fisiológica de glicose<sup>74</sup>, mas não modificou a secreção de insulina em baixa concentração de glicose e diminuiu em alta concentração de glicose. Como esperado, ilhotas isoladas de ratas CP exibiram aumento na secreção de insulina em resposta a todas as concentrações de glicose.

Alguns estudos têm tentado identificar mecanismos moleculares subjacentes às adaptações estruturais e funcionais das ilhotas pancreáticas em resposta à prenhez e à privação protéica. Foi demonstrado que ilhotas de ratos mantidos com dieta hipoprotéica em fase de crescimento após o desmame apresentavam maiores conteúdos de IR- $\beta$ , IRS2 e PI3K e menores de IRS1 e p70<sup>S6K</sup><sup>75, 76</sup>. Neste estudo a exposição à mesma dieta por quinze dias não alterou os conteúdos de IR- $\beta$ , IRS1, IRS2 e PI3K-p85, mas aumentou a expressão de p70<sup>S6K</sup>

em ilhotas de ratas adultas não prenhes. Possivelmente as diferenças observadas se devam ao reduzido tempo de exposição à dieta e a fase da vida em que esses animais foram expostos à privação nutricional. A prenhez associada à privação protéica foi acompanhada pela redução da expressão de Akt1 e p70<sup>S6K</sup>, enquanto a prenhez normal não alterou a expressão de Akt1, mas aumentou o conteúdo de p70<sup>S6K</sup>. Em ambas as situações não houve alteração do conteúdo de IR- $\beta$ , IRS1/2 e PI3K-p85. É interessante ressaltar que na prenhez normal as ilhotas pancreáticas exibem concentrações inalteradas de IRS1/2, mas aumento da fosforilação e da associação de IRS1/2 com a p85, bem como aumento do conteúdo e da fosforilação da Akt1 e da p70<sup>S6K</sup><sup>53</sup>. No presente estudo, a grande variabilidade no conteúdo de Akt1 verificado no grupo controle não prenhe pode ter contribuído para mascarar as diferenças entre esse grupo e o controle prenhe, uma vez que se observou uma tendência de aumento da expressão dessa proteína no último grupo em relação ao primeiro.

Diversos estudos indicam que o crescimento e a função das ilhotas pancreáticas são influenciados pelo conteúdo e/ou atividade do IR- $\beta$ , IRS1/2, Akt1 e p70<sup>S6K</sup>. A redução do IR em células  $\beta$  diminui severamente a secreção de insulina em resposta à glicose<sup>77</sup>. Em contrapartida a deficiência IRS1 promove hiperinsulinemia e aumento na massa de células  $\beta$ , enquanto a ausência de IRS2 é acompanhada de hiperinsulinemia, diabetes precoce e falência das células  $\beta$  secundária à hipoplasia das ilhotas<sup>78, 79</sup>. A Akt promove a síntese de proteína por modular mTOR e sua proteína alvo p70<sup>S6K</sup><sup>80</sup>, sendo o aumento da sua atividade associado a elevação da massa de células  $\beta$ , devido a maior sobrevivência e a hipertrofia das células  $\beta$ <sup>81</sup>. Finalmente, a deficiência da p70<sup>S6K</sup> está associada à hipoinsulinemia, insensibilidade à glicose, redução do conteúdo de insulina nas ilhotas e do tamanho das células  $\beta$ <sup>82</sup>. No presente estudo, as alterações nas expressões de Akt 1 ou p70<sup>S6K</sup> não foram acompanhadas de alterações no conteúdo de insulina, independente da dieta, mas foram seguidas da diminuição na área das ilhotas no grupo HPP. Considerando que o grupo HPP apresentou menor

expressão de Akt1, do seu conteúdo fosforilado e da razão pAkt1<sup>Ser473</sup>/Akt1, que indica a sua atividade, é possível que a área reduzida das ilhotas desse grupo tenha resultado do aumento da apoptose e/ou da redução da proliferação e crescimento celular mediados por essa proteína. Curiosamente, o padrão de secreção de insulina em resposta a concentração fisiológica de glicose foi acompanhado da redução do conteúdo pAkt1<sup>Ser473</sup> e da razão pAkt1<sup>Ser473</sup>/Akt1. Também, secreção de insulina em alta concentração de glicose acompanhou o padrão de expressão da p70<sup>S6K</sup>.

