

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

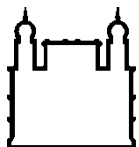
Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PAPEL DO RECEPTOR NUCLEAR PPAR- γ SOBRE A
HIPERATIVIDADE DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL
OBSERVADA EM ANIMAIS DIABÉTICOS

RAFAEL CARVALHO TORRES

Rio de Janeiro

2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

RAFAEL CARVALHO TORRES

Papel do receptor nuclear PPAR- γ sobre a hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal observada em animais diabéticos

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Imunologia e Farmacologia.

Orientador: Dr. Vinícius de Frias Carvalho

RIO DE JANEIRO

Maio de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

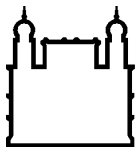
T693 Torres, Rafael Carvalho

Papel do receptor nuclear PPAR- γ sobre a hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal observada em animais diabéticos / Rafael Carvalho Torres. – Rio de Janeiro, 2015.
xiii, 106 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.
Bibliografia: f. 65-77

1. Diabetes. 2. Eixo HPA. 3. Glicocorticoides. 4. PPAR- γ . 5. PI3K. I.
Título.

CDD 573.439



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: RAFAEL CARVALHO TORRES

Papel do receptor nuclear PPAR- γ sobre a hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal observada em animais diabéticos

ORIENTADOR: Dr. Vinícius de Frias Carvalho

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Patricia Torres Bozza (FIOCRUZ-RJ) – Presidente

Prof. Dra. Carmen Cabanelas Pazos de Moura (UFRJ)

Prof. Dra. Priscilla Christina Olsen (UFRJ)

Prof. Dra. Adriana Ribeiro Silva (FIOCRUZ-RJ)

Prof. Dra. Maria Christina Werneck de Avellar (UNIFESP)

Rio de Janeiro, 20 de maio de 2015.

Dedico esta tese á minha família, em especial a meus pais José Antônio e Dalma, minha irmã Renata e minha noiva Luciana.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos últimos nove anos, muitas pessoas contribuíram para minha formação não apenas como pesquisador, mas também como pessoa. Dessa forma, não poderia deixar de expressar minha gratidão a todos, mesmo para aqueles não lembrados nominalmente.

Agradeço em primeiro lugar a Deus.

Aos meus pais e irmã, pelo apoio e carinho, independente de distâncias;

A minha noiva Luciana, pelo amor incondicional;

Aos amigos que fiz no Rio de Janeiro, seja durante a graduação na UNIRIO ou mais recentemente na UFRJ;

A todas as pessoas que passaram pelo Laboratório de Inflamação ao longo dos últimos anos. Grandes amizades que com certeza serão mantidas. Agradeço em especial à ajuda das alunas Daniela, Jessika, Tássia e Nathália;

As colaborações que ajudaram a compor o trabalho, em especial ao amigo Felipe Freitas;

Aos funcionários do pavilhão Osório de Almeida e secretaria acadêmica: secretárias, pessoal da limpeza, seguranças. Em especial aos bioteristas Nelson e Edson e aos porteiros Antônio e Alexandre;

Aos membros da banca, por gentilmente aceitarem o convite e contribuírem com o trabalho;

A Dr^a. Patrícia Silva e aos Drs. Marco Aurélio e Renato Cordeiro pelo exemplo na carreira científica;

Ao Dr. Vinicius de Frias Carvalho, pelos longos anos dedicados a minha orientação científica, deste a iniciação ao doutorado;

Por fim, agradeço ao auxílio financeiro da FIOCRUZ, FAPERJ, CAPES e, principalmente, CNPq, pela bolsa de estudos.

“ Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco; à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida. ”

Johann von Goethe

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Papel do receptor nuclear PPAR- γ sobre a hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal observada em animais diabéticos

RESUMO

Rafael Carvalho Torres

O *Diabetes mellitus* é uma das principais doenças crônicas que afetam a população mundial. Além de hiperglicemia, os pacientes diabéticos exibem uma marcante hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) evidenciada pelo aumento dos níveis de glicocorticoides (GCs) circulantes. Este hipercortisolismo é importante em várias complicações diabéticas. No entanto, há poucas evidências da participação dos GCs em outras morbidades do diabetes, como na atrofia muscular, compartilhadas por pacientes com o diabetes e pessoas com Cushing, uma doença caracterizada pela hiperatividade deste eixo HPA. A redução na expressão do receptor nuclear PPAR- γ tem sido demonstrada em órgãos de animais diabéticos acometidos por complicações da doença, e a ativação de PPAR- γ é capaz de restaurar a funcionalidade desses órgãos. Além disso, o tratamento de pacientes com a doença de Cushing com ligantes de PPAR- γ reduz os níveis de GCs circulantes. Desse modo, o nosso objetivo foi investigar o papel do PPAR- γ na atividade do eixo HPA em animais diabéticos. O diabetes foi induzido por injeção intravenosa de aloxana em ratos em jejum. O agonista de PPAR- γ rosiglitazona (rosi), o antagonista do receptor de GCs RU486 ou inibidor de PI3K wortmannin foram administrados diariamente durante 18 dias consecutivos, começando três dias após a injeção de aloxana. Observamos que a condição diabética induzida por administração de aloxana em ratos é caracterizada por hiperatividade do eixo HPA com redução na expressão de receptores de GCs na hipófise, hipertrofia adrenal e aumento dos níveis de GCs circulantes. O papel destes hormônios esteroides sobre a atrofia muscular em animais diabéticos foi evidenciado pela melhoria no parâmetro microvascular funcional do músculo grácil, e aumento da massa do músculo gastrocnêmio observada em animais diabéticos tratados com RU486. Em paralelo com a hiperatividade do eixo HPA, observamos uma redução da expressão de PPAR- γ nas adrenais e hipófise, bem como uma diminuição no ligante de PPAR- γ 15-d-PGJ₂ no plasma dos animais diabéticos. O tratamento destes animais com rosi foi capaz de reduzir os níveis de GCs, em associação com a diminuição da hipertrofia adrenal e expressão de MC2-R. Em paralelo, a rosi restaurou os níveis de ACTH no plasma, em associação com a redução no número de células corticotróficas e expressão de POMC na hipófise dos ratos diabéticos, mesmo não restabelecendo o mecanismo de controle por retroalimentação da produção de GCs na hipófise através dos receptores de mineralocorticoides e GCs, respectivamente, MR e GR. Além disso, o tratamento com rosi aumentou a expressão de PPAR- γ nas glândulas adrenais e hipófise dos ratos diabéticos, e o bloqueio de PPAR- γ com GW9662 inibiu a capacidade da droga de reduzir os níveis plasmáticos de GCs. Os ratos diabéticos também apresentaram redução na expressão de PI3K na hipófise, e a rosi aumentou a expressão desta cinase nas glândulas adrenais e na hipófise. Além disso, o pré-tratamento de ratos diabéticos com wortmannin foi capaz de reduzir parcialmente a capacidade da rosi em reduzir os níveis de GCs no plasma. Assim, sugerimos que a hiperatividade do eixo HPA em animais diabéticos está diretamente relacionada com a atrofia muscular. Além disso, a ativação de PPAR- γ restaura a reatividade eixo HPA em ratos diabéticos através de um mecanismo dependente da ativação de PI3K, surgindo como um possível alvo no controle das complicações da doença.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Role of the nuclear receptor PPAR- γ in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis hyperactivation observed in diabetic animals

ABSTRACT

Rafael Carvalho Torres

Diabetes mellitus is one of the major chronic diseases that affect the world population. Beyond of hyperglycemia, diabetic patients exhibit a marked hyperactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis evidenced by increased levels of circulating glucocorticoids (GCs). This hypercortisolism is important in several diabetic complications. However, there are few evidences of the participation of GCs in other diabetic morbidities, including muscle atrophy, that are shared by patients with diabetes and individuals with Cushing, a disease characterized by hyperactivity of HPA axis. The reduction in the expression of the nuclear receptor PPAR- γ has been demonstrated in diabetic animal organs affected by complications of disease, and the PPAR- γ activation is able to restore the functionality of these organs. Furthermore, treatment of patients with Cushing's disease with PPAR- γ ligands reduces the levels of circulating GCs. Thereby, our aim was to investigate the role of PPAR- γ on HPA axis activity in diabetic animals. Diabetes was induced by the intravenous injection of alloxan into fasted rats. The PPAR- γ agonist rosiglitazone (rosi), GCs receptor antagonist RU486 or PI3K inhibitor wortmannin were administered daily for 18 consecutive days, starting three days after alloxan injection. We observed that the diabetic condition induced by alloxan administration in rats is characterized by a hyperactivity of the HPA axis with reduction in GCs receptor expression in the pituitary, adrenal hypertrophy and increase in circulating levels of GCs. The role of these steroid hormones on muscular atrophy in the diabetic animals was evidenced by improvement in the microvascular functional parameter of gracilis muscle, and increase of the mass of the gastrocnemius muscle observed in diabetic animals treated with RU486. In parallel with the hyperactivity of the HPA axis, we observed a reduction of PPAR- γ expression in the adrenal and pituitary as well as a decreased on plasma PPAR- γ ligand 15-d-PGJ₂ in the diabetic animals. Treatment of these animals with rosi was able to reduce the GCs levels, in association with decrease of adrenal hypertrophy and MC2R expression. In parallel, rosi restored plasma ACTH levels, in association with reduction of corticotrophic cells and POMC expression in pituitary of diabetic rats, despite of not restoring the feedback control of GCs production in the pituitary through mineralocorticoid and GCs receptors, respectively MR and GR. Furthermore, treatment with rosi increases the expression of PPAR- γ in both adrenal and pituitary glands in diabetic rats, and the blockage of PPAR- γ with GW9662 inhibited the capacity of the drug to reduce plasma GCs levels. Diabetic rats also presented reduction of PI3K expression in pituitary, and rosi increased the expression of this kinase in both adrenal and pituitary glands. In addition, pre-treatment of diabetic rats with wortmannin was able to partially reduce the ability of rosi to reduce plasma GCs levels. Thus, we suggest that the HPA axis hyperactivity in diabetic animals is directly related with muscle atrophy. Moreover, the activation of PPAR- γ restored HPA axis reactivity in diabetic rats via a mechanism dependent on PI3K activation, emerging as a possible target in the control of the disease complications.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| Resumo..... | vi |
| Abstract..... | vii |
| 1. Introdução..... | 01 |
| 1.1. Diabetes..... | 01 |
| 1.1.1 Histórico..... | 01 |
| 1.1.2. Descrição..... | 02 |
| 1.1.3. Incidência e prevalência do diabetes..... | 04 |
| 1.1.4. Modelos experimentais para o estudo do diabetes..... | 06 |
| 1.2. Eixo HPA..... | 09 |
| 1.2.1. Visão geral..... | 09 |
| 1.2.2. Regulação da atividade do eixo HPA..... | 11 |
| 1.2.3. Eixo HPA e o diabetes..... | 12 |
| 1.2.4. Glicocorticoides e complicações do diabetes..... | 15 |
| 1.3. PPAR- γ | 18 |
| 1.3.1. Estrutura e distribuição dos PPARs..... | 18 |
| 1.3.2. PPAR- γ e o diabetes..... | 20 |
| 1.3.3. PPAR- γ e o eixo HPA..... | 21 |
| 2. Objetivo | 23 |
| 2.1. Objetivo Geral | 23 |
| 2.2. Objetivos específicos | 23 |
| 3. Material e Métodos | 24 |
| 3.1. Animais e indução do diabetes..... | 24 |
| 3.2. Tratamento dos animais..... | 24 |
| 3.3. Avaliação da hipertrofia das glândulas adrenais..... | 24 |
| 3.4. Determinação das alterações musculares - Laser Speckle..... | 25 |
| 3.5. Quantificação de hormônios plasmático - Radioimunoensaio..... | 25 |
| 3.5.1. Obtenção das amostras..... | 25 |
| 3.5.2. Determinação dos níveis dos hormônios..... | 26 |
| 3.6. Quantificação de ligante endógeno de PPAR- γ | 26 |
| 3.6.1. Obtenção das amostras..... | 26 |
| 3.6.2. Quantificação de 15d-PGJ ₂ | 26 |
| 3.7. Imunohistoquímica..... | 27 |

| | |
|---|----|
| 3.8. Soluções..... | 28 |
| 3.8.1 – Milloning..... | 28 |
| 3.8.2 – TBS 1X..... | 28 |
| 3.8.3 – AEC uso..... | 28 |
| 3.8.4 – Meio de montagem para imunohistoquímica..... | 29 |
| 3.9. Drogas e reagentes..... | 29 |
| 3.10. Análise estatística..... | 29 |
| 4. Resultados | 30 |
| 4.1. Administração de aloxana induz aumento da atividade do eixo HPA em ratos, em paralelo ao estabelecimento do quadro diabético e manifestação de complicações da doença..... | 30 |
| 4.2. Animais diabéticos apresentam redução na expressão do receptor PPAR- γ na hipófise e adrenais, bem como nos níveis circulantes do seu ligante endógeno 15-deoxy- Δ 12,14-PGJ..... | 31 |
| 4.3. A ativação do receptor nuclear PPAR- γ reduz a hipertrofia adrenal e os níveis de glicocorticoides em animais diabéticos em paralelo com a redução na expressão do receptor de ACTH MC2-R..... | 38 |
| 4.4. Tratamento com rosiglitazona reduz os níveis de ACTH bem como de seu precursor POMC, de forma independente do restabelecimento do mecanismo de retroalimentação negativa do eixo HPA em animais diabéticos | 42 |
| 4.5. Tratamento com rosiglitazona aumenta a expressão do PPAR- γ em órgãos do eixo HPA de animais diabéticos..... | 52 |
| 4.6. Tratamento com rosiglitazona reduz a atividade do eixo HPA em animais diabéticos através de um mecanismo dependente da ativação da via da PI3K..... | 49 |
| 5. Discussão..... | 56 |
| 6. Conclusões..... | 63 |
| 7. Referências Bibliográficas..... | 65 |
| 8. Anexos..... | 78 |
| 8.1 Artigos publicados..... | 78 |
| 8.2 Artigo submetido..... | 78 |

LISTA DE SIGLAS

- 15d-PGJ₂ – 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostglandina J₂
- Ach – Acetilcolina
- ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico
- AEC – Aminoetilcarbazol
- AGE – Produtos finais de glicação não enzimática
- AKT – Proteína cinase B
- AMPC - Adenosina monofosfato cíclica
- ANOVA - Análise de variância
- AP-1 – Proteína ativadora 1
- AT1 – Receptor do tipo 1 de angiotensina II
- AVP – Arginina vasopressina
- AVP1b – Receptor 1b de arginina vasopressina
- BSA – Albumina do soro bovino
- CECAL – Centro de criação de animais de laboratório
- CEUA – Comitê de ética no uso de animais de laboratório
- CRF – Fator liberador de corticotrofina
- CRF1 – Receptor do tipo 1 de CRF
- Db/db – Camundongo diabético
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DPBB – Rato diabético criado em laboratório
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EIA – Ensaio Imunoenzimático
- EMC – Encefalomiocardite
- EPM – Erro padrão da média
- FATP – Proteína transportadora de ácidos graxos
- GLUT – Transportador de glicose
- GPCR – Receptor acoplado a proteína G
- GR – Receptor de glicocorticoides
- HE – Hematoxilina e eosina
- HPA – Hipotálamo-hipófise-adrenal
- HPF – Campo de alta magnificação

IDF – Federação internacional de diabetes
IL1- β – Interleucina 1 - β
LXR – Receptor X do fígado
MAFbx – “Muscle atrophy F-Box”
MAPK – Proteína cinase ativada por mitógenos
MC2-R – Receptor de melanocortina do tipo 2
MR – Receptor de mineralocorticoides
MURF1 – “Muscle ring finger-1”
NF- κ B – Fator nuclear κ B
NO – Óxido nítrico
NOD – Diabéticos não-obesos
Nramp 1 – “Natural-resistance-associated macrophage protein 1”
NSQ – Núcleo supraquiasmático
Ob/ob – Camundongo obeso
OMS – Organização mundial de saúde
PDE4 – Fosfodiesterase do tipo 4
PI3K – Fosfatidilinositol-3-cinase
PKA – Proteína cinase A
POMC – Pro-opiomelanocortina
PPAR – Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos
PVN – Núcleos paraventriculares
RAR – Receptor do ácido retinoico
ROS – Espécie reativa de oxigênio
RXR – Receptor X retinoide
SDRA – Síndrome do desconforto respiratório agudo
StAR – Proteína esteroidogênica reguladora aguda
TBST – Solução salina tampona de Tris com Tween
TNF- α – Fator de necrose tumoral- α
TR – Receptor dos hormônios da tireoide
VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 – Prevalência global do diabetes na população adulta..... | 6 |
| Figura 1.2 – A hiperatividade do eixo HPA em diabéticos..... | 15 |
| Figura 1.3 – Mecanismo de regulação gênica dos PPARs..... | 20 |
| Figura 4.1 – Administração de aloxana em diferentes tempos é capaz de induzir um quadro de diabetes do tipo 1..... | 32 |
| Figura 4.2 – Animais tornados diabéticos com injeção de aloxana apresentam aumento nos níveis circulantes de corticosterona..... | 33 |
| Figura 4.3 – Animais tornados diabéticos apresentam redução na expressão do receptor de glicocorticoides na hipófise 48 horas após a administração de aloxana..... | 34 |
| Figura 4.4 – Animais tornados diabéticos apresentam perda de massa do músculo gastrocnêmio..... | 35 |
| Figura 4.5 – Participação dos hormônios glicocorticoides na atrofia do músculo gastrocnêmio em animais diabéticos..... | 35 |
| Figura 4.6 – Tratamento com RU486 restabelece a reatividade microvascular no músculo grácil de animais diabéticos..... | 36 |
| Figura 4.7 – Animais diabéticos apresentam redução na expressão do PPAR- γ em órgãos do eixo HPA..... | 37 |
| Figura 4.8 – Animais diabéticos apresentam redução nos níveis plasmáticos do seu ligante endógeno 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ ₂ (15d-PGJ ₂)..... | 37 |
| Figura 4.9 – Rosiglitazona reduz a hipertrofia adrenal em ratos diabéticos..... | 39 |
| Figura 4.10 – Rosiglitazona reduz a hipertrofia e os níveis plasmáticos de corticosterona em ratos diabéticos..... | 40 |
| Figura 4.11 – Rosiglitazona reduz a expressão de MC2-R nas adrenais de animais diabéticos..... | 41 |
| Figura 4.12 – Rosiglitazona reduz a expressão de ACTH e o número de células produtoras do hormônio na hipófise de animais diabéticos..... | 43 |
| Figura 4.13 – Rosiglitazona reduz os níveis circulantes do hormônio ACTH em animais diabéticos..... | 44 |
| Figura 4.14 – Efeito do tratamento com rosiglitazona sobre a expressão do receptor de glicocorticoides..... | 45 |
| Figura 4.15 – Efeito do tratamento com rosiglitazona sobre a expressão do receptor de | |

| | |
|--|----|
| mineralocorticoides..... | 46 |
| Figura 4.16 – Rosiglitazona reduz a expressão de POMC na hipófise de animais diabéticos..... | 47 |
| Figura 4.17 – Rosiglitazona aumenta a expressão do PPAR- γ nas adrenais de animais diabéticos..... | 49 |
| Figura 4.18 – Rosiglitazona aumenta a expressão do PPAR- γ na hipófise de animais diabéticos..... | 50 |
| Figura 4.19 – Rosiglitazona reduz a produção de glicocorticoides em animais diabéticos através de um mecanismo dependente da ativação do receptor nuclear PPAR- γ | 51 |
| Figura 4.20 – Rosiglitazona aumenta a expressão da PI3K na hipófise de animais diabéticos..... | 53 |
| Figura 4.21 – Rosiglitazona aumenta a expressão do PPAR- γ nas adrenais de animais diabéticos..... | 54 |
| Figura 4.22 – Rosiglitazona reduz a produção de glicocorticoides em animais diabéticos através de um mecanismo dependente da via da PI3K..... | 55 |
| Figura 6.1 – Representação esquemática do possível mecanismo envolvido na restauração da reatividade do eixo HPA em animais diabéticos tratados com rosiglitazona..... | 64 |

1 - Introdução

1.1 - Diabetes

1.1.1 – Histórico

O *Diabetes mellitus* é uma das doenças mais antigas de que se tem conhecimento. Os primeiros relatos documentados dos sintomas que hoje caracterizam a doença foram feitos no papiro de Ebers, datado de 1552 a.C. Neste famoso documento médico, considerado o mais importante do antigo Egito, um parágrafo é dedicado a pacientes que apresentavam emagrecimento, sede contínua e urinavam em abundância. Mil anos mais tarde, na Índia antiga, o indiano Sushruta diagnosticou a doença em seus pacientes e pela primeira vez diferenciou duas formas da mesma, uma em jovens, altamente fatal, e outra encontrada em pacientes adultos e obesos (1).

No entanto, foi somente no ano 250 a.C. que o médico grego Apollonius de Memphis cunhou o termo “diabetes” cujo significado em grego é “passar por”, “fluir através de”, em uma comparação entre a excessiva produção de urina pelos doentes com a drenagem contínua de água por um sifão (1). No primeiro século da era Cristã, grandes avanços foram feitos no entendimento do diabetes graças ao médico Aretaeus nascido na Capadócia, região hoje pertencente à Turquia. Aretaeus é autor da primeira descrição clínica completa da doença ao reunir em seus relatos suas principais manifestações: polifagia (alimentação excessiva), polidipsia (sede excessiva), poliúria (produção e eliminação abundante e excessiva de urina) e poliastenia (fraqueza excessiva do organismo). O médico observou também que, quase sempre, as pessoas com esses sintomas entravam em coma antes da morte.

Durante muitos séculos o diabetes foi equivocadamente considerado uma doença causada pela perda da capacidade de retenção da urina pelos rins, sendo o famoso médico grego Galeno um dos principais defensores dessa teoria. Embora hoje essa teoria não seja aceita, nem tão pouco o rim seja o órgão responsável pelo armazenamento da urina, as ideias de Galeno, por sua importância no estudo da fisiologia, foram aceitas por mais de um milênio.

Em 1670, o médico inglês Thomas Willis adicionou o termo “mellitus” (do latim “mel ou adocicado”) ao diabetes em virtude da urina de indivíduos que apresentavam a doença ser “muitíssimo doce, cheia de açúcar” (2). Mais do que simplesmente descrever que a urina de diabéticos era adocicada, Willis afirmou que o sangue dos doentes também era doce. Se apoiando na recém descoberta circulação sanguínea por Willian Harvey em 1628 (3), Willis se aproximou da descoberta da principal manifestação do diabetes, a hiperglicemia, ao afirmar

que o distúrbio era um acometimento do sangue e não mais dos rins como postulado por Galeno.

Mais tarde, no início do século XIX, o químico francês Michel Chevreul demonstrou que o açúcar em excesso presente na urina dos diabéticos era a glicose, momento a partir do qual a molécula se tornou o principal vilão da doença (4).

Apesar dos avanços no entendimento do diabetes, ainda faltava a descoberta do elemento desencadeador da doença. Experimentos realizados em 1889, pelos fisiologistas Joseph Mering e Oscar Minkowski, mostraram que cães pancreatectomizados apresentavam síndrome semelhante ao *Diabetes mellitus*, com poliúria, polifagia, emagrecimento, cetose e má cicatrização de feridas (5). Os cientistas observaram também que a condição dos animais pancreatectomizados era revertida pela implantação subcutânea de fragmentos do pâncreas, levantando-se a hipótese de que a doença estaria relacionada com a ausência de um fator deste órgão (4).

Em outubro de 1921, em Toronto, Frederick Banting e Charles Best, utilizando cães, conseguiram isolar uma substância das células pancreáticas que se mostrava capaz de eliminar os sintomas do diabetes em pacientes. O extrato foi batizado de “insulina”, palavra derivada do latim *insula*, que significa “ilha” (6).

Com a descoberta da importância da insulina pancreática no desenvolvimento do diabetes, a teoria de que a doença seria causada por alterações renais estava encerrada, no entanto, a associação da doença com problemas nos rins, bem como em diversos outros órgãos acometidos pelo excesso de glicose circulante no sangue estava apenas começando a ser estabelecida.

1.1.2 – Descrição

O diabetes é uma doença metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia resultante da insuficiência de insulina ou incapacidade do organismo em utilizar eficientemente o hormônio (7). Em uma parcela dos indivíduos com diabetes, essas alterações nos níveis e função da insulina podem ainda coexistir (8).

A insulina é um hormônio produzido pelas células β pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis sanguíneos de glicose. Este carboidrato é transportado através da membrana plasmática das células β por uma proteína integral de membrana chamada de GLUT 2 (do inglês “glucose transporter 2”), ativando uma cascata de sinalização envolvida com a exocitose dos grânulos nos quais a insulina encontra-se armazenada (9). Uma vez na circulação sanguínea, a insulina é fundamental para o aporte de glicose para as células musculares e adiposas, bem como para a síntese hepática de glicogênio. O hormônio induz

uma rápida entrada da glicose nos tecidos muscular e adiposo mediante o recrutamento de transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT 4) do “pool” intracelular para a membrana plasmática (10).

Dessa forma, diabéticos quando não tratados adequadamente apresentam desequilíbrio nos níveis de glicose no sangue, com conseqüentes alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Em paralelo a hiperglicemia plasmática, outras alterações são sintomáticas do diabetes, tais como cetoacidose, glicosúria, poliúria e polifagia (11). Cabe ressaltar, no entanto, que essas manifestações do estado diabético podem estar ausentes em alguns pacientes, mesmo existindo glicose sanguínea em quantidade suficiente para causar alterações funcionais ou patológicas por um longo período antes que o diagnóstico seja estabelecido.

Classicamente são descritos dois tipos principais de diabetes, a doença dita do tipo 1, que se relaciona com a deficiência na secreção de insulina e o diabetes do tipo 2, caracterizado pela perda da eficiência do hormônio. No entanto, outras manifestações da doença, como é o caso do diabetes gestacional também são recorrentes na clínica (12).

No diabetes do tipo 1, o sistema imunológico responsável pela defesa do organismo ataca as células β pancreáticas produtoras de insulina do próprio indivíduo, levando a deficiência do hormônio. Embora essa forma de diabetes possa se manifestar em qualquer idade, a incidência é maior em crianças e adolescentes em virtude da maior taxa de destruição das células produtoras de insulina nestes quando comparada a verificada em adultos. Embora seja sabido que indivíduos com outras doenças autoimunes são mais propensos ao diabetes tipo 1, as causas da doença ainda não são totalmente conhecidas. Sabe-se que há uma predisposição genética associada à doença, sendo inclusive relatado que gêmeos monozigóticos apresentam um percentual de concordância para a doença em 50% dos casos (13). Dessa forma, mesmo com um significativo componente genético, essa não é a única causa da doença. Fatores externos ao organismo, como por exemplo, a infecção por determinados tipos de vírus como o coxsackie ou mesmo uma alta carga de estresse podem ser determinantes para o aparecimento da doença (14).

Alguns doentes, em especial crianças e adolescentes, apresentam como manifestação inicial da hiperglicemia a cetoacidose, intercorrência aguda grave decorrente do uso de lipídeos como fonte energética, que leva ao acúmulo de corpos cetônicos e redução do pH sanguíneo (15). Quando diagnosticados, diabéticos do tipo 1 tornam-se dependentes de insulina exógena para viver e se manterem saudáveis, devendo receber injeções diárias do hormônio com o intuito de regularizar o metabolismo da glicose (16).

Outra manifestação do diabetes, é a doença do tipo 2, usualmente observada em adultos, embora esteja cada dia mais recorrente em crianças e adolescentes. Ela aparece quando as células do organismo que dependem de insulina para internalização da glicose vão progressivamente tornando-se resistentes a esse hormônio (8). Essa forma da doença tem em suas causas uma elevada contribuição genética, superior inclusive a observada no diabetes do tipo 1. No entanto, outros fatores de risco são o aumento da idade, a etnia, e principalmente a dieta e estado físico da pessoa (17). A obesidade, especialmente a observada na região abdominal, na qual a gordura se acumula mais ao redor da cintura que no restante do corpo, aumenta consideravelmente os riscos do desenvolvimento da doença. Este é o padrão de obesidade frequentemente associado à resistência à insulina e a uma condição conhecida como síndrome metabólica (18). O tratamento do diabetes do tipo 2 envolve restrições alimentares e perda de peso associadas a prática de atividades físicas bem como em alguns casos o uso de medicamentos capazes de reduzir os níveis de glicose sanguínea (19).

Quanto ao diabetes gestacional, ele acomete mulheres nas quais os quadros de hiperglicemia se iniciam ou ao menos tem seu primeiro diagnóstico feito durante a gravidez. Embora na maioria das vezes seja observado o restabelecimento dos níveis plasmáticos de glicose após o nascimento da criança, ainda assim, por definição, estes são casos descritos como de diabetes gestacional. Mulheres que desenvolveram o diabetes gestacional são mais propensas ao desenvolvimento de diabetes do tipo 2 no futuro (20).

A hiperglicemia nessa apresentação do diabetes, quando não oriunda da manifestação da doença ainda não diagnosticada, deve-se a incapacidade do organismo da mãe em utilizar adequadamente a insulina. Essa resistência à insulina pode se relacionar a alterações hormonais naturais decorrentes das modificações no corpo da mulher bem como ao estresse fisiológico imposto pela gravidez (21). Quando a doença se instala em um momento avançado da gravidez, com o feto já formado, os riscos de complicações para a criança são menores. No entanto, há casos em que o diabetes gestacional manifesta-se no início da gravidez tendo como possíveis consequências o desenvolvimento de fetos com peso elevado e o nascimento de crianças com tendência a obesidade e o diabetes (22). Não raro também é o aparecimento de malformações congênitas, como é o caso da imaturidade pulmonar que se relaciona ao desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) no recém-nascido (23).

1.1.3 – Incidência e prevalência do diabetes

Com o crescimento da expectativa de vida da população em um grande número de países, o diabetes tem se tornado uma das principais preocupações em termos de saúde

pública. A ausência de cura para a doença somada a sua evolução crônica contribuem para o aumento de sua prevalência (Figura 1.1). Além disso, o processo de industrialização e urbanização populacional das últimas décadas tem impacto direto sobre os hábitos de vida das pessoas sendo um fator importante para o surgimento de novos casos de diabetes em todas as partes do mundo.

Desde 1988, a OMS (Organização Mundial de Saúde) reconhece o diabetes como uma doença epidêmica (24), com elevada morbidade, mortalidade e repercussões econômicas significativas em escala mundial. Os dados mais recentes disponíveis acerca do acompanhamento realizado pela Federação Internacional de Diabetes (IDF) sobre o cenário do diabetes no mundo apontam para um número de 385 milhões de adultos (20-79 anos) com a doença ao final de 2013 e projeção de crescimento do número de diabéticos para 592 milhões até o ano de 2035. Esses valores refletem uma prevalência em 2013 de 8,3% da doença na população adulta e uma estimativa para 2035 de uma prevalência de 10,1% (um adulto com diabetes em cada dez pessoas em 2035) (25). Outra informação relevante refere-se ao enorme número de indivíduos que desconhecem serem diabéticos. Em 2013, 175 milhões de doentes, ou 46% do total de diabéticos, não haviam sido diagnosticados com a doença, o que impossibilita o tratamento dessas pessoas, reduzindo a capacidade de resposta frente a complicações associadas à doença.

Dos pacientes diagnosticados com a doença, 5 a 10 % possuem o diabetes do tipo I sendo que, somente no ano de 2013, 79 mil crianças desenvolveram essa forma da doença. O diabetes do tipo II, a forma mais prevalente da doença, responde por 85 a 95 % dos casos relatados. Outros tipos de diabetes, como o gestacional, ocorrem com uma frequência menor. O diabetes gestacional é uma intercorrência clínica cuja prevalência varia entre 1 e 14% de todas as gestações dependendo da população estudada, e dos testes diagnósticos empregados (26). Somente em 2013, mais de 21 milhões de nascimentos foram afetados por algum tipo de diabetes, dentre eles o gestacional. No Brasil, apesar da inexistência de dados recentes, a prevalência do diabetes gestacional é estimada entre 2,4 e 7,2% das gestações, dependendo dos critérios diagnósticos (27).

No cenário geral, o Brasil é o quarto país no mundo em número de pessoas com diabetes, com 11,9 milhões de doentes, ou 9% da população entre 20-79 anos. Estima-se que em 2035 o Brasil ultrapasse a marca dos 19 milhões de diabéticos. No Brasil, como no restante do mundo, quase a metade dos adultos diabéticos tem idade entre 40 e 59 anos, com um discreto predomínio da doença em homens em comparação as mulheres. Uma informação importante é que 80% de todas as pessoas com diabetes vivem em países pobres ou em desenvolvimento, sendo ainda essas nações as que apresentam o maior número de casos não

diagnosticados e as maiores estimativas de crescimento da epidemia para as próximas décadas (25). Esses dados são alarmantes, pois o diabetes é uma das principais causas de morte em todo o mundo e representa um considerável gasto econômico aos indivíduos e seus países, especialmente quando mal controlado, o que ocorre em muitos casos como consequência da falta do seu diagnóstico.

Aproximadamente 5,1 milhões de pessoas na idade adulta morreram em 2013 em decorrência do diabetes, o que representa 8,4% de todas as causas de mortes globais na faixa etária em questão. Por outro lado, no mesmo período, foram gastos mais de 548 bilhões de dólares americanos no tratamento e suporte a complicações associadas à doença que diminuem a produtividade, a qualidade de vida e sobrevida dos indivíduos (25).

Esses números preocupantes encontrados tanto em países desenvolvidos como nos em desenvolvimento fazem do estudo do diabetes e do seu melhor entendimento um dos principais desafios do século XXI.

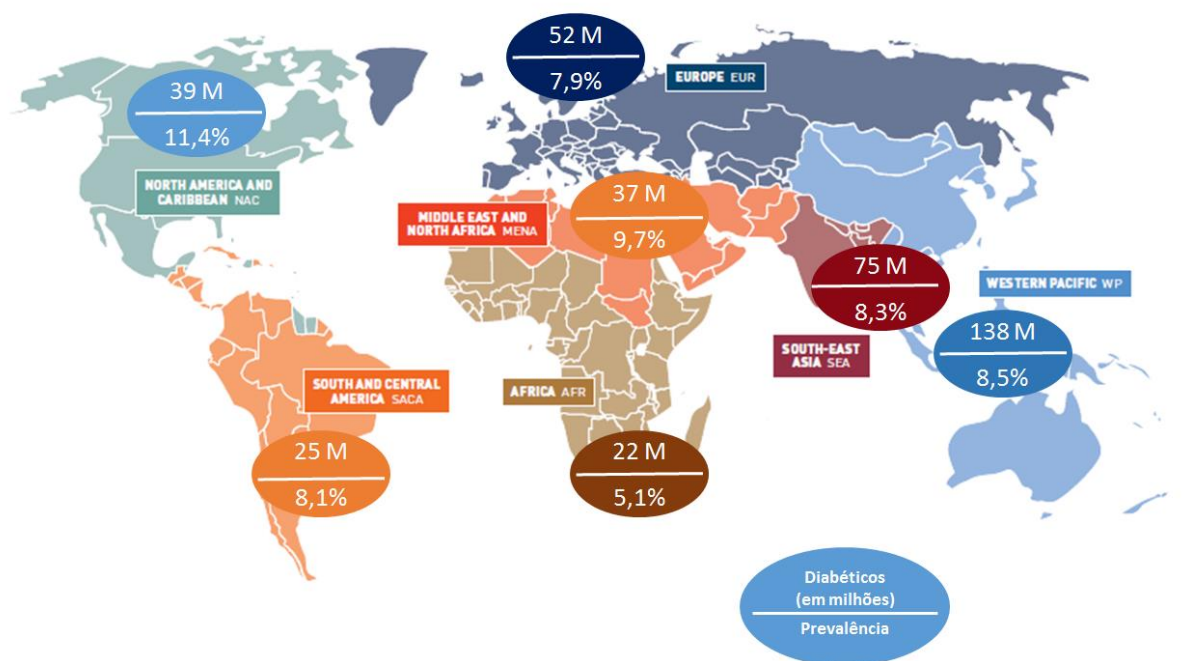


Figura 1.1 – Prevalência global do *diabetes mellitus* na população adulta. Modificado de IDF Diabetes Atlas 6ª edição, 2013 (25).

1.1.4 - Modelos experimentais para o estudo do diabetes

Em função da importância do avanço no entendimento do diabetes e busca de alternativas para o tratamento do mesmo, foram desenvolvidos vários modelos animais que

buscam mimetizar a doença tal qual observada em humanos. A maioria dos estudos é feita em roedores, embora outras espécies com características biológicas semelhantes aos humanos também sejam utilizadas. Diversos modelos reproduzem sinais importantes da fisiopatologia do diabetes como a hiperglicemia e suas manifestações associadas, tais como polidipsia, polifagia e poliúria. Dentre as opções disponíveis para experimentação científica, os modelos mais adotados são os do diabetes espontâneo e o induzido, seja por alguns tipos de vírus, dieta, procedimentos cirúrgicos ou ainda administração de substâncias químicas (28-30).

Determinadas cepas de roedores desenvolvidas por pesquisadores possuem predisposição genética para o desenvolvimento do diabetes autoimune, como é o caso dos camundongos NOD (do inglês “non-obese diabetes”) e ratos DPBB (do inglês “diabetes probe biobreding”) (31). Os animais NOD desenvolvem entre 4 e 5 semanas de vida uma insulite marcada por um infiltrado leucocitário na região das ilhotas pancreáticas que leva a destruição gradual das células β e aparecimento, em torno da 24^a e 30^a semana de vida, do diabetes (32, 33). É importante ressaltar que o desenvolvimento do diabetes nesses animais só é possível em um ambiente controlado, livre de patógenos, uma vez que esses animais são aptos a desenvolverem uma resposta imunomoduladora protetiva ao diabetes na presença de determinados microrganismos (34).

Os animais DPBB assim como os camundongos NOD desenvolvem uma insulite dependente de linfócitos T que repercute em um quadro de hiperglicemia e insulinoopenia com manifestação de poliúria e polidipsia entre a 8^a e 16^a semana de vida do animal (35). Em adição aos modelos de diabetes do tipo 1 espontâneo, animais com mutações gênicas que se associam a deficiência na produção ou funcionalidade de leptina ou ainda alterações no receptor desta adipocina, como é o caso dos camundongos ob/ob e db/db, apresentam obesidade e um quadro de diabetes do tipo 2 com resistência à insulina, hiperinsulinemia e hiperglicemia (36).

Quanto ao diabetes induzido, evidências epidemiológicas apontam que alguns vírus podem ser determinantes para o desenvolvimento do diabetes tanto em humanos como em animais (37, 38). Na literatura são descritos modelos de diabetes nos quais vírus são capazes tanto de induzir uma resposta imunológica contra as células produtoras de insulina como destruir estas células mediante infecção direta. Em animais geneticamente susceptíveis, a infecção por vírus tais quais o da rubéola ou rotavírus é capaz de desencadear, através da autoimunidade mediada pelos mesmos, o desenvolvimento de um quadro de diabetes (39, 40). Em adição, outros vírus como o coxsackie B e variantes de vírus causadores de encefalomiocardite (EMC) podem induzir o diabetes mediante tropismo e efeitos citotóxicos diretos sobre as células β pancreáticas (37, 41).

Outra ferramenta para a obtenção de modelos animais do diabetes se baseia na associação entre a doença e maus hábitos alimentares e sedentarismo. A utilização de alimentação rica em lipídeos, quase sempre ultrapassando os 50% da composição da ração ofertada aos animais, é descrita em diferentes estudos do diabetes do tipo 2. Estes usualmente são de longa duração, embora em alguns modelos o aumento de peso e dos níveis de glicose plasmática possa ser observado já nas primeiras semanas de dieta hiperlipídica (42).

Em adição aos modelos de diabetes induzido por infecções virais e dieta hiperlipídica, a doença pode se manifestar a partir de determinados procedimentos cirúrgicos. A descoberta do papel do pâncreas na etiologia do diabetes utilizando-se cães pancreatectomizados posiciona esse como um dos modelos animais mais antigos utilizados para o estudo da doença (5). Ainda hoje, no entanto, o diabetes cirúrgico apresenta-se como uma alternativa para o desenvolvimento e estudo do estado diabético, em especial nas investigações das possibilidades relacionadas ao transplante de ilhotas pancreáticas (43). Em paralelo aos métodos cirúrgicos de indução do diabetes, modelos menos invasivos de lesões pancreáticas baseados na administração de substâncias químicas tóxicas ao órgão, como é o caso da estreptozotocina e aloxana, são amplamente utilizados em roedores (30, 44).

As substâncias químicas reconhecidas por sua atividade diabetogênica atuam mediante destruição das células produtoras de insulina das ilhotas pancreáticas. Os diabetogênicos químicos funcionam como análogos tóxicos da glicose sendo internalizados pelas células β através de GLUT do tipo 2 que são altamente expressos nessas células.

Tanto a estreptozotocina quanto a aloxana levam à necrose das células produtoras de insulina o que culmina na deficiência do hormônio e estabelecimento de um quadro de diabetes do tipo 1. A diferença entre essas substâncias químicas está no mecanismo como elas destroem seu alvo. Enquanto a estreptozotocina atua principalmente via alcalinização e fragmentação do DNA, com modificação de macromoléculas e destruição das células β , a aloxana induz o estabelecimento de um ciclo redox com formação de radicais superóxidos e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) que levam a morte das células produtoras de insulina (30, 45). A importância de ROS na ativação da resposta adaptativa autoimune relacionada à destruição das células β em pessoas com o diabetes do tipo 1 é descrita na literatura (46). A produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 beta (IL-1 β), é induzida por ROS em macrófagos e células dendríticas a partir da ativação das vias das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), da proteína ativadora 1 (AP-1) e do fator nuclear κ B (NF κ B) (47). Por sua vez, essas citocinas funcionam como um importante sinal para a ativação de células efetoras da imunidade adaptativa e destruição das ilhotas β pancreáticas em humanos (46).

A aloxana é uma substância hidrofílica e instável, com meia-vida de poucos minutos. Em doses diabetogênicas, no entanto, o tempo de decomposição da droga é suficientemente grande para que a mesma alcance o pâncreas em quantidades necessárias para estabelecimento do quadro diabético (48). A rápida entrada da aloxana nas células β pancreáticas é ainda facilitada em animais em jejum (49).

Dessa forma, o diabetes induzido por administração de aloxana em ratos apresenta-se como um modelo acessível de estudo da doença não somente no que se refere as manifestações clínicas observadas nos pacientes diabéticos, como também pelo desenvolvimento da lesão pancreática com produção de ROS e ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B, de forma semelhante ao observado em humanos (30, 50).

1.2 – Eixo HPA

1.2.1 – Visão geral

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é parte do sistema neuroendócrino que se relaciona com a síntese, liberação e regulação dos hormônios glicocorticoides. Estes são hormônios derivados da molécula de colesterol sendo o cortisol e a corticosterona as suas principais formas presentes em humanos e roedores, respectivamente. Glicocorticoides atuam na regulação do metabolismo animal, possuem importante participação sobre o sistema imunológico e também sobre o comportamento (51, 52). Também são os principais hormônios relacionados a resposta adaptativa ao estresse, controle complexo homeostático que permite, por exemplo, que o organismo se prepare sob o ponto de vista energético e cardiovascular para uma situação de necessidade física (53).

Em condições normais, a atividade do eixo HPA é regulada pelo ritmo circadiano, período de aproximadamente 24 horas no qual se baseia o ciclo biológico de quase todos os seres vivos. Este relógio biológico é altamente conservado em mamíferos, centralmente controlado pelo núcleo supraquiasmático (NSQ) hipotalâmico e influenciado pelos ciclos de dia e noite (54). Dessa forma, o ritmo diário do sistema endócrino é sincronizado ao tempo solar mediante aferências da retina (55, 56). Através do trato retino-hipotalâmico e do fotopigmento melanopsina, a luz se comunica com neurônios dos NSQ sendo importante para a regulação, dentre outros, do eixo HPA. Em humanos, a produção de glicocorticoides é maior no começo da manhã com diminuição nos níveis do hormônio ao final do dia (54).

Em adição ao controle central hipotalâmico, evidências apontam a participação de “relógios” periféricos regulados pelos chamados genes “clock” na síntese dos glicocorticoides, como é o caso do ritmo circadiano encontrado nas adrenais. Em particular, a

proteína esteroideogênica reguladora aguda (StAR) aparece como um importante elo entre os sistema central de controle hipotalâmico e a síntese adrenal dos hormônios glicocorticoides (57). Estudos demonstram que os níveis da proteína StAR apresentam variação diária mesmo após os animais serem submetidos a período de escuridão por dois dias (58).

A sequência de eventos envolvidos na ativação do eixo HPA engloba uma complexa e dinâmica intercomunicação entre o sistema nervoso simpático, neurônios dos núcleos paraventriculares hipotalâmicos (PVN), hipófise anterior e mediadores peptídicos que culmina com a liberação dos glicocorticoides na circulação pelas adrenais. A secreção pelo hipotálamo do fator liberador de corticotrofina (CRH) e da arginina vasopressina (AVP) estimula células corticotróficas da hipófise anterior a produzirem o hormônio adrenocorticotrófico ou corticotrofina (ACTH), que ativa a síntese adrenal dos glicocorticoides (59).

O CRH é um hormônio peptídico composto por 41 aminoácidos produzido por neurônios parvocelulares do hipotálamo, sendo o principal estimulador da síntese hipofisária de ACTH em condições normais (51). Ele atua através do seu receptor do tipo 1 (CRF1), um receptor acoplado a proteína G (GPCR) expresso não somente na adenohipófise como também em outras regiões do cérebro, com destaque para o córtex cerebral, amídalas e hipocampo (60). Via sistema porta-hipofiseal, o CRH ativa a produção de ACTH em um mecanismo potencializado, principalmente em situações de estresse, pela AVP. Este nonapeptídeo cíclico é produzido por neurônios paraventriculares hipotalâmicos desempenhando uma série de funções no organismo incluindo retenção de água nos rins e regulação da atividade da glândula hipófise. Dessa forma, AVP atua através do GPCR AVP1b aumentando a produção de ACTH pela pituitária (53).

O ACTH é obtido a partir da clivagem do precursor pro-opiomelanocortina (POMC) por pro-hormônio convertases específicas (61). Uma vez sintetizado, o hormônio peptídico é secretado na circulação sanguínea atingindo as glândulas adrenais onde se liga aos receptores de melanocortina do tipo 2 (MC2-R) expressos na zona fasciculada do córtex adrenal. A ativação de MC2-R pelo ACTH estimula a enzima adenilato ciclase com subsequente ativação da proteína cinase A (PKA) e transcrição de genes associados a síntese de proteínas esteroideogênicas envolvidas com a produção de glicocorticoides (62). Dessa maneira, a partir da molécula precursora de colesterol, os glicocorticoides são sintetizados através de uma série de etapas bioquímicas catalisadas pelo citocromo P450 que envolvem reações de hidroxilação e culminam com a produção pelas células adrenocorticais de duas formas ativas do hormônio esteroide, as moléculas de cortisol e corticosterona (63). O primeiro, também chamado de hidrocortisona é o mais importante glicocorticoide presente em humanos, ao passo que a

corticosterona é mais abundantemente encontrada em roedores. No entanto, apesar da variação nos níveis destes hormônios entre diferentes espécies, ambos apresentam os mesmos efeitos no organismo, como as já referidas participações na regulação da atividade metabólica, funções imunes e comportamentais (52, 64, 65).

Além de sua associação com ritmo circadiano, o eixo HPA é também um dos principais sistemas efetores na resposta adaptativa ao estresse, controle complexo que atua restabelecendo a homeostase do organismo, fundamental para sua sobrevivência (53). As características da resposta ao estresse são fortemente determinadas pelos desafios ocasionados pelos agentes estressores, que variam desde fatores físico/químicos a fatores sociais e comportamentais (66). Quando o organismo é submetido a um estressor, através de componentes sensoriais, diferentes regiões cerebrais são ativadas. Respeitando a natureza do estímulo, informações integradas pelo sistema límbico ou mesmo por neurónios hipotalâmicos sensíveis ao desequilíbrio homeostático, desencadeiam respostas do eixo HPA (67). Glicocorticoides como o cortisol liberados em resposta a ativação do eixo HPA influenciam no metabolismo energético e resposta cardiovascular que são fundamentais na resposta física do organismo a determinadas situações de estresse (53). No entanto, em situações nas quais a ativação do eixo HPA é mantida em função da permanência do agente estressor ou mesmo nos casos nos quais a produção de glicocorticoides supera as necessidades do organismo, o hormônio pode ocasionar ou agravar uma série de condições prejudiciais à saúde do indivíduo (68). Dessa forma, é de fundamental importância a existência de mecanismos de controle da produção dos hormônios.

1.2.2 – Regulação da atividade do eixo HPA

Tanto a atividade basal do eixo HPA quanto a estimulação do eixo que se sucede a presença de um estressor são reguladas por um mecanismo de retroalimentação negativa que ocorre por ao menos duas formas, um processo lento e outro rápido (69). O controle clássico, dito lento, do sistema neuroendócrino envolvido com a síntese dos glicocorticoides é mediado por sinalização genômica através da ativação de receptores intracelulares de glicocorticoides (GR) e mineralocorticoides (MR) (70). A ativação destes fatores de transcrição nos PVN hipotalâmicos e na glândula hipófise provoca a redução nos níveis de CRH e ACTH como consequência do decréscimo no conteúdo de RNAm codificante para CRH e POMC, contribuindo para a restauração da homeostase do eixo (71, 72). Em sintonia com o mecanismo de retroalimentação negativa lento de controle da atividade do eixo HPA, a enzima 11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 atua na modulação da sinalização dos glicocorticoides convertendo cortisona, forma inativa do hormônio esteroide, na forma ativa

cortisol. No hipotálamo, a enzima se localiza com os hormônios CRH e AVP sugerindo uma participação da mesma potencializando a retroalimentação negativa no controle da atividade do eixo HPA nos PVN via conversão autócrina de cortisona em cortisol (73).

Embora o mecanismo genômico de controle da atividade do eixo HPA contribua para regulação a longo prazo nos níveis de hormônios do eixo, uma resposta rápida é importante em situações nas quais o controle minuto-a-minuto na função do eixo seja requerida. Estudos sugerem que esse “feedback” rápido seja compatível com um efeito dos glicocorticoides sobre receptores de membrana nos PVN. Nestes trabalhos, a administração local de um conjugado de dexametasona e albumina de soro bovino (BSA) impermeável a membrana dos PVN demonstrou que a inibição rápida da liberação de ACTH e corticosterona é decorrente da atuação do glicocorticoide na membrana das células (69, 74).

A compreensão dessa complexa regulação do eixo HPA, desde a produção e regulação dos níveis de glicocorticoides é crucial para o entendimento dos mecanismos associados com o desenvolvimento das doenças relacionadas com alterações na função do eixo. No grupo de doenças marcadas por modificações na função do eixo HPA, é do nosso interesse o estudo das alterações observadas no eixo de indivíduos com diabetes, o que se relaciona com complicações e a elevada morbimortalidade da doença.

1.2.3 – Eixo HPA e o diabetes

Pacientes diabéticos com frequência apresentam complicações que também são observadas em pessoas com Síndrome de Cushing, doença classicamente relacionada com aumento atípico da atividade do eixo HPA. Hipertensão, redução da resposta imunológica, aumento do risco do desenvolvimento de depressão e fraqueza muscular são manifestações compartilhadas por indivíduos com essas doenças, embora no caso de diabéticos sejam quase sempre associadas a hiperglicemia (75-77). Há décadas é sabido que pessoas com diabetes apresentam aumento nos níveis plasmáticos basais de glicocorticoides, bem como níveis aumentados do hormônio na urina (78, 79). Além disso, foi observado que mesmo durante o teste de supressão por dexametasona, os níveis de ACTH e cortisol apresentaram-se significativamente aumentados no grupo de pessoas com diabetes (78).

Em adição a descrição de uma marcada hiperatividade do eixo HPA em humanos, diversos trabalhos demonstram que o mesmo fenômeno ocorre em modelos animais de diabetes e hiperglicemia (80, 81). Em alguns destes estudos, uma explicação para a atividade aumentada do eixo em diabéticos se relaciona com a hiperglicemia característica da doença. Em modelo utilizando-se “zebrafish”, foi observado que o aumento nos níveis de glicose é capaz de elevar os níveis quantificados de cortisol, de forma tempo dependente (82). Soma-se

a isso, o fato de estudos feitos em células adrenocorticais Y-1 demonstrarem que a hiperglicemia é capaz de induzir um quadro de estresse oxidativo que se relaciona com o aumento da atividade esteroidogênica das células (83). O efeito da hiperglicemia sobre o eixo HPA pode se relacionar com a ativação da via dos polióis, uma rota alternativa de metabolismo da glicose, uma vez que as glândulas adrenais apresentam elevados níveis de aldose redutase e a inibição dessa enzima *in vivo* foi capaz de reduzir os níveis de corticosterona em ratos diabéticos (84).

No caso do diabetes do tipo 1, o aumento da atividade do eixo HPA se relaciona também com a drástica redução nos níveis de insulina enfrentada pelos doentes. Animais diabéticos tratados com insulina exógena apresentam atividade do eixo HPA normalizada via redução da secreção de ACTH e glicocorticoides em um mecanismo associado com o aumento na expressão de RNAm codificante de GR na hipófise e presumivelmente restabelecimento do mecanismo de controle por retroalimentação do eixo HPA (80, 85). Dessa forma, podemos relacionar a falha no mecanismo de controle da produção de glicocorticoides, diagnosticada pela perda da sensibilidade ao teste de supressão por dexametasona, a redução na expressão de GR e MR na hipófise de animais tornados diabéticos através da administração de aloxana (86).

Além do impacto direto da redução nos níveis de insulina sobre a atividade do eixo HPA em diabéticos, outros hormônios importantes que apresentam flutuação em função do diabetes podem desempenhar papel relevante na atividade do eixo neuroendócrino investigado. Ao passo que indivíduos com diabetes do tipo 1 apresentam redução na produção de insulina, é característico da doença um aumento nos níveis de glucagon e redução nos hormônios leptina e prolactina (85, 87, 88). O glucagon é um hormônio pancreático envolvido no metabolismo de carboidratos e que se apresenta em níveis elevados em indivíduos com quadro de diabetes mal controlado (89, 90). Estudos demonstram que a exposição crônica a níveis elevados de glucagon é capaz de induzir aumento na produção de ACTH e conseqüentemente na dosagem de glicocorticoides plasmáticos em humanos saudáveis (91, 92). Soma-se a esse fato, a observação de que a administração intracerebroventricular de glucagon em galinhas eleva os níveis de corticosterona nas mesmas, sinalizando para a importância do hormônio peptídico na ativação central do eixo HPA (93).

Por sua vez, a leptina é um hormônio com atividades pleiotrópicas com participação importante na modulação da resposta do eixo HPA em roedores e primatas. Em paralelo a sua atuação direta no controle do metabolismo através da regulação do apetite, a leptina tem efeitos supressores sobre todos os componentes do eixo HPA (90, 94, 95). Através de mecanismos centrais e periféricos, a adipocina atua sobre: hipotálamo, hipófise e adrenais,

inibindo a síntese de ACTH e glicocorticoides (94). Microdissecções e separação de células adrenocorticais humanas seguidas de ensaios de biologia molecular demonstraram a presença de receptores funcionais de leptina nestas células, bem como demais ensaios com células adrenais humanas e de ratos demonstraram um efeito inibidor dose-resposta do hormônio sobre a síntese de glicocorticoides (94, 96). Os mesmos efeitos supressores da proteína foram observados em modelo de diabetes do tipo 1 em ratos, no qual o restabelecimento dos níveis de leptina foi capaz de reverter a hiperglicemia dos animais através da redução da atividade do eixo HPA. Por fim, é descrito que em macacos rhesus a administração crônica de leptina por via subcutânea favorece o mecanismo de retroalimentação negativa responsável pela redução na atuação do CRH sobre a síntese de ACTH e glicocorticoides (97).

Quanto a prolactina, alguns de seus efeitos antagonizam aos descritos para os glicocorticoides, como no caso da estimulação da resposta imunológica imposta pelo hormônio peptídico (98). Trabalhos relatam seu efeito protetor sobre o dano das células β pancreáticas associado com o desenvolvimento do diabetes, bem como a conseqüente menor incidência da doença em pessoas com níveis elevados do hormônio hipofisiário (88, 98, 99). Além disso, a prolactina reduz a reatividade do eixo HPA, na medida em que em condições de hiperprolactemia, animais apresentam resposta comprometida frente a diferentes agentes estressores (100, 101). Em adição, em modelo murino de infecção por *Trypanosoma cruzi* a hiperatividade do eixo HPA e o aumento nos níveis de glicocorticoides descritos apresentaram correlação inversa com a dosagem de prolactina feita nos animais (102).

Em conjunto, todas as alterações mencionadas que estão presentes no desenvolvimento do diabetes contribuem para um quadro de estimulação excessiva do eixo HPA nestes indivíduos, o que se relaciona com a presença de níveis elevados de glicocorticoides circulantes nestes pacientes e uma série de repercussões no seu estado de saúde (Figura 1.2).

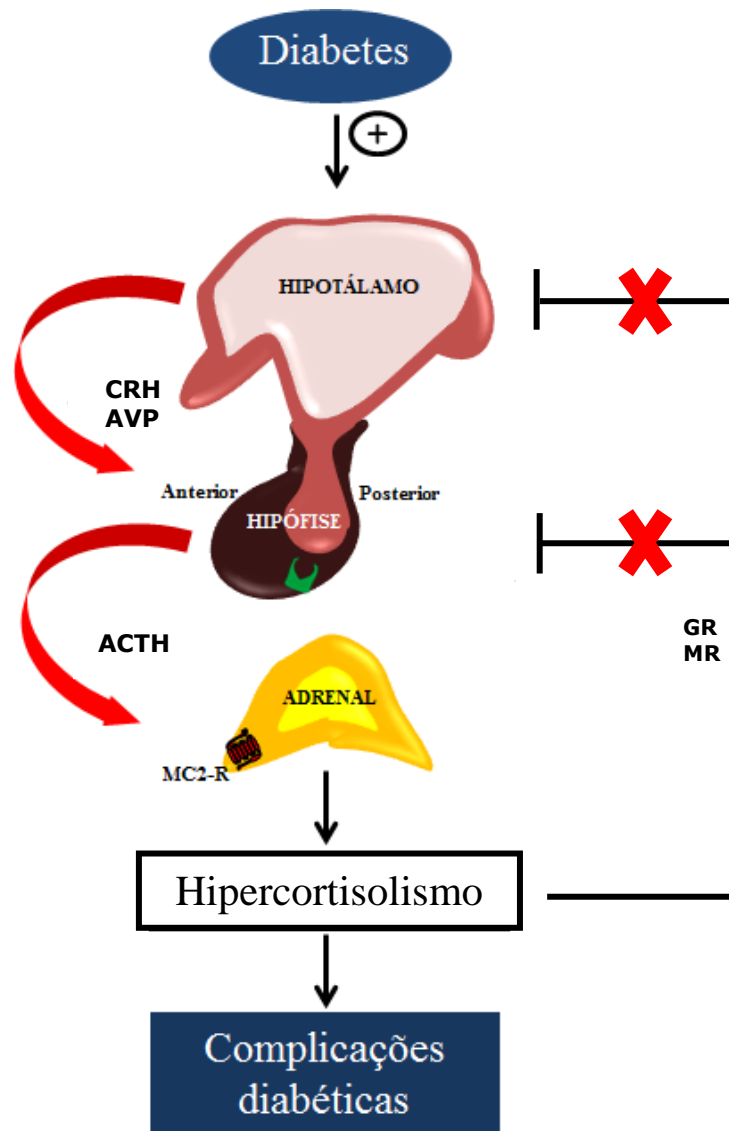


Figura 1.2 – A hiperatividade do eixo HPA em diabéticos – Modificado de Torres e cols (86).

1.2.4 – Glicocorticoides e complicações do diabetes

O diabetes é uma doença associada com um amplo espectro de complicações relacionadas a hiperglicemia que impactam diretamente a vida dos pacientes, frequentemente ocasionando graves limitações pessoais e profissionais quando não a morte dos doentes (103). As principais manifestações da doença se originam a partir de disfunções vasculares e/ou neuronais que comprometem a função de diferentes sistemas fisiológicos (104-108). Doenças cardiovasculares como os derrames, infarto do miocárdio e doença congestiva cardíaca são as principais causas de perda de qualidade de vida e morte entre os diabéticos (109). Problemas renais, a chamada nefropatia diabética são fruto da lesão de pequenos vasos que levam a uma perda da eficiência renal, refletida inicialmente pela presença de glicose na urina, progredindo para a falência do órgão (110).

Em adição aos problemas cardíacos e renais, a retina, a pele e o sistema nervoso periférico também são alvo de lesões provocadas pelo diabetes, com relevante impacto sobre a saúde do indivíduo, podendo levar à cegueira e amputação não-traumática de membros. É o que ocorre, por exemplo, no pé diabético, complicação relacionada com problemas do sistema nervoso periférico, circulatório e de cicatrização que dificultam a recuperação dos machucados em diabéticos, e por vezes levam à perda de membros (111, 112).

Além da hiperglicemia, ou mesmo como mais um fator agravante dessa, a hiperatividade do eixo HPA e o conseqüente aumento nos níveis de glicocorticoides presentes na circulação sanguínea são um desafio para o entendimento e controle de várias complicações diabéticas. Em algumas manifestações da doença, no entanto, a participação dos hormônios esteroides já foi comprovada. No laboratório de Inflamação, observamos que animais diabéticos do tipo 1 apresentam redução em sua resposta a estimulação alérgica, inclusive no que se refere ao desenvolvimento de asma, por um mecanismo dependente da presença de níveis circulantes aumentados de glicocorticoide (113, 114). Além disso, o bloqueio da ação dos glicocorticoides em animais diabéticos, seja por método cirúrgico ou farmacológico, melhora a o processo de cicatrização de feridas nestes animais (115).

Por outro lado, risco elevado de infecções, aterosclerose, hipertensão e distúrbios neurológicos com danos cognitivos graves são exemplos de complicações diabéticas nas quais a participação dos glicocorticoides merece um estudo mais aprofundado (116-118).

Os efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios dos glicocorticoides devem ser considerados no estabelecimento de outras complicações enfrentadas pelos diabéticos, como no caso das infecções oportunistas (119, 120). A elevada incidência de tuberculose, pneumonia e até mesmo sepse em indivíduos com o diabetes está relacionada com anormalidades no processo de quimiotaxia, e adesão de neutrófilos, bem como de destruição do patógeno após sua fagocitose. Além disso, são relatadas deficiências na resposta humoral e de opsonização em diabéticos (121). Estas alterações nas funções de fagócitos e linfócitos e conseqüente predisposição a doenças infecciosas se relacionam classicamente com a hiperglicemia e insulinopenia, quando esta última está presente (122). No entanto, níveis elevados de glicocorticoides circulantes também podem contribuir para aumentar o risco de infecções oportunistas, como tuberculose e pneumonia (123, 124). A ativação do eixo HPA ou o tratamento de macrófagos de animais susceptíveis com corticosterona suprime a expressão do RNAm de Nramp 1, proteína que controla a resistência do hospedeiro a determinadas infecções por parasitas intracelulares como o *Mycobacterium tuberculosis*, aumentando a taxa de infecção nesses animais (125).

Pacientes com diabetes também apresentam alta incidência de hipertensão o que acelera a perda da função renal, retinopatia e risco de danos cerebrais, como derrames (77). Corroborando a hipótese da participação da hiperatividade do eixo HPA nestas complicações diabéticas, é descrito a recorrência de hipertensão em portadores da Síndrome de Cushing ou mesmo em indivíduos que recebem administração farmacológica de glicocorticoides (126). Estes hormônios esteroides promiscuamente ativam os receptores MR, desempenhando efeitos de mineralocorticoides, resultando em retenção de sódio, expansão no volume sanguíneo e conseqüentemente na pressão arterial (127). Além disso, ratos tratados com dexametasona apresentam aumento da expressão do RNAm do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1) e redução na produção de óxido nítrico (NO) vascular com conseqüente aumento de sua pressão sanguínea (128, 129). Como mencionado anteriormente, a hipertensão é um fator de risco para outras morbidades, se enquadrando neste grupo a aterosclerose (130). No entanto, os glicocorticoides podem atuar diretamente sobre células do coração e da parede dos vasos sanguíneos alterando sua estrutura, função e facilitando a formação de placas de ateroma de forma independente de alterações nos níveis plasmáticos de colesterol (131-133).

Por fim, o diabetes é um fator que deve ser considerado de risco quando do estabelecimento das probabilidades da ocorrência de distúrbios da cognição e outros manifestações de doenças neurológicas (134). A hiperglicemia diabética se relaciona com a ativação da via dos polióis, aumento do estresse oxidativo e formação dos produtos avançados de glicação não-enzimática (AGEs) que são fatores preditivos importantes para o surgimento de danos do tecido nervoso (135, 136). Além disso, a dislipidemia e o comprometimento da função da insulina e peptídeo C estão envolvidos no desenvolvimento das neuropatias (137, 138). Neste contexto, o eixo HPA em seu estado superativado também desempenha relevante função nas alterações neurológicas as quais indivíduos diabéticos estão sujeitos. Níveis aumentados de glicocorticoides estão associados com a perda de memória dependente do hipocampo e de plasticidade sináptica em diabéticos (139). Em adição, outras doenças relacionadas com distúrbios neurodegenerativos, incluindo Alzheimer e a Síndrome de Cushing, estão marcadas pela presença do eixo HPA hiperativado e níveis aumentados do seu produto final (140, 141).

Coletivamente, seja por mecanismos indiretos via potencialização da hiperglicemia diabética, ou através de efeitos diretos sobre diferentes células do organismo, tendo em vista a ampla expressão dos receptores GR e MR, os glicocorticoides merecem maior destaque na fisiopatologia do diabetes e no estudo de diversas complicações que são enfrentadas pelos doentes em algum momento de suas vidas.

Dessa forma, a busca do aprofundamento do estudo do eixo HPA e investigação de alternativas para sua regulação em diabéticos é de suma importância. Nesse contexto, trabalhos descrevem que em alguns órgãos frequentemente acometidos por complicações diabéticas, como é o caso da retina e dos rins, a expressão do fator de transcrição conhecido como Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomos (PPAR) γ encontra-se reduzida em diabéticos (142). Além disso, agonistas do PPAR- γ são capazes de reduzir a atividade do eixo HPA em doentes com Cushing (143, 144).

1.3 - PPAR- γ

1.3.1 – Estrutura e distribuição dos PPARs

Os PPARs são fatores de transcrição da superfamília dos receptores nucleares que originalmente foram descritos como os receptores que mediavam os efeitos de compostos sintéticos chamados de proliferadores de peroxissomos sobre a transcrição gênica (145). São pertencentes a classe dos receptores nucleares que obrigatoriamente se ligam ao receptor X retinoide (RXR) para formação de heterodímeros e ligação a região promotora dos genes sobre sua regulação (146). Nesta classe também se incluem os receptores do ácido retinoico (RAR), receptor X do fígado (LXR) e os receptores dos hormônios da tireoide (TR). Na ausência de ligantes, a maioria dos heterodímeros de RXR encontram-se ligados ao DNA acoplados a moléculas co-repressoras, histonas deacetilases e outros fatores modificadores de cromatina para a manutenção de sua atividade repressora sobre os genes alvos (147) (Figura 1.3).

Assim como a maioria dos receptores nucleares, a estrutura dos PPAR segue um padrão de domínios relacionados a função desempenhada por cada uma de suas porções. O domínio A/B, mas conhecido como região aminoterminal possui papel na transativação, sendo o local de ligação de moléculas co-ativadoras. A ligação do receptor nuclear ao DNA fica sob a responsabilidade do domínio C formado por arranjos proteicos, os chamados “dedos de zinco”, constituídos de uma α -hélice e uma folha β -pregueada mantidas unidas por um íon de zinco na região central. A porção D ou “hinge”, tem função ainda mal definida, mas a princípio está associada com as mudanças conformacionais na estrutura da proteína que se seguem a ativação do receptor por seus ligantes. Por fim, a região E/F contém a porção C-terminal do receptor e é nela que ocorre o acoplamento do ligante o que confere especificidade a molécula. Este domínio possui ainda sinais de localização nuclear do receptor e permite sua associação com moléculas co-reguladoras e outros fatores de transcrição (148).

A família dos PPARs é composta por três diferentes isotipos, alfa (α), beta (β) ou delta (δ) e gama (γ), codificados por genes distintos e que apresentam funções e perfis de expressão variáveis entre si, apesar da alta homologia estrutural entre as proteínas (149). O PPAR- α é predominantemente expresso no fígado, tecido adiposo marrom e coração e está implicado na regulação do metabolismo celular a partir de sua atuação sobre a oxidação mitocondrial e peroxissomal de ácidos graxos. O receptor α é o alvo molecular dos fibratos, drogas hipolipidêmicas usadas no tratamento de dislipidemias. Ligantes endógenos do receptor incluem ácidos graxos poli-insaturados e derivados de leucotrienos (150).

O PPAR- β/δ é o subtipo do receptor nuclear menos estudado, embora seja o isotipo com distribuição mais ampla. A ausência de ligantes sintéticos potentes e seletivos durante muitos anos dificultou os estudos do papel do receptor (150). Essa forma de PPAR está envolvida do catabolismo de ácidos graxos e metabolismo energético em diferentes tecidos, como nos músculos esqueléticos (151). Ácidos graxos insaturados e eicosanoides atuam como ligantes naturais de PPAR- β (149).

Por fim, o PPAR- γ é a forma mais investigada do receptor nuclear sendo encontrado de forma predominante no tecido adiposo, embora sua expressão já tenha sido constatada em diferentes locais como coração, rins, baço, intestino, retina, músculo esquelético, hipocampo e hipófise (146, 152). Classicamente esse subtipo do receptor é reconhecido como elemento importante na transcrição gênica e regulação da diferenciação de adipócitos (153). Além disso, o PPAR- γ interfere através de um mecanismo de transrepressão com as funções de outros fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1 (154) (Figura 1.3). O PPAR- γ é o alvo molecular das drogas conhecidas como tiazolidinedionas, que dentre vários efeitos, atuam sensibilizando células do fígado e tecidos musculares à insulina e dessa forma respondendo por sua ação mais conhecida, a antidiabética (155).

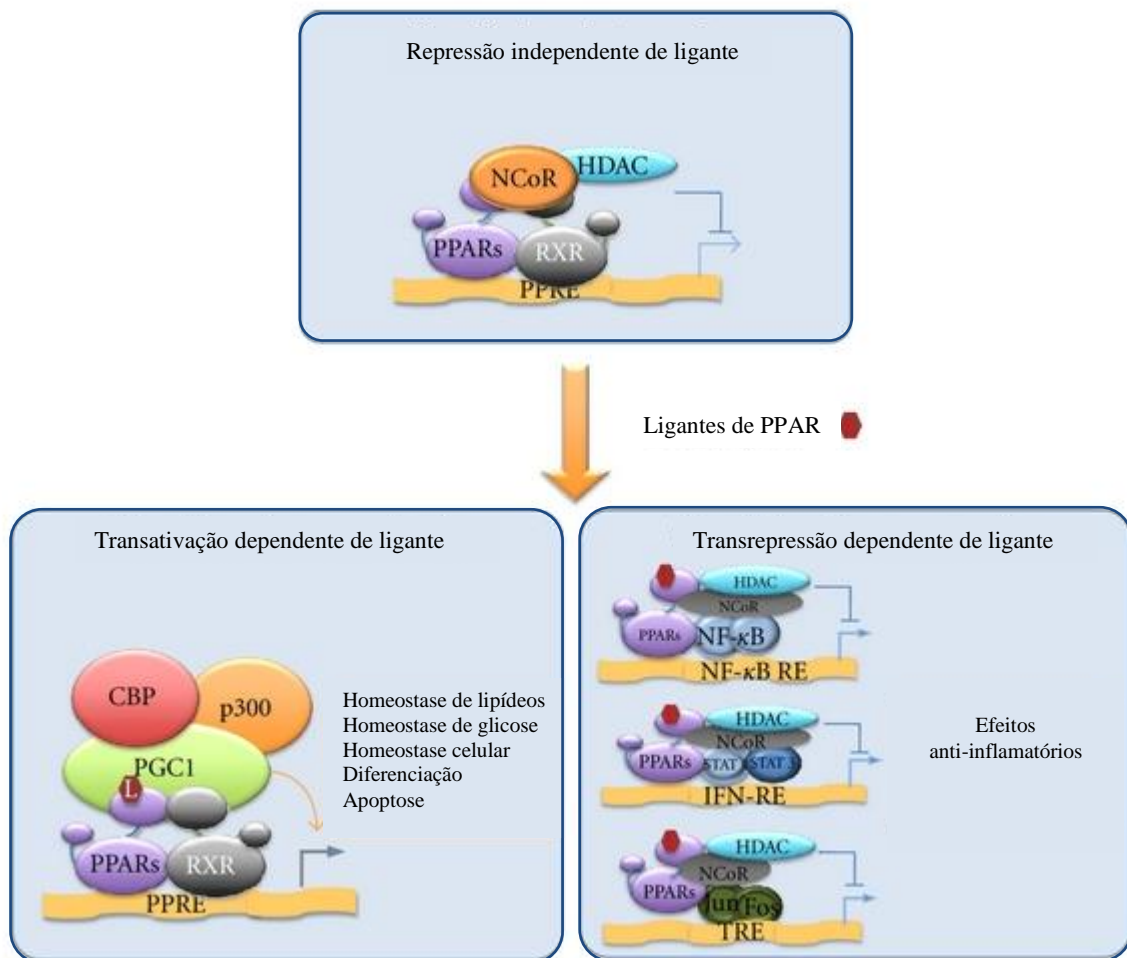


Figura 1.3 – Mecanismo de regulação gênica dos PPARs. Modificado de Fucci e cols. (156).

1.3.2 – PPAR- γ e o diabetes

A partir da descoberta dos PPARs na década de 90, ligantes sintéticos seletivos de PPAR- γ (também conhecidos como glitazonas) foram introduzidos no tratamento de indivíduos com diabetes do tipo 2. Durante cerca de 15 anos, pacientes com a doença se beneficiaram dos efeitos hipoglicemiantes dessas drogas (157). Através do aumento da sensibilidade dos tecidos adiposo, muscular e hepático à insulina, pacientes experimentaram controle glicêmico igual ou mesmo superior a outras classes de agentes antidiabéticos como as sulfonilureias (158). O mecanismo clássico de ação dos agonistas de PPAR- γ no tratamento da hiperglicemia diabética se relaciona com a indução da transcrição gênica a partir da ativação do receptor nuclear. O aumento da expressão de proteínas transportadoras de glicose (GLUT 4) e de ácidos graxos (FATP) é induzida pelas glitazonas, o que em conjunto com a redução nos níveis de triglicerídeos e ácidos graxos associado a lipogênese se relaciona com a redução nos níveis de glicose plasmática em diabéticos (159). Além disso, as

glitazonas induzem a formação de pequenos adipócitos, mais sensíveis a insulina e a apoptose das células maiores responsáveis pela liberação de ácidos graxos e citocinas expressas em condições de obesidade e resistência à insulina, como o TNF- α (160). Por fim, é descrito que ligantes de PPAR- γ induzem a expressão da enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), envolvida com a mobilização de GLUT 4 para a membrana plasmática e entrada de glicose em tecidos dependentes de insulina (161).

No entanto, após alguns anos de comercialização e apesar de seus efeitos benéficos sobre o diabetes, membros da família das glitazonas deixaram de ser utilizados no tratamento da doença. A troglitazona em função de possíveis riscos hepáticos e mais tarde, em 2010, a rosiglitazona por conta de estudos que relacionaram a droga com risco aumentado de problemas cardíacos, saíram de circulação (162). Atualmente a única droga da família das glitazonas liberada para o tratamento do diabetes é a pioglitazona.

Apesar dessa limitação do uso dos ligantes do PPAR- γ na clínica, o que já vem sendo estudado com a criação de uma segunda geração de ligantes (163), a utilização dessas moléculas na pesquisa básica, em especial da rosiglitazona, é uma constante. A rosiglitazona é um potente ligante do receptor nuclear PPAR- γ e diversos trabalhos relatam um provável efeito benéfico dessa droga sobre algumas formas de câncer. Estudos descrevem que indivíduos diabéticos que se valeram do uso de rosiglitazona antes de sua retirada do mercado apresentam redução na incidência de câncer hepático e de coloretal (164)

Além disso, trabalhos descrevem que a expressão do PPAR- γ encontra-se reduzida em alguns tecidos diabéticos, como no córtex renal e na retina, sendo que neste último órgão a redução na expressão do receptor se relaciona com ativação de NF- κ B, inflamação vascular e desenvolvimento da retinopatia diabética (142, 165). Soma-se a isso, que apesar dos riscos descritos na clínica do uso de ligantes de PPAR- γ sobre o sistema cardiovascular, a ativação do receptor resulta em diminuição da síntese e ação de tromboxano A₂, um potente indutor de agregação plaquetária e vasoconstritor, com benefício descrito sobre modelo animal de falência renal aguda e possível aplicação na terapia frente a doenças cardiovasculares (166, 167).

Dessa forma, a participação dos ligantes do PPAR- γ na fisiopatologia do diabetes, a parte dos seus efeitos sobre o metabolismo de carboidratos e a hiperglicemia característica da doença, são importantes e precisam ser melhor compreendidos. Considerando ainda que esses ligantes podem desempenhar papéis que independem da ativação do receptor, sua gama de atuações se torna ainda mais relevante e uma possível relação entre o receptor com a funcionalidade do eixo HPA em diabéticos merece um estudo mais aprofundado.

1.3.3 – PPAR- γ e o eixo HPA

Como mencionado anteriormente, a isoforma γ do receptor nuclear é encontrada de forma predominante nos tecidos adiposos, no entanto sua expressão já foi descrita nos mais diversos sítios anatômicos, incluindo o hipotálamo e hipófise (146, 152, 168, 169). Estudos realizados com o uso de células corticotróficas tumorais murinas e humanas demonstram que ativadores de PPAR- γ induzem a apoptose dessas células e supressão da síntese de ACTH. Além disso, o desenvolvimento de tumores corticotróficos em roedores, induzido através da administração subcutânea da linhagem de células de adenohipófise Att-20 foi impedido em 80% dos animais tratados com rosiglitazona, bem como todos os animais apresentaram redução nos níveis de ACTH e corticosterona (170). Em paralelo a esse trabalho, foi observado que o tratamento crônico com rosiglitazona em indivíduos com a Síndrome de Cushing foi eficaz em reduzir a secreção de cortisol nesses doentes (143).

Não apenas os pacientes com Cushing se beneficiam dos efeitos dos ligantes de PPAR- γ sobre o eixo HPA. Em um modelo animal de doença de Alzheimer, o tratamento dos animais com rosiglitazona foi capaz de atenuar a perda de memória e dificuldade de aprendizagem em um mecanismo descrito como dependente da redução dos níveis de glicocorticoides no soro dos animais (171). Foi observado que a administração de rosiglitazona reduziu os níveis de proteína beta-amiloide nos animais com doença de Alzheimer em associação com a redução nos níveis de corticosterona circulantes.

Dessa forma, é recorrente a presença de estudos que relacionam a ativação do receptor nuclear PPAR- γ com redução na atividade do eixo HPA, tanto em modelos animais como em estudos clínicos. Uma vez que o diabetes é uma doença que apresenta como uma de suas características a hiperatividade do eixo HPA e o estudo da relação entre o receptor e o eixo no diabetes ainda não foi aprofundado, a despeito de todas as evidências aqui apresentadas, a presente tese se pauta na busca do entendimento do papel do PPAR- γ sobre a funcionalidade do eixo HPA em animais diabéticos.

2 – Objetivo

2.1 - Objetivo Geral

O objetivo da presente tese de doutorado foi o estudo do papel do receptor nuclear PPAR- γ sobre a hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em animais diabéticos e sua implicação sobre complicações musculares da doença.

2.2 - Objetivos específicos

Buscamos cumprir os seguintes objetivos específicos:

- i) Elucidação dos marcadores da ativação do eixo HPA presentes durante o estabelecimento do modelo de diabetes com aloxana;
- ii) Estabelecimento do paralelo entre a hiperatividade do eixo HPA com complicações musculares observadas em animais tornados diabéticos após administração de aloxana;
- iii) Investigação da expressão do receptor PPAR- γ no eixo HPA e avaliação do efeito do tratamento com o agonista rosiglitazona sobre a atividade do eixo em animais diabéticos;
- iv) Estudo do mecanismo de ação relacionado aos efeitos decorrentes da administração de rosiglitazona sobre a funcionalidade do eixo HPA de animais diabéticos.

3 – Material e Métodos

3.1 - Animais e indução do diabetes

Nesta tese foram utilizados ratos Wistar machos obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz e todos os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animal de Laboratório (CEUA, Licença LW – 23/10). Os animais foram mantidos sob condições de temperatura controlada e ciclo de luz definido em 12 horas de claro e 12 horas de escuro com livre acesso à ração e água.

O diabetes foi induzido através de uma injeção única da substância aloxana diluída em salina estéril a 0,9% (114). Ratos em jejum por 15 horas foram sedados através de inalação de halotano e receberam 40 mg/Kg da substância diabetogênica por via intravenosa, através da veia peniana. Animais do grupo não-diabético receberam injeção de salina estéril a 0,9% após período de jejum e procedimento de anestesia com halotano idêntico ao realizado com animais de grupos diabéticos.

3.2 - Tratamento dos animais

O tratamento dos animais foi feito com o agonista do receptor nuclear PPAR- γ rosiglitazona (0,5 mg/Kg, i.p.) diluído em DMSO (dimetilsufóxido) a 0,05%. Em outros experimentos, animais receberam em paralelo ao tratamento com rosiglitazona, doses do antagonista do receptor nuclear PPAR- γ GW9662 (0,5 mg/Kg, i.p) ou o inibidor da PI3K wortmannin (0,1 mg/Kg, i.p), diluídos também em DMSO a 0,05%. Um conjunto de ensaios foi ainda realizado com o antagonista do receptor de glicocorticoides RU486 na dose de 20 mg/Kg, em suspensão de metilcelulose a 0,1% por via oral. Todos os tratamentos foram realizados diariamente entre o 3^o e 21^o dia contados a partir da indução do diabetes, e os animais controle receberam diariamente o veículo DMSO ou metilcelulose, de acordo com o esquema de tratamento.