Em várias vias de sinalização, a expressão e a fosforilação de membros da cascata da MAPK ativam diversos reguladores transcricionais que controlam o crescimento celular. No presente estudo a prenhez aumentou a expressão de Shc e Erk1/2 independente da dieta, e melhorou o conteúdo de pErk1/2 em ilhotas de ratas na prenhez normal, como previamente demonstrado<sup>53, 83</sup>. A dieta hipoprotéica também elevou a expressão de Shc e conteúdo de pErk1/2 e reduziu a expressão de Erk1/2. A prenhez foi incapaz de aumentar o conteúdo de pErk1/2 em ilhotas de ratas submetidas à restrição protéica. Embora Erk1/2 modulem a secreção de insulina<sup>84</sup>, o papel mais importante dessas proteínas em células  $\beta$  pancreáticas é a regulação da proliferação, crescimento e sobrevivência celular<sup>85</sup>.

Nutrientes, hormônios e fatores de crescimento modulam a expressão de proteínas das vias Shc/Erk and IRS/PI3K/Akt/p70<sup>S6K</sup> em células  $\beta$  pancreáticas. A prolactina tem sido considerada um importante fator de crescimento envolvido no aumento da massa de ilhotas e da sensibilidade à glicose durante a prenhez, por ativação de proteínas alvo das cascatas da PI3K e da MAPK<sup>53</sup>. A dexametasona, um glicocorticóide sintético, aumenta a expressão de p70<sup>S6K</sup> e conteúdo de pAkt em ilhotas pancreáticas<sup>15</sup>. Curiosamente, neste estudo ratas HPP que exibiram um aumento no nível sérico de prolactina e uma diminuição na concentração sérica de corticosterona, também tiveram baixo conteúdo de p70<sup>S6K</sup>, Akt1, pAkt1. Estes resultados confirmam a observação que glicocorticóides atuam em sinergismo com a

prolactina induzindo a ativação da STAT5 através de mecanismos distintos envolvendo o receptor de glicocorticóides<sup>28, 29, 30</sup>.

*Conclusão*



## 6.0 CONCLUSÃO

- Ratas prenhes submetidas à restrição protéica não apresentaram os sinais típicos da desnutrição, tais como baixo peso e hipoalbuminemia, mas tiveram aumento da concentração sérica de prolactina e redução da corticosterona.
- A dieta hipoprotéica durante a prenhez não alterou o conteúdo de insulina, mas reduziu a área das ilhotas pancreáticas, bem como a resposta secretória especialmente em resposta à concentrações fisiológica e suprafisiológica de glicose.
- A prenhez associada à privação protéica reduziu o conteúdo de Akt1 e de p70<sup>S6K</sup>, e foi incapaz de aumentar o conteúdo de pErk1/2.

Portanto, o curto tempo de restrição protéica durante a prenhez alterou a estrutura e a função das ilhotas pancreáticas, possivelmente devido a redução do conteúdo e da atividade de proteínas das vias da PI3K e MAPK em resposta à baixa concentração sérica de corticosterona. A alteração estrutural pode ter resultado do aumento da apoptose e/ou da redução da proliferação e do crescimento celular.

# *Referências Bibliográficas*

## 7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bonner-Weir S. Cell turnover. Its assessment and implications. *Diabetes*. 2001; 50: S20-4.
2. Swenne I, Borg LA, Crace CJ, Schnell Landstrom A. Persistent reduction of pancreatic beta-cell mass after a limited period of protein-energy malnutrition in the young rat. *Diabetologia*. 1992; 35(10): 939-45.
3. Petrik J, Reusens B, Arany E, Remacle C, Coelho C, Hoet JJ, Hill DJ. A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology*. 1999; 140(10): 4861-73.
4. Heard CR, Stewart RJ. Protein-calorie deficiency and disorders of the endocrine glands. *Hormones*. 1971; 2(1): 40-64.
5. Pimstone B. Endocrine function in protein-calorie malnutrition. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 1976; 5(1): 79-95.
6. Weinkove C, Weinkove E, Timme A, Pimstone B. Pancreatic islets of malnourished rats: quantitative histologic and electron microscopic findings. *Arch Pathol Lab Med*. 1977; 101(5): 266-9.
7. Van Assche FA. Quantitative morphologic and histoenzymatic study of the endocrine pancreas in nonpregnant and pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol*. 1974; 118(1): 39-41.