3.3 - Avaliação da hipertrofia das glândulas adrenais

A investigação das alterações nas glândulas adrenais dos animais foi feita sobre o ponto de vista macro e microscópico. O aspecto macroscópico foi determinado através da razão entre o peso da glândula adrenal direita dissecada e o peso corporal do animal correspondente. Utilizando um microscópio óptico e cortes histológicos corados com HE das adrenais avaliamos outros dois parâmetros: o número de células adrenocorticais e a área média dessas células. Baseado na metodologia descrita por Beuschlein e colaboradores (172),

a hipertrofia das adrenais foi avaliada através da contagem ao microscópio do número de células da zona fasciculada em no mínimo três diferentes campos por animal, sendo o resultado expresso em número de células por campo de alta magnificação (HPF do inglês “High Power Field”). Além disso, a área média das células adrenocorticais produtoras de glicocorticoides foi calculada com o auxílio do programa de análise de imagens “Image Pro-Plus” versão 6.2.

3.4 - Determinação das alterações musculares

O estudo do parâmetro de atrofia muscular foi realizado a partir da correlação entre o peso do músculo gastrocnêmio e o comprimento da tíbia dos animais. Em paralelo, através da técnica de laser Speckle investigamos alterações musculares a nível microvascular, mediante parâmetros funcionais (173).

A avaliação da reatividade microvascular foi feita no músculo grácil dos animais anestesiados com ketamina (90 mg/Kg, i.p) e xilazina (10 mg/Kg, i.v). Nessa técnica, utiliza-se um laser com comprimento de onda de 785 nm (“PeriCam PSI System”, Perimed, Järfälla, Suécia) que ao incidir sobre o tecido sofre um padrão de espalhamento conhecido como “speckle”. Este padrão de desvio óptico é característico para cada estrutura que constitui o tecido, de tal forma que na medida em que elementos se movam no tecido estudado, como no caso das hemácias, o espalhamento de luz sofre pequenas variações. Imagens digitais vão sendo adquiridas e integradas e através das alterações de contraste e intensidade é possível a determinação do fluxo sanguíneo tecidual, em um momento inicial e após a administração do agente dilatador endotelial acetilcolina (ACh) a 2%. Para construção dos gráficos, foi utilizada a área sobre as curvas geradas para cada animal na presença ou ausência do agente vasodilatador.

3.5 - Quantificação de hormônios plasmático - Radioimunoensaio

3.5.1 – Obtenção das amostras

Imediatamente após a eutanásia dos animais em câmara com atmosfera de CO₂ controlada, 3 mL de sangue foram coletados da veia cava inferior dos mesmos. Para tanto foi utilizada uma solução anticoagulante de salina heparinizada na concentração de 40 UI de heparina por mililitro de sangue. As amostras obtidas foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 x g e a 4°C para separação do plasma que foi armazenado a – 20°C até o momento das análises.

No caso específico da quantificação dos níveis plasmáticos de ACTH foi utilizado EDTA como anticoagulante, conforme orientação do fabricante do “kit” de detecção, na concentração de 2 mg por mililitro de sangue (0,2% EDTA) e a quantificação feita logo após a obtenção do material, tendo em vista a natureza lábil do hormônio, mesmo quanto estocado a baixas temperaturas.

3.5.2 – Determinação da concentração plasmática dos hormônios

A determinação dos níveis dos hormônios insulina, corticosterona e ACTH foi realizada a partir do plasma dos animais, através de um ensaio competitivo imunoradiológico, utilizando-se I^{125} , conforme descrição do “kit” (“MP Biomedicals”, Nova Iorque, EUA). De forma sucinta, nesta técnica é avaliada a capacidade do hormônio contido nas amostras em se ligar a anticorpos específicos na presença de um hormônio marcado com o elemento radioativo I^{125} . Dessa forma, trata-se de um ensaio competitivo, cujos níveis do analito são inversamente proporcionais a radiação quantificada pelo contador de partículas gama ICN Isomedic 4/600 (“ICN Pharmaceuticals”, Califórnia, EUA).

3.6 – Quantificação de ligante endógeno de PPAR- γ

3.6.1 - Obtenção das amostras

De forma idêntica à realizada para obtenção do plasma para avaliação dos hormônios circulantes, foi feita a coleta do plasma com solução heparinizada para quantificação do ligante endógeno do receptor nuclear PPAR- γ , 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ - prostaglandina J_2 (15d-PG J_2).

3.6.2 - Quantificação de 15d-PG J_2

Os níveis do ligante foram determinados no plasma dos animais estudados utilizando-se um “kit” (“Assay Designs Inc.”, Michigan, EUA) de ensaio imunoenzimático (EIA), seguindo-se as instruções do fabricante. O princípio do ensaio baseia-se na competição entre o ligante contido nas amostras e aquele fornecido pelo kit, e acoplado com uma enzima, pela ligação aos anticorpos anti-15d-PG J_2 . Após uma série de incubações e lavagens é acrescentado o substrato da enzima presente no ligante do kit sendo a determinação da intensidade de cor da reação feita em espectrofotômetro SpectraMax M5 (“Molecular Devices”, Califórnia, EUA) a 405 nm. Nessa quantificação, segundo o fabricante do kit, a probabilidade de reações cruzadas é de 49,2% para PG J_2 e 5,99% para Δ^{12} -PG J_2 e 4,92% para PGD $_2$.

3.7 – Imunohistoquímica

Na sequência da eutanásia dos animais, sua adrenal esquerda e hipófise foram removidas e colocadas em solução de fixação Milloning para preservação do material. Após período de 48 horas na solução de fixação, os órgãos passaram por procedimento de desidratação em banhos com concentrações crescentes de etanol e clarificação em xilol para remoção do álcool antes da inclusão em blocos de parafina. Cortes histológicos das glândulas com 5 µm de espessura foram acondicionados em lâminas filmadas com solução de silane a 4% em acetona e utilizados para a análise da expressão de diversas proteínas, incluindo substratos, enzimas e receptores, através da metodologia de imunohistoquímica.

Inicialmente, os cortes histológicos foram desparafinizados em estufa a 60° C por 1 hora e dois banhos em xilol de 5 minutos cada. Na sequência, o material foi reidratado com banhos de concentração decrescente de etanol e incubação por 10 minutos em água destilada. A etapa seguinte foi de recuperação antigênica, importante para o reconhecimento específico dos epítomos dos antígenos dos anticorpos utilizados no ensaio. Para isso, as lâminas foram incubadas em tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 pré-aquecido em banho maria a 95-99°C por 20 minutos. Após 2 lavagens com solução salina tamponada com Tris-HCl enriquecida com 0,1% de Tween 20 (TBST) por 5 minutos, o material foi incubado por 20 minutos com solução de H₂O₂ a 3% em metanol para o bloqueio das peroxidases endógenas e minimização de marcações inespecíficas. Outro bloqueio, de ligações inespecíficas dos anticorpos a receptores Fc presentes no tecido estudado, foi feito através de incubação dos cortes com solução de BSA 2,5%, leite de vaca desnatado 1% filtrado e soro fetal bovino 8% em TBST por 3 horas.

Após as etapas de bloqueio, os cortes foram incubados por 16 horas a 4°C com anticorpos primários para as proteínas alvo (anticorpos policlonais feitos em coelho para POMC, GR, e MC2-R, policlonais feitos em cabra para PI3K p110α e MR; monoclonal feito em camundongo para ACTH e monoclonal feitos em coelho para PPAR-γ) diluídos em TBST com BSA 1%. No dia seguinte, o material foi lavado com TBST, duas lavagens de 5 minutos, e incubado por 2 horas com anticorpos de detecção dos anticorpos primários conjugados a enzima peroxidase (anticorpos secundários policlonais anti-camundongo, coelho e cabra). A revelação foi feita após nova lavagem do material com TBST e incubação por 15 a 20 minutos com o substrato aminoetilcarbazol (AEC). Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Mayer por 10 segundos para visualização da estrutura do tecido estudado e as lâminas montadas com solução de gelatina/glicerina e lamínulas para análise ao microscópio óptico Olympus BX50 (Center Valley, EUA).

Ao menos 15 campos capturados com câmera digital Olympus UC30 (Center Valley, EUA) em magnificação de 400X foram analisados utilizando-se o software “Image Pro Plus” versão 6.2. Nesta análise, foi determinado o número de pixels em cada imagem capturada marcados positivamente para a reação de imunohistoquímica. Dessa forma, é possível expressar a presença dos antígenos de interesse em pixels por unidade de área (μm^2) do tecido estudado.

3.8 - Soluções

3.8.1 - Milloning

- Formaldeído (HCOH) a 4% em água destilada
- Fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4) a 155 mM
- Hidróxido de sódio (NaOH) a 105 mM

Dissolver o NaH_2PO_4 e o NaOH em água destilada e na sequência acrescentar a solução de formaldeído

3.8.2 - TBS 1X

- 90 mL de NaCl 0,85%
- 10 mL de tris-HCl 0,05 M
- pH 7,6

3.8.3 - AEC uso

Fotossensível, colocar as substâncias nesta ordem:

1) 9,5 mL de tampão acetato:

Preparo tampão acetato:

Solução 1: Acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) a 0,1M

Solução 2: Ácido acético glacial a 0,575%

Misturar 79 mL da solução 1 com 21 mL da solução 2

pH 5,2

2) 0,5 mL de AEC estoque

Preparo AEC estoque:

0,8% de AEC em N,N-dimetilformamida ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$)

3) 50 μL de H_2O_2 3%

3.8.4 - Meio de montagem para imunohistoquímica

- 10 g de gelatina em pó
- 70 mL de glicerina
- 1 mL fenol
- 60 mL de água destilada

3.9 - Drogas e reagentes

Aloxana monohidratada, acetilcolina, DMSO, citrato de sódio, Tris-HCL, DMSO, NaOH, AEC, EDTA, BSA, H₂O₂, CH₃COONa.3H₂O e Tween 20 foram comprados da empresa Sigma Chemical Co. (“Saint Louis”, EUA). Rosiglitazona e GW9662 da Cayman Chemicals (“Saint Louis”, EUA), enquanto a heparina sódica foi adquirida na Roche (São Paulo, Brasil). Gelatina em pó foi obtida na Reagen (Paraná, Brasil) e a glicerina na Vetec Química (Rio de Janeiro, Brasil). NaCl, formaldeído, ácido acético glacial, etanol, metanol, xilol, N,N-dimetilformamida, bem como o corante hematoxilina de Harris foram comprados da Merck (Darmstadt, Alemanha). Ketamina foi comprada na Cristália (São Paulo, Brasil) e xilazina na Syntec (São Paulo, Brasil). O soro fetal bovino adquirido na Cultilab (São Paulo, Brasil), os anticorpos primários anti- POMC, GR, MC2R, PI3K p110 α e ACTH comprados da Santa Cruz Biotechnology (Califórnia, EUA) e anti-PPAR- γ da Cell Signaling Technology (Massachusetts, EUA). Já os anticorpos secundários anti-camundongo, coelho e cabra acoplados a enzima peroxidase foram fabricados pela R&D System (Minneapolis, EUA).

Todas as soluções foram utilizadas frescas, sendo preparadas imediatamente antes do seu uso.

3.10 - Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente, no caso de três ou mais grupos, através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla “Student-Newman-Keuls” (SNK). Para comparação entre dois grupos experimentais, foi utilizado o teste t de “Student” para amostras não pareadas. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Através destes cálculos foi possível determinar se as diferenças observadas entre populações com distribuições normais foram reais ou meras variações amostrais.

4 – Resultados

4.1 – Administração de aloxana induz aumento da atividade do eixo HPA em ratos, em paralelo ao estabelecimento do quadro diabético e manifestação de complicações da doença

Ratos wistar machos receberam injeção única intravenosa de aloxana (40 mg/Kg) e foram avaliados marcadores do estado diabético, bem como da funcionalidade do eixo HPA em diferentes intervalos de tempo. Inicialmente, confirmando dados anteriores do grupo (174), observamos que a aloxana foi capaz de induzir um modelo de diabetes do tipo 1 caracterizado por hiperglicemia (Figura 4.1A) em associação com redução nos níveis circulantes de insulina (Figura 4.1B). Em todos os tempos estudados (24 horas, 48 horas, 72 horas e 21 dias) os animais que receberam a substância diabetogênica apresentaram níveis de glicose no sangue típicos de indivíduos com desregulação metabólica diabética. De forma semelhante, com exceção dos animais que receberam aloxana 24 horas antes das análises, todos os demais apresentaram redução nos níveis de insulina plasmática compatíveis com o diabetes do tipo 1.

Quanto ao eixo HPA, observamos a hipertrofia das glândulas adrenais determinada pelo aumento significativo da razão entre o peso das glândulas e o peso dos animais após 24 horas da administração de aloxana. Essa hipertrofia adrenal presente 24 horas após a administração da aloxana se manteve nos demais tempos experimentais estudados (Figura 4.2A). Além disso, a produção de glicocorticoides também se elevou a partir de 24 horas da administração da substância diabetogênica (Figura 4.2B). A hipertrofia das glândulas adrenais e o aumento nos níveis de corticosterona plasmática precederam a redução na expressão dos receptores de glicocorticoides na hipófise dos animais investigados, na medida em que alterações nos níveis dos receptores envolvidos com o controle do eixo HPA apenas foram notadas 48 horas decorridas da administração de aloxana (Figura 4.3). Esses dados em conjunto, demonstram uma ativação de forma expressiva do eixo HPA durante o estabelecimento do quadro diabético que se segue a administração de aloxana.

Ratos tornados diabéticos através de injeção de aloxana apresentaram perda de massa muscular de forma significativa após 21 dias da doença em análise feita através da correlação entre o peso do músculo gastrocnêmio e o comprimento da tíbia dos animais (Figura 4.4). No intuito de relacionar essas complicações apresentadas pelos animais diabéticos com o aumento nos níveis de glicocorticoides, realizamos o tratamento dos animais com o antagonista do receptor do hormônio pelo período de 18 dias e na sequência avaliamos o parâmetro do peso relativo do músculo gastrocnêmio dos animais. Observamos, de forma

significativa, um aumento da massa muscular dos animais diabéticos tratados com o antagonista RU486, quando comparados aos animais diabéticos tratados com salina (Figura 4). Embora o ganho de massa tenha sido parcial, esse resultado relaciona os glicocorticoides em uma importante complicação diabética. Somam-se a esse resultado, as investigações relativas à reatividade da microcirculação em animais diabéticos, bem como a participação dos glicocorticoides neste fenômeno. Animais diabéticos apresentaram uma perda significativa na sua capacidade microvascular de resposta ao estímulo vasodilatador da acetilcolina na região do músculo grácil (Figura 4.6 C e E) que seguramente se relaciona com o comprometimento na função desempenha pelo músculo. Novamente, o tratamento dos animais com RU486 foi capaz de desempenhar um efeito protetor sobre as alterações diabéticas, no caso, restabelecendo a capacidade de resposta microvascular à acetilcolina. Dessa forma, fica clara a participação no modelo de diabetes do tipo 1 dos glicocorticoides na atrofia muscular que é uma complicação secundária a hiperglicemia característica do estado diabético.

4.2 – Animais diabéticos apresentam redução na expressão do receptor PPAR- γ na hipófise e adrenais, bem como nos níveis circulantes do seu ligante endógeno 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂

Em paralelo com as alterações diabéticas e o marcado aumento na atividade do eixo HPA, observamos que os animais tornados diabéticos apresentaram redução na expressão do receptor nuclear PPAR- γ tanto na região anterior da hipófise (Figura 4.7 D) como no córtex da adrenal (Figura 4.7 C). Constatamos também que, após 21 dias da administração de aloxana, os níveis circulantes de um importante ligante endógeno do receptor PPAR- γ , a molécula derivada de prostaglandina D₂, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ encontram-se reduzidos (Figura 4.7 E) (175). Esses dados, em sintonia com outros trabalhos na literatura que apontam uma relação entre a redução na expressão do PPAR- γ e complicações diabéticas tais como retinopatia e nefropatia (142) pautaram nosso tratamento com um ligante sintético do receptor e avaliação de suas implicações sobre o eixo HPA de animais diabéticos.

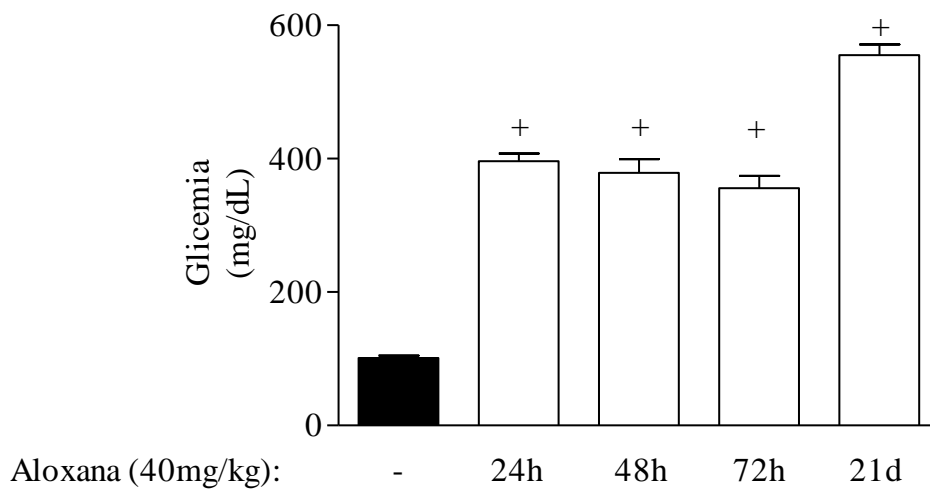
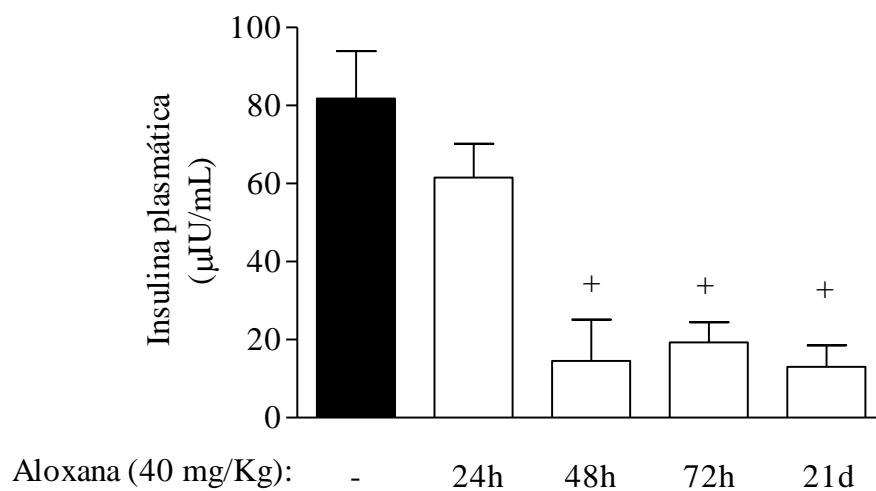
A**B**

Figura 4.1 – Administração de aloxana em diferentes tempos é capaz de induzir um quadro de diabetes do tipo 1. Em A, a medida dos níveis de glicose na circulação dos animais estudados e em B os níveis circulantes do hormônio pancreático insulina. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. + p < 0,05 em comparação com animais que receberam somente salina.

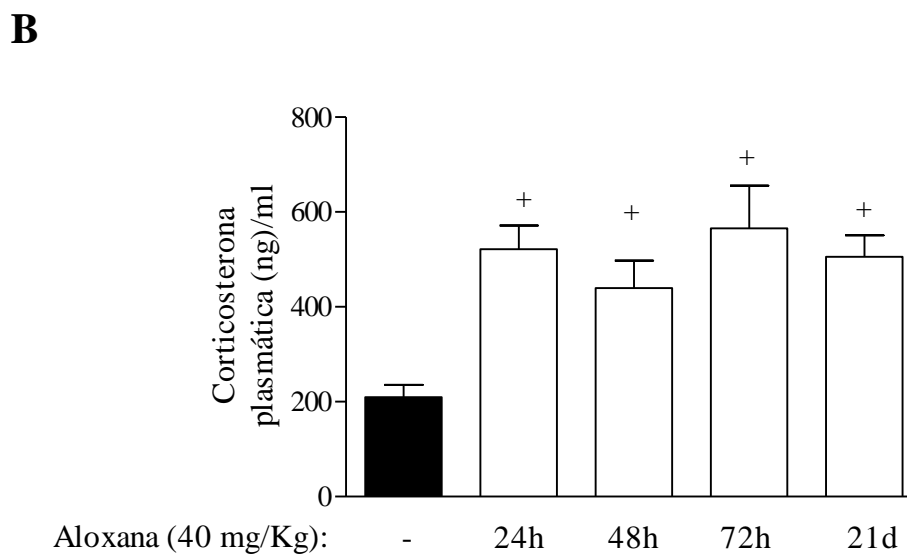
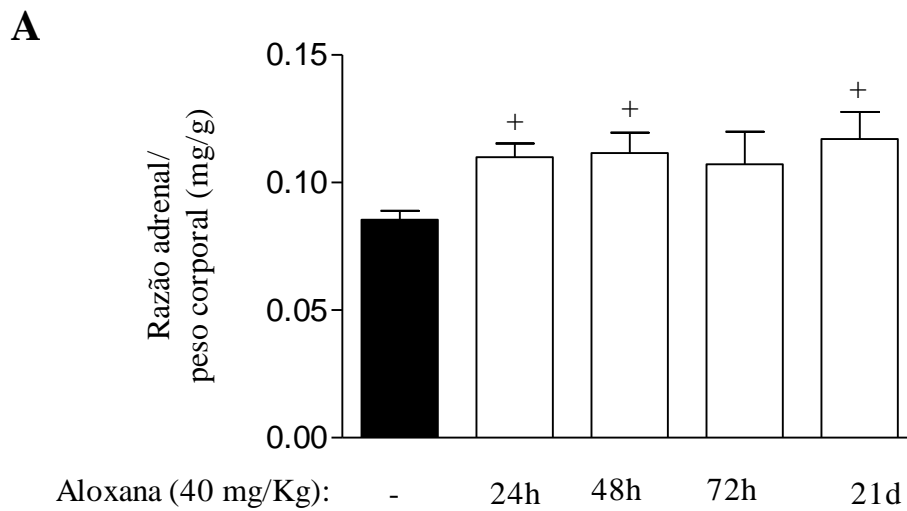


Figura 4.2 – Animais tornados diabéticos com injeção de aloxana apresentam aumento nos níveis circulantes de corticosterona e hipertrofia muscular. Em A, razão entre o peso das glândulas adrenais e o peso dos animais, em B os níveis circulantes de corticosterona. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. + $p < 0,05$ em comparação com animais que receberam somente salina.

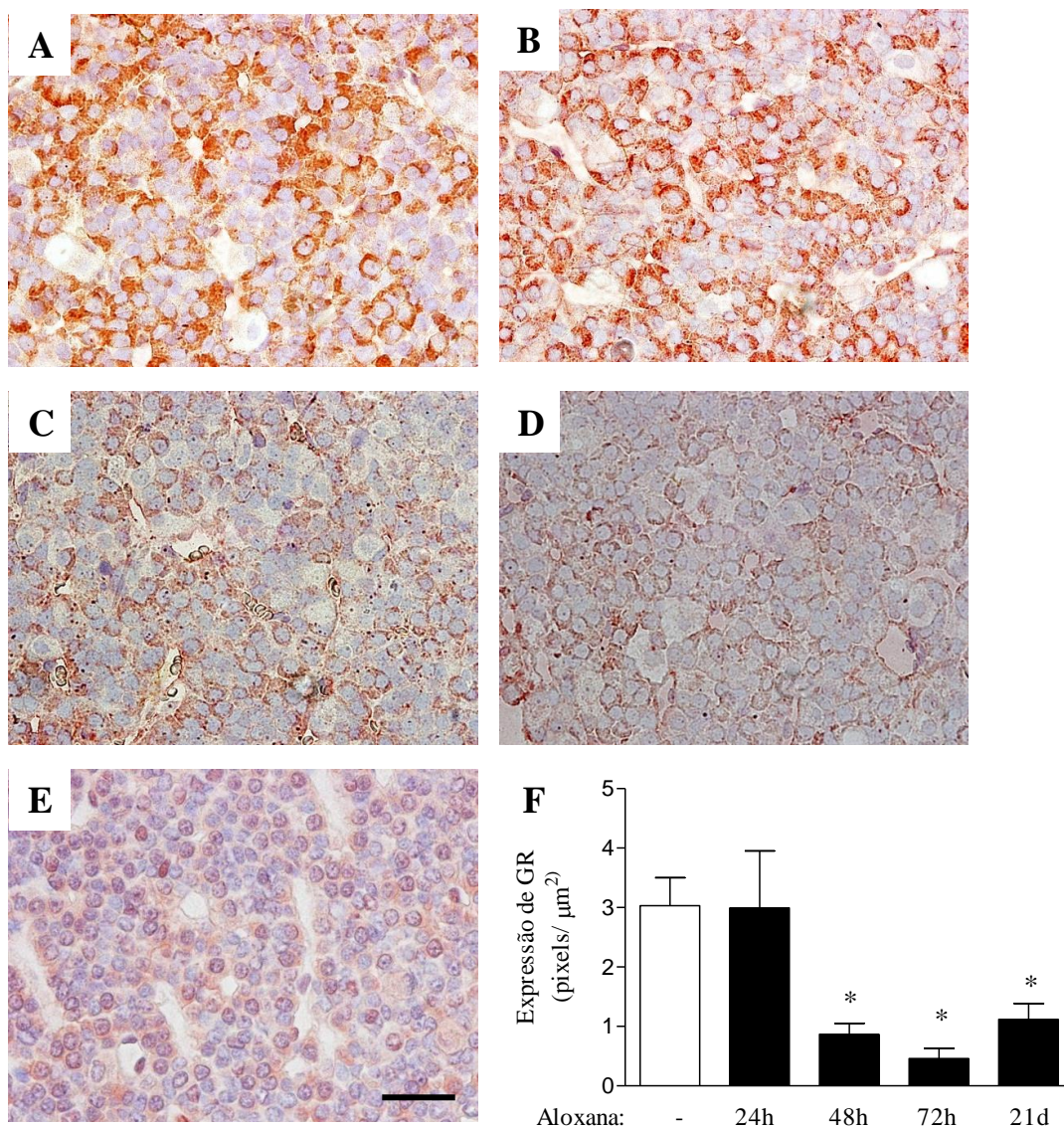


Figura 4.3 – Animais tornados diabéticos apresentam redução na expressão do receptor de glicocorticoides na hipófise 48 horas após a administração de aloxana. Em A, B, C, D e E fotomicrografias representativas da região anterior da hipófise de animais dos grupos salina, aloxana 24 horas, aloxana 48 horas, aloxana 72 horas e aloxana 21 dias, respectivamente. Em F, determinação da razão entre o número de pixels correspondentes a marcação positiva para a proteína investigada pela área do campo capturado. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. * $p < 0,05$ em comparação com animais que receberam somente salina. Barra de escala = 20 μm .

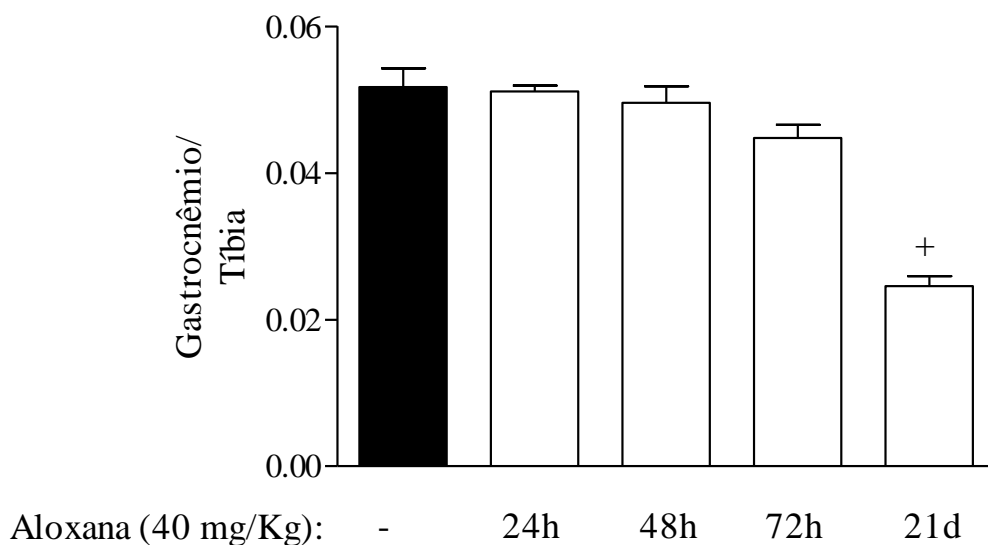


Figura 4.4 – Animais tornados diabéticos apresentam perda de massa do músculo gastrocnêmio. Na figura é expressa a razão entre o peso do músculo gastrocnêmio e o comprimento da tíbia dos animais. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. + $p < 0,05$ em comparação com animais que receberam somente salina.

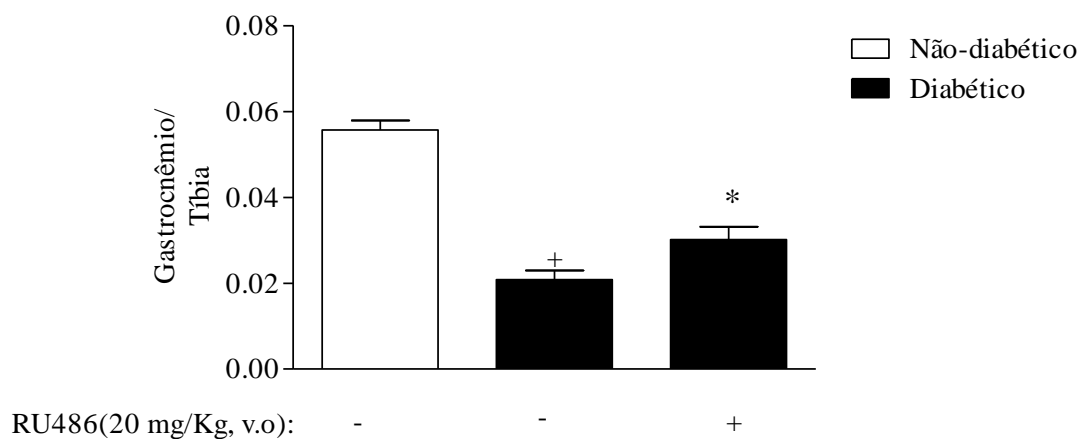


Figura 4.5 – Participação dos hormônios glicocorticoides na atrofia do músculo gastrocnêmio em animais com 21 dias de diabetes. Avaliação da massa do músculo gastrocnêmio em animais diabéticos tratados com o antagonista do receptor de glicocorticoide RU 486. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. + $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos. * $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados.

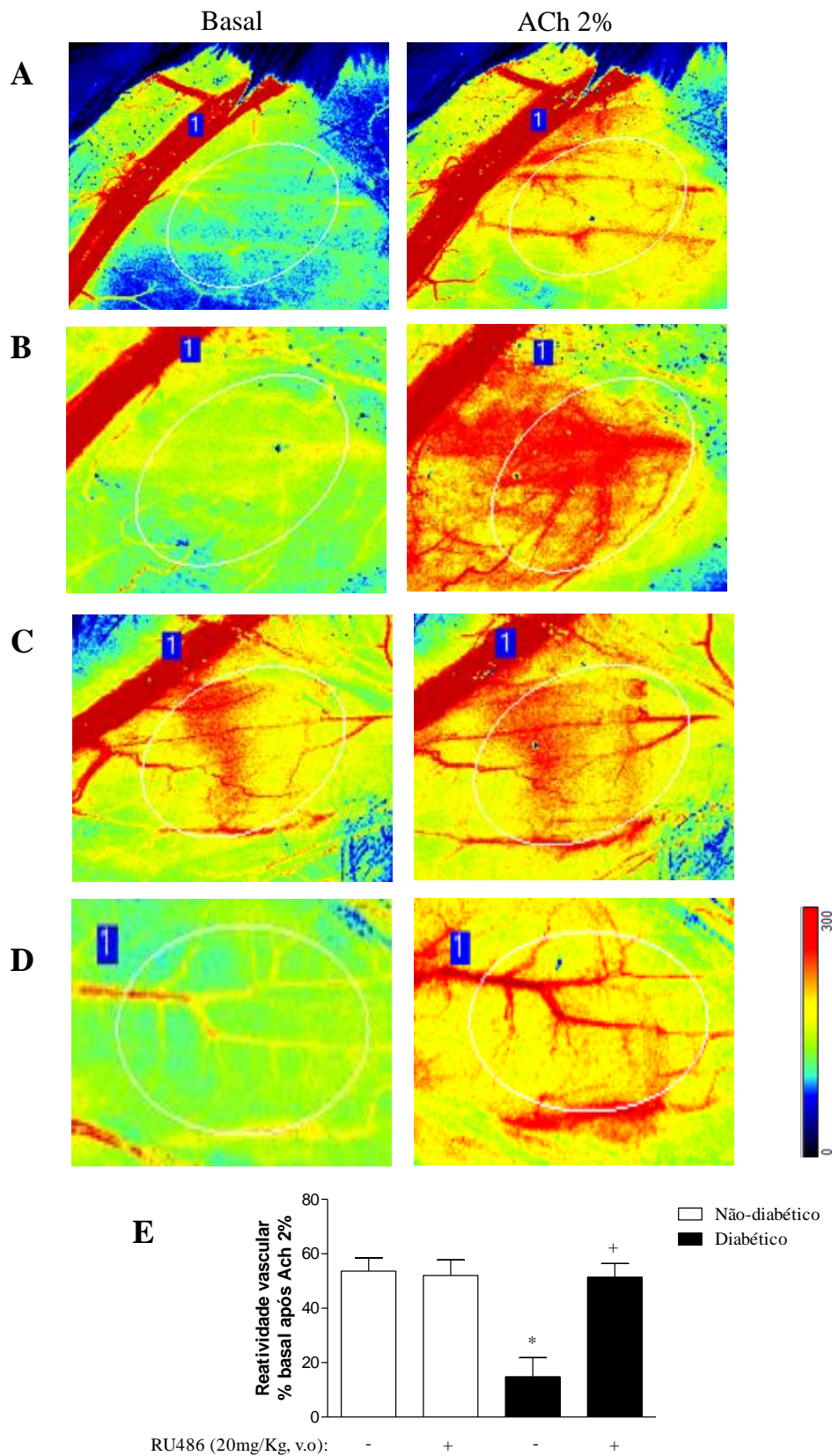


Figura 4.6 – Tratamento com RU486 restabelece a reatividade microvascular no músculo grácil de animais com 21 dias de diabetes. Fotomicrografias representativas da microcirculação funcional no músculo grácil de animais não diabéticos (A), não diabéticos tratados com RU486 (B), diabéticos (C) e diabéticos tratados com RU486 (D) frente ao estímulo com acetilcolina (ACh) a 2%. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. * $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos. + $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados.

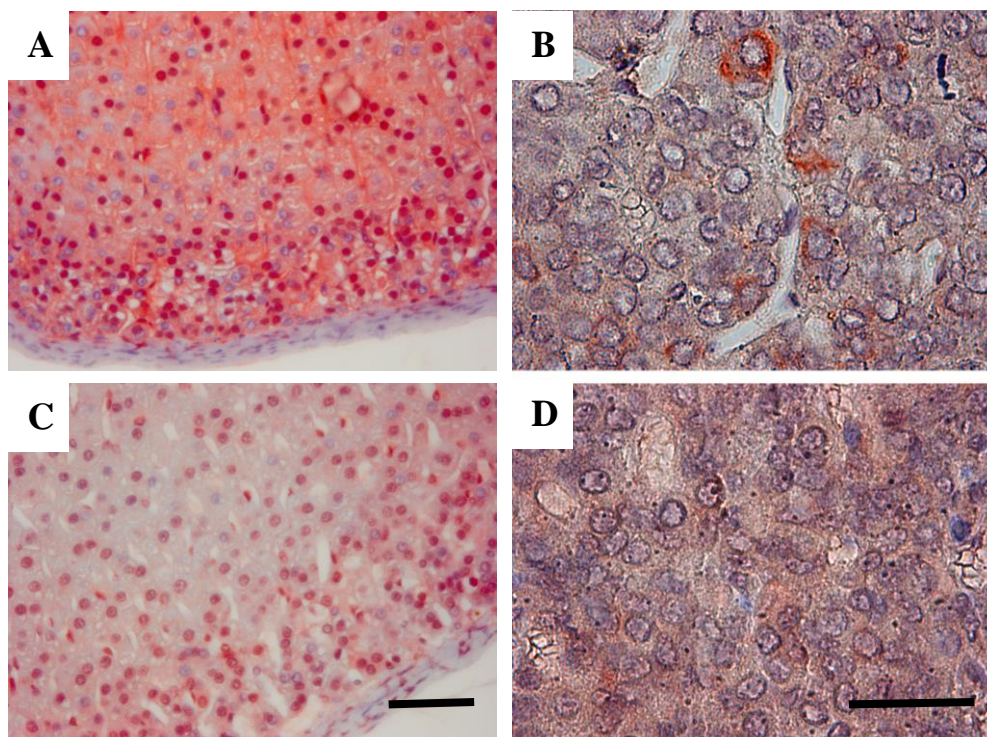


Figura 4.7 – Animais diabéticos apresentam redução na expressão do PPAR- γ em órgãos do eixo HPA, 21 após o estabelecimento do modelo com aloxana. Fotomicrografias representativas da expressão do PPAR- γ nas adrenais e hipófise de animais não diabéticos (respectivamente A e B) e diabéticos (respectivamente C e D). Barra de escala = 50 μ m.

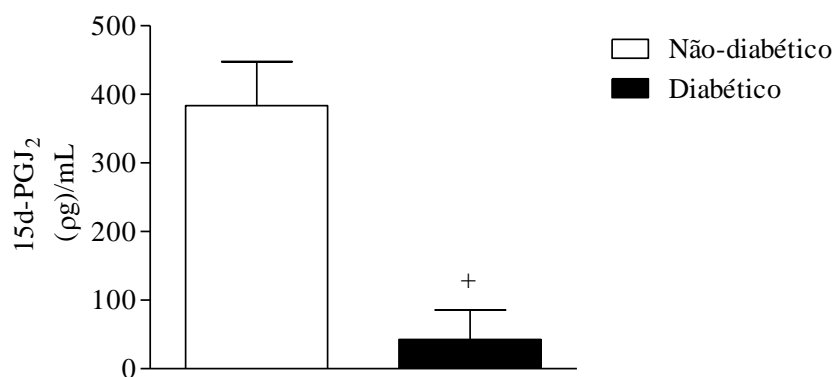


Figura 4.8 – Animais diabéticos apresentam redução nos níveis plasmáticos do ligante endógeno do PPAR- γ 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂). Os níveis de 15d-PGJ₂ foram determinados através de ensaio imunoenzimático a partir de amostras de plasma obtidas 21 dias após indução do diabetes. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. + $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos.

4.3 – O tratamento com o ligante de PPAR- γ rosiglitazona reduz a hipertrofia adrenal e os níveis de glicocorticoides em animais diabéticos em paralelo com a redução na expressão do receptor de ACTH MC2-R

Após 21 dias de indução do diabetes observamos que as células adrenais produtoras de glicocorticoides apresentavam-se com tamanho alterado, o que se refletiu em um menor número de células detectado em microscopia de alta magnificação por campo capturado (*HPF*, Figura 4.9 C e 4.9 E), bem como no aumento na área média calculada para estas células (Figura 4.9 C e 4.9 F). Além dessas alterações microscópicas, também sob o ponto de vista macroscópico observamos um aumento na relação entre o peso das glândulas e o peso dos animais diabéticos (Figura 4.10 A) em associação com altos níveis circulantes de corticosterona nesses animais (Figura 4.10 B).

O tratamento com o agonista do PPAR- γ rosiglitazona iniciado no terceiro dia após a indução do diabetes foi capaz de reduzir de forma significativa os marcadores de hipertrofia adrenal avaliados. Após 18 dias de tratamento, observamos um aumento no número de células por *HPF* (Figura 4.9 D e 4.9 E), e uma redução da área média das células da zona fasciculada dos animais (Figura 4.9 D e 4.9 F). Além disso, a razão peso glândula/ peso animal foi reduzida com o tratamento (Figura 4.10 A). Essas alterações nos animais diabéticos tratados se relacionam diretamente com a redução apresentada pelos mesmos nos níveis de glicocorticoides plasmáticos (Figura 4.10 B). Por outro lado, a administração de rosiglitazona em animais não diabéticos não foi capaz de alterar os parâmetros avaliados. Somando-se a essas observações, constatamos através de imunohistoquímica que a expressão do receptor de ACTH, MC2-R, encontra-se aumentada nas adrenais de animais diabéticos (Figura 4.11 C e 4.11 E) quando comparada a de animais não diabéticos (Figura 4.11 A e 4.11 E), revelando-se como mais um fator associado ao aumento da produção do hormônio esteroide nesses animais. Animais diabéticos submetidos ao tratamento com rosiglitazona apresentaram marcada redução na expressão do receptor MC2-R (Figura 4.11 D e 4.11 E). Nenhuma alteração, no entanto, foi observada neste parâmetro quando animais não diabéticos foram tratados com o ligante agonista do receptor nuclear (Figura 4.11 B e 4.11 E).

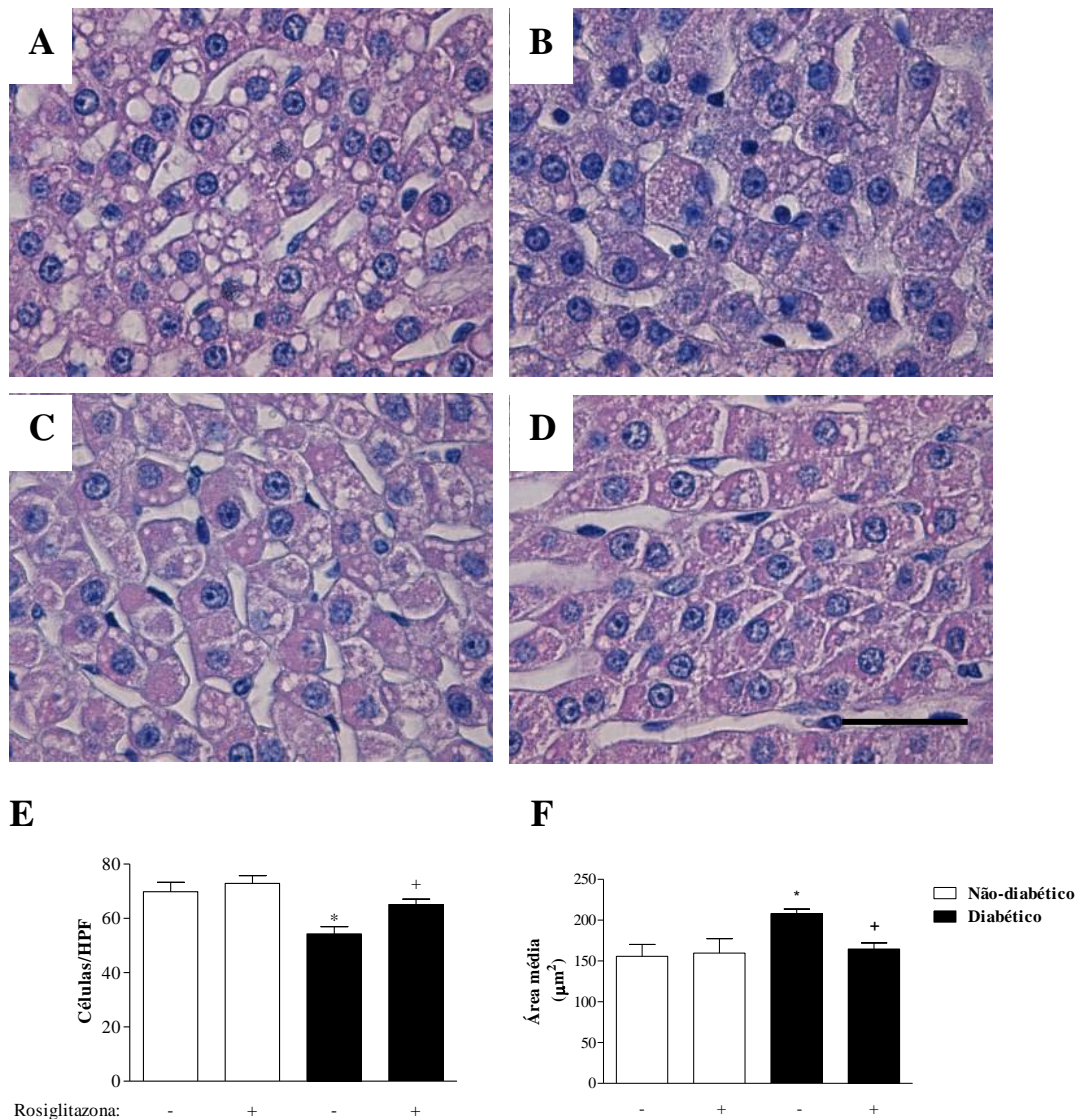


Figura 4.9 – Rosiglitazona reduz a hipertrofia adrenal em ratos diabéticos. Em A, B, C e D, fotomicrografias representativas da zona fasciculada do córtex adrenal de animais dos grupos não diabéticos, não diabéticos tratados com rosiglitazona, diabéticos e diabéticos tratados com rosiglitazona, respectivamente. Em E e F determinação, respectivamente, do número de células por HPF e da área média das células avaliadas. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. As análises foram feitas 21 dias após a administração de aloxana. * $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos. + $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados. Barra de escala = 50 μm .

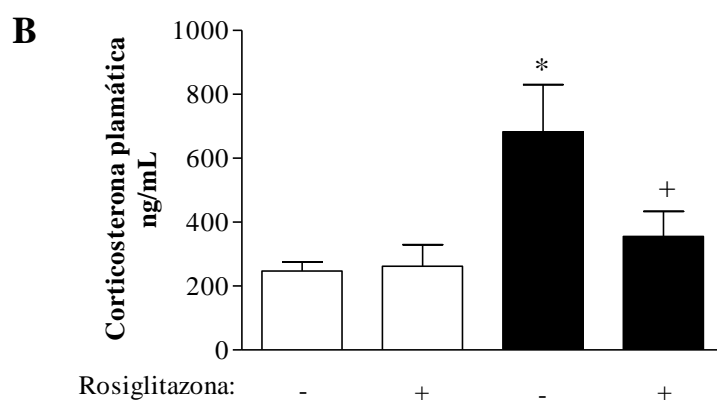
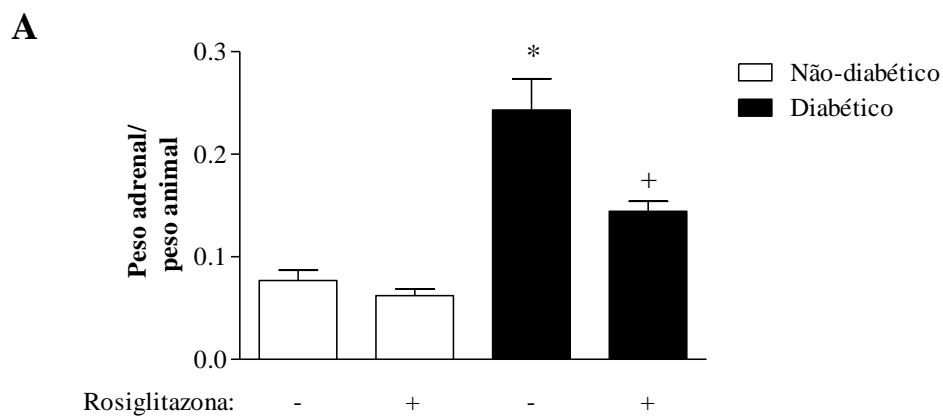


Figura 4.10 – Rosiglitazona reduz a hipertrofia adrenal e os níveis plasmáticos de corticosterona em ratos diabéticos. Em A, determinação da razão do peso adrenal/peso do animal e em B, quantificação dos níveis circulantes de corticosterona. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. As análises foram feitas 21 dias após a administração de aloxana. * $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos. + $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados.

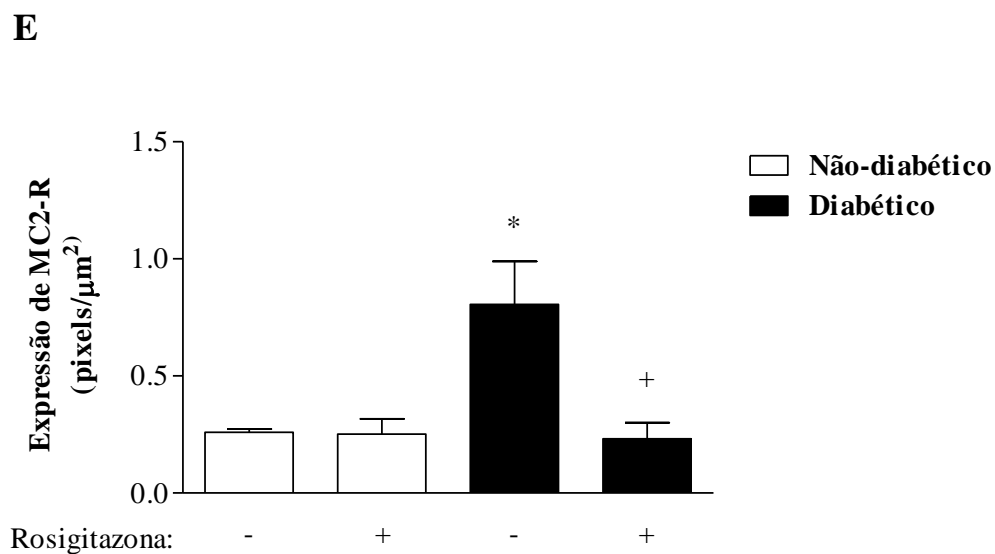
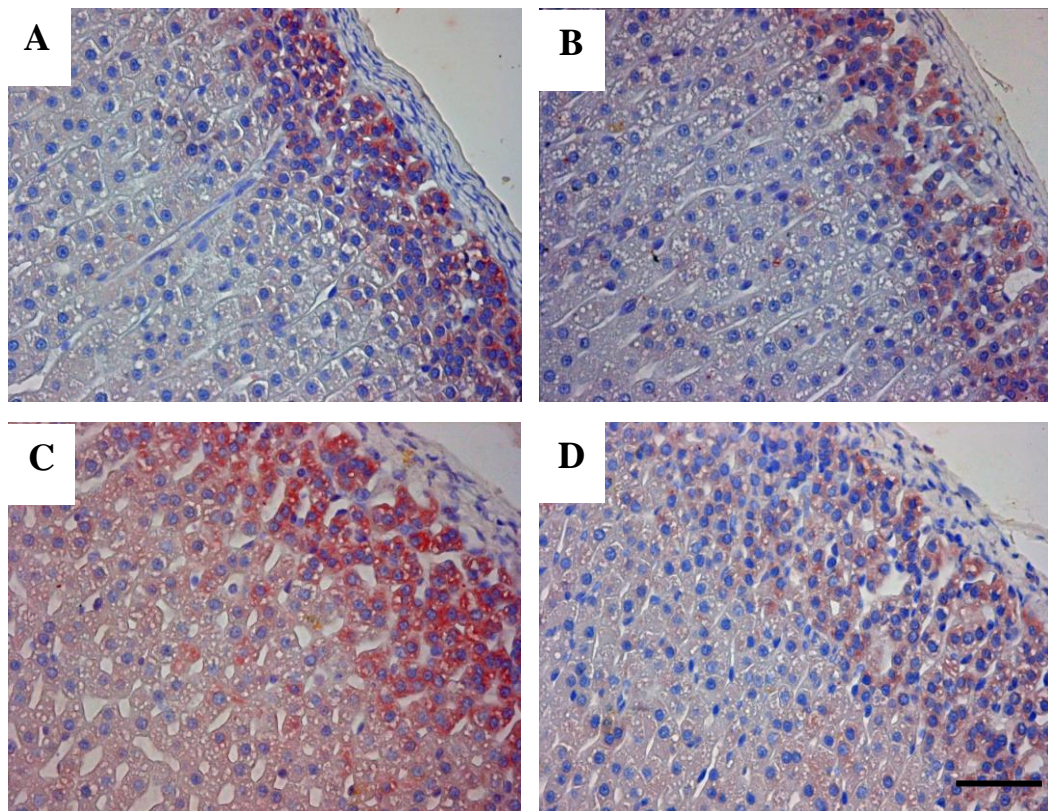


Figura 4.11 – Rosiglitazona reduz a expressão de MC2-R nas adrenais de animais diabéticos. Em A, B, C e D, fotomicrografias representativas do córtex adrenal de animais dos grupos não diabéticos, não diabéticos tratados com rosiglitazona, diabéticos e diabéticos tratados com rosiglitazona, respectivamente. Em E, determinação da razão entre o número de pixels correspondentes a marcação positiva para a proteína investigada pela área do campo capturado. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. As análises foram feitas 21 dias após a administração de aloxana. * $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos. + $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados. Barra de escala = 50 μm .

4.4 - Tratamento com rosiglitazona reduz os níveis de ACTH bem como de seu precursor POMC, de forma independente do restabelecimento do mecanismo de retroalimentação negativa do eixo HPA na hipófise de animais diabéticos

O aumento na produção de glicocorticoides em animais diabéticos se relaciona com a elevação na produção do hormônio hipofisiário ACTH. Observamos que animais tornados diabéticos apresentam aumento no conteúdo do hormônio peptídico nas células corticotróficas (ACTH+) da região anterior da hipófise. Tanto a expressão do hormônio (Figura 4.12 C e 4.12 E) quanto o número de células ACTH+ (Figuras 4.12 C e 4.12 F) encontram-se aumentados em animais diabéticos. Além disso, os níveis circulantes de ACTH quantificados por radioimunoensaio apresentam expressivo aumento nos animais diabéticos quando comparados com animais do grupo não diabético (Figura 4.13). A administração de rosiglitazona em animais diabéticos foi capaz de reduzir tanto a expressão de ACTH e o número de células ACTH+ na hipófise (Figura 4.12 D, 4.12 E e 4.12 F) quanto os níveis do hormônio circulantes (Figura 4.13). Nenhuma alteração significativa nestes parâmetros foi observada quando os animais tratados com rosiglitazona não eram diabéticos (Figura 4.12 B, 4.12 E, 4.12 F e 4.13).

Um mecanismo envolvido com as alterações no eixo HPA de animais diabéticos é a falha no controle da produção de glicocorticoides através da sinalização do próprio hormônio em receptores GR e MR expressos no hipotálamo e na hipófise dos animais. De fato, animais com 21 dias de diabetes apresentam uma acentuada redução na expressão dos receptores indicados na hipófise (Figura 4.14 C e 4.14 E e Figura 4.15 C e 4.15 E, respectivamente GR e MR) quando comparados com animais não diabéticos (Figura 4.14 A e 4.14 E, e Figura 4.15 A e 4.15 E, respectivamente GR e MR). No entanto, observamos que o tratamento com o agonista do PPAR- γ rosiglitazona não foi capaz de aumentar, pelo menos no nível da hipófise, a expressão de GR ou a de MR (respectivamente, Figura 4.14 D e 4.14 E e Figura 4.15 D e 4.15 E), indicando não ser esse o mecanismo pelo qual reduz a hiperatividade do eixo HPA em diabéticos. Por outro lado, investigando a expressão do precursor de ACTH, POMC, observamos que embora não seja possível detectar um aumento do peptídeo em diabéticos (Figura 4.16 C e 4.16 E), o tratamento com rosiglitazona foi capaz de reduzir os níveis da molécula em animais diabéticos de forma significativa (Figura 4.16 D e 4.16 E), sugerindo que este possa ser um importante alvo da ativação do PPAR- γ na redução da atividade do eixo HPA.

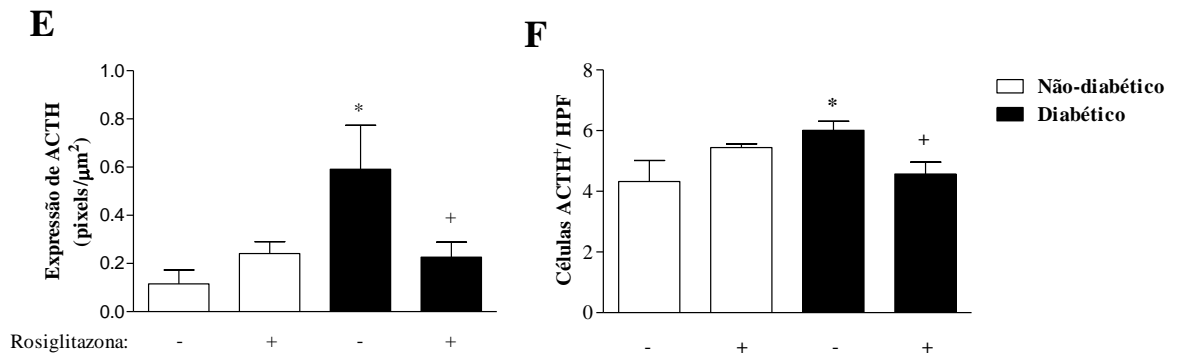
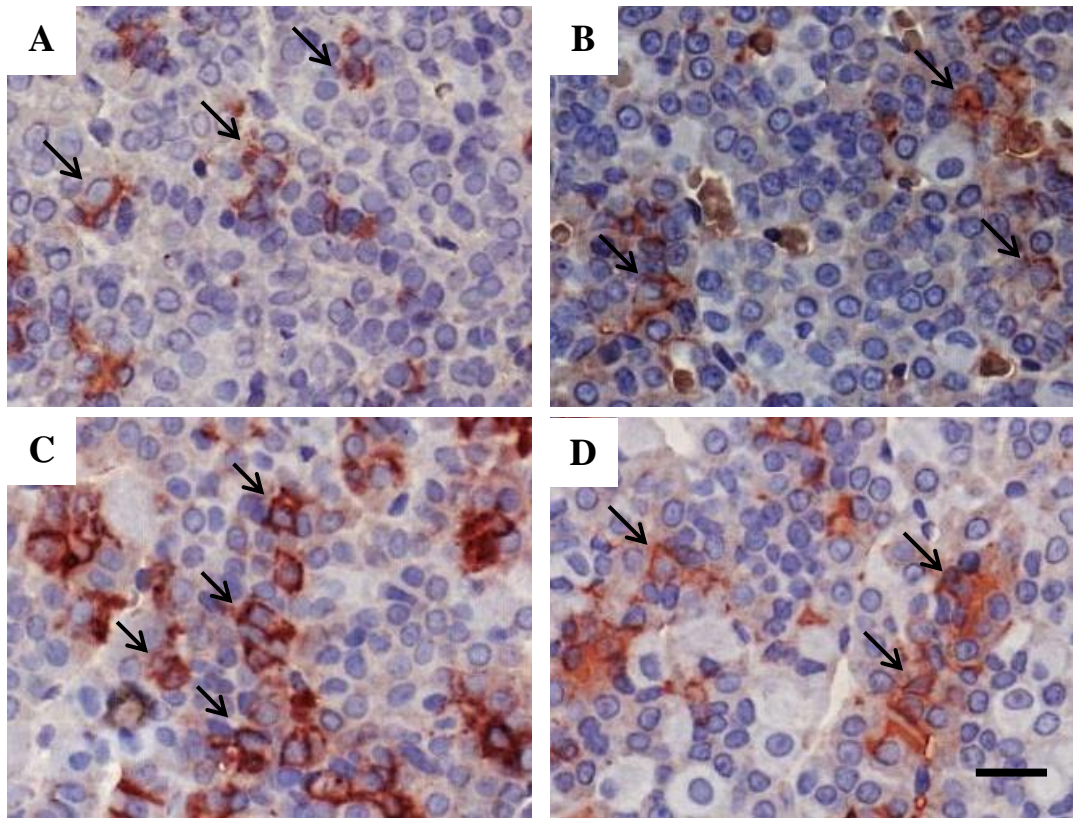


Figura 4.12 – Rosiglitazona reduz a expressão de ACTH e o número de células produtoras do hormônio na hipófise de animais diabéticos. Em A, B, C e D, fotomicrografias representativas da região anterior da hipófise de animais dos grupos não diabéticos, não diabéticos tratados com rosiglitazona, diabéticos e diabéticos tratados com rosiglitazona, respectivamente. Em E, determinação da razão entre o número de pixels correspondentes a marcação positiva para a proteína investigada pela área do campo capturado e em F, a determinação do número de células ACTH+ por campo de análise. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. As análises foram feitas 21 dias após a administração de aloxana. * $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos. + $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados. Barra de escala = 20 μ m.

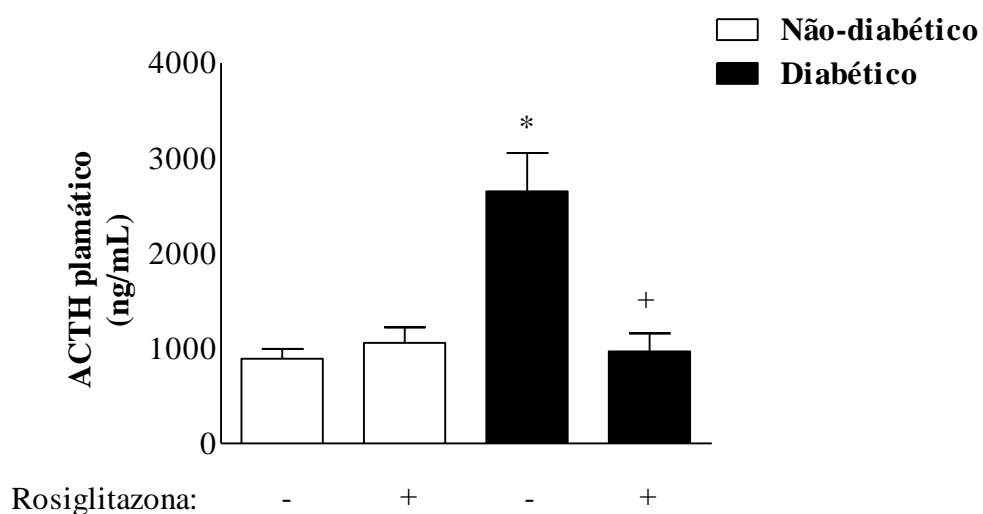


Figura 4.13 – Rosiglitazona reduz os níveis circulantes do hormônio ACTH em animais diabéticos. Determinação dos níveis circulantes no plasma do hormônio ACTH através da metodologia de radioimunoensaio. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. A análise foi feita 21 dias após a administração de aloxana. * $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos. + $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados.

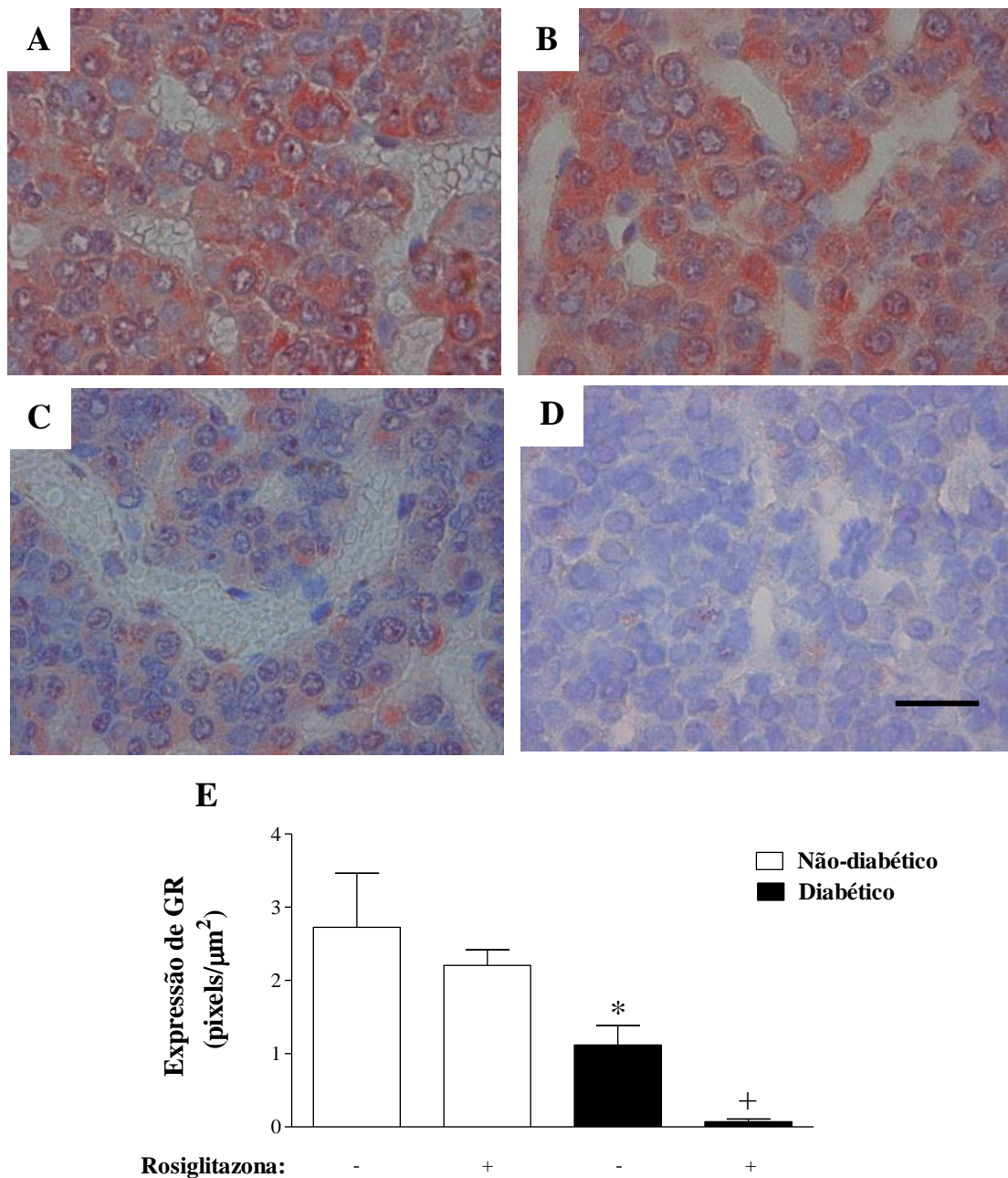


Figura 4.14 – Efeito do tratamento com rosiglitazona sobre a expressão do receptor de glicocorticoides (GR) na hipófise de animais diabéticos. No painel, fotomicrografias representativas da expressão de GR em animais dos grupos não diabéticos (A) não diabéticos tratados com rosiglitazona (B), diabéticos (C) e diabéticos tratados com rosiglitazona (D). Em E, a determinação da razão entre o número de pixels correspondentes a marcação positiva para GR pela área dos campos capturados. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. A análise foi feita 21 dias após a administração de aloxana. * $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos. + $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados. Barra de escala = 20 μm .

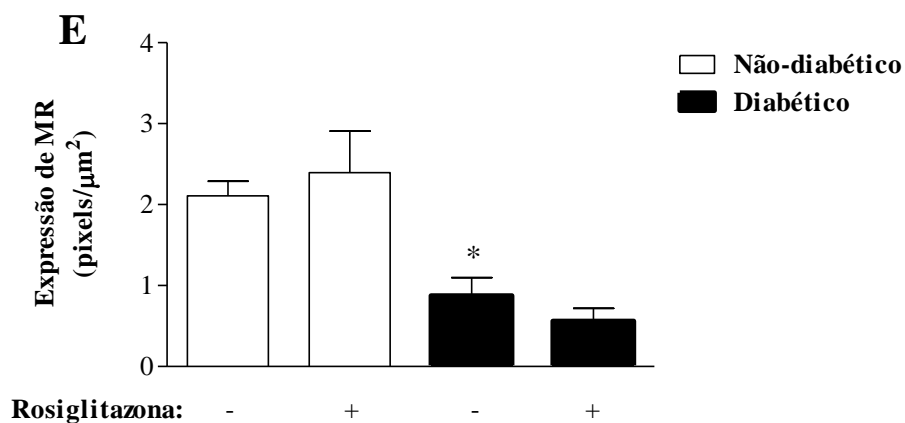
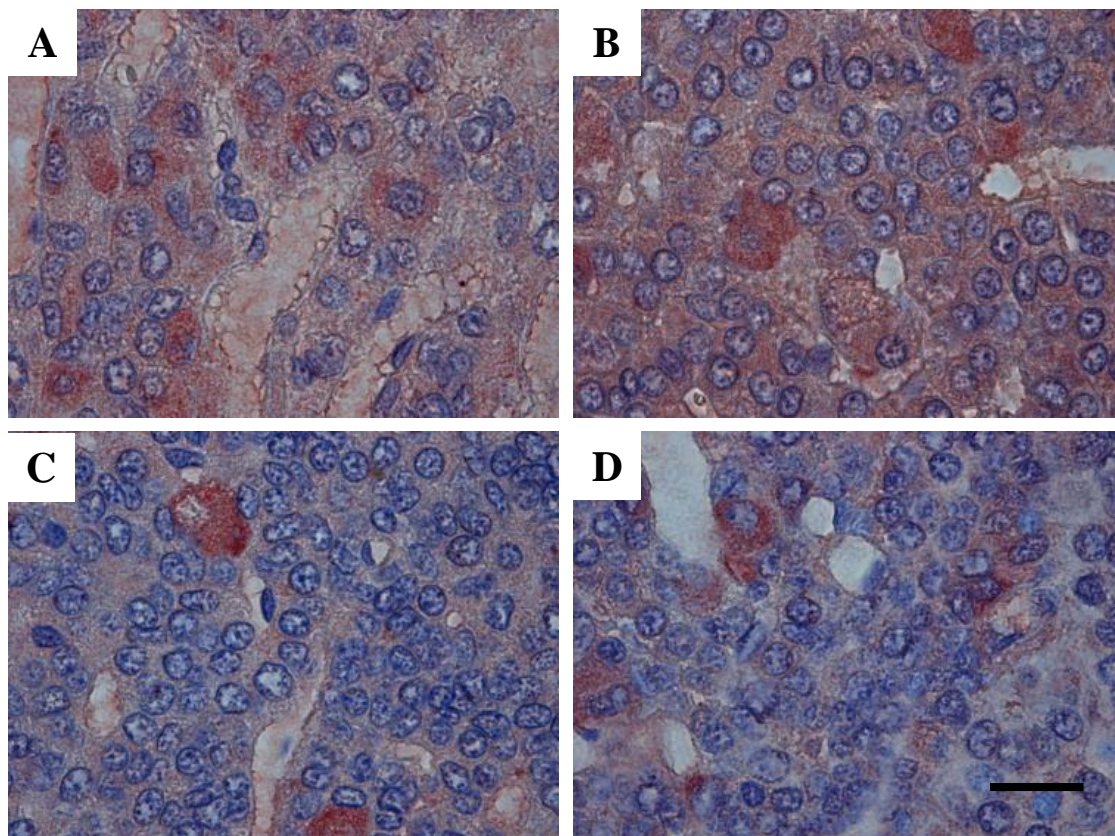


Figura 4.15 – Efeito do tratamento com rosiglitazona sobre a expressão do receptor de mineralocorticoides (MR) na hipófise de animais diabéticos. No painel, fotomicrografias representativas da expressão de MR em animais dos grupos não diabéticos (A) não diabéticos tratados com rosiglitazona (B), diabéticos (C) e diabéticos tratados com rosiglitazona (D). Em E, a determinação da razão entre o número de pixels correspondentes a marcação positiva para MR pela área dos campos capturados. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. A análise foi feita 21 dias após a administração de aloxana. * $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos. + $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados. Barra de escala = 20 μm .

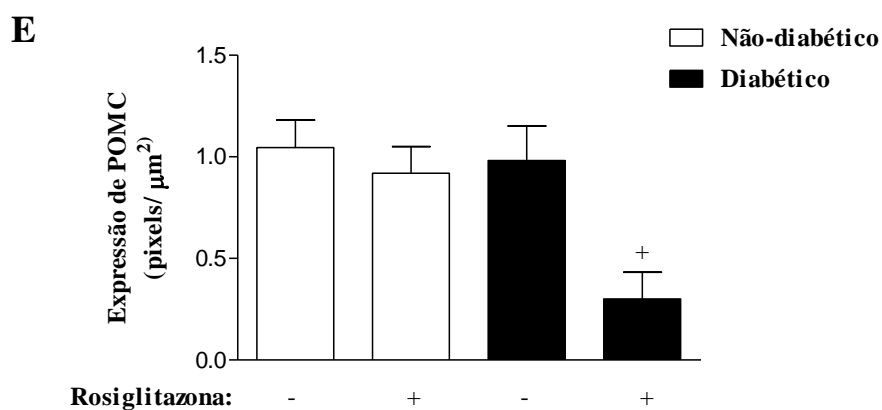
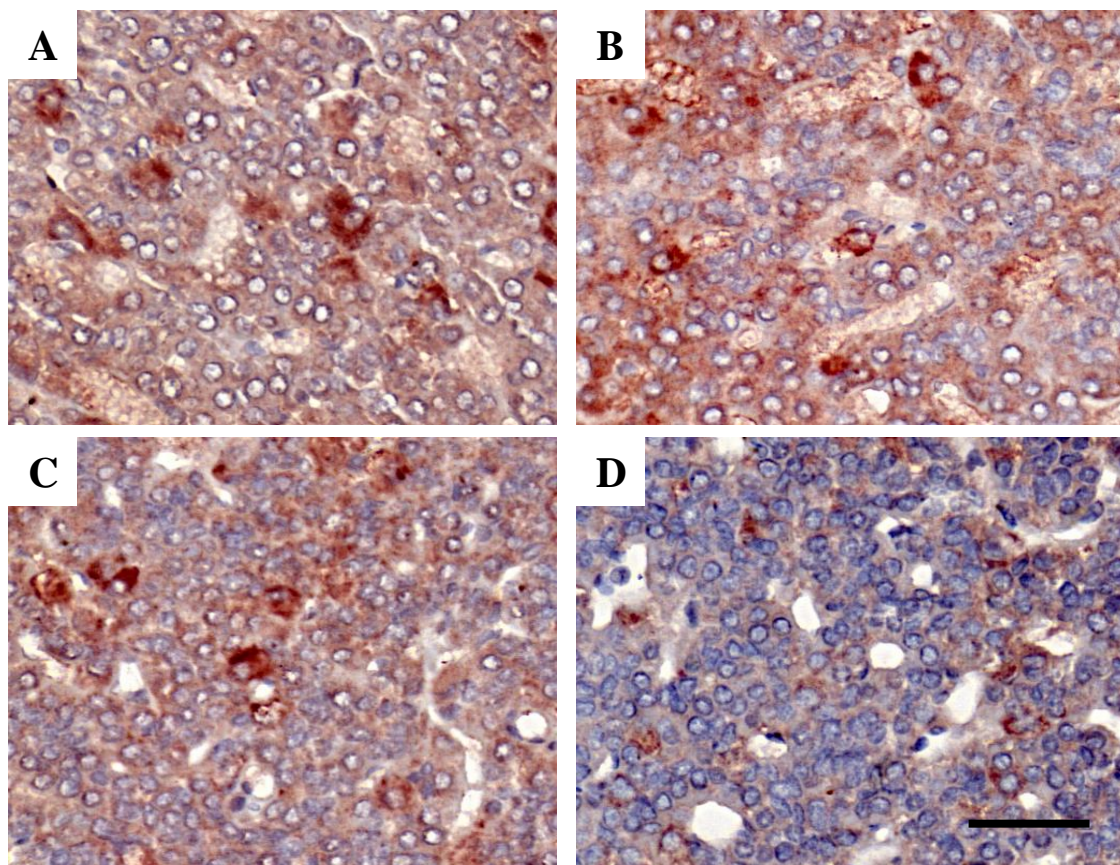


Figura 4.16 – Rosiglitazona reduz a expressão de POMC na hipófise de animais diabéticos. No painel, fotomicrografias representativas da expressão de POMC em animais dos grupos não diabéticos (A) não diabéticos tratados com rosiglitazona (B), diabéticos (C) e diabéticos tratados com rosiglitazona (D). Em E, a determinação da razão entre o número de pixels correspondentes a marcação positiva para POMC pela área dos campos capturados. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. A análise foi feita 21 dias após a administração de aloxana. * $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos. + $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados. Barra de escala = 40 μm .

4.5 – Tratamento com rosiglitazona aumenta a expressão do PPAR- γ em órgãos do eixo HPA, papel da ativação do receptor na redução dos níveis circulantes de glicocorticoides em animais diabéticos

Tendo em vista as alterações observadas no eixo HPA de animais diabéticos após o tratamento com rosiglitazona, avaliamos a expressão do PPAR- γ em órgãos do eixo HPA dos animais tratados. O tratamento com rosiglitazona aumentou a expressão do receptor nuclear tanto nas glândulas adrenais (Figura 4.17 D e 4.17 E) como na hipófise (Figura 4.18 D e 4.18 E) dos animais diabéticos, sugerindo que a ativação do receptor e o aumento de sua expressão estejam envolvidos com o controle da ativação do eixo HPA e conseqüentemente dos níveis de glicocorticoides em ratos diabéticos. Por outro lado, o tratamento com rosiglitazona em animais não diabéticos reduziu de forma significativa a expressão do receptor PPAR- γ nas adrenais destes animais (Figura 4.17 B e 4.17 E) embora não tenham sido constatadas alterações na expressão do receptor na hipófise dos mesmos animais quando submetidos ao tratamento (Figura 4.18 B e 4.18E). Observamos, ainda, que a redução nos níveis de glicocorticoides nos animais diabéticos tratados com rosiglitazona é fruto da ativação do receptor PPAR- γ , uma vez que o pré-tratamento dos animais com o antagonista do receptor (GW9662) foi capaz de inibir a redução nos níveis quantificados do hormônio (Figura 4.19).

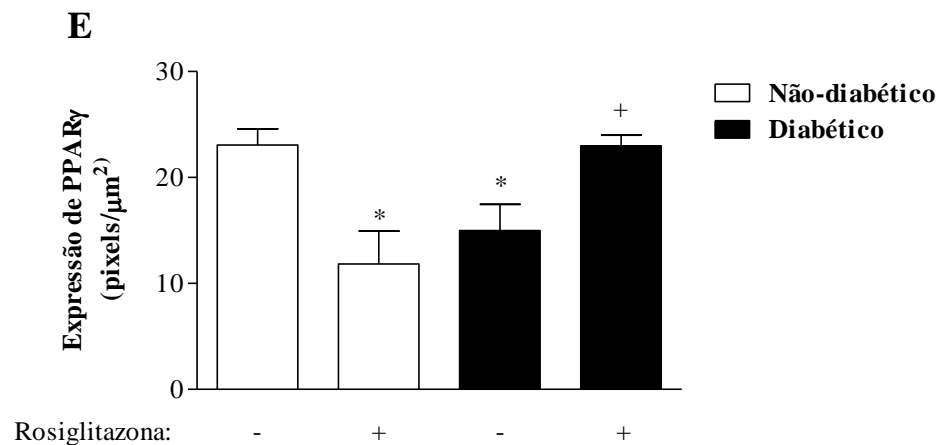
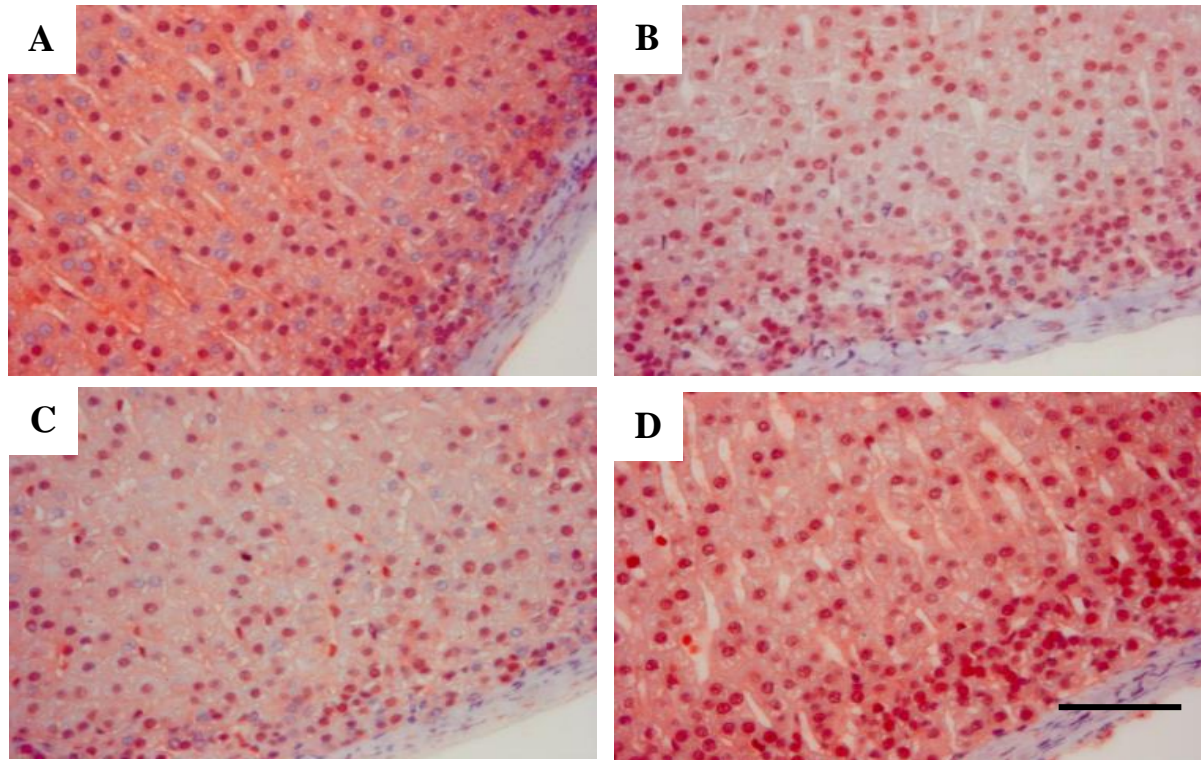


Figura 4.17 – Rosiglitazona aumenta a expressão do PPAR- γ nas adrenais de animais diabéticos. No painel, fotomicrografias representativas da expressão do PPAR- γ nas adrenais de animais dos grupos não diabéticos (A), não diabéticos tratados com rosiglitazona (B), diabéticos (C) e diabéticos tratados com rosiglitazona (D). Em E, a determinação da razão entre o número de pixels correspondentes a marcação positiva para o receptor nuclear nas adrenais pela área dos campos capturados. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. A análise foi feita 21 dias após a administração de aloxana. * $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos. + $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados. Barra de escala = 50 μm .