8. Sorenson RL, Brelje TC. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res.* 1997; 29(6): 301-7.
9. Parsons JA, Bartke A, Sorenson RL. Number and size of islets of Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones. *Endocrinology.* 1995; 136(5): 2013-21.
10. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology.* 1992; 130(3): 1459-66.
11. Scharfmann R, Czernichow P. Differentiation and growth of pancreatic beta cells. *Diabetes Metab.* 1996; 22(4): 223-8.
12. Hogg J, Han VK, Clemmons DR, Hill DJ. Interactions of nutrients, insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in the regulation of DNA synthesis by isolated fetal rat islets of Langerhans. *J Endocrinol.* 1993; 138(3): 401-12.
13. Hügl SR, White MF, Rhodes CJ. Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells. 1998; 273(28): 17771-9.
14. Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, et al. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division

- and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology*. 1993; 132(2): 879-87.
15. Rafacho A, Roma LP, Taboga SR, Boschero AC, Bosqueiro JR. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007; 85(5): 536-45.
  16. Herbert DC, Carrillo AJ. The hypophyseal-adrenal axis in the protein-calorie malnourished rat. *Horm Metab Res*. 1982; 14(4): 205-7.
  17. Prewitt TE, D'Ercole AJ, Switzer BR, Van Wyk JJ. Relationship of serum immunoreactive somatomedin-C to dietary protein and energy in growing rats. *J Nutr*. 1982; 112(1): 144-50.
  18. Maes M, Underwood LE, Ketelslegers JM. Low serum somatomedin-C in protein deficiency: relationship with changes in liver somatogenic and lactogenic binding sites. *Mol Cell Endocrinol*. 1984; 37(3): 301-9.
  19. Bartholomeusz RK, Bruce NW, Martin CE, Hartmann PE. Serial measurement of arterial plasma progesterone levels throughout gestation and parturition in individual rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1976; 82(2): 436-43.
  20. Shaikh AA. Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod*. 1971; 5(3): 297-307.

21. Ogren L, Talamantes F. Prolactins of pregnancy and their cellular source. *Int Rev Cytol.* 1988; 112: 1-65.
22. Møldrup A, Petersen ED, Nielsen JH. Effects of sex and pregnancy hormones on growth hormone and prolactin receptor gene expression in insulin-producing cells. *Endocrinology.* 1993; 133(3): 1165-72.
23. Brelje TC, Sorenson RL. The physiological roles of prolactin, growth hormone and placental lactogen in the regulation of islet beta cell proliferation. In *Pancreatic Growth and Regeneration.* Sarvetnick N, Ed. Basel, Karger Landes Systems; 1997; 1-30.
24. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Ropero AB, Quesada I. The role of estrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. *J Physiol* 2009.
25. Picard F, Wanatabe M, Schoonjans K, Lydon J, O'Malley BW, Auwerx J. Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to beta -cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(24): 15644-8.
26. Dupouy JP, Coffigny H, Magre S. Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. *J Endocrinol.* 1975; 65(3): 347-52.
27. Weinhaus AJ, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL. Dexamethasone counteracts the effect of prolactin on islet function: implications for islet regulation in late pregnancy. *Endocrinology.* 2000; 141(4): 1384-93.

28. Stöcklin E, Wissler M, Gouilleux F, Groner B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature*. 1996; 24; 383(6602): 726-8.
29. Lechner J, Welte T, Doppler W. Mechanism of interaction between the glucocorticoid receptor and Stat5: role of DNA-binding. *Immunobiology*. 1997; 198(1-3): 112-23.
30. Wyszomierski SL, Yeh J, Rosen JM. Glucocorticoid receptor/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) interactions enhance STAT5 activation by prolonging STAT5 DNA binding and tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol*. 1999; 13(2): 330-43.
31. Taga T, Kishimoto T. Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J*. 1992; 6: 3387-96.
32. Wells JA, De Vos AM. Hematopoietic receptor complexes. *Annu Rev Biochem*. 1996; 65: 609-34.
33. Wells JA. Structural and functional basis for hormone binding and receptor oligomerization. *Curr Opin Cell Biol*. 1994; 6: 163-73 .
34. Wells JA. Binding in the growth hormone receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 1-6.
35. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*. 1998; 19(3): 225-68.