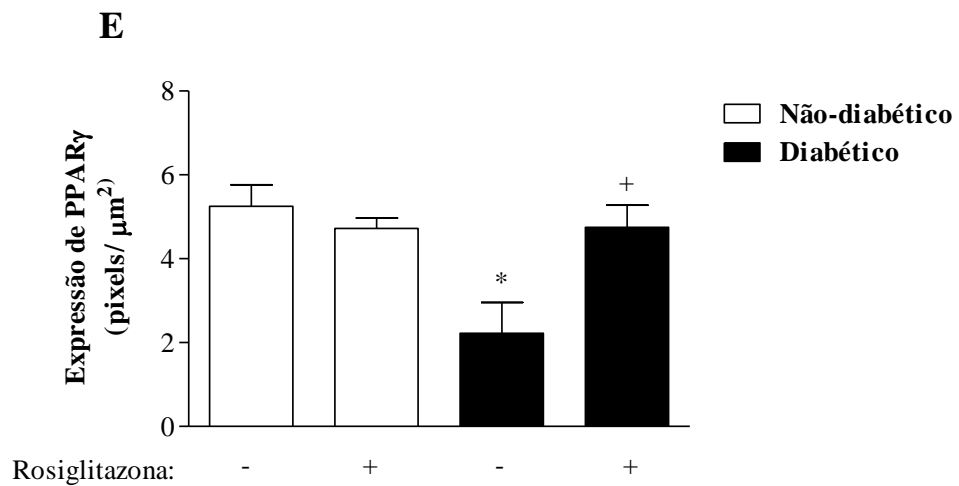
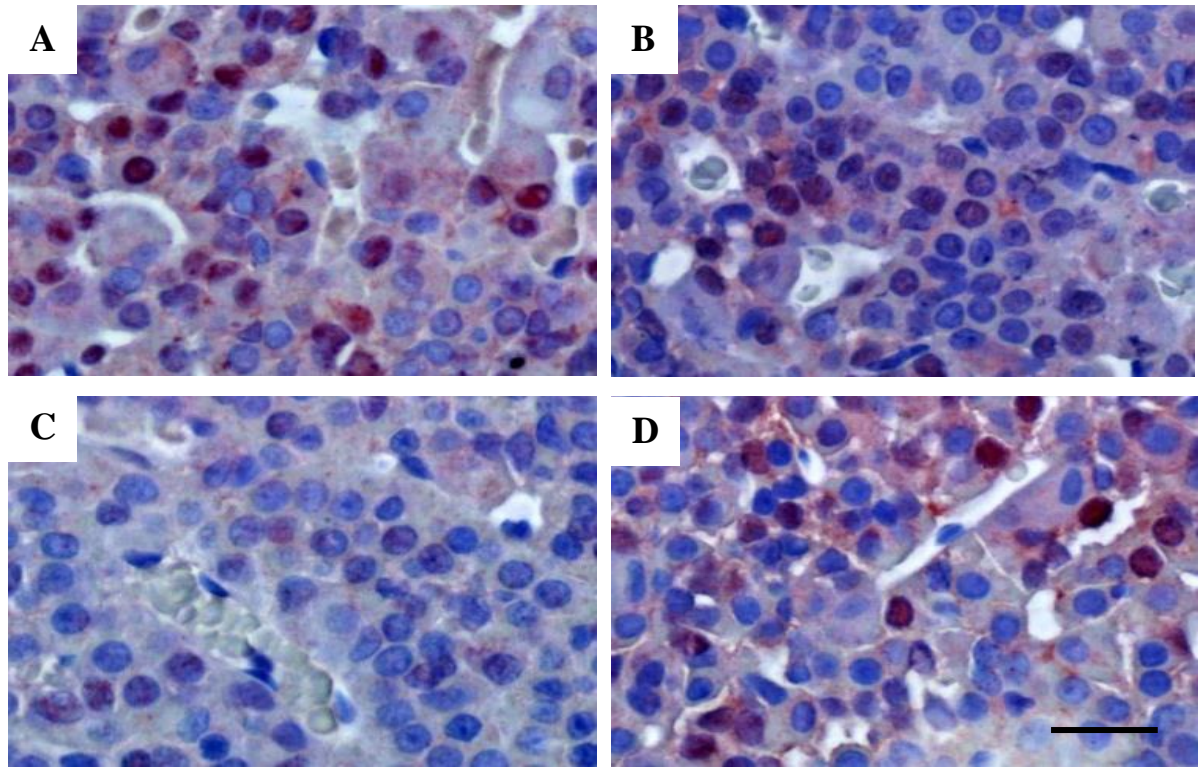


Figura 4.18 – Rosiglitazona aumenta a expressão do PPAR- γ na hipófise de animais diabéticos. No painel, fotomicrografias representativas da expressão do PPAR- γ na hipófise de animais dos grupos não diabéticos (A), não diabéticos tratados com rosiglitazona (B), diabéticos (C) e diabéticos tratados com rosiglitazona (D). Em E, a determinação da razão entre o número de pixels correspondentes a marcação positiva para o receptor nuclear na hipófise, pela área dos campos capturados. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. A análise foi feita 21 dias após a administração de aloxana. * $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos. + $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados. Barra de escala = 20 μm .

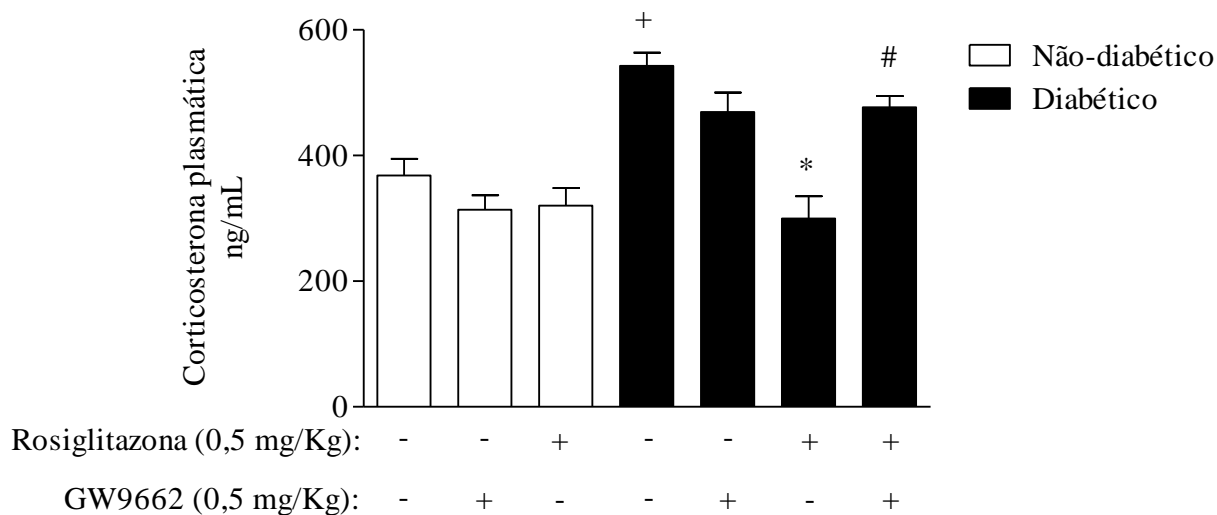


Figura 4.19 – Rosiglitazona reduz a produção de glicocorticoides em animais diabéticos através de um mecanismo dependente da ativação do receptor nuclear PPAR- γ . Grupos de animais foram pré-tratados com o antagonista do receptor PPAR- γ e na sequência receberam a administração do ligante agonista rosiglitazona. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. A análise foi feita 21 dias após a administração de aloxana. + $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos, * $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados e # $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos tratados com rosiglitazona.

4.6 – Tratamento com rosiglitazona reduz a atividade do eixo HPA em animais diabéticos através de um mecanismo dependente da ativação da via da PI3K

Finalmente, buscamos elucidar o mecanismo pelo qual a ativação do receptor nuclear PPAR- γ , em animais diabéticos, é capaz de reduzir a expressão de POMC na hipófise e como resultado final normalizar a produção de corticosterona. Indivíduos diabéticos do tipo 1 apresentam redução nos hormônios insulina, prolactina e leptina que atuam pela via, PI3K/AKT. Dessa forma, investigamos a expressão da cinase em órgãos do eixo HPA como um provável alvo da rosiglitazona. Observamos que a expressão da PI3K encontra-se sensivelmente reduzida na hipófise de animais diabéticos (Figura 4.20 C e 4.20 E), embora não tenhamos constatado alterações nas adrenais dos mesmos (Figura 4.21 C e 4.21 E). Após o tratamento com rosiglitazona, observamos um aumento significativo na expressão da enzima nos dois locais avaliados, hipófise (Figura 4.20 D e 4.20 E) e adrenais (Figura 4.21 D e 4.21 E). Para confirmarmos a participação da PI3K no efeito do tratamento com rosiglitazona sobre a atividade do eixo HPA dos animais diabéticos, realizamos o tratamento dos mesmos com o inibidor da PI3K wortmannin. Observamos que mais uma vez o tratamento com rosiglitazona foi capaz de reduzir a produção de glicocorticoides em animais diabéticos, fenômeno este parcialmente impedido nos animais diabéticos que receberam wortmannin de forma concomitante a rosiglitazona. Constatamos também que os animais não diabéticos quando tratados com wortmannin passaram a apresentar uma hiperatividade do eixo HPA sugerida pelo aumento nos níveis circulantes de glicocorticoides.

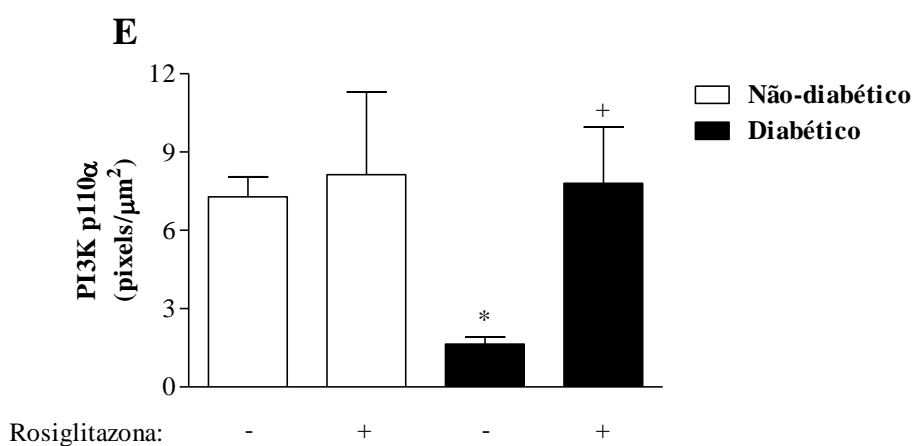
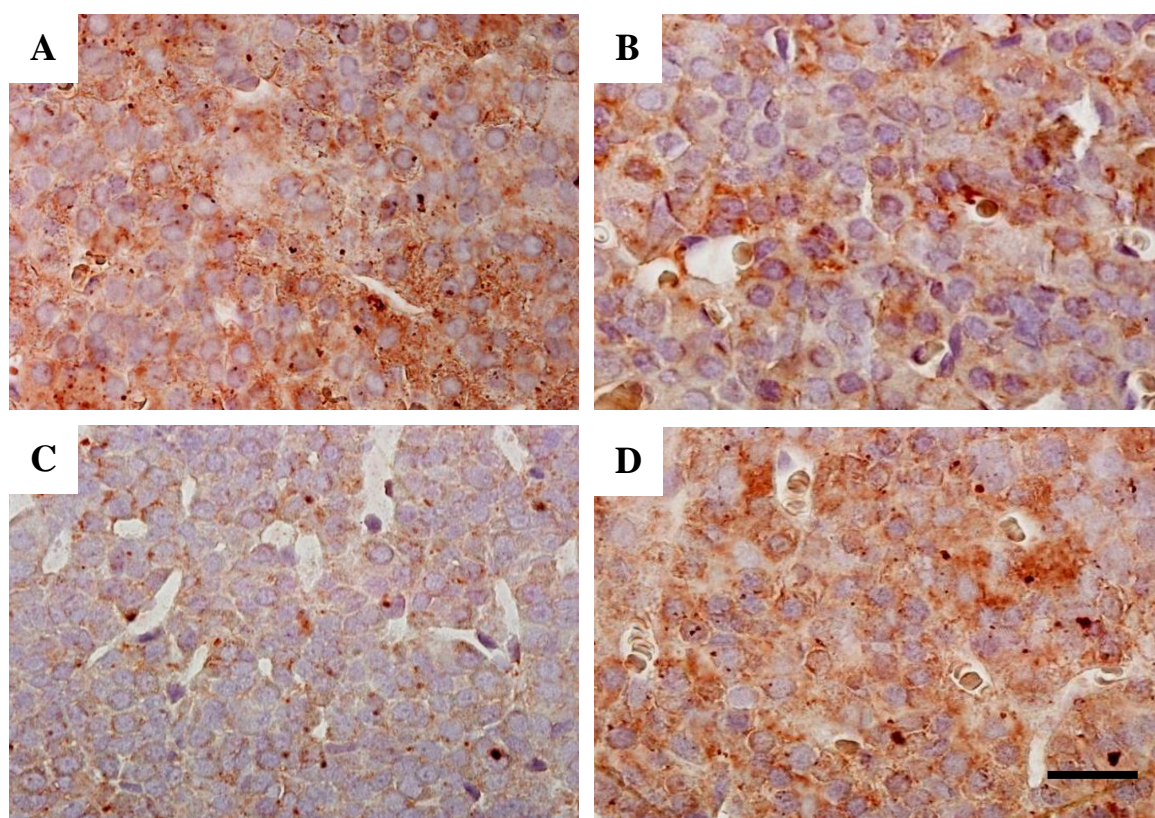


Figura 4.20 – Rosiglitazona aumenta a expressão da PI3K na hipófise de animais diabéticos. No painel, fotomicrografias representativas da expressão da PI3K na hipófise de animais dos grupos não diabéticos (A), não diabéticos tratados com rosiglitazona (B), diabéticos (C) e diabéticos tratados com rosiglitazona (D). Em E, a determinação da razão entre o número de pixels correspondentes a marcação positiva na hipófise pela área dos campos capturados. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. A análise foi feita 21 dias após a administração de aloxana. * $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos. + $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados. Barra de escala = 20 μm .

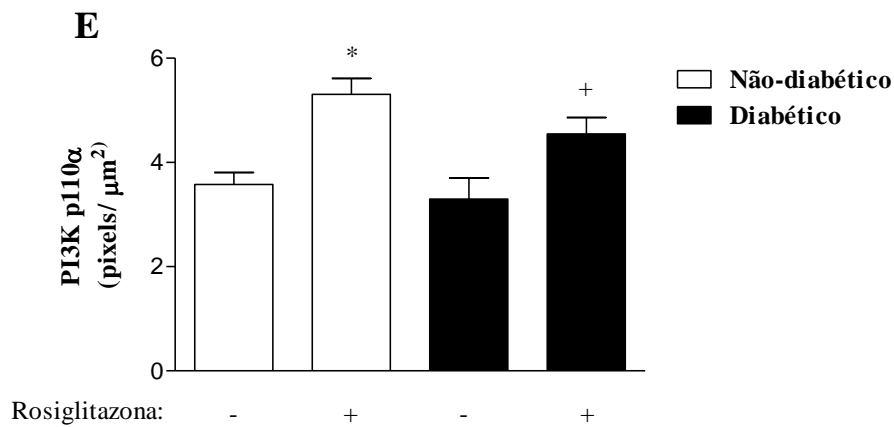
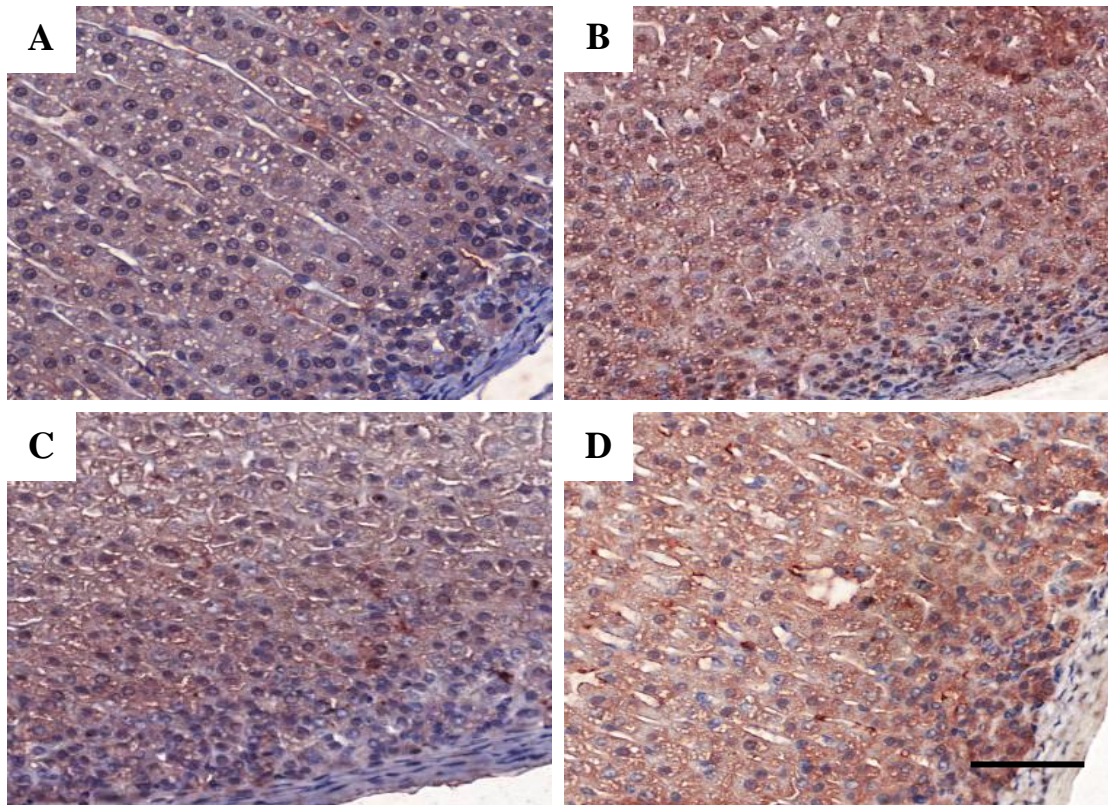
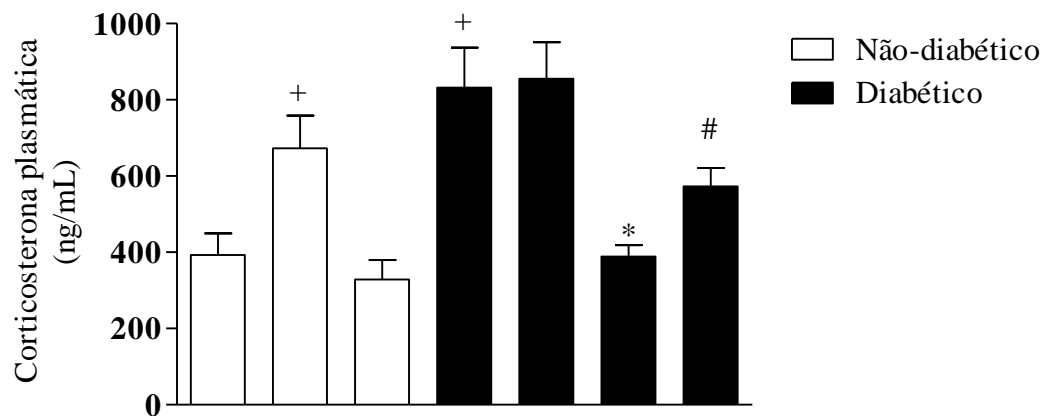


Figura 4.21 – Rosiglitazona aumenta a expressão da PI3K nas adrenais de animais diabéticos. No painel, fotomicrografias representativas da expressão do PPAR- γ nas adrenais de animais dos grupos não diabéticos (A), não diabéticos tratados com rosiglitazona (B), diabéticos (C) e diabéticos tratados com rosiglitazona (D). Em E, a determinação da razão entre o número de pixels correspondentes a marcação positiva para o receptor nuclear, respectivamente nas adrenais pela área dos campos capturados. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. A análise foi feita 21 dias após a administração de aloxana. * $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos. + $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados. Barra de escala = 50 μm .



Wortmannin (0,1 mg/Kg): - + - - + - +
 Rosiglitazone (0,5 mg/Kg): - - + - - + +

Figura 4.22 – Rosiglitazone reduz a produção de glicocorticoides em animais diabéticos através de um mecanismo dependente da via da PI3K. Grupos de animais foram tratados com o ligante agonista de PPAR- γ rosiglitazone e/ou com inibidor da PI3K wortmannin. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 8 animais. A análise foi feita 21 dias após a administração de aloxana. + $p < 0,05$ em comparação com animais não diabéticos, * $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos não tratados e # $p < 0,05$ em comparação com animais diabéticos tratados com rosiglitazone.

5 - Discussão

Na presente tese de doutorado buscamos identificar o papel do receptor nuclear PPAR- γ sobre a hiperatividade do eixo HPA em animais diabéticos. Observamos que o estado diabético induzido por aloxana em ratos se caracteriza por desregulação na atividade do eixo HPA com redução na expressão de receptores de glicocorticoides na hipófise, hipertrofia adrenal e aumento nos níveis circulantes de glicocorticoides. Em paralelo a hiperatividade do eixo HPA, constatamos redução nos níveis expressos do PPAR- γ nas adrenais e hipófise dos animais diabéticos. O tratamento destes animais com o ligante agonista do PPAR- γ rosiglitazona foi capaz de reduzir a hipertrofia adrenal em associação com redução nos níveis de glicocorticoides, de forma dependente da ativação do receptor. A importância da diminuição dos níveis de glicocorticoides circulantes sobre a redução da atrofia muscular em animais diabéticos foi evidenciada pela melhora em parâmetros microvasculares funcionais do músculo grácil observada em animais diabéticos tratados com o antagonista do receptor de glicocorticoides RU486. Em adição, o tratamento de animais diabéticos com rosiglitazona foi capaz de reduzir a expressão do receptor de ACTH MC2-R nas adrenais, bem como a expressão do hormônio na hipófise e seus níveis circulantes no plasma. Esses resultados não refletiram alterações na expressão dos receptores de glicocorticoides na hipófise dos animais, mas sim a redução da expressão do precursor de ACTH POMC no órgão, em um mecanismo relacionado com aumento na expressão da PI3K. Soma-se a isto, o fato de que o tratamento dos animais diabéticos com o inibidor da PI3K wortmannin foi capaz de reduzir parcialmente o efeito da rosiglitazona sobre a produção de glicocorticoides nesses animais. O tratamento com rosiglitazona reverteu, ainda, a redução na expressão do PPAR- γ nas adrenais e hipófise de animais diabéticos. A importância não apenas do aumento da expressão do receptor nuclear mas também de sua ativação fica evidente na medida em que o pré tratamento dos animais diabéticos com o antagonista do receptor nuclear PPAR- γ GW9662 impediu a redução dos níveis de glicocorticoides associada ao tratamento com rosiglitazona.

Após administração de aloxana, animais tornados diabéticos apresentaram níveis aumentados de glicose no sangue em todos os tempos analisados (24 horas, 48 horas, 72 horas e 21 dias). Este resultado está em sintonia com dados publicados pelo laboratório, que apontam a detecção de níveis de glicemia compatíveis com o estado diabético 24 horas após a injeção da substância diabetogênica (114). Em paralelo com a hiperglicemia, observamos um quadro de hipoinsulinemia estabelecido a partir de 48 horas após a indução do modelo de diabetes. A manutenção dos níveis de insulina 24 horas após a indução do diabetes, mesmo os animais já apresentando níveis aumentados de glicose no sangue, é compreensível uma vez

que nas primeiras horas após a lesão pancreática todo o conteúdo glandular é liberado na circulação, incluindo as formas pré-pro-insulina e pro-insulina (45). Além da hiperglicemia e queda nos níveis de insulina que caracterizam o quadro de diabetes do tipo 1, os animais que receberam aloxana também apresentaram redução no peso corporal, bem como polidipsia, poliúria e polifagia (resultados não apresentados).

Observamos na sequência do trabalho que os animais diabéticos também apresentavam um quadro de hiperatividade do eixo HPA relacionado com hipertrofia adrenal e aumento dos níveis circulantes do produto principal da ativação do eixo em roedores, o hormônio glicocorticoide corticosterona, já a partir de 24 horas após a administração de aloxana. Conforme relatado, não detectamos redução dos níveis de insulina 24 horas após a administração de aloxana, embora os animais já se encontrassem sobre marcante hiperglicemia. Dessa forma, podemos sugerir que o quadro de alterações adrenais e aumento nos níveis de glicocorticoides se relacione, em um primeiro momento, ao desequilíbrio hemodinâmico causado pela repentina elevação nos níveis de glicose sanguínea. Em decorrência da hiperglicemia, diabéticos com frequência apresentam uma desregulação nos níveis plasmáticos de sódio (Na^+), com um quadro inicial de hiponatremia (176) o que pode justificar o aumento com 24 horas dos níveis de corticosterona em animais diabéticos, uma vez que o hormônio também possui ação mineralocorticoide.

Apesar dessas alterações com 24 horas, observamos que a redução na expressão do receptor GR aconteceu somente após 48 horas da indução do diabetes, redução está também notada nos tempos de 72 horas e 21 dias. O mecanismo de controle por retroalimentação da atividade do eixo HPA é importante na regulação da produção de glicocorticoides (69). Anteriormente, já havíamos apontado a redução na expressão dos receptores GR e MR na hipófise dos animais após 21 dias da indução da doença (86), que se relaciona com a também demonstrada ausência de resposta dos animais ao teste de supressão com dexametasona (81). Agora, através dos dados apresentados, podemos afirmar que o aumento nos níveis de corticosterona nos animais diabéticos precede a redução na expressão de GR em sua hipófise, e conseqüentemente precede a falha no mecanismo de controle do eixo HPA por retroalimentação negativa nesse órgão.

Em paralelo com o aumento nos níveis circulantes de corticosterona e redução na expressão de seu principal receptor na região anterior da hipófise, os animais diabéticos apresentaram após 21 dias da indução da doença, significativa redução na massa do músculo gastrocnêmio. A perda de massa muscular é uma complicação do diabetes relacionada principalmente com alterações no metabolismo de proteínas, com aumento do catabolismo

dos músculos esqueléticos em direta correção com as alterações apresentadas nos níveis circulantes de insulina, bem como na funcionalidade do hormônio (177).

No intuito de investigarmos uma possível relação entre o aumento na atividade do eixo HPA em animais tornados diabéticos após administração de aloxana e complicações da doença, realizamos o tratamento dos animais com o antagonista do receptor de glicocorticoides RU486. Notamos que após o tratamento dos animais diabéticos com o antagonista em questão, a massa do músculo gastrocnêmio apresentou um aumento significativo, embora ainda tenha ficado aquém daquela encontrada em animais não diabéticos. Estes dados estão em sintonia com a literatura, na medida em que é reconhecida a participação de glicocorticoides endógenos no mecanismo de atrofia muscular, principalmente em tecidos com fibras de contração rápida, que apresentam maior expressão de receptores de glicocorticoides quando comparados a tecidos musculares com predomínio de fibras de contração lenta (178). Glicocorticoides induzem o aumento da expressão de proteínas envolvidas com a atrofia de músculos esqueléticos como as ubiquitinas ligases “muscle atrophy F-Box” (MAFbx) e “muscle ring finger-1” (MURF1) e a miostatina, proteína esta limitadora do crescimento muscular (179).

Além disso, o tratamento dos animais diabéticos com RU486 foi capaz de recuperar a resposta vasodilatadora do músculo grácil ao estímulo com acetilcolina. Este dado mostra que no tempo investigado, de 21 dias de diabetes, os animais tratados apresentaram resposta vascular no músculo avaliado compatível a apresentada por animais não diabéticos. Em conjunto com os resultados de ganho de massa do músculo gastrocnêmio, esse dado sugere que talvez possam ser observadas melhoras expressivas no parâmetro de atrofia muscular se a redução nos níveis de glicocorticoides ou atividade do hormônio forem mantidas por tempos maiores, ou se, principalmente, o tratamento dos animais for associado à prática de atividade física, que induza um fortalecimento muscular em benefício da melhora nos parâmetros circulatórios.

Dessa forma, constatamos que, ao menos parcialmente, o aumento na ativação do eixo HPA se relaciona com uma complicação do quadro diabético induzido pela administração de aloxana em ratos. Em adição, como ressaltado anteriormente, é possível traçarmos um paralelo entre outras complicações apresentadas por indivíduos diabéticos e a presença de níveis aumentados de glicocorticoides nestes indivíduos, com destaque para os problemas na cicatrização de feridas, alta incidência de infecções oportunistas e distúrbios neurológicos (116, 118). A dexametasona, um glicocorticoide sintético, é capaz de reduzir a síntese de colágeno por fibroblastos, bem como a sua capacidade proliferativa, migratória e contrátil, com prejuízo sobre o processo de cicatrização (180). Além disso, alterações em células

fagocíticas e linfócitos em indivíduos expostos a níveis aumentados de glicocorticoides predis põem ao aparecimento de infecções oportunistas, como tuberculose e pneumonia (122). Por fim, o hormônio esteroide em níveis elevados se relaciona com prejuízo na formação da memória no hipocampo bem como na plasticidade sináptica e na neurogênese em diabéticos (139).

Evidências na literatura apontam que animais diabéticos apresentam redução na expressão do receptor PPAR- γ em órgãos frequentemente acometidos por complicações da doença, como retina e rins, e que o tratamento dos animais com substância capaz de elevar a expressão do receptor nuclear é capaz de reduzir a gravidade das complicações diabéticas (142). Além disso, é descrito que mulheres com diabetes gestacional, um tipo de diabetes marcado por resistência à insulina que aparece no último terço da gravidez, apresentam redução da expressão do PPAR- γ na placenta, assim com camundongos NOD, espontaneamente diabéticos, apresentam menor expressão do receptor em seus linfócitos CD4 e CD8 (181, 182). Dentre as moléculas capazes de regular a expressão do PPAR- γ destacam-se os seus próprios ligantes, sendo descrito que a ativação do receptor induz um aumento de sua expressão (183).

Neste contexto, observamos em sintonia ao quadro de hiperatividade do eixo HPA a redução nos níveis plasmáticos do agonista endógeno do PPAR- γ 15d-PGJ₂, bem como a redução na expressão do receptor nas adrenais e hipófise dos animais tornados diabéticos após administração de aloxana. A molécula de 15d-PGJ₂ é um ligante natural de PPAR- γ que possui como precursor a prostaglandina D₂ (PGD₂), um mediador lipídico sintetizado em grandes quantidades por mastócitos. Dessa forma, a mastocitopenia descrita em diferentes sítios anatômicos de diabéticos (184, 185) pode estar relacionada com a redução dos níveis de 15d-PGJ₂ nestes animais. A menor detecção dos níveis circulantes do ligante 15d-PGJ₂ em animais diabéticos pode então ser uma possível explicação para a redução na expressão de PPAR- γ em nosso modelo da doença. Dessa forma, tratamento dos animais diabéticos com o ligante agonista do PPAR- γ rosiglitazona foi a estratégia utilizada para investigação do papel do receptor nuclear na função do eixo HPA.

A administração de aloxana foi capaz de induzir a hipertrofia das glândulas adrenais dos animais estudados. Esta alteração foi notada tanto no aumento da massa relativa dos órgãos quanto pelo aumento do tamanho das células da zona fasciculada, em sintonia com a elevação na produção de glicocorticoides. Após 18 dias de tratamento com rosiglitazona, os animais tornados diabéticos apresentaram redução nos parâmetros de hipertrofia que refletiram na normalização dos níveis de glicocorticoides circulantes. Em paralelo com esses resultados, observamos uma redução na expressão do receptor de ACTH MC2-R no córtex da

adrenal, em associação com a redução no número de células corticotróficas na hipófise dos animais e consequente redução também nos níveis circulantes do hormônio peptídico ACTH nos animais tratados. Esses dados apresentam efeitos importantes do tratamento com rosiglitazona que afetam diretamente a função do eixo HPA em animais diabéticos. Na literatura, a parte do seu bem descrito efeito sobre a resistência à insulina em diabéticos do tipo 2, ativadores do PPAR- γ também respondem por redução na secreção de ACTH e na produção de corticosterona em camundongos com tumores hipofisiários e pacientes com doença de Cushing (143, 170).

Embora um dos mecanismos mais bem descritos para justificar a hiperatividade do eixo HPA em diabéticos se relacione com a falha no controle por retroalimentação negativa da produção de glicocorticoides (186), o tratamento com rosiglitazona foi capaz de reduzir a atividade do eixo sem restabelecer esse mecanismo ao nível da glândula hipófise. É sabido que o controle por retroalimentação negativa do eixo HPA também ocorre nos PVN e hipocampo, sendo inclusive estabelecida a relação entre o aumento da expressão de receptores de glicocorticoides nestes locais com a redução na atividade do eixo HPA em modelos de estresse (187). Dessa forma, a reversão na hiperatividade do eixo HPA em diabéticos tratados com rosiglitazona aconteceu sem o aumento na expressão dos receptores de glicocorticoides GR e MR na hipófise dos animais, não sendo descartada, no entanto, a possibilidade de regulação do “feedback” negativo através destes receptores no hipotálamo.

Por outro lado, observamos que o ligante do PPAR- γ foi capaz de alterar sensivelmente a expressão do precursor de ACTH POMC na hipófise dos ratos diabéticos. A molécula de POMC, pro-opiomelanocortina, é um peptídeo de 241 aminoácidos produzido em diferentes tecidos, tais como o hipotálamo e a hipófise sofrendo clivagem tecido-específica e originando diferentes moléculas, dentre elas o hormônio ACTH e a β -endorfina, um opioide endógeno (61). Não observamos alteração na expressão de POMC entre animais não diabéticos e diabéticos, o que sugere que possa haver uma maior clivagem do precursor em ACTH em detrimento de outros peptídeos na hipófise dos animais diabéticos. Na literatura é relatada uma diminuição no conteúdo de β -endorfina na hipófise anterior de animais tornados diabetes após a administração de streptozotocina, modelo químico este semelhante ao utilizado no presente trabalho (188). Após o tratamento com rosiglitazona observamos uma redução significativa na expressão de POMC na hipófise dos animais diabéticos, o que sugerimos que se relacione com a referida redução nos níveis do hormônio ACTH mensurados na hipófise e no plasma dos animais.

Constatamos que o tratamento com rosiglitazona aumentou a expressão do seu receptor PPAR- γ tanto na hipófise como nas adrenais dos animais diabéticos. Como

mencionado anteriormente, substâncias capazes de induzir aumento na expressão do PPAR- γ em animais diabéticos tem apresentado importante participação na redução de complicações diabéticas (142). A importância do aumento da expressão do receptor nuclear estudado nas implicações do presente trabalho foi reafirmada com o bloqueio farmacológico do PPAR- γ . Reconhecidamente a molécula de rosiglitazona, bem como outros ligantes de PPAR- γ podem desempenhar papéis que independem do receptor nuclear, tanto na redução a resistência à insulina, como no caso de alguns efeitos anti-inflamatórios relacionados a inibição de vias de sinalização pró-inflamatórias (189, 190). Em nosso trabalho, o pré-tratamento dos animais diabéticos com o antagonista do PPAR- γ GW9662 foi capaz de impedir a redução nos níveis circulantes de corticosterona anteriormente observada após o tratamento com rosiglitazona. Dessa forma, no caso da redução nos níveis de glicocorticoides nos animais diabéticos tratados com o ligante agonista de PPAR- γ trata-se de um efeito dependente da ativação do receptor para o qual a molécula rosiglitazona foi sintetizada.

Em paralelo a esses dados, observamos que o ligante rosiglitazona também foi capaz de aumentar, nas adrenais e hipófise, a expressão da subunidade catalítica p110 α da cinase heterodimérica PI3K (classe 1A) o que acreditamos esteja relacionado com o mecanismo de redução da produção de POMC e conseqüentemente da ativação do eixo HPA nesses animais. O aumento da atividade e expressão da PI3K e AKT após o tratamento com agonistas de PPAR- γ é descrito na literatura, sendo inclusive o mecanismo mais aceito para a redução da resistência à insulina em indivíduos com diabetes do tipo 2 (191, 192).

No diabetes do tipo 1, os doentes apresentam não apenas redução nos níveis de insulina como também de leptina e prolactina, bem como aumento nos níveis de glucagon (85, 88, 193). Os hormônios leptina e prolactina, assim como a insulina, apresentam importante sinalização através da via intracelular da PI3K/AKT (194-197). Além disso, é reconhecida a ação da leptina no controle da hiperatividade do eixo HPA em resposta ao estresse em roedores, bem como sua eficácia na redução da produção de ACTH e cortisol em macacos rhesus (94, 97). Quanto a prolactina, estudos sugerem que níveis aumentados do hormônio se relacionam com redução na resposta a diferentes agentes estressores em roedores (101).

Por outro lado, a molécula de glucagon ao se ligar em seu receptor induz ativação de adenilato ciclase, aumento de AMPc e indução da proteína cinase A (PKA), mecanismo este envolvido com várias funções associadas ao hormônio (198, 199). De forma interessante, algumas substâncias com a capacidade de elevar os níveis de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), como no caso dos inibidores de fosfodiesterase do tipo 4 (PDE4), aumentam a atividade do eixo HPA com elevação dos níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona (200,

201). Dessa forma, o diabetes do tipo 1 se relaciona com a redução de pelo menos três hormônios que atuam pela via da PI3K, e que reconhecidamente apresentam capacidade de redução da atividade do eixo HPA, e aumento nos níveis de glucagon que ativa uma cascata de sinalização dependente de AMPc e envolvida com a ativação do eixo HPA. Além disso, algumas drogas antipsicóticas atuam reduzindo a expressão do hormônio hipotalâmico CRH, através da ativação de vias de sinalização dependentes da PI3K/AKT (202).

Sendo assim, o aumento na expressão da PI3K na hipófise e adrenais de animais diabéticos tratados com rosiglitazona se apresenta como provável alvo da droga no controle da funcionalidade do eixo HPA em animais diabéticos. Para comprovar a participação da cinase nos efeitos associados ao tratamento com rosiglitazona, realizamos o tratamento dos animais com o inibidor específico da PI3K wortmannin. Animais que receberam rosiglitazona e wortmannin apresentaram redução nos níveis de corticosterona significativamente aquém daquele verificado nos animais tratados somente com rosiglitazona. Esses achados são reafirmados na literatura, na medida em que trabalhos recentes *in vitro* sugerem a importância da via da PI3K/AKT não apenas na redução da produção de glicocorticoides com também na proteção a danos associados aos hormônios. Estudo com células do hipocampo de roedores aponta a ativação da PI3K e fosforilação de AKT como alvos de drogas que atuam reduzindo danos ocasionados pelos hormônios glicocorticoides (203). Além disso, a síntese de cortisol por células adrenais de ovinos induzida por ACTH é potencializada por wortmannin (204).

Dessa forma, acreditamos que nosso modelo de diabetes o tratamento com rosiglitazona é capaz de reduzir os vários parâmetros avaliados da hiperatividade do eixo HPA em um mecanismo, ao menos em parte, relacionado com o aumento da expressão da PI3K.

6 – Conclusões

O receptor nuclear PPAR- γ está envolvido com a regulação da atividade do eixo HPA em animais diabéticos na medida em que estes animais apresentam expressão diminuída do receptor e o tratamento com seu ligante agonista é capaz de aumentar essa expressão e reduzir marcadores da hiperatividade do eixo endócrino. Em adição, os efeitos relacionados ao tratamento com rosiglitazona são dependentes da ativação do PPAR- γ e da cinase PI3K, uma vez que tanto o uso de um antagonista do receptor PPAR- γ quanto de um inibidor da PI3K foram capazes de reduzir os efeitos do ligante sobre o produto final da ativação do eixo, o hormônio esteroide corticosterona. A importância do controle da atividade do eixo HPA nos animais diabéticos estudados é evidenciada a partir dos achados nos quais a inibição da atuação dos glicocorticoides com o uso do antagonista de seu receptor GR RU486 é capaz de restabelecer a resposta microvascular no músculo grácil bem como reduzir a atrofia do músculo gastrocnêmio dos animais. Dessa forma, sugerimos que a hiperatividade do eixo HPA em animais tornados diabéticos por administração de aloxana se relaciona com complicações do estado diabético e que a ativação do receptor nuclear PPAR- γ é importante para o controle da atividade do eixo, surgindo como um possível alvo no controle de complicações da doença (Figura 6.1).

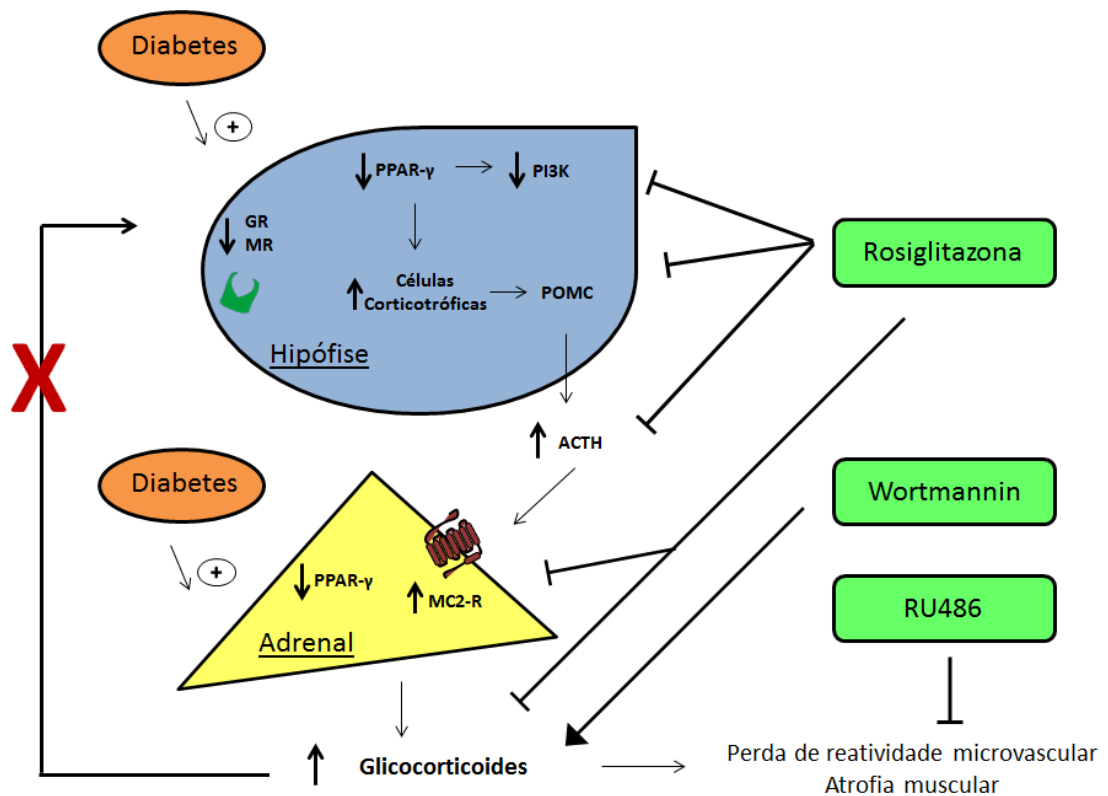


Figura 6.1 – Representação esquemática do possível mecanismo envolvido na restauração da reatividade do eixo HPA em animais diabéticos tratados com rosiglitazona. O estado diabético caracteriza-se por hiperatividade do eixo HPA com redução na expressão do receptor nuclear PPAR- γ e da PI3K na hipófise, em paralelo com o aumento na produção e liberação de ACTH. Níveis elevados deste hormônio peptídico no plasma e elevada expressão de seu receptor MC2-R nas adrenais se relacionam com o aumento nos níveis quantificados de corticosterona. O papel dos glicocorticoides na atrofia muscular e comprometimento da reatividade microvascular muscular foi evidenciado pela redução destas alterações após o tratamento com o antagonista RU486. Além disso, o tratamento com rosiglitazona foi capaz de aumentar a expressão de PPAR- γ e PI3K, bem como reduzir os níveis de POMC e ACTH da hipófise de animais diabéticos. Esses achados em associação com o aumento da expressão de PPAR- γ e PI3K e redução de MC2-R nas adrenais culminaram com a reversão da hipercortisolemia diabética, de forma independente do restabelecimento do mecanismo de controle por retroalimentação do eixo na hipófise. A participação da PI3K nos efeitos atribuídos a rosiglitazona foram demonstrados com a inibição da cinase utilizando-se wortmannin e a consequente redução do efeito da rosiglitazona sobre os níveis de glicocorticoides circulantes.

7 – Referências Bibliográficas

1. King KM, Rubin G. A history of diabetes: from antiquity to discovering insulin. *Br J Nurs*. 2003;12(18):1091-5. Epub 2003/10/29.
2. Rigby D, Gray K. Understanding urine testing. *Nursing times*. 2005;101(12):60-2. Epub 2005/04/13.
3. Ribatti D. William Harvey and the discovery of the circulation of the blood. *Journal of angiogenesis research*. 2009;1:3. Epub 2009/12/01.
4. Eknoyan G, Nagy J. A history of diabetes mellitus or how a disease of the kidneys evolved into a kidney disease. *Advances in chronic kidney disease*. 2005;12(2):223-9. Epub 2005/04/12.
5. Jorgens V. Oskar Minkowski (1858-1931). An outstanding master of diabetes research. *Hormones (Athens)*. 2006;5(4):310-1. Epub 2006/12/21.
6. Rosenfeld L. Insulin: discovery and controversy. *Clinical chemistry*. 2002;48(12):2270-88. Epub 2002/11/26.
7. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiological reviews*. 2011;91(1):79-118. Epub 2011/01/21.
8. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jorns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*. 2005;54 Suppl 2:S97-107. Epub 2005/11/25.
9. Ohneda M, Johnson JH, Inman LR, Unger RH. GLUT-2 function in glucose-unresponsive beta cells of dexamethasone-induced diabetes in rats. *The Journal of clinical investigation*. 1993;92(4):1950-6. Epub 1993/10/01.
10. Leney SE, Tavaré JM. The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling, trafficking and potential drug targets. *The Journal of endocrinology*. 2009;203(1):1-18. Epub 2009/04/25.
11. World Health Organization, WHO. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. 2006.
12. Nerenberg K, Daskalopoulou SS, Dasgupta K. Gestational diabetes and hypertensive disorders of pregnancy as vascular risk signals: an overview and grading of the evidence. *The Canadian journal of cardiology*. 2014;30(7):765-73. Epub 2014/04/15.
13. Todd JA. Etiology of type 1 diabetes. *Immunity*. 2010;32(4):457-67. Epub 2010/04/24.
14. Jaidane H, Hober D. Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes & metabolism*. 2008;34(6 Pt 1):537-48. Epub 2008/10/28.
15. Wolfsdorf J, Craig ME, Daneman D, Dunger D, Edge J, Lee W, et al. Diabetic ketoacidosis in children and adolescents with diabetes. *Pediatric diabetes*. 2009;10 Suppl 12:118-33. Epub 2009/09/17.
16. Raslova K. An update on the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus: focus on insulin detemir, a long-acting human insulin analog. *Vascular health and risk management*. 2010;6:399-410. Epub 2010/06/12.
17. Malecki MT, Klupa T. Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. *Pharmacological reports : PR*. 2005;57 Suppl:20-32. Epub 2006/01/18.
18. Silva JLT, Barbosa DS, Oliveira JA, Guedes DP. Distribuição Centrípeta da Gordura Corporal, Sobrepeso e Aptidão Cardiorrespiratória: Associação Com Sensibilidade Insulínica e Alterações Metabólicas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006;50(6):1034-40.
19. Jung CH, Jang JE, Park JY. A Novel Therapeutic Agent for Type 2 Diabetes Mellitus: SGLT2 Inhibitor. *Diabetes & metabolism journal*. 2014;38(4):261-73. Epub 2014/09/13.

20. Metzger BE. Long-term outcomes in mothers diagnosed with gestational diabetes mellitus and their offspring. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2007;50(4):972-9. Epub 2007/11/06.
21. Abourawi FI. Diabetes mellitus and pregnancy. *The Libyan journal of medicine*. 2006;1(1):28-41. Epub 2006/01/01.
22. Buchanan TA, Xiang AH, Page KA. Gestational diabetes mellitus: risks and management during and after pregnancy. *Nature reviews Endocrinology*. 2012;8(11):639-49. Epub 2012/07/04.
23. Bental Y, Reichman B, Shiff Y, Weisbrod M, Boyko V, Lerner-Geva L, et al. Impact of maternal diabetes mellitus on mortality and morbidity of preterm infants (24-33 weeks' gestation). *Pediatrics*. 2011;128(4):e848-55. Epub 2011/09/21.
24. King H, Rewers M. Diabetes in adults is now a Third World problem. *World Health Organization Ad Hoc Diabetes Reporting Group. Ethnicity & disease*. 1993;3 Suppl:S67-74. Epub 1993/01/01.
25. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 6th edn*. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation. 2013.
26. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2014;37 Suppl 1:S81-90. Epub 2013/12/21.
27. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Diabetes mellitus gestacional. *Rev Assoc Med Bras*. 2008;54(6):471-86.
28. Gordon CS, Serino AS, Krause MP, Campbell JE, Cafarelli E, Adegoke OA, et al. Impaired growth and force production in skeletal muscles of young partially pancreatectomized rats: a model of adolescent type 1 diabetic myopathy? *PLoS one*. 2010;5(11):e14032. Epub 2010/11/26.
29. de la Monte SM, Tong M, Lawton M, Longato L. Nitrosamine exposure exacerbates high fat diet-mediated type 2 diabetes mellitus, non-alcoholic steatohepatitis, and neurodegeneration with cognitive impairment. *Molecular neurodegeneration*. 2009;4:54. Epub 2009/12/26.
30. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216-26. Epub 2007/12/19.
31. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo*. 2009;23(2):245-58. Epub 2009/05/06.
32. Driver JP, Serreze DV, Chen YG. Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Seminars in immunopathology*. 2011;33(1):67-87. Epub 2010/04/29.
33. Thayer TC, Wilson SB, Mathews CE. Use of nonobese diabetic mice to understand human type 1 diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2010;39(3):541-61. Epub 2010/08/21.
34. Kirsten VR, Sesterheim P, Saitovitch D. Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. *Medicina*. 2010;43(1):3-10.
35. Bortell R, Yang C. The BB rat as a model of human type 1 diabetes. *Methods Mol Biol*. 2012;933:31-44. Epub 2012/08/16.
36. Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Current diabetes reviews*. 2014;10(2):131-45. Epub 2014/05/09.
37. Jun HS, Yoon JW. A new look at viruses in type 1 diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2003;19(1):8-31. Epub 2003/02/20.
38. Craig ME, Nair S, Stein H, Rawlinson WD. Viruses and type 1 diabetes: a new look at an old story. *Pediatric diabetes*. 2013;14(3):149-58. Epub 2013/03/23.

39. Graham KL, Sanders N, Tan Y, Allison J, Kay TW, Coulson BS. Rotavirus infection accelerates type 1 diabetes in mice with established insulinitis. *Journal of virology*. 2008;82(13):6139-49. Epub 2008/04/18.
40. Ginsberg-Fellner F, Witt ME, Yagihashi S, Dobersen MJ, Taub F, Fedun B, et al. Congenital rubella syndrome as a model for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: increased prevalence of islet cell surface antibodies. *Diabetologia*. 1984;27 Suppl:87-9. Epub 1984/07/01.
41. Craighead JE, McLane MF. Diabetes mellitus: induction in mice by encephalomyocarditis virus. *Science*. 1968;162(3856):913-4. Epub 1968/11/22.
42. Winzell MS, Ahren B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 3:S215-9. Epub 2004/11/25.
43. Kin T, Korbitt GS, Kobayashi T, Dufour JM, Rajotte RV. Reversal of diabetes in pancreatectomized pigs after transplantation of neonatal porcine islets. *Diabetes*. 2005;54(4):1032-9. Epub 2005/03/29.
44. Lenzen S, Panten U. Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia*. 1988;31(6):337-42. Epub 1988/06/01.
45. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2001;50(6):537-46. Epub 2002/02/07.
46. Padgett LE, Broniowska KA, Hansen PA, Corbett JA, Tse HM. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013;1281:16-35. Epub 2013/01/18.
47. Tse HM, Milton MJ, Schreiner S, Profozich JL, Trucco M, Piganelli JD. Disruption of innate-mediated proinflammatory cytokine and reactive oxygen species third signal leads to antigen-specific hyporesponsiveness. *J Immunol*. 2007;178(2):908-17. Epub 2007/01/05.
48. Lenzen S, Munday R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochemical pharmacology*. 1991;42(7):1385-91. Epub 1991/09/12.
49. Szkudelski T, Kandulska K, Okulicz M. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 1998;47(5):343-6. Epub 1999/03/03.
50. Samadder A, Chakraborty D, De A, Bhattacharyya SS, Bhadra K, Khuda-Bukhsh AR. Possible signaling cascades involved in attenuation of alloxan-induced oxidative stress and hyperglycemia in mice by ethanolic extract of *Syzygium jambolanum*: drug-DNA interaction with calf thymus DNA as target. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2011;44(3):207-17. Epub 2011/08/16.
51. Braquehais MD, Picouto MD, Casas M, Sher L. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction as a neurobiological correlate of emotion dysregulation in adolescent suicide. *World journal of pediatrics : WJP*. 2012;8(3):197-206. Epub 2012/08/14.
52. Barnes PJ. Glucocorticosteroids: current and future directions. *British journal of pharmacology*. 2011;163(1):29-43. Epub 2011/01/05.
53. Roper J, O'Carroll AM, Young W, 3rd, Lolait S. The vasopressin Avpr1b receptor: molecular and pharmacological studies. *Stress*. 2011;14(1):98-115. Epub 2010/09/11.
54. Nader N, Chrousos GP, Kino T. Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2010;21(5):277-86. Epub 2010/01/29.

55. Charmandari E, Chrousos GP, Lambrou GI, Pavlaki A, Koide H, Ng SS, et al. Peripheral CLOCK regulates target-tissue glucocorticoid receptor transcriptional activity in a circadian fashion in man. *PloS one*. 2011;6(9):e25612. Epub 2011/10/08.
56. Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *The Journal of endocrinology*. 2007;195(2):187-98. Epub 2007/10/24.
57. Son GH, Chung S, Kim K. The adrenal peripheral clock: glucocorticoid and the circadian timing system. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2011;32(4):451-65. Epub 2011/08/02.
58. Son GH, Chung S, Choe HK, Kim HD, Baik SM, Lee H, et al. Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(52):20970-5. Epub 2008/12/19.
59. Armario A. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS & neurological disorders drug targets*. 2006;5(5):485-501. Epub 2006/11/01.
60. Kageyama K, Suda T. Role and action in the pituitary corticotroph of corticotropin-releasing factor (CRF) in the hypothalamus. *Peptides*. 2009;30(4):810-6. Epub 2009/01/07.
61. Wardlaw SL. Hypothalamic proopiomelanocortin processing and the regulation of energy balance. *European journal of pharmacology*. 2011;660(1):213-9. Epub 2011/01/07.
62. Gorrigan RJ, Guasti L, King P, Clark AJ, Chan LF. Localisation of the melanocortin-2-receptor and its accessory proteins in the developing and adult adrenal gland. *Journal of molecular endocrinology*. 2011;46(3):227-32. Epub 2011/03/04.
63. Davies E, MacKenzie SM. Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2003;30(7):437-45. Epub 2003/06/26.
64. Rose AJ, Vegiopoulos A, Herzig S. Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: insights from genetic manipulations. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010;122(1-3):10-20. Epub 2010/02/23.
65. Herman JP, McKlveen JM, Solomon MB, Carvalho-Netto E, Myers B. Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2012;45(4):292-8. Epub 2012/03/28.
66. Faravelli C, Lo Sauro C, Lelli L, Pietrini F, Lazzeretti L, Godini L, et al. The Role of Life Events and HPA Axis in Anxiety Disorders: A Review. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(35):5663-74. Epub 2012/05/29.
67. Feng B, Liu JC, Zhang J, Ozaki KI, Guo YY, Yi DH, et al. Anxiolytic Actions of Motilin in the Basolateral Amygdala Molecular neurobiology. 2013;[Epub ahead of print] 2013/01/12. Epub 2013/01/12.
68. McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain research*. 2000;886(1-2):172-89. Epub 2000/12/20.
69. Evanson NK, Tasker JG, Hill MN, Hillard CJ, Herman JP. Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. *Endocrinology*. 2010;151(10):4811-9. Epub 2010/08/13.
70. Ginsberg AB, Campeau S, Day HE, Spencer RL. Acute glucocorticoid pretreatment suppresses stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormone secretion and expression of corticotropin-releasing hormone hnRNA but does not affect c-fos mRNA or fos protein expression in the paraventricular nucleus

- of the hypothalamus. *Journal of neuroendocrinology*. 2003;15(11):1075-83. Epub 2003/11/19.
71. Heitzer MD, Wolf IM, Sanchez ER, Witchel SF, DeFranco DB. Glucocorticoid receptor physiology. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2007;8(4):321-30. Epub 2007/12/01.
72. Laryea G, Schutz G, Muglia LJ. Disrupting hypothalamic glucocorticoid receptors causes HPA axis hyperactivity and excess adiposity. *Mol Endocrinol*. 2013;27(10):1655-65. Epub 2013/08/28.
73. Bisschop PH, Dekker MJ, Osterthun W, Kwakkel J, Anink JJ, Boelen A, et al. Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the human hypothalamus. *Journal of neuroendocrinology*. 2013;[Epub ahead of print] 2013/01/05. Epub 2013/01/05.
74. Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(12):4850-7. Epub 2003/07/02.
75. Rodriguez Calvin JL, Zapatero Gaviria A, Martin Rios MD. Prevalence of depression in type 2 diabetes mellitus. *Revista clinica espanola*. 2014. Epub 2014/11/30. Prevalencia de la depresion en la diabetes mellitus tipo 2.
76. Arnaldi G, Mancini T, Tirabassi G, Trementino L, Boscaro M. Advances in the epidemiology, pathogenesis, and management of Cushing's syndrome complications. *Journal of endocrinological investigation*. 2012;35(4):434-48. Epub 2012/06/02.
77. Grossman E, Messerli FH. Hypertension and diabetes. *Advances in cardiology*. 2008;45:82-106. Epub 2008/01/31.
78. Roy M, Collier B, Roy A. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation among diabetic outpatients. *Psychiatry research*. 1990;31(1):31-7. Epub 1990/01/01.
79. Roy MS, Roy A, Brown S. Increased urinary-free cortisol outputs in diabetic patients. *Journal of diabetes and its complications*. 1998;12(1):24-7. Epub 1998/01/27.
80. Chan O, Inouye K, Vranic M, Matthews SG. Hyperactivation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in streptozotocin-diabetes is associated with reduced stress responsiveness and decreased pituitary and adrenal sensitivity. *Endocrinology*. 2002;143(5):1761-8. Epub 2002/04/17.
81. Silva PMRE, Carvalho VF, Cordeiro RSB, Martins MA. Down-Regulation of Allergic Responses in Conditions of Experimental Diabetes: A Role for Glucocorticoids? *Neuroimmunomodulat*. 2009;16(1):13-8.
82. Powers JW, Mazilu JK, Lin S, McCabe ER. The effects of hyperglycemia on adrenal cortex function and steroidogenesis in the zebrafish. *Molecular genetics and metabolism*. 2010;101(4):421-2. Epub 2010/10/22.
83. Astort F, Repetto EM, Martinez Calejman C, Cipelli JM, Sanchez R, Di Gruccio JM, et al. High glucose-induced changes in steroid production in adrenal cells. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2009;25(5):477-86. Epub 2009/06/03.
84. Carvalho VF, Barreto EO, Serra MF, Cordeiro RS, Martins MA, Fortes ZB, et al. Aldose reductase inhibitor zopolrestat restores allergic hyporesponsiveness in alloxan-diabetic rats. *European journal of pharmacology*. 2006;549(1-3):173-8. Epub 2006/09/19.
85. Chan O, Chan S, Inouye K, Vranic M, Matthews SG. Molecular regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in streptozotocin-induced diabetes: effects of insulin treatment. *Endocrinology*. 2001;142(11):4872-9. Epub 2001/10/19.
86. Torres R, Prevatto J, Silva P, Martins M, Carvalho V. From Type-1 Diabetes HPA Axis to the Disease Complications. *J Diabetes Metab*. 2013;S12:002.

87. Wang J, Obici S, Morgan K, Barzilai N, Feng Z, Rossetti L. Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes*. 2001;50(12):2786-91. Epub 2001/11/28.
88. Wang T, Lu J, Xu Y, Li M, Sun J, Zhang J, et al. Circulating Prolactin Associates With Diabetes and Impaired Glucose Regulation: A population-based study. *Diabetes care*. 2013;[Epub ahead of print] 2013/01/24. Epub 2013/01/24.
89. Unger RH. Role of glucagon in the pathogenesis of diabetes: the status of the controversy. *Metabolism: clinical and experimental*. 1978;27(11):1691-709. Epub 1978/11/01.
90. Perry RJ, Zhang XM, Zhang D, Kumashiro N, Camporez JP, Cline GW, et al. Leptin reverses diabetes by suppression of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Nature medicine*. 2014;20(7):759-63. Epub 2014/06/16.
91. Littley MD, Gibson S, White A, Shalet SM. Comparison of the ACTH and cortisol responses to provocative testing with glucagon and insulin hypoglycaemia in normal subjects. *Clinical endocrinology*. 1989;31(5):527-33. Epub 1989/11/01.
92. Waldhausl W, Haydl H, Nowotny P. ACTH and cortisol responses to glucagon stimulation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1976;43(3):675-8. Epub 1976/09/01.
93. Honda K, Kamisoyama H, Uemura T, Yanagi T, Saito N, Kurose Y, et al. The mechanism underlying the central glucagon-induced hyperglycemia and anorexia in chicks. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology*. 2012;163(3-4):260-4. Epub 2012/08/23.
94. Roubos EW, Dahmen M, Kozicz T, Xu L. Leptin and the hypothalamo-pituitary-adrenal stress axis. *General and comparative endocrinology*. 2012;177(1):28-36. Epub 2012/02/02.
95. Malendowicz LK, Rucinski M, Belloni AS, Ziolkowska A, Nussdorfer GG. Leptin and the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *International review of cytology*. 2007;263:63-102. Epub 2007/08/30.
96. Pralong FP, Roduit R, Waeber G, Castillo E, Mosimann F, Thorens B, et al. Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology*. 1998;139(10):4264-8. Epub 1998/09/29.
97. Wilson ME, Fisher J, Brown J. Chronic subcutaneous leptin infusion diminishes the responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in female rhesus monkeys. *Physiology & behavior*. 2005;84(3):449-58. Epub 2005/03/15.
98. Holstad M, Sandler S. Prolactin protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. *The Journal of endocrinology*. 1999;163(2):229-34. Epub 1999/11/11.
99. Labriola L, Montor WR, Krogh K, Lojudice FH, Genzini T, Goldberg AC, et al. Beneficial effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet-cell cultures. *Molecular and cellular endocrinology*. 2007;263(1-2):120-33. Epub 2006/11/04.
100. Seggie JA, Brown GM. Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin, and growth hormone in the rat, following handling or exposure to novel environment. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1975;53(4):629-37. Epub 1975/08/01.
101. Schlein PA, Zarrow MX, Denenberg VH. The role of prolactin in the depressed or 'buffered' adrenocorticosteroid response of the rat. *The Journal of endocrinology*. 1974;62(1):93-9. Epub 1974/07/01.
102. Lepletier A, de Frias Carvalho V, Morrot A, Savino W. Thymic atrophy in acute experimental Chagas disease is associated with an imbalance of stress hormones. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1262:45-50. Epub 2012/07/25.

103. International Diabetes Federation IDF. Diabetes Atlas, 5th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation. 2011.
104. Zoja C, Cattaneo S, Fiordaliso F, Lionetti V, Zambelli V, Salio M, et al. Distinct cardiac and renal effects of ETA receptor antagonist and ACE inhibitor in experimental type 2 diabetes. *American journal of physiology Renal physiology*. 2011;301(5):F1114-23. Epub 2011/08/06.
105. Imam K. Clinical features, diagnostic criteria and pathogenesis of diabetes mellitus. *Advances in experimental medicine and biology*. 2012;771:340-55. Epub 2013/02/09.
106. Heltianu C, Guja C. Role of Nitric Oxide Synthase Family in Diabetic Neuropathy. *J Diabetes Metab*. 2011;S5:002.
107. Kytö JP, Lindström-Karjalainen M, Summanen PA. Not Only Diabetic Retinopathy - Retinal Vascular Lesions and Signs in Diabetic Patients: Description and Associations. *J Diabetes Metab*. 2012;S3:003.
108. Mongkolsomlit S, Rawdaree P, Komoltri C, Tawichasri C, Patumanond aJ. Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and/or Angiotensin Receptor Blockers on the Prevention of Death in Patients with Type 2 Diabetes and Undetermined Nephropathy : Five-Year Survival Data. *J Diabetes Metab*. 2012;3:188.
109. Carnethon MR, Biggs ML, Barzilay J, Kuller LH, Mozaffarian D, Mukamal K, et al. Diabetes and coronary heart disease as risk factors for mortality in older adults. *The American journal of medicine*. 2010;123(6):556 e1-9. Epub 2010/06/24.
110. Lomas-Soria C, Ramos-Gomez M, Guevara-Olvera L, Guevara-Gonzalez R, Torres-Pacheco I, Gallegos-Corona MA, et al. Transcriptomic analysis in diabetic nephropathy of streptozotocin-induced diabetic rats. *International journal of molecular sciences*. 2011;12(12):8431-48. Epub 2012/01/25.
111. Chatziralli IP, Sergentanis TN, Keryttopoulos P, Vatkalis N, Agorastos A, Papazisis L. Risk factors associated with diabetic retinopathy in patients with diabetes mellitus type 2. *BMC research notes*. 2010;3:153. Epub 2010/06/03.
112. Johannesson A, Larsson GU, Ramstrand N, Turkiewicz A, Wirehn AB, Atroshi I. Incidence of lower-limb amputation in the diabetic and nondiabetic general population: a 10-year population-based cohort study of initial unilateral and contralateral amputations and reamputations. *Diabetes care*. 2009;32(2):275-80. Epub 2008/11/13.
113. Carvalho VF, Barreto EO, Diaz BL, Serra MF, Azevedo V, Cordeiro RS, et al. Systemic anaphylaxis is prevented in alloxan-diabetic rats by a mechanism dependent on glucocorticoids. *European journal of pharmacology*. 2003;472(3):221-7. Epub 2003/07/23.
114. Diaz BL, Serra MF, Barreto EO, Cordeiro RS, Martins MA, e Silva PM. Antigen-induced pleural eosinophilia is suppressed in diabetic rats: role of corticosteroid hormones. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1997;92 Suppl 2:219-22. Epub 1997/01/01.
115. Bitar MS, Farook T, Wahid S, Francis IM. Glucocorticoid-dependent impairment of wound healing in experimental diabetes: amelioration by adrenalectomy and RU 486. *J Surg Res*. 1999;82(2):234-43. Epub 1999/03/26.
116. Bruhn-Olszewska B, Korzon-Burakowska A, Gabig-Ciminska M, Olszewski P, Wegrzyn A, Jakobkiewicz-Banecka J. Molecular factors involved in the development of diabetic foot syndrome. *Acta biochimica Polonica*. 2012;59(4):507-13. Epub 2012/12/20.
117. de Wit M, Wiaterek GK, Gray ND, Goulet KE, Best AM, Clore JN, et al. Relationship between alcohol use disorders, cortisol concentrations, and cytokine levels in patients with sepsis. *Crit Care*. 2010;14(6):R230. Epub 2010/12/24.

118. Pitchot W, Herrera C, Anseau M. HPA axis dysfunction in major depression: relationship to 5-HT(1A) receptor activity. *Neuropsychobiology*. 2001;44(2):74-7. Epub 2001/08/08.
119. Meerwaldt R, Odink RJ, Landaeta R, Aarts F, Brunekreef B, Gerritsen J, et al. A lower prevalence of atopy symptoms in children with type 1 diabetes mellitus. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(2):254-5. Epub 2002/04/04.
120. Muller LM, Gorter KJ, Hak E, Goudzwaard WL, Schellevis FG, Hoepelman AI, et al. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;41(3):281-8. Epub 2005/07/12.
121. Koh GC, Peacock SJ, van der Poll T, Wiersinga WJ. The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(4):379-88. Epub 2011/08/02.
122. Dooley KE, Chaisson RE. Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(12):737-46. Epub 2009/11/21.
123. Jick SS, Lieberman ES, Rahman MU, Choi HK. Glucocorticoid use, other associated factors, and the risk of tuberculosis. *Arthritis Rheum*. 2006;55(1):19-26. Epub 2006/02/08.
124. Christ-Crain M, Opal SM. Clinical review: the role of biomarkers in the diagnosis and management of community-acquired pneumonia. *Crit Care*. 2010;14(1):203. Epub 2010/03/20.
125. Brown DH, Lafuse WP, Zwilling BS. Host resistance to mycobacteria is compromised by activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;840:773-86. Epub 1998/06/18.
126. Baid S, Nieman LK. Glucocorticoid excess and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2004;6(6):493-9. Epub 2004/11/06.
127. Frey FJ, Odermatt A, Frey BM. Glucocorticoid-mediated mineralocorticoid receptor activation and hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2004;13(4):451-8. Epub 2004/06/17.
128. Sato A, Suzuki H, Nakazato Y, Shibata H, Inagami T, Saruta T. Increased expression of vascular angiotensin II type 1A receptor gene in glucocorticoid-induced hypertension. *J Hypertens*. 1994;12(5):511-6. Epub 1994/05/01.
129. Aras-Lopez R, Xavier FE, Ferrer M, Balfagon G. Dexamethasone decreases neuronal nitric oxide release in mesenteric arteries from hypertensive rats through decreased protein kinase C activation. *Clin Sci (Lond)*. 2009;117(8):305-12. Epub 2009/03/10.
130. Mangiapane H. Cardiovascular disease and diabetes. *Adv Exp Med Biol*. 2012;771:219-28. Epub 2013/02/09.
131. Fantidis P. The role of the stress-related anti-inflammatory hormones ACTH and cortisol in atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010;8(4):517-25. Epub 2009/06/03.
132. Garcia RA, Search DJ, Lupisella JA, Ostrowski J, Guan B, Chen J, et al. 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Gene Knockout Attenuates Atherosclerosis and In Vivo Foam Cell Formation in Hyperlipidemic apoE(-/-) Mice. *PloS one*. 2013;8(2):e53192. Epub 2013/02/06.
133. Hadoke PW, Iqbal J, Walker BR. Therapeutic manipulation of glucocorticoid metabolism in cardiovascular disease. *Br J Pharmacol*. 2009;156(5):689-712. Epub 2009/02/26.
134. Cheng G, Huang C, Deng H, Wang H. Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies. *Intern Med J*. 2012;42(5):484-91. Epub 2012/03/01.

135. Sugimoto K, Yasujima M, Yagihashi S. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr Pharm Des.* 2008;14(10):953-61. Epub 2008/05/14.
136. Wada R, Yagihashi S. Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2005;1043:598-604. Epub 2005/07/23.
137. Sima AA, Zhang W, Grunberger G. Type 1 diabetic neuropathy and C-peptide. *Exp Diabetes Res.* 2004;5(1):65-77. Epub 2004/06/17.
138. Vincent AM, Callaghan BC, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nat Rev Neurol.* 2011;7(10):573-83. Epub 2011/09/14.
139. Stranahan AM, Arumugam TV, Cutler RG, Lee K, Egan JM, Mattson MP. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci.* 2008;11(3):309-17. Epub 2008/02/19.
140. Brureau A, Zussy C, Delair B, Ogier C, Ixart G, Maurice T, et al. Deregulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis functions in an Alzheimer's disease rat model. *Neurobiol Aging.* 2013;34(5):1426-39. Epub 2013/01/01.
141. Valassi E, Crespo I, Santos A, Webb SM. Clinical consequences of Cushing's syndrome. *Pituitary.* 2012;15(3):319-29. Epub 2012/04/25.
142. Wang F, Gao L, Gong B, Hu J, Li M, Guan Q, et al. Tissue-specific expression of PPAR mRNAs in diabetic rats and divergent effects of cilostazol. *Can J Physiol Pharmacol.* 2008;86(7):465-71. Epub 2008/07/22.
143. Ambrosi B, Dall'Asta C, Cannavo S, Libe R, Vigo T, Epaminonda P, et al. Effects of chronic administration of PPAR-gamma ligand rosiglitazone in Cushing's disease. *Eur J Endocrinol.* 2004;151(2):173-8. Epub 2004/08/07.
144. Cho N, Momose Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as insulin sensitizers: from the discovery to recent progress. *Current topics in medicinal chemistry.* 2008;8(17):1483-507. Epub 2008/12/17.
145. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990;347(6294):645-50. Epub 1990/10/18.
146. Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research.* 2011;2(4):236-40. Epub 2012/01/17.
147. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes & development.* 2000;14(2):121-41. Epub 2000/02/01.
148. Chandra V, Huang P, Hamuro Y, Raghuram S, Wang Y, Burriss TP, et al. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature.* 2008;456(7220):350-6. Epub 2008/12/02.
149. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annual review of medicine.* 2002;53:409-35. Epub 2002/01/31.
150. Castrillo A, Tontonoz P. Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annual review of cell and developmental biology.* 2004;20:455-80. Epub 2004/10/12.
151. Ehrenborg E, Krook A. Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Pharmacological reviews.* 2009;61(3):373-93. Epub 2009/10/07.
152. Qi WW, Zhong LY, Li XR, Li G, Liu ZX, Hu JF, et al. Hyperglycemia induces the variations of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and peroxisome

- proliferator-activated receptor-gamma expression in hippocampus and hypothalamus of diabetic rats. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:107130. Epub 2012/07/14.
153. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994;79(7):1147-56. Epub 1994/12/30.
154. Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature*. 2008;454(7203):470-7. Epub 2008/07/25.
155. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(22):12953-6. Epub 1995/06/02.
156. Fucci A, Colangelo T, Votino C, Pancione M, Sabatino L, Colantuoni V. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in the esophageal, gastric, and colorectal cancer. *PPAR research*. 2012;2012:242498. Epub 2012/09/20.
157. Consoli A, Formoso G. Do thiazolidinediones still have a role in treatment of type 2 diabetes mellitus? *Diabetes, obesity & metabolism*. 2013;15(11):967-77. Epub 2013/03/26.
158. Derosa G. Efficacy and tolerability of pioglitazone in patients with type 2 diabetes mellitus: comparison with other oral antihyperglycaemic agents. *Drugs*. 2010;70(15):1945-61. Epub 2010/10/05.
159. Hauner H. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2002;18 Suppl 2:S10-5. Epub 2002/03/29.
160. Tjokroprawiro A. New approach in the treatment of T2DM and metabolic syndrome (focus on a novel insulin sensitizer). *Acta medica Indonesiana*. 2006;38(3):160-6. Epub 2006/11/23.
161. Rieusset J, Chambrier C, Bouzakri K, Dusserre E, Auwerx J, Riou JP, et al. The expression of the p85alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase is induced by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human adipocytes. *Diabetologia*. 2001;44(5):544-54. Epub 2001/05/31.
162. Gallagher AM, Smeeth L, Seabroke S, Leufkens HG, van Staa TP. Risk of death and cardiovascular outcomes with thiazolidinediones: a study with the general practice research database and secondary care data. *PloS one*. 2011;6(12):e28157. Epub 2011/12/14.
163. Feldman PL, Lambert MH, Henke BR. PPAR modulators and PPAR pan agonists for metabolic diseases: the next generation of drugs targeting peroxisome proliferator-activated receptors? *Current topics in medicinal chemistry*. 2008;8(9):728-49. Epub 2008/06/10.
164. Chang CH, Lin JW, Wu LC, Lai MS, Chuang LM, Chan KA. Association of thiazolidinediones with liver cancer and colorectal cancer in type 2 diabetes mellitus. *Hepatology*. 2012;55(5):1462-72. Epub 2011/12/03.
165. Tawfik A, Sanders T, Kahook K, Akeel S, Elmarakby A, Al-Shabrawey M. Suppression of retinal peroxisome proliferator-activated receptor gamma in experimental diabetes and oxygen-induced retinopathy: role of NADPH oxidase. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(2):878-84. Epub 2008/09/23.
166. Yousefipour Z, Hercule H, Truong L, Oyekan A, Newaz M. Ciglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma inducer, ameliorates renal preglomerular production and activity of angiotensin II and thromboxane A2 in glycerol-induced acute renal failure. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2007;322(2):461-8. Epub 2007/05/15.
167. Fuentes E, Palomo I. Mechanism of antiplatelet action of hypolipidemic, antidiabetic and antihypertensive drugs by PPAR activation: PPAR agonists: new antiplatelet agents. *Vascular pharmacology*. 2014;62(3):162-6. Epub 2014/05/31.

168. Wiesner G, Morash BA, Ur E, Wilkinson M. Food restriction regulates adipose-specific cytokines in pituitary gland but not in hypothalamus. *The Journal of endocrinology*. 2004;180(3):R1-6. Epub 2004/03/12.
169. Zaripheh S, Nara TY, Nakamura MT, Erdman JW, Jr. Dietary lycopene downregulates carotenoid 15,15'-monooxygenase and PPAR-gamma in selected rat tissues. *J Nutr*. 2006;136(4):932-8. Epub 2006/03/22.
170. Heaney AP, Fernando M, Yong WH, Melmed S. Functional PPAR-gamma receptor is a novel therapeutic target for ACTH-secreting pituitary adenomas. *Nat Med*. 2002;8(11):1281-7. Epub 2002/10/16.
171. Pedersen WA, McMillan PJ, Kulstad JJ, Leverenz JB, Craft S, Haynatzki GR. Rosiglitazone attenuates learning and memory deficits in Tg2576 Alzheimer mice. *Exp Neurol*. 2006;199(2):265-73. Epub 2006/03/07.
172. Beuschlein F, Mutch C, Bavers DL, Ulrich-Lai YM, Engeland WC, Keegan C, et al. Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. *Endocrinology*. 2002;143(8):3122-35. Epub 2002/07/20.
173. Cordovil I, Huguenin G, Rosa G, Bello A, Kohler O, de Moraes R, et al. Evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging. *Microvascular research*. 2012;83(3):376-9. Epub 2012/02/14.
174. Diaz BL, Serra MF, Alves AC, Pires AL, Correa FM, Cordeiro RS, et al. Alloxan diabetes reduces pleural mast cell numbers and the subsequent eosinophil influx induced by allergen in sensitized rats. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996;111(1):36-43. Epub 1996/09/01.
175. Torres RC, Batista MM, Pons AH, Silva AR, Cordeiro RS, Martins MA, et al. Activation of PPARgamma by restores mast cell numbers and reactivity in alloxan-diabetic rats by reducing the systemic glucocorticoid levels. *European journal of pharmacology*. 2012;691(1-3):261-7. Epub 2012/06/21.
176. Liamis G, Liberopoulos E, Barkas F, Elisaf M. Diabetes mellitus and electrolyte disorders. *World journal of clinical cases*. 2014;2(10):488-96. Epub 2014/10/18.
177. Karakelides H, Asmann YW, Bigelow ML, Short KR, Dhatariya K, Coenen-Schimke J, et al. Effect of insulin deprivation on muscle mitochondrial ATP production and gene transcript levels in type 1 diabetic subjects. *Diabetes*. 2007;56(11):2683-9. Epub 2007/07/31.
178. Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, et al. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell metabolism*. 2011;13(2):170-82. Epub 2011/02/03.
179. Braun TP, Marks DL. The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids. *Frontiers in physiology*. 2015;6:12. Epub 2015/02/19.
180. Bitar MS, Al-Mulla F. ROS constitute a convergence nexus in the development of IGF1 resistance and impaired wound healing in a rat model of type 2 diabetes. *Dis Model Mech*. 2012;5(3):375-88. Epub 2012/03/01.
181. Catalano PM, Nizielski SE, Shao J, Preston L, Qiao L, Friedman JE. Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2002;282(3):E522-33. Epub 2002/02/08.
182. Yaacob NS, Kaderi MA, Norazmi MN. Differential transcriptional expression of PPARalpha, PPARgamma1, and PPARgamma2 in the peritoneal macrophages and T-cell subsets of non-obese diabetic mice. *Journal of clinical immunology*. 2009;29(5):595-602. Epub 2009/05/28.
183. Goyal S, Arora S, Bhatt TK, Das P, Sharma A, Kumari S, et al. Modulation of PPAR-gamma by telmisartan protects the heart against myocardial infarction in experimental diabetes. *Chemico-biological interactions*. 2010;185(3):271-80. Epub 2010/03/24.

184. Carvalho Vde F, Barreto Ede O, Farias-Filho FA, Gomes LH, Mendonca Lde L, Cordeiro RS, et al. Reduced expression of IL-3 mediates intestinal mast cell depletion in diabetic rats: role of insulin and glucocorticoid hormones. *International journal of experimental pathology*. 2009;90(2):148-55. Epub 2009/04/02.
185. Carvalho VF, Florim LT, de OBE, Torres RC, Batista MM, Amendoeira FC, et al. Inhibition of advanced glycation end products by aminoguanidine restores mast cell numbers and reactivity in alloxan-diabetic rats. *European journal of pharmacology*. 2011;669(1-3):143-8. Epub 2011/08/26.
186. e Silva PM, Carvalho VF, Cordeiro RS, Martins MA. Down-regulation of allergic responses in conditions of experimental diabetes: a role for glucocorticoids? *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(1):13-8. Epub 2008/12/17.
187. Carter RN, Paterson JM, Tworowska U, Stenvers DJ, Mullins JJ, Seckl JR, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis abnormalities in response to deletion of 11beta-HSD1 is strain-dependent. *Journal of neuroendocrinology*. 2009;21(11):879-87. Epub 2009/07/16.
188. Forman LJ, Marquis DE, Stevens R, Adler R, Vasilenko P. Diabetes induced by streptozocin results in a decrease in immunoreactive beta-endorphin levels in the pituitary and hypothalamus of female rats. *Diabetes*. 1985;34(11):1104-7. Epub 1985/11/01.
189. Kapadia R, Yi JH, Vemuganti R. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:1813-26. Epub 2007/11/06.
190. Park EJ, Park SY, Joe EH, Jou I. 15d-PGJ2 and rosiglitazone suppress Janus kinase-STAT inflammatory signaling through induction of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and SOCS3 in glia. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(17):14747-52. Epub 2003/02/14.
191. Kim YB, Ciaraldi TP, Kong A, Kim D, Chu N, Mohideen P, et al. Troglitazone but not metformin restores insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity and increases p110beta protein levels in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes*. 2002;51(2):443-8. Epub 2002/01/29.
192. Beeson M, Sajan MP, Dizon M, Grebenev D, Gomez-Daspert J, Miura A, et al. Activation of protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO4)3 is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: amelioration by rosiglitazone and exercise. *Diabetes*. 2003;52(8):1926-34. Epub 2003/07/29.
193. Coppari R, Bjorbaek C. Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(9):692-708. Epub 2012/09/01.
194. Klockener T, Hess S, Belgardt BF, Paeger L, Verhagen LA, Husch A, et al. High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons. *Nat Neurosci*. 2011;14(7):911-8. Epub 2011/06/07.
195. Rodriguez A, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Garcia-Navarro S, Rotellar F, Valenti V, et al. Insulin- and leptin-mediated control of aquaglyceroporins in human adipocytes and hepatocytes is mediated via the PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(4):E586-97. Epub 2011/02/04.
196. Li Z, Shen J, Wu WK, Yu X, Liang J, Qiu G, et al. Leptin induces cyclin D1 expression and proliferation of human nucleus pulposus cells via JAK/STAT, PI3K/Akt and MEK/ERK pathways. *PloS one*. 2012;7(12):e53176. Epub 2013/01/10.
197. Jantarajit W, Thongon N, Pandaranandaka J, Teerapornpuntakit J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Prolactin-stimulated transepithelial calcium transport in duodenum and Caco-2 monolayer are mediated by the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(1):E372-84. Epub 2007/05/10.