36. Liu KD, Gaffen SL, Goldsmith MA. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol.* 1998; 10(3): 271-8.
37. Dusanter-Fourt I, Muller O, Ziemiecki A, Mayeux P, Drucker B, Djiane J, Wilks A, Harper AG, Fischer S, Gisselbrecht S. Identification of Jak protein tyrosine kinases as signaling molecules for prolactin. Functional analysis of prolactin receptor and prolactin-erythropoietin receptor chimera expressed in lymphoid cells. *EMBO J.* 1994; 13: 2583-91.
38. Smit LS, Meyer DJ, Billestrup N, Norstedt G, Schwartz J, Carter-Su C. The role of the growth hormone (GH) receptor and Jak1 and Jak2 kinases in the activation of Stats 1, 3, and 5 by GH. *Mol. Endocrinol.* 1996; 10: 519-33.
39. Lebrun JJ, Ali S, Sofer L, Ullrich A, Kelly PA. Prolactin-induced proliferation of Nb2 cells involves tyrosine phosphorylation of the prolactin receptor and its associated tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1994; 269: 14021-6.
40. Goupille O, Daniel N, Bignon C, Jolivet G, Djiane J. Prolactin signal transduction to milk protein genes: carboxy-terminal part of the prolactin receptor and its tyrosine phosphorylation are not obligatory for Jak2 and Stat5 activation. *Mol Cell Endocrinol.* 1997; 127: 155-69.
41. Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C. Identification of Jak2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell.* 1993; 74: 237-44.



42. Ihle JN, Stravapodis D, Parganas E, Thierfelder W, Feng J, Wang D, et al. The roles of Jaks and Stats in cytokine signaling. *Cancer J Sci Am*. 1998; 4 Suppl 1:S84-91.
43. Galsgaard ED, Nielsen JH, Møldrup A. Regulation of prolactin receptor (PRLR) gene expression in insulin-producing cells. Prolactin and growth hormone activate one of the rat prlr gene promoters via STAT5a and STAT5b. *J Biol Chem*. 1999; 274(26): 18686-92.
44. Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(9): 651-62.
45. Friedrichsen BN, Galsgaard ED, Nielsen JH, Møldrup A. Growth hormone and prolactin-induced proliferation of insulinoma cells, INS-1, depends on activation of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5). *Mol Endocrinol*. 2001; 15(1): 136-48.
46. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Thierfelder WE, Kreider B, Silvennoinen O. Signalling by the cytokine receptor superfamily: Jaks and Stats. *Trends Biochem Sci*. 1994; 19: 222-7.
47. Sorenson RL, Brelje TC. Prolactin receptors are critical to the adaptation of islets to pregnancy. *Endocrinology*. 2009; 150(4): 1566-9.
48. Zeidler, PM. Der JAK/STAT-Signalübertragungsweg. *Tätigkeitsbericht* 2006; 1-6.
49. Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shananowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J*. 1991; 10(4): 885-92.

50. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995; 9(9): 726-35.
51. Silva BV, Horta BAC, Alencastro RB, Pinto AC. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Quím Nova.* 2009; 32(2): 453-62.
52. Amaral ME, Ueno M, Carvalheira JB, Carneiro EM, Velloso LA, Saad MJ, et al. Prolactin-signal transduction in neonatal rat pancreatic islets and interaction with the insulin-signaling pathway. *Horm Metab Res.* 2003; 35(5): 282-9.
53. Amaral ME, Cunha DA, Anê GF, Ueno M, Carneiro EM, Velloso LA, Bordin S, Boschero AC. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. *J Endocrinol.* 2004; 183(3): 469-76.
54. Brelje TC, Svensson AM, Stout LE, Bhagroo NV, Sorenson RL. An immunohistochemical approach to monitor the prolactin-induced activation of the JAK2/STAT5 pathway in pancreatic islets of Langerhans. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50(3): 365-83.
55. Hügl SR, Merger M. Prolactin stimulates proliferation of the glucose-dependent beta-cell line INS-1 via different IRS-proteins. *Jop.* 2007; 8(6): 739-52.
56. Cousin SP, Hügl SR, Myers MG, Jr., White MF, Reifel-Miller A, Rhodes CJ. Stimulation of pancreatic beta-cell proliferation by growth hormone is glucose-dependent: signal transduction via janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 5

- (STAT5) with no crosstalk to insulin receptor substrate-mediated mitogenic signalling. *Biochem J.* 1999; 344 Pt 3: 649-58.
57. Dickson LM, Lingohr MK, McCuaig J, Hugl SR, Snow L, Kahn BB, et al. Differential activation of protein kinase B and p70(S6)K by glucose and insulin-like growth factor 1 in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem.* 2001; 276(24): 21110-20.
58. Schuppin GT, Pons S, Hügl S, Aiello LP, King GL, White M, Rhodes CJ. A specific increased expression of insulin receptor substrate 2 in pancreatic beta-cell lines is involved in mediating serum-stimulated beta-cell growth. *Diabetes.* 1998; 47(7): 1074-85.
59. Song YH, Godard M, Li Y, Richmond SR, Rosenthal N, Delafontaine P. Insulin-like growth factor I-mediated skeletal muscle hypertrophy is characterized by increased mTOR-p70S6K signaling without increased Akt phosphorylation. *J Investig Med.* 2005; 53(3): 135-42.
60. Gahr S, Merger M, Bollheimer LC, Hammerschmied CG, Scholmerich J, Hugl SR. Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of pancreatic beta-cells particularly in the presence of subphysiological glucose concentrations. *J Mol Endocrinol.* 2002;28(2):99-110.
61. Galsgaard ED, Friedrichsen BN, Nielsen JH, Møldrup A. Expression of dominant-negative STAT5 inhibits growth hormone- and prolactin-induced proliferation of insulin-producing cells. *Diabetes.* 2001; 50 Suppl 1: S40-1.