198. Gagnon J, Anini Y. Glucagon stimulates ghrelin secretion through the activation of MAPK and EPAC and potentiates the effect of norepinephrine. *Endocrinology*. 2013;154(2):666-74. Epub 2013/01/12.
199. Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284(4):E671-8. Epub 2003/03/11.
200. Vargas ML, Abella C, Hernandez J. Diazepam increases the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis activity by a cyclic AMP-dependent mechanism. *Br J Pharmacol*. 2001;133(8):1355-61. Epub 2001/08/11.
201. Kumari M, Cover PO, Poyser RH, Buckingham JC. Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat by three selective type-4 phosphodiesterase inhibitors: in vitro and in vivo studies. *Br J Pharmacol*. 1997;121(3):459-68. Epub 1997/06/01.
202. Basta-Kaim A, Budziszewska B, Jaworska-Feil L, Tetich M, Kubera M, Leskiewicz M, et al. Antipsychotic drugs inhibit the human corticotropin-releasing-hormone gene promoter activity in neuro-2A cells-an involvement of protein kinases. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(4):853-65. Epub 2005/10/06.
203. Freitas AE, Egea J, Buendia I, Navarro E, Rada P, Cuadrado A, et al. Agmatine Induces Nrf2 and Protects Against Corticosterone Effects in Hippocampal Neuronal Cell Line. *Molecular neurobiology*. 2014. Epub 2014/08/03.
204. Newby EA, Kaushal KM, Myers DA, Ducsay CA. Adrenocorticotrophic Hormone and PI3K/Akt Inhibition Reduce eNOS Phosphorylation and Increase Cortisol Biosynthesis in Long-Term Hypoxic Ovine Fetal Adrenal Cortical Cells. *Reprod Sci*. 2015. Epub 2015/02/07.

8 – Anexos

8.1 – Artigos publicados

1) **Torres RC**, Batista MM, Pons AH, Silva AR, Cordeiro RS, Martins MA, E Silva PM, Carvalho VF. Activation of PPAR γ by restores mast cell numbers and reactivity in alloxan-diabetic rats by reducing the systemic glucocorticoid levels. *Eur J Pharmacol.* 2012 Sep 15;691(1-3):261-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.06.010. Epub 2012 Jun 16. PubMed PMID: 22713549.

2) **Torres RC**, Prevatto JP, Silva PMR, Martins and MA, Carvalho VF (2013) From Type-1 Diabetes HPA Axis to the Disease Complications. *J Diabetes Metab S12:002.* doi: 10.4172/2155-6156.S12-002

3) Freitas F, Estado V, Carvalho VF, **Torres RC**, Lessa MA, Tibiriçá E. Cardiac microvascular rarefaction in hyperthyroidism-induced left ventricle dysfunction. *Microcirculation.* 2013 Oct;20(7):590-8. doi: 10.1111/micc.12057. PubMed PMID: 23510303.

4) Ribeiro-Filho J, Leite FC, Costa HF, Calheiros AS, **Torres RC**, de Azevedo CT, Martins MA, Dias Cda S, Bozza PT, Piuvezam MR. Curine inhibits mast cell-dependent responses in mice. *J Ethnopharmacol.* 2014 Sep 11;155(2):1118-24. doi: 10.1016/j.jep.2014.06.041. Epub 2014 Jun 23. PubMed PMID: 24969825

8.2 – Artigo submetido

5) Activation of PPAR- γ reduces hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity in diabetic rats by up-regulating PI3K expression.

Autores: Rafael C. Torres, Patrícia M. R. e Silva, Marco A. Martins e Vinicius F. Carvalho.

Revista: “Molecular and Cellular Endocrinology”.

Manuscript Number:

Title: Activation of PPAR- γ reduces hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity in diabetic rats by up-regulating PI3K expression

Article Type: Research Paper

Keywords: Diabetes, Glucocorticoids, HPA axis, PPAR- γ , PI3K

Corresponding Author: Mr. Vinicius Frias Carvalho, Ph.D.

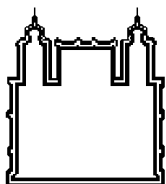
Corresponding Author's Institution: Oswaldo Cruz Foundation

First Author: Rafael C Torres, Msc.

Order of Authors: Rafael C Torres, Msc.; Patricia M Silva, Ph.D; Marco A Martins, Ph.D; Vinicius Frias Carvalho, Ph.D.

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: This study investigates the role of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ in hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA) axis hyperactivity in diabetic rats. The PPAR- γ agonist rosiglitazone and/or PI3K inhibitor wortmannin were administered daily for 18 consecutive days, starting 3 days after diabetes induction. Rosiglitazone treatment inhibited adrenal hypertrophy and hypercortisolism observed in diabetic rats. Rosiglitazone also significantly reversed the diabetes-induced increase the ACTH receptor (MC2R) expression in adrenal cortex. We noted that rosiglitazone reduced the number of corticotroph cells and inhibited both anterior pituitary POMC expression and plasma ACTH levels. Rosiglitazone increased the expression of PPAR- γ and PI3K in both the anterior pituitary and adrenal cortex of diabetic rats. In addition, wortmannin blocked the ability of rosiglitazone to restore baseline plasma corticosterone levels in diabetic rats. In conclusion, our findings revealed that rosiglitazone restored HPA axis reactivity in diabetic rats via a mechanism dependent on PI3K activation in the pituitary and adrenal glands.



Laboratory of Inflammation
Oswaldo Cruz Institute - FIOCRUZ

Vinicius de Frias Carvalho, PhD
Researcher of the Laboratory of Inflammation

April 24th, 2015

Prof. Dr. Carolyn M. Klinge
Editor-in-Chief of Molecular and Cellular Endocrinology

Dear Prof. Klinge,

Please find here attached the version of the manuscript entitled “Activation of PPAR- γ reduces hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity in diabetic rats by up-regulating PI3K expression”, which we are submitting for publication in the Molecular and Cellular Endocrinology.

This study was developed by Rafael C. Torres, Patrícia M. R. e Silva, Marco A. Martins and Vinicius F. Carvalho.

I should like to inform you that this MS has not been published previously, is not under evaluation for publication elsewhere, and that all authors have seen and approved its content.

Furthermore, one or more of native English speaking editors at American Journal Experts edited the manuscript. The certificate was attached in the submission process.

Looking forward to receiving a positive evaluation from the referees and readers,

Sincerely yours,

Vinicius de Frias Carvalho, PhD

1 **Activation of PPAR- γ reduces hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity**
2 **in diabetic rats by up-regulating PI3K expression**

3

4 Rafael Carvalho Torres¹ (rctorres@ioc.fiocruz.br), Patrícia M. R. e Silva¹ (patmar@ioc.fiocruz.br),
5 Marco A. Martins¹ (mmartins@ioc.fiocruz.br) and Vinicius F. Carvalho^{1*} (vfrias@ioc.fiocruz.br).

6

7 1- Laboratório de Inflamação, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; Av. Brasil, nº 4365,
8 Manguinhos, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil.

9

10

11

12 **Word count:** 3462

13 *Author for correspondence:

14 Dr. Vinicius F. Carvalho

15 Laboratório de Inflamação

16 Fundação Oswaldo Cruz

17 Av. Brasil, nº 4365, Manguinhos,

18 Rio de Janeiro, Brazil.

19 E.mail: vfrias@ioc.fiocruz.br

20 Tel. 55.21. 2562-1334; fax 55.21. 2562-1340

21

22 **Disclosure Statement:** The authors have nothing to disclose.

23

1 **Abstract:**

2 This study investigates the role of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ in
3 hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA) axis hyperactivity in diabetic rats. The PPAR- γ agonist
4 rosiglitazone and/or PI3K inhibitor wortmannin were administered daily for 18 consecutive days,
5 starting 3 days after diabetes induction. Rosiglitazone treatment inhibited adrenal hypertrophy and
6 hypercortisolism observed in diabetic rats. Rosiglitazone also significantly reversed the diabetes-
7 induced increase the ACTH receptor (MC2R) expression in adrenal cortex. We noted that
8 rosiglitazone reduced the number of corticotroph cells and inhibited both anterior pituitary POMC
9 expression and plasma ACTH levels. Rosiglitazone increased the expression of PPAR- γ and PI3K in
10 both the anterior pituitary and adrenal cortex of diabetic rats. In addition, wortmannin blocked the
11 ability of rosiglitazone to restore baseline plasma corticosterone levels in diabetic rats. In conclusion,
12 our findings revealed that rosiglitazone restored HPA axis reactivity in diabetic rats via a mechanism
13 dependent on PI3K activation in the pituitary and adrenal glands.

14

15

16 **Key terms:** Diabetes, Glucocorticoids, HPA axis, PPAR- γ , PI3K

17

18

19

20

21

22

23

1 1. INTRODUCTION

2 The hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis is a neuroendocrine system with a vital role
3 in mediating normal circadian function and the stress response through the release and action of
4 glucocorticoids. HPA axis activation begins with the release of corticotropin releasing hormone
5 (CRH) and vasopressin (AVP) from the hypothalamus, which then synergistically stimulate pituitary
6 adrenocorticotrophic cells to cleave proopiomelanocortin (POMC) into adrenocorticotrophic hormone
7 (ACTH). ACTH is then released into the bloodstream and acts on the adrenal cortex to induce the
8 release of glucocorticoids (Myers, McKlveen and Herman, 2013). However, due to the extensive
9 biological actions of glucocorticoids, the neuroendocrine response to stress is highly-regulated. The
10 HPA axis activity is controlled by negative feedback mediated by glucocorticoid signaling primarily
11 via interaction with the glucocorticoid receptor (GR) and mineralocorticoid receptor (MR). ACTH
12 maintains homeostasis by inhibiting the release of CRH from the hypothalamus and additional ACTH
13 from the pituitary (Laryea, Schutz and Muglia, 2013).

14 Increased HPA axis activity has been reported in both diabetic patients and laboratory animals
15 subjected to poor glycemic control or ketoacidosis (Chan, Chan, Inouye et al., 2001,Chiodini, Adda,
16 Scillitani et al., 2007). Hyperactivity of the HPA axis is marked by elevated circulating ACTH and
17 glucocorticoids, increased free urinary cortisol levels, enhanced cortisol response to CRH or ACTH
18 administration, and decreased negative feedback following a dexamethasone suppression test (Chan,
19 Inouye, Vranic et al., 2002,Roy, Roy and Brown, 1998,e Silva, Carvalho, Cordeiro et al., 2009). We
20 previously demonstrated that the greater responsiveness to ACTH and the reduction in HPA axis
21 negative feedback observed in diabetic rats compared to non-diabetic rats are associated with
22 increased expression of the ACTH receptor (MC2R) in adrenal glands and decreased expression of
23 glucocorticoid receptors in the pituitary (GR and MR), respectively (Torres, Prevatto, P.M. et al.,
24 2013).

25 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ is an isoform of the PPAR family of
26 nuclear hormone receptors, which can regulate gene expression (Ahmadian, Suh, Hah et al., 2013).

1 Endogenous agonists of PPAR- γ include unsaturated fatty acids, eicosanoids and oxidized-LDL.
2 Thiazolidinediones, including rosiglitazone, have a high binding affinity to PPAR- γ and are used
3 clinically as anti-diabetic agents due to anti-hyperglycemic activity (Raji and Plutzky, 2002). PPAR- γ
4 is highly expressed in both brown and white adipose tissue and possesses a transcriptome that
5 regulates genes involved in lipid metabolism, energetics and adipocyte differentiation (Jain, Pulikuri,
6 Zhu et al., 1998). However, PPAR- γ expression can be observed in other organs, including the
7 hypothalamus (Qi, Zhong, Li et al., 2012), pituitary (Wiesner, Morash, Ur et al., 2004) and adrenals
8 (Zaripheh, Nara, Nakamura et al., 2006), all of which comprise the HPA axis. Moreover, PPAR- γ
9 ligands inhibit POMC transcription induced by CRH in mouse corticotroph pituitary tumor cells *in*
10 *vitro* and reduce the circulating levels of ACTH and corticosterone in mice inoculated with
11 corticotroph pituitary tumor cells (Heaney, Fernando, Yong et al., 2002). In addition, treatment with
12 rosiglitazone was able to normalize cortisol secretion in patients with Cushing disease (Ambrosi,
13 Dall'Asta, Cannavo et al., 2004).

14 We previously demonstrated that alloxan-diabetic rats presented a reduction in plasma levels
15 of the natural ligand of PPAR- γ , 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ and that PPAR- γ activation inhibited diabetes-
16 induced hypercortisolism (Torres, Batista, Pons et al., 2012). Here, we evaluated the molecular
17 mechanisms involved in the normalization of HPA axis function after treatment with a synthetic
18 PPAR- γ agonist, rosiglitazone.

19 **2. MATERIALS AND METHODS**

20 ***2.1 Animals and diabetes induction***

21 In accordance with the guidelines of the Committee on Use of Laboratory Animals of
22 FIOCRUZ (CEUA-FIOCRUZ, license LW 23/11), male Wistar rats obtained from Oswaldo Cruz
23 Foundation breeding colony were used. Diabetes was induced in 12-h-fasted rats (water *ad libitum*) by
24 a single i.v. injection of alloxan monohydrate (40 mg/kg) diluted with sterile saline (0.9% NaCl). Rats
25 injected with vehicle and subjected to similar experimental conditions were used as negative controls.
26 Blood glycemia was determined with a glucose monitor (Johnson & Johnson, California, USA) from

1 samples obtained from the tail vein. Three days after alloxan injection, only rats with blood glucose
2 levels above 11 mmol/L were used in further experiments.

3 **2.2 Treatment**

4 Three days after diabetes induction, the animals were treated daily with the PPAR- γ agonist
5 rosiglitazone (0.5 mg/Kg, i.p.) and/or the PI3K inhibitor wortmannin (0.1 mg/Kg, i.p.) for 18
6 consecutive days. Non-diabetic rats received the same treatment and were used as a control group.
7 Untreated non-diabetic and diabetic rats received an equal volume of vehicle (DMSO 0.05%, i.p.).

8 **2.3 Determination of macro- and microscopic adrenal hypertrophy indexes**

9 Adrenal glands from each experimental group were dissected and placed in Millonig fixative
10 solution for 48 h. Tissues were dehydrated and cleared with xylene before paraffin embedding.
11 Adrenal sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). A Light microscope (Olympus
12 BX50) with a 1000 X magnification coupled to a video camera (Olympus UC30) was employed for
13 the analysis of at least five different fields from the *zona fasciculata* of each adrenal gland section.
14 Cell nuclei were counted and data expressed as cell number per high power field (HPF), as reported
15 (Beuschlein, Mutch, Bavers et al., 2002). An additional hypertrophy index was obtained by
16 determining the mean area of *zona fasciculata* cells obtained from the HPF using the software Image
17 Pro-Plus 6.2 (Media Cybernetics). To assess adrenal gland hypertrophy macroscopically, the ratio
18 between adrenal weight and body weight was determined.

19 **2.4 Immunohistochemistry staining**

20 Paraffin-embedded sections of rat pituitary and adrenals were deparaffinized with xylene,
21 rehydrated by a graded series of ethanol washes and boiled in 10 mM sodium citrate (pH 6.0) for 15
22 min to enhance antigen retrieval. Tissue sections were incubated with 3% H₂O₂ in methanol for 15
23 min to block endogenous peroxidase. To prevent non-specific binding, the sections were then
24 incubated for 3 h with a solution containing 2.5% bovine serum albumin (BSA), 8% fetal bovine

1 serum (FBS) and 1% of non-fat milk dissolved in Tris-buffered saline enriched with 0.1% Tween 20
2 (TBST). Sections were incubated overnight with the specific antibody (polyclonal rabbit anti-rat
3 POMC, GR, or MC2-R from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; polyclonal goat anti-
4 rat PI3K p110 α or MR from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; monoclonal mouse
5 anti-rat ACTH from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, and monoclonal rabbit anti-rat
6 PPAR- γ from Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) diluted in TBST with 1% BSA.
7 Primary antibody binding was detected after incubating the sections with a horseradish peroxidase
8 conjugated- secondary antibody (polyclonal anti-goat, anti-rabbit or anti-mouse IgG HRP, R&D
9 System, Minneapolis, MN, USA), followed by a 15 min exposure to the enzyme substrate 3-amino-9-
10 ethylcarbazole (AEC). Sections were washed with TBST between all steps and weakly counterstained
11 with hematoxylin for the easy identification of tissue structures.

12 Tissue sections were mounted in aqueous medium and images captured via light microscope
13 (Olympus BX50) coupled to a video camera (Olympus UC30), and the images obtained from the
14 anterior pituitary or *zona fasciculata* of the adrenal cortex were analyzed with the software Image Pro
15 Plus 6.2 (Media Cybernetics). Briefly, the red to brown colored pixels associated with a positive
16 immunohistochemistry stain were selected in a model image and applied to the remaining fields. The
17 number of positive pixels was divided by the field area and expressed as pixels/ μm^2 .

18 ***2.5 Hormone evaluation***

19 Animals were killed in a CO₂ chamber 21 days after diabetes induction, and blood was
20 immediately collected from the abdominal aorta in vials containing either heparin (40 U/ml) or EDTA
21 (0.2%) for corticosterone or ACTH quantification, respectively. Plasma was obtained after sample
22 centrifugation for 10 min at 1,000 \times g and stored at -80°C until use. ACTH and corticosterone levels
23 were quantified by radioimmunoassay following manufacturer's guidelines (MP Biomedicals, Solon,
24 OH, USA), using a gamma counter (ICN Isomedic 4/600 HE; ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA,
25 USA) for quantification.

1 2.6 Drugs

2 Alloxan monohydrate, dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium citrate, hydrogen peroxide and
3 wortmannin were purchased from Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, USA), rosiglitazone from
4 Cayman Chemicals (Saint Louis, MO, USA), ethanol, methanol and xylene from Merck (Rio de
5 Janeiro, RJ, Brazil) and sodium heparin from Roche (São Paulo, SP, Brazil). All solutions were
6 freshly prepared immediately before use.

7 2.7 Statistical analysis

8 The data are reported as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M.) and statistically
9 analyzed by ANOVA followed by a Student-Newman–Keuls post-hoc test. Probability values (p) of
10 0.05 or less were considered significant.

11 3. RESULTS

12 3.1 Rosiglitazone reduces adrenal hypertrophy, MC2R overexpression in the adrenal cortex and 13 corticosterone levels in diabetic rats

14 Rats injected with alloxan presented a diabetic condition characterized by greater levels of
15 circulating glucose in the bloodstream compared to rats that received sterile saline. The values of
16 circulating glucose increased from 5.5 ± 0.2 mmol/L (mean \pm SEM; $n = 12$) in non-diabetic rats to
17 30.0 ± 0.7 mmol/L ($n = 12$; $p < 0.001$) in diabetic rats. Eighteen consecutive days of rosiglitazone
18 treatment significantly reduced blood glucose levels, although rats remained hyperglycemic ($25.5 \pm$
19 0.75 mmol/L; mean \pm SEM; $n = 12$; $P < 0.001$). Diabetes induced adrenal hypertrophy, as evidenced
20 by a reduction in cell number from the *zona fasciculata* of the adrenal cortex visible in high power
21 field (HPF) images (Figures 1C and 1E). This reduction in cell number was associated with an
22 increase in the mean area of these cells (Figures 1C and 1F) and in the ratio between adrenal and body
23 weight (Figure 1G) compared to non-diabetic animals (Figures 1A, 1E, 1F and 1G). Remarkably, all
24 of these changes were clearly sensitive to rosiglitazone treatment (Figures 1D, 1E, 1F and 1G), as
25 evidenced by conditions in which the baseline levels remained unaltered in non-diabetic rats, such as

1 cell number (Figure 1E), mean area of *zona fasciculata* (Figure 1F) and adrenal/body weight ratio
2 (Figure 1G).

3 We found that rosiglitazone significantly impaired the increase in plasma corticosterone levels
4 observed 21 days after diabetes induction, as previously reported (Torres et al., 2012). Again, no
5 alteration in the basal levels of corticosterone was noted in non-diabetic rats treated with rosiglitazone
6 (Figure 1H). Moreover, diabetic rats presented a pronounced increase in ACTH receptor (MC2R)
7 expression in the adrenal cortex, including the *zona fasciculata* (Figure 2C and 2E), compared to non-
8 diabetic rats (Figure 2A and 2E). Rosiglitazone significantly reduced alloxan-induced up-regulation of
9 MC2R expression (Figure 2D and 2E) without modifying the baseline levels of these receptors
10 (Figure 2B and 2E).

11 **3.2 Rosiglitazone reduces corticotroph cell numbers, POMC and ACTH production in the** 12 **pituitary of diabetic rats**

13 Compared to non-diabetic rats (Figures 3A, 3E, 3F and 3G), diabetic rats showed increased
14 numbers of corticotroph cells (ACTH⁺ cells) in the anterior pituitary (Figures 3C and 3E), in parallel
15 with greater expression of ACTH (Figures 3C and 3F). These changes were accompanied by
16 increased levels of plasma ACTH (Figure 3G). Treatment with rosiglitazone in diabetic rats restored
17 the number of corticotroph cells in the anterior pituitary (Figures 3D and 3E) and the levels of ACTH
18 in both the anterior pituitary (Figures 3D and 3F) and circulation (Figure 3G). The number of
19 corticotroph cells (Figures 3B and 3E), ACTH expression in the anterior pituitary (Figures 3B and
20 3F), and plasma ACTH levels (Figure 3G) did not change in non-diabetic rats after treatment with
21 rosiglitazone.

22 Next, we evaluated the expression of glucocorticoid receptors (GR and MR) associated with
23 HPA axis negative feedback in the anterior pituitary of diabetic rats. As previously reported (Torres et
24 al., 2013), diabetic rats presented a reduction of GR (Figures 4G and 4M) and MR (Figures 4H and
25 4N) expression in the anterior pituitary compared to non-diabetic rats (Figures 4A, 4B, 4M and 4N).
26 Treatment with rosiglitazone reduced the expression of GR (Figures 4J and 4M) and did not alter the

1 expression of MR (Figures 4K and 4N) in the anterior pituitary of diabetic rats. No changes in GR
2 (Figures 4D and 4M) or MR (Figures 4E and 4N) expression were observed in the anterior pituitary of
3 non-diabetic rats treated with rosiglitazone. In addition, we observed that the expression of the ACTH
4 precursor POMC was the same in the anterior pituitary of non-diabetic (Figures 4C and 4O) and
5 diabetic rats (Figures 4I and 4O). However, rosiglitazone treatment decreased the expression of
6 POMC in the anterior pituitary of diabetic rats (Figures 4L and 4O) but not non-diabetic rats (Figures
7 4F and 4O).

8 **3.3 Rosiglitazone induces an up-regulation of PPAR- γ in the adrenal and pituitary glands of** 9 **diabetic rats**

10 Diabetic rats presented significantly reduced PPAR- γ expression in the adrenal cortex
11 (Figures 5E and 5I) and anterior pituitary (Figures 5F and 5J) compared to non-diabetic rats (Figures
12 5A, 5I, 5B and 5J). Notably, rosiglitazone increased the expression of PPAR- γ in both the adrenal
13 cortex (Figures 5G and 5I) and anterior pituitary (Figures 5H and 5J) of diabetic rats. Non-diabetic
14 rats treated with rosiglitazone showed a reduction in PPAR- γ expression in the adrenal cortex (Figures
15 5C and 5I), but not the anterior pituitary (Figures 5D and 5J).

16 **3.4 Involvement of PI3K on the rosiglitazone mediated down regulation of the corticosterone** 17 **levels in diabetic rats**

18 We found that diabetic rats presented a significant reduction of PI3K levels in the anterior
19 pituitary (Figures 6F and 6J) whereas the levels of this kinase in the adrenal cortex remained unaltered
20 (Figures 6E and 6I). Diabetic rats treated with rosiglitazone showed an up-regulation of PI3K in the
21 adrenal cortex (Figures 6G and 6I) and anterior pituitary (Figures 6H and 6J). In addition,
22 rosiglitazone induced an increase in PI3K p110 α expression in the adrenal cortex (Figures 6C and 6I)
23 but not the anterior pituitary (Figures 6D and 6J) of non-diabetic rats.

24 Treatment with rosiglitazone significantly impaired the enhancement of plasma corticosterone
25 levels of diabetic rats to values close to those in control animals. No alteration of basal levels of
26 corticosterone was observed in control non-diabetic rats after treatment with rosiglitazone. Pre-

1 treatment with wortmannin partially reversed the effects of rosiglitazone on hypercortisolism of
2 diabetic rats. Compared with the non-diabetic untreated rats, administration of wortmannin increased
3 plasma corticosterone levels, although did not affect hormone levels when was administrated in
4 diabetic (Figure 7).

5 **4. DISCUSSION**

6 This study investigated the role of PPAR- γ in HPA axis hyperactivity in diabetic rats. We
7 found that treatment with rosiglitazone, a PPAR- γ agonist, reduced adrenal hypertrophy, ACTH
8 receptor levels in adrenal glands and plasma corticosterone levels in diabetic rats. These findings
9 corresponded with decreased corticotroph cell numbers and diminished POMC and ACTH production
10 from the anterior pituitary. Reduced HPA axis activity induced by rosiglitazone was associated with
11 the up-regulation of PPAR- γ and PI3K in both the adrenal and pituitary glands. Our findings indicate
12 that the lower expression of PPAR- γ in the adrenal and pituitary glands of diabetic rats seems to be
13 significantly involved in the observed HPA axis hyperactivity in these animals, with a clear
14 dependency on up-regulation of ACTH and its receptor in association with down-regulation of PI3K.

15 We previously demonstrated that activation of PPAR- γ by rosiglitazone significantly reduced
16 hyperglycemia and hypercortisolism observed in diabetic rats (Torres et al., 2012). Here, we
17 confirmed these data and showed that rosiglitazone decreased adrenal hypertrophy both macro- and
18 microscopically in diabetic rats. The close relationship between increased levels of plasma cortisol
19 and enlarged adrenals has been observed in several diseases, including depression, Cushing's and
20 diabetes (Szigethy, Conwell, Forbes et al., 1994, Kraus, 1973, Lentle and Thomas, 1964, Nomura,
21 Saito, Aiba et al., 2003). In this work, we demonstrated that the adrenal hypertrophy observed in
22 diabetic rats is associated with an increased area of the cells present in the *zona fasciculata* of the
23 adrenal cortex. The main function of *zone fasciculata* is steroidogenesis. An animal model of Chagas
24 disease shows a correlation between *zona fasciculata* hypertrophy and increased expression of
25 steroidogenic enzymes, including steroidogenic acute regulatory protein and 11 β -hydroxysteroid
26 dehydrogenase 1 (Villar, Ronco, Fernandez Bussy et al., 2013). The possibility does exist that

1 rosiglitazone decreased adrenal hypertrophy through reduction in steroidogenic enzymes expression,
2 once PPAR- γ agonists inhibit ovarian steroidogenesis (Mitwally, Witchel and Casper, 2002) and the
3 activity in native microsomal environments (Arlt, Auchus and Miller, 2001). Next, we found
4 decreased MC2R expression in the adrenal cortex of diabetic rats treated with rosiglitazone. This
5 reduction in ACTH receptors may explain, at least in part, the impairment of plasma corticosterone
6 levels, considering that the MC2R signaling pathway is essential to induce expression of
7 steroidogenic enzyme genes and provoke subsequent adrenal hypertrophy and glucocorticoid
8 secretion (Park, Walker, Johnson et al., 2013, Simmonds, Phillips, Poore et al., 2001).

9 To assess whether rosiglitazone treatment in diabetic rats normalizes HPA axis activity
10 through adrenal-specific activation by PPAR- γ , we evaluated ACTH levels in these animals. We
11 showed that diabetic rats presented an increased number of corticotroph cells in the anterior pituitary
12 accompanied by an increase in the production and secretion of ACTH by these cells. Treatment with
13 rosiglitazone reduced the number of corticotroph cells as well as production and secretion of ACTH in
14 diabetic rats. Together, these data show that rosiglitazone decreases HPA axis activation in diabetic
15 rats by the activation of PPAR- γ in both the adrenal and pituitary glands. Increased plasma ACTH
16 levels of diabetic animals are associated with enhanced production and secretion of CRH by the
17 hypothalamus and the impairment of HPA axis negative feedback (Chan et al., 2001). We previously
18 demonstrated that the inability of diabetic rats to negatively feedback on the HPA axis is correlated
19 with a lower expression of glucocorticoid receptors (GR and MR) in the anterior pituitary (Torres et
20 al., 2013). Treatment with rosiglitazone did not restore the expression of GR and MR in the anterior
21 pituitary of diabetic rats, indicating that the reduction of plasma ACTH levels is not related to
22 improved HPA axis negative feedback in diabetic rats.

23 In an attempt to understand how treatment with rosiglitazone reduces plasma ACTH levels in
24 diabetic rats, we evaluated the expression of the ACTH precursor POMC in the anterior pituitary. We
25 did not observe changes in POMC expression between non-diabetic and diabetic rats. In the pituitary
26 gland, POMC can be cleaved into several products, including ACTH, α -melanotropin, γ -
27 melanotropin, β -lipotropin and β -endorphin (Yasuda, Jones and Shigeri, 2013, Does and Baron,

1 2011). Because we observed that diabetic rats presented with increased ACTH production in the
2 anterior pituitary, an explanation for the absence of changes in POMC expression could be reduced
3 expression of other POMC-derived peptides. In fact, diabetic mice showed a reduction in pituitary β -
4 endorphin production (Forman, Marquis, Stevens et al., 1985). We found that treatment with
5 rosiglitazone drastically decreased POMC expression in the pituitary of diabetic rats. These findings
6 are consistent with a previous report showing that rosiglitazone reduces POMC gene transcription in a
7 mouse anterior pituitary cell lineage *in vitro* (Heaney et al., 2002).

8 We also demonstrated that diabetic rats presented a reduction in PPAR- γ expression in both
9 the adrenal cortex and anterior pituitary when compared to non-diabetic rats. These data are in
10 accordance with the findings of decreased PPAR- γ expression in several organs of diabetic rats
11 frequently associated with diabetic disabilities, including the kidneys and retina (Wang, Gao, Gong et
12 al., 2008). We found that treatment with rosiglitazone restored the expression of PPAR- γ in the
13 adrenals and pituitary of diabetic rats. Moreover, we previously demonstrated that diabetic rats
14 exhibited a lower amount of the natural plasma PPAR- γ agonist, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J2,
15 compared to non-diabetic rats (Torres et al., 2012). The lower expression of PPAR- γ in adrenals and
16 pituitary of diabetic rats and the reversion of this phenomenon after treatment with a synthetic agonist
17 might be explained by the fact that the activation of PPAR- γ induces its own gene transcription
18 (Goyal, Arora, Bhatt et al., 2010).

19 In addition, we evaluated the expression of PI3K in both the adrenal cortex and anterior
20 pituitary of animals because the PI3K pathway is associated with HPA axis inhibition (Basta-Kaim,
21 Budziszewska, Jaworska-Feil et al., 2006) and there is evidence that the activation of PPAR- γ induces
22 increased PI3K/AKT signaling in a colon cancer cell lineage *in vitro* (Chen and Harrison, 2005).
23 Here, we found that diabetic rats showed decreased PI3K expression in the anterior pituitary, but no
24 changes were detected in the adrenal cortex compared to non-diabetic rats. Treatment with
25 rosiglitazone increased PI3K expression in the adrenal cortex and anterior pituitary of diabetic rats.
26 Furthermore, we demonstrated that the ability of rosiglitazone to inhibit the diabetes-induced
27 hypercortisolism was partially restored with pre-treatment with wortmannin. Thus, it can be

1 hypothesized that the effectiveness of PPAR- γ activation to reverse hypercortisolism might be, at
2 least partially, dependent on its ability to induce PI3K expression in adrenal cortex and anterior
3 pituitary. Rosiglitazone is a potent activator of PPAR- γ with robust insulin-sensitizing activities
4 through increased expression of IRS-1, IRS-2, GLUT-4 and PI3K in adipose tissue (Ahmadian et al.,
5 2013). Moreover, insulin therapy is able to normalize HPA axis function in diabetic rats (Chan et al.,
6 2002). We can hypothesize that in our model activation of PPAR- γ could be increasing the insulin-
7 sensitizing activity of the adrenal cortex and anterior pituitary of diabetic rats through an induction in
8 PI3K expression.

9 **5. CONCLUSIONS**

10 Our results indicate that the activation of PPAR- γ with rosiglitazone normalizes HPA axis
11 activity in diabetic rats by a mechanism related to up-regulation of PI3K in both the adrenal and
12 pituitary glands, once the blockage of PI3K with wortmannin impaired rosiglitazone mediated down
13 regulation of corticosterone levels.

14

15 **ACKNOWLEDGEMENTS**

16 We thank Mr. Andrey Junio Moreira Fernandes from FIOCRUZ for his technical support.
17 This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
18 and Tecnológico (CNPq) MCT/CNPq/CT-SAÚDE/MS/SCTIE/DECIT N° 42/2010;
19 Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ);
20 Programa de Auxílio à Pesquisa (PAPESVI/FIOCRUZ); Ministério da Saúde, Brazil.

21

22 **LEGENDS**

23 **Figure 1: Rosiglitazone reduces adrenal hypertrophy and hypercortisolism observed in diabetic**
24 **rats.** Three days after diabetes induction, rosiglitazone (0.5 mg/kg, i.p.) was administered once daily

1 for 18 consecutive days. Untreated animals received an equal amount of vehicle (DMSO 0.05 %, i.p.),
2 and analyses were performed 21 days after diabetes induction. Photomicrographs are representative of
3 *zona fasciculata* from non-diabetic (A), rosiglitazone-treated non-diabetic (B), diabetic (C) and
4 rosiglitazone-treated diabetic animals (D). Quantification of fasciculate cell numbers on high power
5 field (HPF) (E) and the mean area of *zona fasciculata* cells (F). (G) The ratio between adrenal and
6 body weight. (H) Plasma quantification of corticosterone levels. Data are expressed as the mean \pm
7 SEM of 6 animals. * $P < 0.05$ compared to non-diabetic rats. + $P < 0.05$ compared to diabetic rats
8 untreated with rosiglitazone. Scale bar = 50 μm . Rosi = Rosiglitazone.

9 **Figure 2: Rosiglitazone induces a down-regulation of ACTH receptor MC2-R expression in the**
10 **adrenal cortex of diabetic rats.** Rosiglitazone (0.5 mg/kg, i.p.) was administered once daily for 18
11 consecutive days, and immunohistochemistry analyses were performed 21 days after diabetes
12 induction. Panel shows representative photomicrographs of the adrenal expression of MC2-R in non-
13 diabetic (A), rosiglitazone-treated non-diabetic (B), diabetic (C) and rosiglitazone-treated diabetic
14 animals (D). (E) Quantification of pixels associated with positive MC2-R expression. Data are
15 expressed as the mean \pm SEM of 6 animals. * $P < 0.05$ compared to non-diabetic rats. + $P < 0.05$
16 compared to diabetic rats untreated with rosiglitazone. Scale bar = 50 μm . Rosi = Rosiglitazone.

17 **Figure 3: Rosiglitazone reduces corticotroph cell hyperplasia in the anterior pituitary and**
18 **decreases the elevated levels of ACTH in both the anterior pituitary and plasma observed in**
19 **diabetic animals.** Rosiglitazone (0.5 mg/kg, i.p.) was administered once daily for 18 consecutive
20 days. Histological and immunohistochemical analyses were made 21 days after diabetes induction.
21 Pituitary photomicrographs are representative of non-diabetic (A), rosiglitazone-treated non-diabetic
22 (B), diabetic (C) and rosiglitazone-treated diabetic animals (D). (E and F) Graphics present the pixels
23 associated with the pituitary expression of ACTH and the number of positive ACTH cells obtained on
24 high power field (HPF), respectively. (G) Plasma quantification of ACTH levels. Data are expressed
25 as the mean \pm SEM of 6 animals. * $P < 0.05$ compared to non-diabetic rats. + $P < 0.05$ compared to
26 diabetic rats untreated with rosiglitazone. Scale bar = 20 μm . Rosi = Rosiglitazone.

1 **Figure 4: Rosiglitazone reduces the ACTH precursor POMC and GR, but does not alter MR**
2 **expression in the anterior pituitary of diabetic animals.** Rosiglitazone (0.5 mg/kg, i.p.) was
3 administered once daily for 18 consecutive days, and immunohistochemical analyses were made 21
4 days after diabetes induction. Panels show representative photomicrographs of the pituitary
5 expression of GR, MR and POMC in the anterior pituitary of non-diabetic (A, B and C, respectively),
6 rosiglitazone-treated non-diabetic (D, E and F, respectively), diabetic (G, H and I, respectively) and
7 rosiglitazone-treated diabetic animals (J, K and L, respectively). In addition, the pituitary expression
8 of POMC in non-diabetic (C), rosiglitazone-treated non-diabetic (F), diabetic (I), and rosiglitazone-
9 treated diabetic (L), is presented. (M, N and O) Quantification of pixels associated with positive GR,
10 MR and POMC expression, respectively. Data are expressed as the mean \pm SEM of 6 animals.
11 * P <0.05 compared to non-diabetic rats. ^+P <0.05 compared to diabetic rats untreated with
12 rosiglitazone. Scale bar = 20 μ m. Rosi = Rosiglitazone.

13 **Figure 5: Rosiglitazone reverses the reduction of PPAR γ expression noted in both the adrenal**
14 **cortex and anterior pituitary of diabetic animals.** Rosiglitazone (0.5 mg/kg, i.p.) was administered
15 once daily for 18 consecutive days, and immunohistochemical analyses were made 21 days after
16 diabetes induction. Panels show representative immunohistochemical photomicrographs of the
17 adrenal cortex and anterior pituitary expression of PPAR γ in non-diabetic (A and B, respectively),
18 rosiglitazone-treated non-diabetic (C and D, respectively), diabetic (E and F, respectively) and
19 rosiglitazone-treated diabetic animals (G and H, respectively). (I and J) Quantification of pixels
20 associated with positive PPAR γ expression in the adrenal cortex and anterior pituitary, respectively.
21 Data are expressed as the mean \pm SEM of 6 animals. * P <0.05 compared to non-diabetic rats. ^+P <0.05
22 compared to diabetic rats untreated with rosiglitazone. Adrenal and pituitary scale bar represents 50
23 μ m and 20 μ m, respectively. Rosi = Rosiglitazone.

24 **Figure 6: Rosiglitazone increases PI3K p110 α expression in both the adrenal cortex and**
25 **anterior pituitary of diabetic animals.** Rosiglitazone (0.5 mg/kg, i.p.) was administered once daily
26 for 18 consecutive days, and immunohistochemical analyses were made 21 days after diabetes
27 induction. Panels show representative immunohistochemical photomicrographs of the adrenal cortex

1 and anterior pituitary expression of PI3K p110 α in non-diabetic (A and B, respectively),
 2 rosiglitazone-treated non-diabetic (C and D, respectively), diabetic (E and F, respectively) and
 3 rosiglitazone-treated diabetic animals (G and H, respectively). (I and J) Quantification of pixels
 4 associated with positive PI3K p110 α expression in adrenal cortex and anterior pituitary, respectively.
 5 Data are expressed as the mean \pm SEM of 6 animals. * P <0.05 compared to non-diabetic rats. + P <0.05
 6 compared to diabetic rats untreated with rosiglitazone. Adrenal and pituitary scale bar represents 50
 7 μ m and 20 μ m, respectively. Rosi = Rosiglitazone.

8 **Figure 7: Blockade of PI3K significantly impaired rosiglitazone mediated down regulation of**
 9 **corticosterone levels in diabetic rats.** Rosiglitazone (0.5 mg/kg, i.p.) and/or wortmannin (0.1 mg/Kg,
 10 i.p) were administered once daily for 18 consecutive days. 21 days after diabetes induction blood was
 11 collected for plasma corticosterone quantification. Data are expressed as the mean \pm SEM of 8
 12 animals. * P <0.05 compared to non-diabetic rats. + P <0.05 compared to diabetic rats untreated with
 13 rosiglitazone. # P <0.05 compared to diabetic rats treated with rosiglitazone. Rosi = Rosiglitazone.
 14 Wort = Wortmannin.