62. Manual para técnicos em laboratório comissão de ensino do colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA). 1996; 2ª Ed.
63. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123(11): 1939-51.
64. Boschero AC, Szpak-Glasman M, Carneiro EM, Bordin S, Paul I, Rojas E, Atwater I. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol.* 1995; 268(2 Pt 1): E336-42.
65. Kelley GG, Zawulich KC, Zawulich WS. Calcium and a mitochondrial signal interact to stimulate phosphoinositide hydrolysis and insulin secretion in rat islets. *Endocrinology.* 1994; 134: 1648-54.
66. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
67. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. *Laboratory Methods in Histotechnology.* 1st ed. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C. 279p. 1992.
68. Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol.* 1969; 22(2): 158-61.
69. Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta.* 1971; 31(1): 87-96.

70. Scott AM, Atwater I, Rojas E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*. 1981; 21(5): 470-5.
71. Sokal RR, Rohlf RJ. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. Freeman WH editor: New York. 1995; 392-450.
72. Martin CE, Cake MH, Hartmann PE, Cook IF. Relationship between foetal corticosteroids, maternal progesterone and parturition in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1977;84(1):167-76.
73. Nishino Y, Michna H, Hasan SH, Schneider MR. Involvement of the adrenal glands in the prolactin rise induced in the female rat by an antiprogesterin, onapristone. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992; 41(3-8): 841-5.
74. Milanski M, Arantes VC, Ferreira F, de Barros Reis MA, Carneiro EM, Boschero AC, Collares-Buzato CB, Latorraca MQ. Low-protein diets reduce PKA $\alpha$  expression in islets from pregnant rats. *J Nutr*. 2005; 135(8): 1873-8.
75. Araujo EP, Amaral ME, Filiputti E, De Souza CT, Laurito TL, Augusto VD, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA, Carneiro EM. Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *J Endocrinol*. 2004; 181(1): 25-38.

76. Filiputti E, Ferreira F, Souza KL, Stoppiglia LF, Arantes VC, Boschero AC, Carneiro EM. Impaired insulin secretion and decreased expression of the nutritionally responsive ribosomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. *Life Sci.* 2008; 82(9-10): 542-8.
77. Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. Tissue-Specific Knockout of the Insulin Receptor in Pancreatic  $\beta$  Cells Creates an Insulin Secretory Defect Similar to that in Type 2 Diabetes. *Cell.* 1999; 96(3): 329-39.
78. Kulkarni RN, Winnay JN, Daniels M, Brüning JC, Flier SN, Hanahan D, Kahn CR. Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. *J. Clin Invest.* 1999; 104(12): R69-75.
79. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature.* 1998; 391(6670): 900-4.
80. Hannan KM, Thomas G, Pearson RB. Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex. *Biochemical Journal.* 2003; **370**(Pt 2): 469-77.
81. Tuttle RL, Gill NS, Pugh W, Lee JP, Koeberlein B, Furth EE, Polonsky KS, Naji A, Birnbaum MJ. Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. *Nat Med.* 2001; 7(10): 1133-7.

82. Pende M, Kozma SC, Jaquet M, Oorschot V, Burcelin R, Le Marchand-Brustel Y, Klumperman J, Thorens B, Thomas G. Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature*. 2000; **408** (6815): 994–7.
83. Bordin S, Amaral ME, Anhe GF, Delghingaro-Augusto V, Cunha DA, Nicoletti-Carvalho JE, et al. Prolactin-modulated gene expression profiles in pancreatic islets from adult female rats. *Mol Cell Endocrinol*. 2004; 220(1-2): 41-50.
84. Longuet C, Broca C, Costes S. Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans. *Endocrinology*. 2005; 146: 643-654.
85. Lawrence M, Shao C, Duan L, et al. The protein kinases ERK1/2 and their roles in pancreatic beta cells. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008; 192(1): 11-7.





# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)