15 REFERENCES

- 16 [1] Myers, B., McKlveen, J.M. and Herman, J.P., 2013. Glucocorticoid actions on synapses,
 17 circuits, and behavior: Implications for the energetics of stress, *Front Neuroendocrinol.*
 18 [2] Laryea, G., Schutz, G. and Muglia, L.J., 2013. Disrupting hypothalamic glucocorticoid
 19 receptors causes HPA axis hyperactivity and excess adiposity, *Mol Endocrinol.* 27, 1655-
 20 65.
 21 [3] Chan, O., Chan, S., Inouye, K., Vranic, M. and Matthews, S.G., 2001. Molecular
 22 regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in streptozotocin-induced diabetes:
 23 effects of insulin treatment, *Endocrinology.* 142, 4872-9.
 24 [4] Chiodini, I., Adda, G., Scillitani, A., Coletti, F., Morelli, V., Di Lembo, S., Epaminonda,
 25 P., Masserini, B., Beck-Peccoz, P., Orsi, E., Ambrosi, B. and Arosio, M., 2007. Cortisol
 26 secretion in patients with type 2 diabetes: relationship with chronic complications,
 27 *Diabetes Care.* 30, 83-8.
 28 [5] Chan, O., Inouye, K., Vranic, M. and Matthews, S.G., 2002. Hyperactivation of the
 29 hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in streptozotocin-diabetes is associated with
 30 reduced stress responsiveness and decreased pituitary and adrenal sensitivity,
 31 *Endocrinology.* 143, 1761-8.
 32 [6] Roy, M.S., Roy, A. and Brown, S., 1998. Increased urinary-free cortisol outputs in
 33 diabetic patients, *J Diabetes Complications.* 12, 24-7.
 34 [7] e Silva, P.M., Carvalho, V.F., Cordeiro, R.S. and Martins, M.A., 2009. Down-regulation
 35 of allergic responses in conditions of experimental diabetes: a role for glucocorticoids?,
 36 *Neuroimmunomodulation.* 16, 13-8.

- 1 [8] Torres, R.C., Prevalto, J.P., P.M., E.S., Martins, M.A. and Carvalho, V.F., 2013. From
2 type-1 diabetes HPA axis to the disease complications, *Journal of Diabetes and*
3 *Metabolism*.
- 4 [9] Ahmadian, M., Suh, J.M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A.R., Downes, M. and Evans,
5 R.M., 2013. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future,
6 *Nat Med.* 19, 557-66.
- 7 [10] Raji, A. and Plutzky, J., 2002. Insulin resistance, diabetes, and atherosclerosis:
8 thiazolidinediones as therapeutic interventions, *Curr Cardiol Rep.* 4, 514-21.
- 9 [11] Jain, S., Pulikuri, S., Zhu, Y., Qi, C., Kanwar, Y.S., Yeldandi, A.V., Rao, M.S. and
10 Reddy, J.K., 1998. Differential expression of the peroxisome proliferator-activated
11 receptor gamma (PPARgamma) and its coactivators steroid receptor coactivator-1 and
12 PPAR-binding protein PBP in the brown fat, urinary bladder, colon, and breast of the
13 mouse, *Am J Pathol.* 153, 349-54.
- 14 [12] Qi, W.W., Zhong, L.Y., Li, X.R., Li, G., Liu, Z.X., Hu, J.F. and Chen, N.H., 2012.
15 Hyperglycemia induces the variations of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1
16 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in hippocampus and
17 hypothalamus of diabetic rats, *Exp Diabetes Res.* 2012, 107130.
- 18 [13] Wiesner, G., Morash, B.A., Ur, E. and Wilkinson, M., 2004. Food restriction regulates
19 adipose-specific cytokines in pituitary gland but not in hypothalamus, *J Endocrinol.* 180,
20 R1-6.
- 21 [14] Zaripheh, S., Nara, T.Y., Nakamura, M.T. and Erdman, J.W., Jr., 2006. Dietary
22 lycopene downregulates carotenoid 15,15'-monooxygenase and PPAR-gamma in
23 selected rat tissues, *J Nutr.* 136, 932-8.
- 24 [15] Heaney, A.P., Fernando, M., Yong, W.H. and Melmed, S., 2002. Functional PPAR-
25 gamma receptor is a novel therapeutic target for ACTH-secreting pituitary adenomas,
26 *Nat Med.* 8, 1281-7.
- 27 [16] Ambrosi, B., Dall'Asta, C., Cannavo, S., Libe, R., Vigo, T., Epaminonda, P., Chiodini, I.,
28 Ferrero, S., Trimarchi, F., Arosio, M. and Beck-Peccoz, P., 2004. Effects of chronic
29 administration of PPAR-gamma ligand rosiglitazone in Cushing's disease, *Eur J*
30 *Endocrinol.* 151, 173-8.
- 31 [17] Torres, R.C., Batista, M.M., Pons, A.H., Silva, A.R., Cordeiro, R.S., Martins, M.A., PM,
32 E.S. and Carvalho, V.F., 2012. Activation of PPARgamma by restores mast cell numbers
33 and reactivity in alloxan-diabetic rats by reducing the systemic glucocorticoid levels,
34 *Eur J Pharmacol.* 691, 261-7.
- 35 [18] Beuschlein, F., Mutch, C., Bavers, D.L., Ulrich-Lai, Y.M., Engeland, W.C., Keegan, C.
36 and Hammer, G.D., 2002. Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal
37 growth following unilateral adrenalectomy, *Endocrinology.* 143, 3122-35.
- 38 [19] Szigethy, E., Conwell, Y., Forbes, N.T., Cox, C. and Caine, E.D., 1994. Adrenal weight
39 and morphology in victims of completed suicide, *Biol Psychiatry.* 36, 374-80.
- 40 [20] Kraus, S.D., 1973. Adrenal and plasma corticosterone and pituitary and plasma ACTH
41 in alloxan diabetic rats, *Proc Soc Exp Biol Med.* 143, 460-4.
- 42 [21] Lentle, B.C. and Thomas, J.P., 1964. Adrenal Function and the Complications of
43 Diabetes Mellitus, *Lancet.* 2, 544-9.
- 44 [22] Nomura, K., Saito, H., Aiba, M., Iihara, M., Obara, T. and Takano, K., 2003. Cushing's
45 syndrome due to bilateral adrenocortical adenomas with unique histological features,
46 *Endocr J.* 50, 155-62.
- 47 [23] Villar, S.R., Ronco, M.T., Fernandez Bussy, R., Roggero, E., Lepletier, A., Manarin, R.,
48 Savino, W., Perez, A.R. and Bottasso, O., 2013. Tumor necrosis factor-alpha regulates
49 glucocorticoid synthesis in the adrenal glands of *Trypanosoma cruzi* acutely-infected
50 mice. the role of TNF-R1, *PLoS One.* 8, e63814.
- 51 [24] Mitwally, M.F., Witchel, S.F. and Casper, R.F., 2002. Troglitazone: a possible
52 modulator of ovarian steroidogenesis, *J Soc Gynecol Investig.* 9, 163-7.
- 53 [25] Arlt, W., Auchus, R.J. and Miller, W.L., 2001. Thiazolidinediones but not metformin
54 directly inhibit the steroidogenic enzymes P450c17 and 3beta -hydroxysteroid
55 dehydrogenase, *J Biol Chem.* 276, 16767-71.

- 1 [26] Park, S.Y., Walker, J.J., Johnson, N.W., Zhao, Z., Lightman, S.L. and Spiga, F., 2013.
2 Constant light disrupts the circadian rhythm of steroidogenic proteins in the rat adrenal
3 gland, *Mol Cell Endocrinol.* 371, 114-23.
- 4 [27] Simmonds, P.J., Phillips, I.D., Poore, K.R., Coghill, I.D., Young, I.R. and Canny, B.J.,
5 2001. The role of the pituitary gland and ACTH in the regulation of mRNAs encoding
6 proteins essential for adrenal steroidogenesis in the late-gestation ovine fetus, *J*
7 *Endocrinol.* 168, 475-85.
- 8 [28] Yasuda, A., Jones, L.S. and Shigeri, Y., 2013. The Multiplicity of Post-Translational
9 Modifications in Pro-Opiomelanocortin-Derived Peptides, *Front Endocrinol*
10 *(Lausanne).* 4, 186.
- 11 [29] Dores, R.M. and Baron, A.J., 2011. Evolution of POMC: origin, phylogeny,
12 posttranslational processing, and the melanocortins, *Ann N Y Acad Sci.* 1220, 34-48.
- 13 [30] Forman, L.J., Marquis, D.E., Stevens, R., Adler, R. and Vasilenko, P., 1985. Diabetes
14 induced by streptozocin results in a decrease in immunoreactive beta-endorphin levels
15 in the pituitary and hypothalamus of female rats, *Diabetes.* 34, 1104-7.
- 16 [31] Wang, F., Gao, L., Gong, B., Hu, J., Li, M., Guan, Q. and Zhao, J., 2008. Tissue-specific
17 expression of PPAR mRNAs in diabetic rats and divergent effects of cilostazol, *Can J*
18 *Physiol Pharmacol.* 86, 465-71.
- 19 [32] Goyal, S., Arora, S., Bhatt, T.K., Das, P., Sharma, A., Kumari, S. and Arya, D.S., 2010.
20 Modulation of PPAR-gamma by telmisartan protects the heart against myocardial
21 infarction in experimental diabetes, *Chem Biol Interact.* 185, 271-80.
- 22 [33] Basta-Kaim, A., Budziszewska, B., Jaworska-Feil, L., Tetich, M., Kubera, M.,
23 Leskiewicz, M., Otczyk, M. and Lason, W., 2006. Antipsychotic drugs inhibit the human
24 corticotropin-releasing-hormone gene promoter activity in neuro-2A cells-an
25 involvement of protein kinases, *Neuropsychopharmacology.* 31, 853-65.
- 26 [34] Chen, F. and Harrison, L.E., 2005. Ciglitazone induces early cellular proliferation and
27 NF-kappaB transcriptional activity in colon cancer cells through p65 phosphorylation,
28 *Int J Biochem Cell Biol.* 37, 645-54.

29

30

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

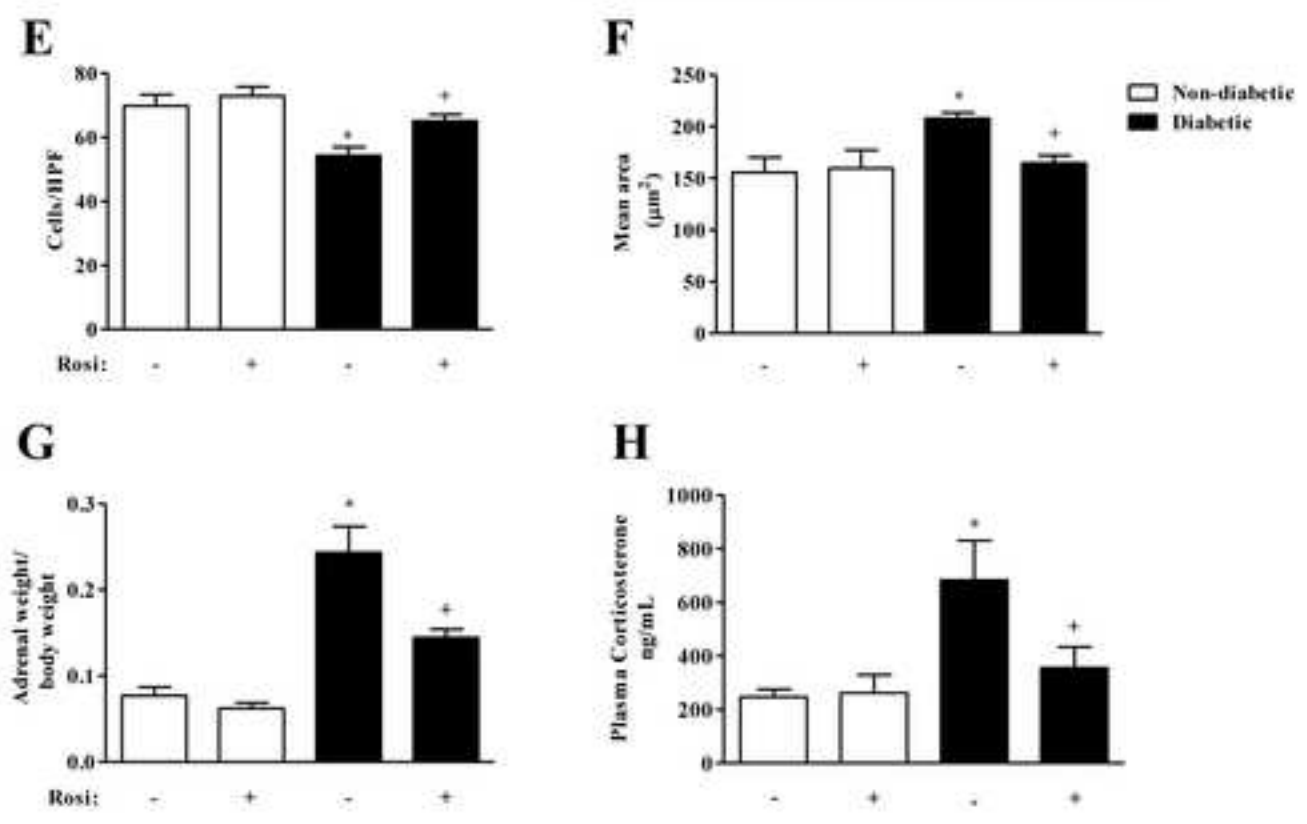
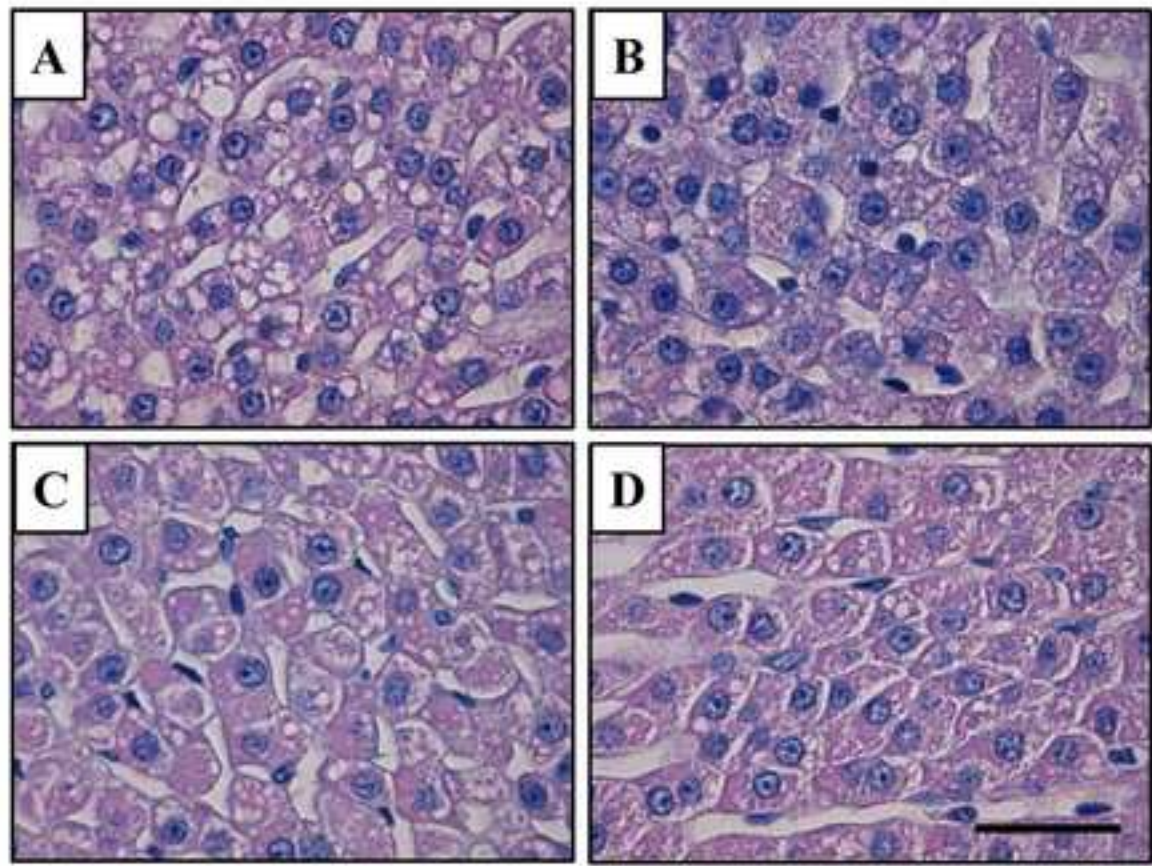


Figure 2

[Click here to download high resolution image](#)

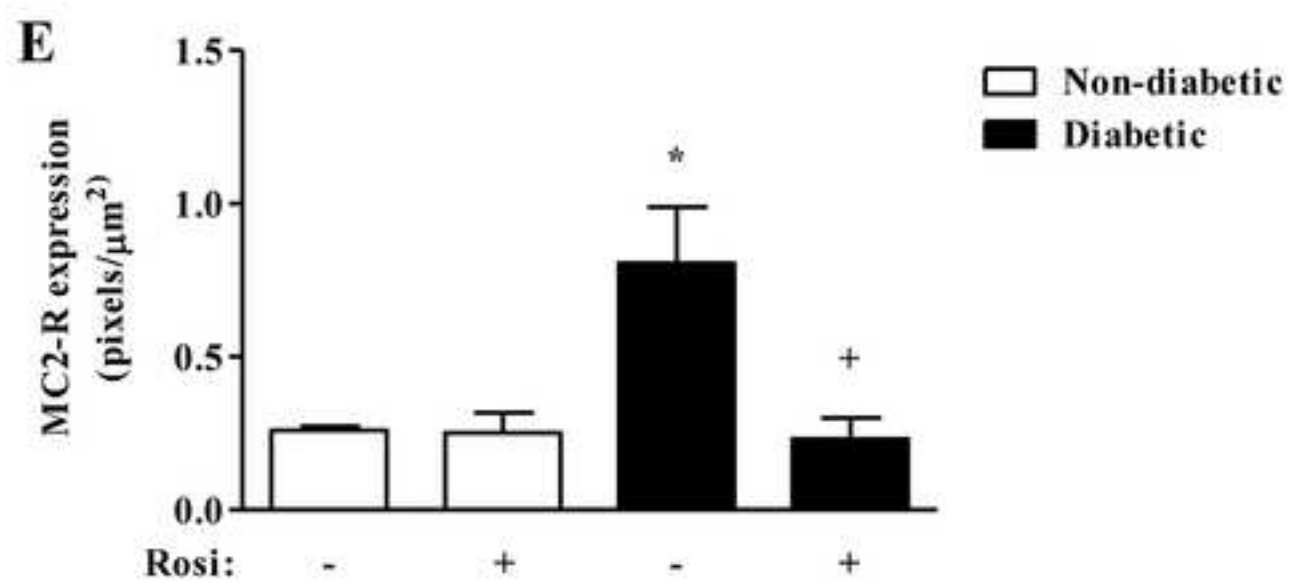
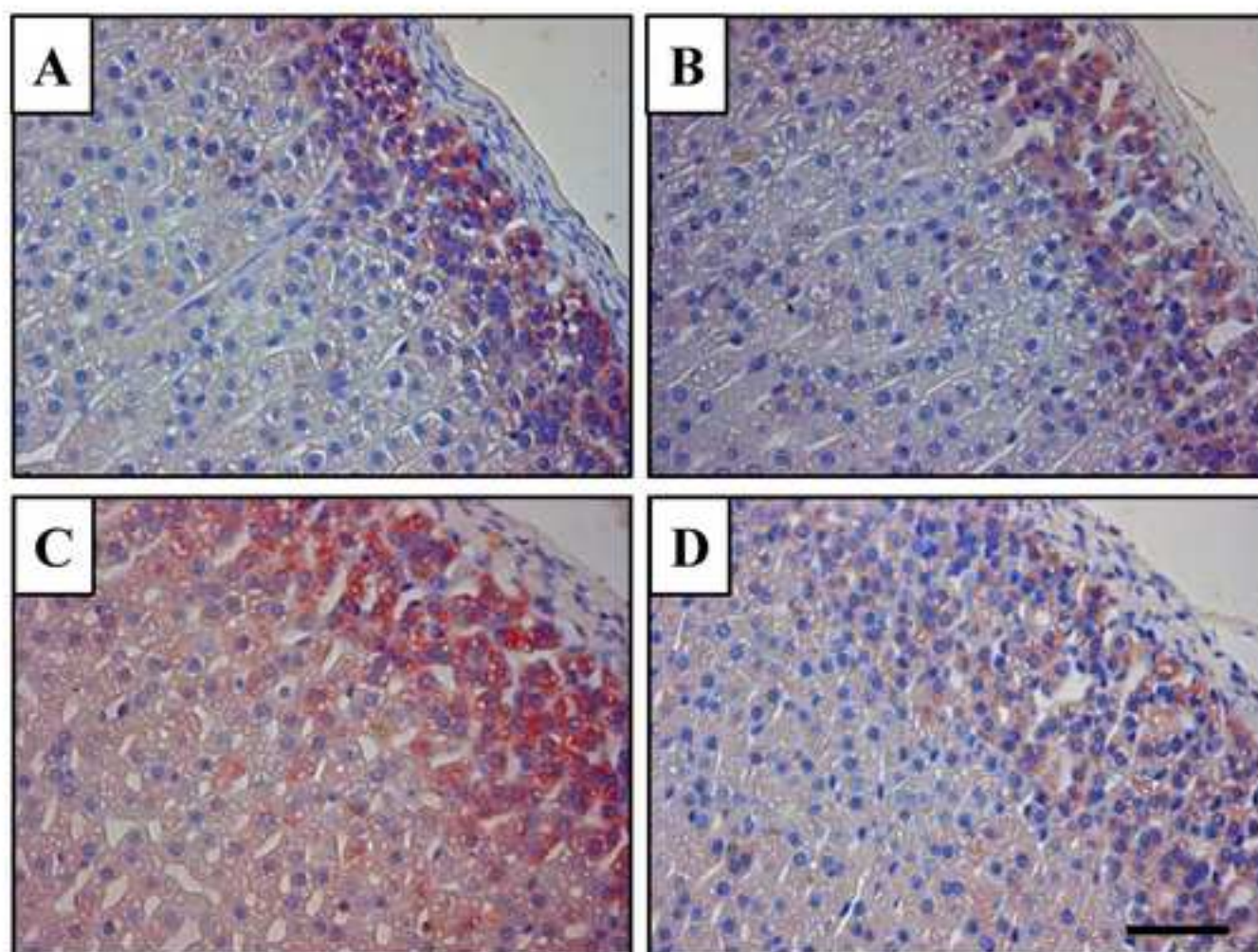
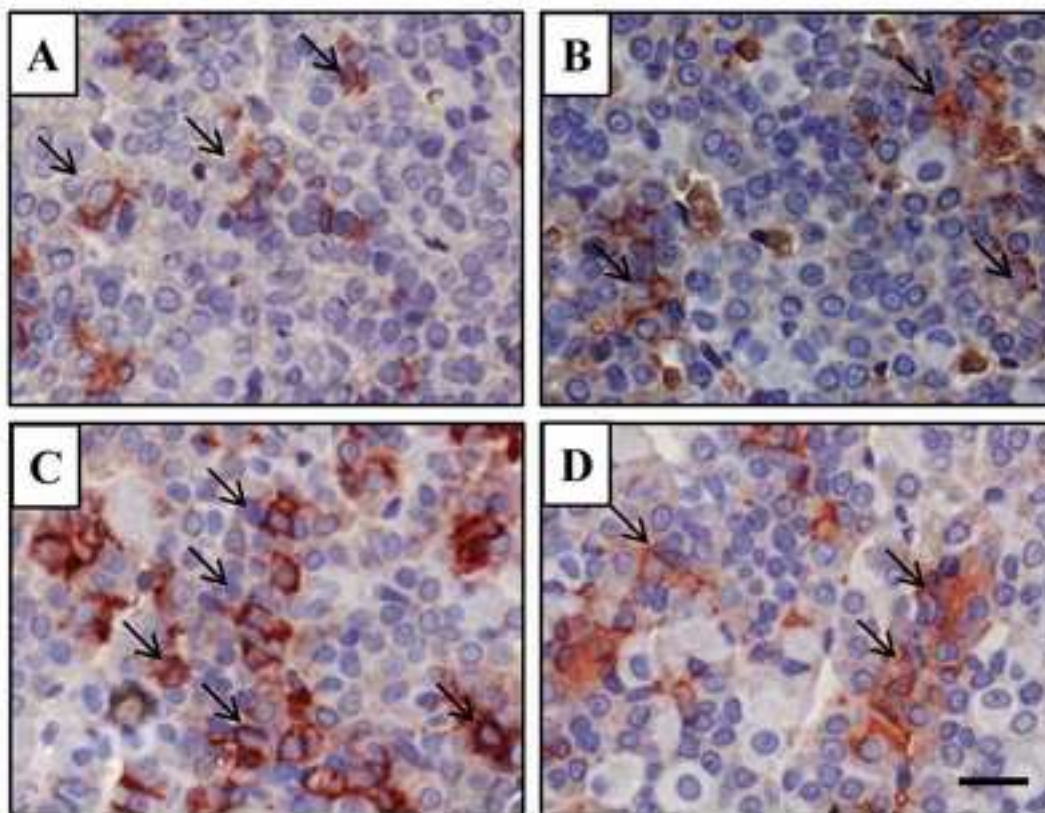
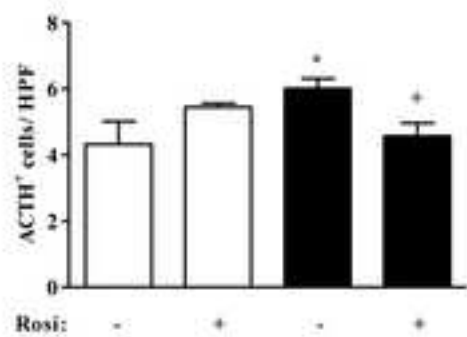


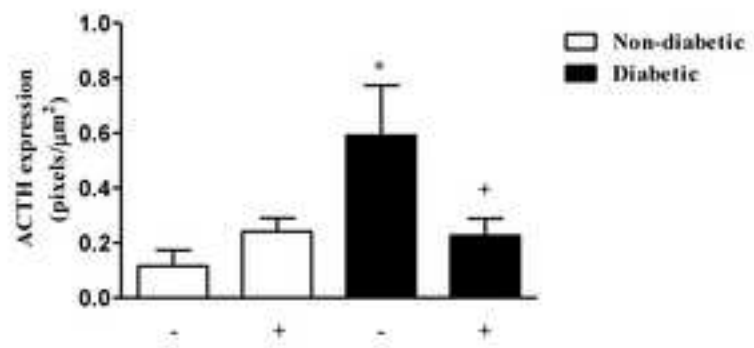
Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)



E



F



G

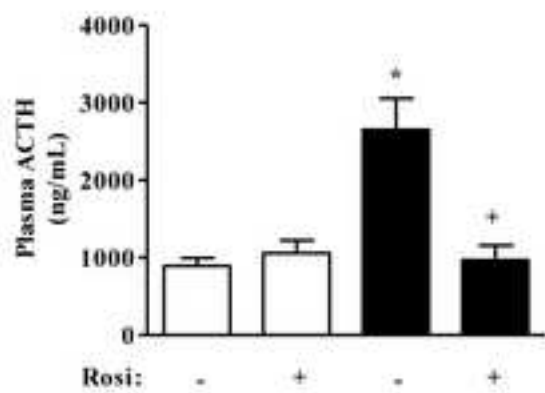


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

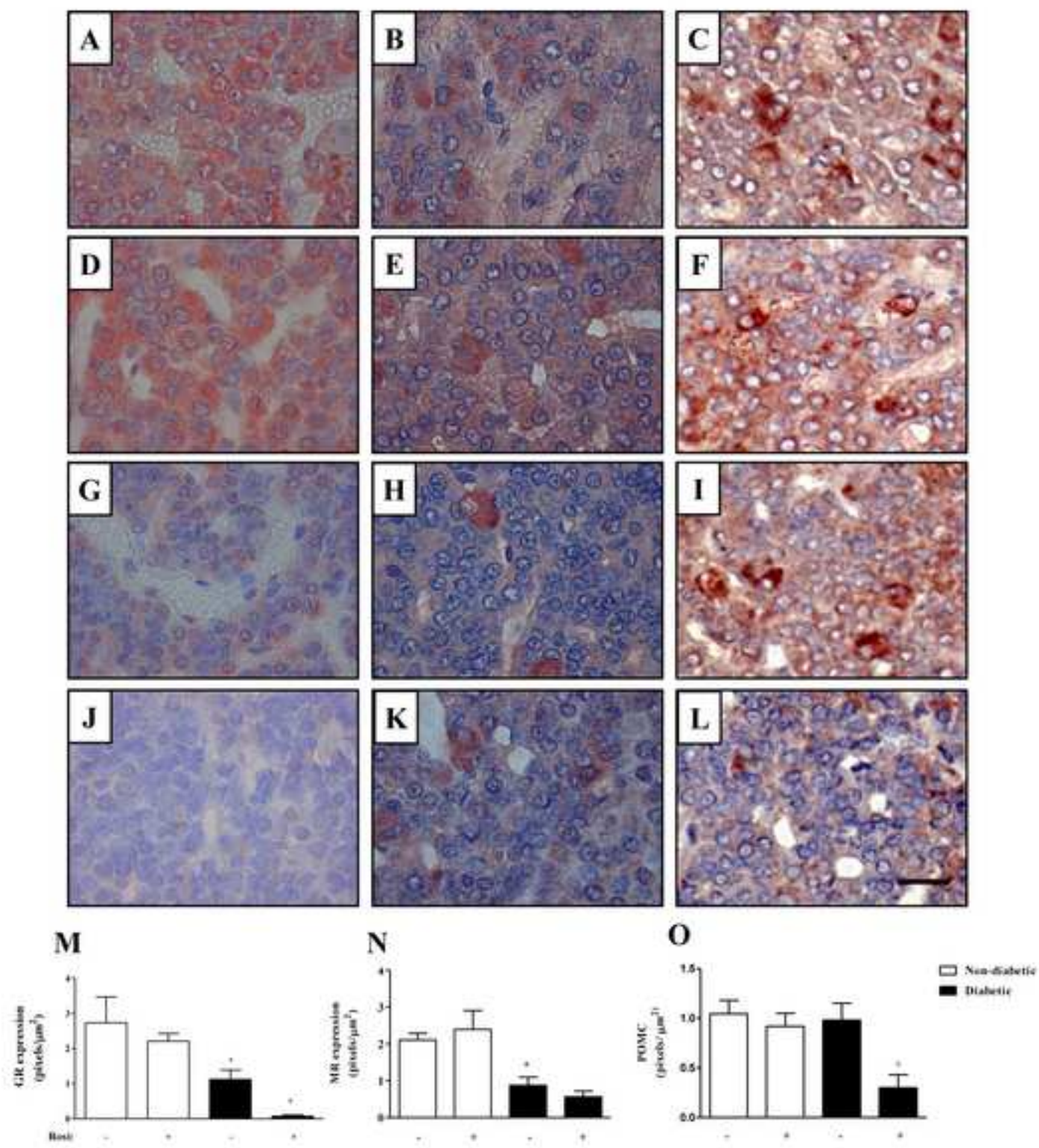


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

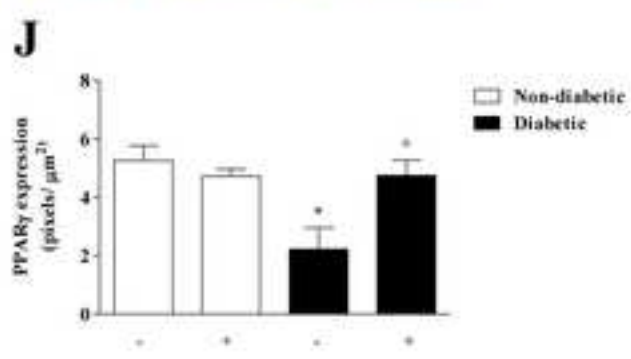
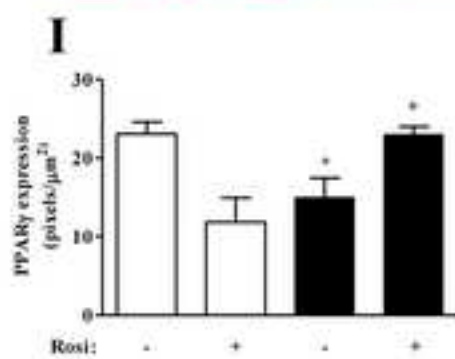
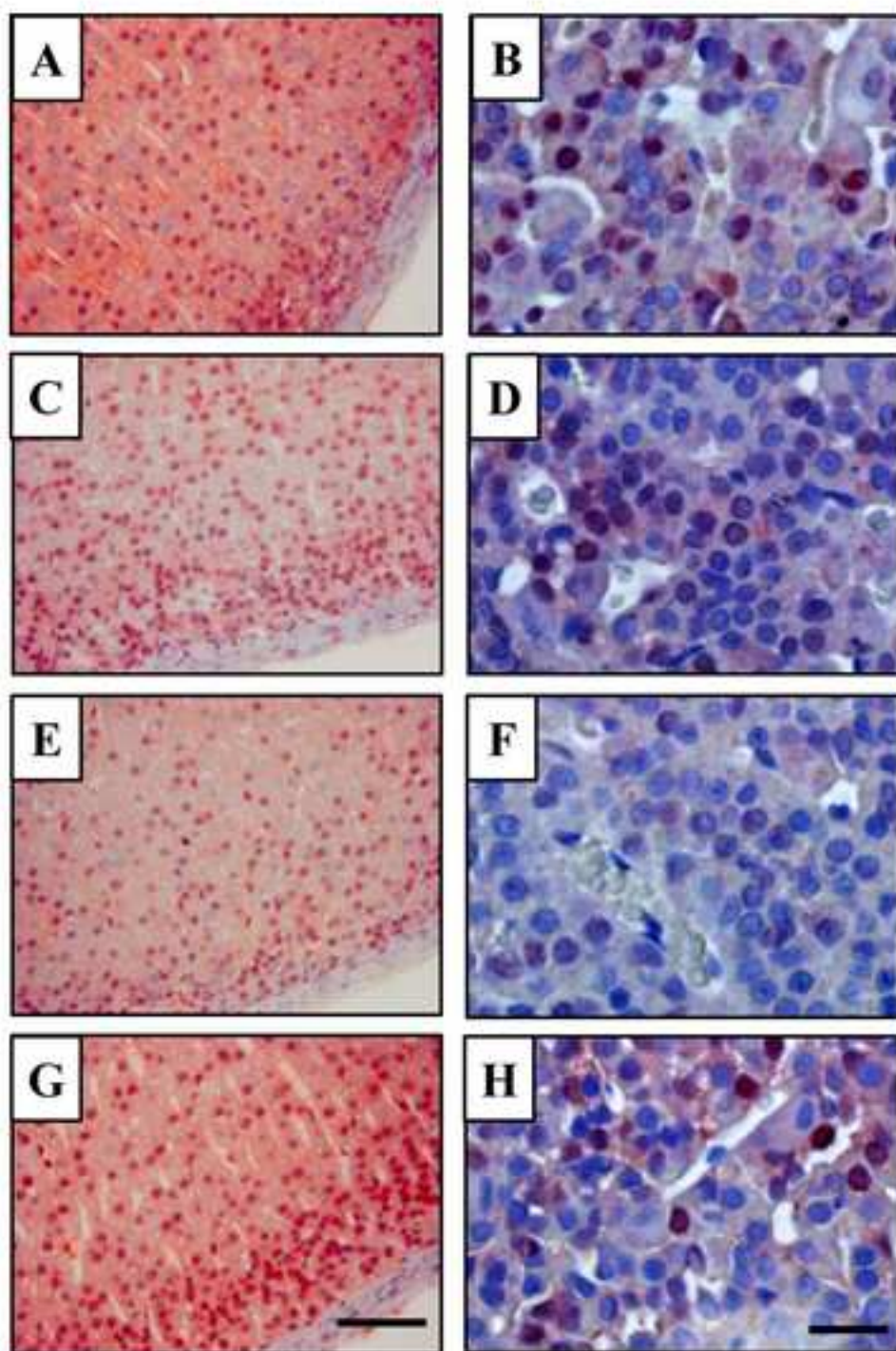


Figure 6

[Click here to download high resolution image](#)

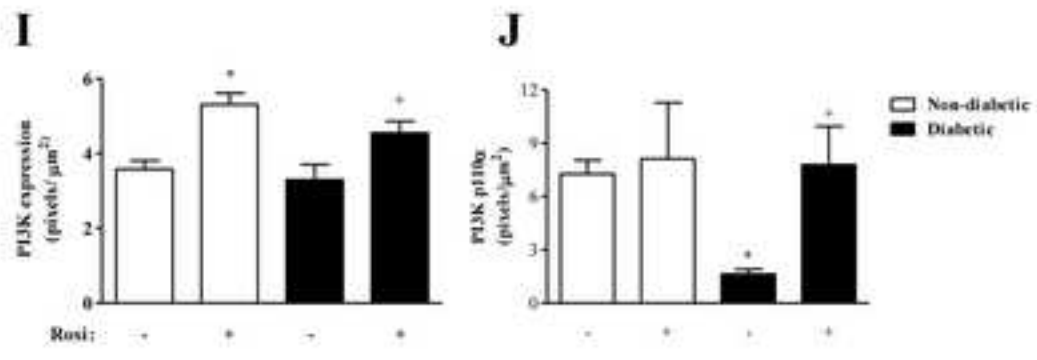
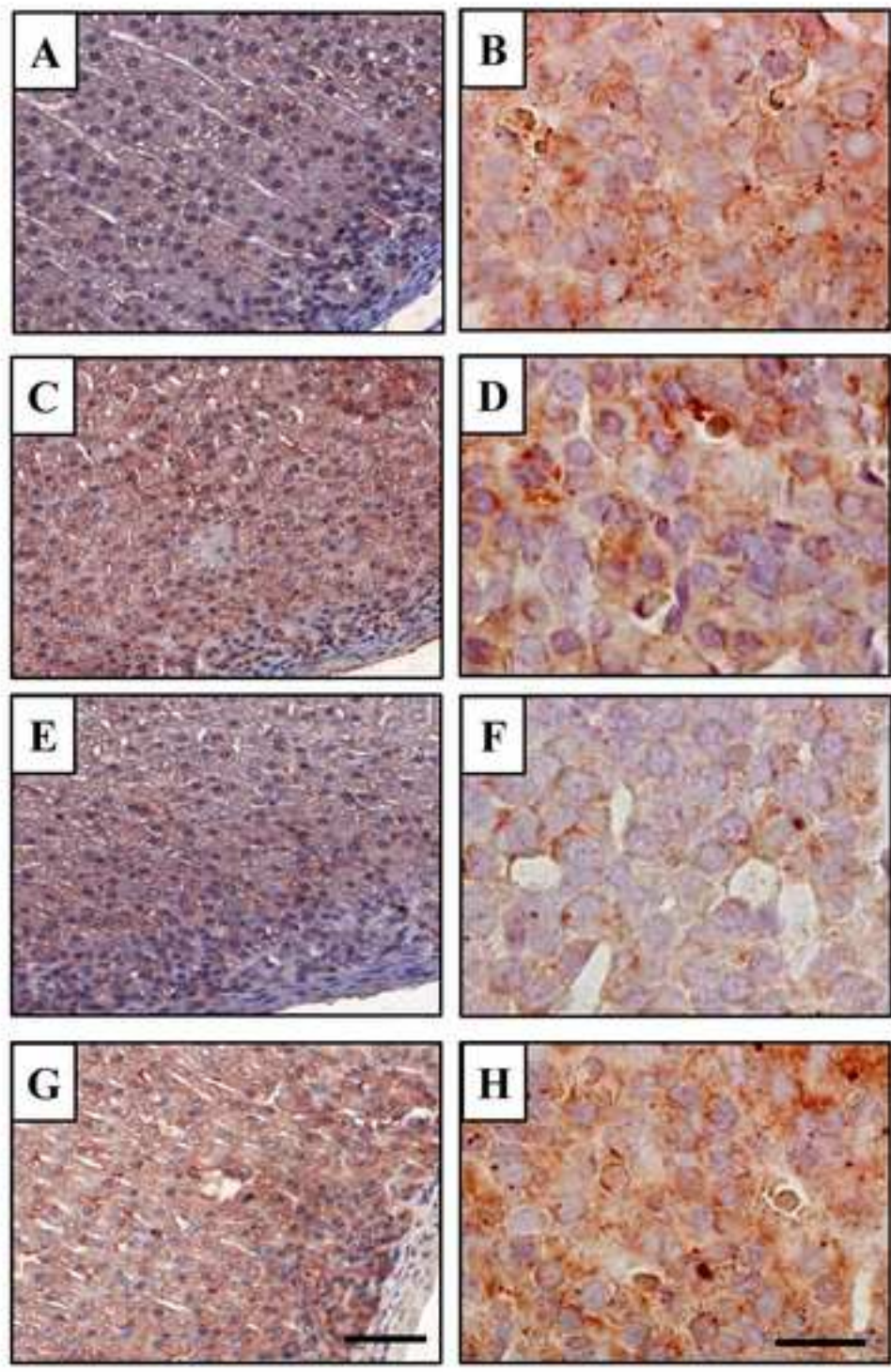
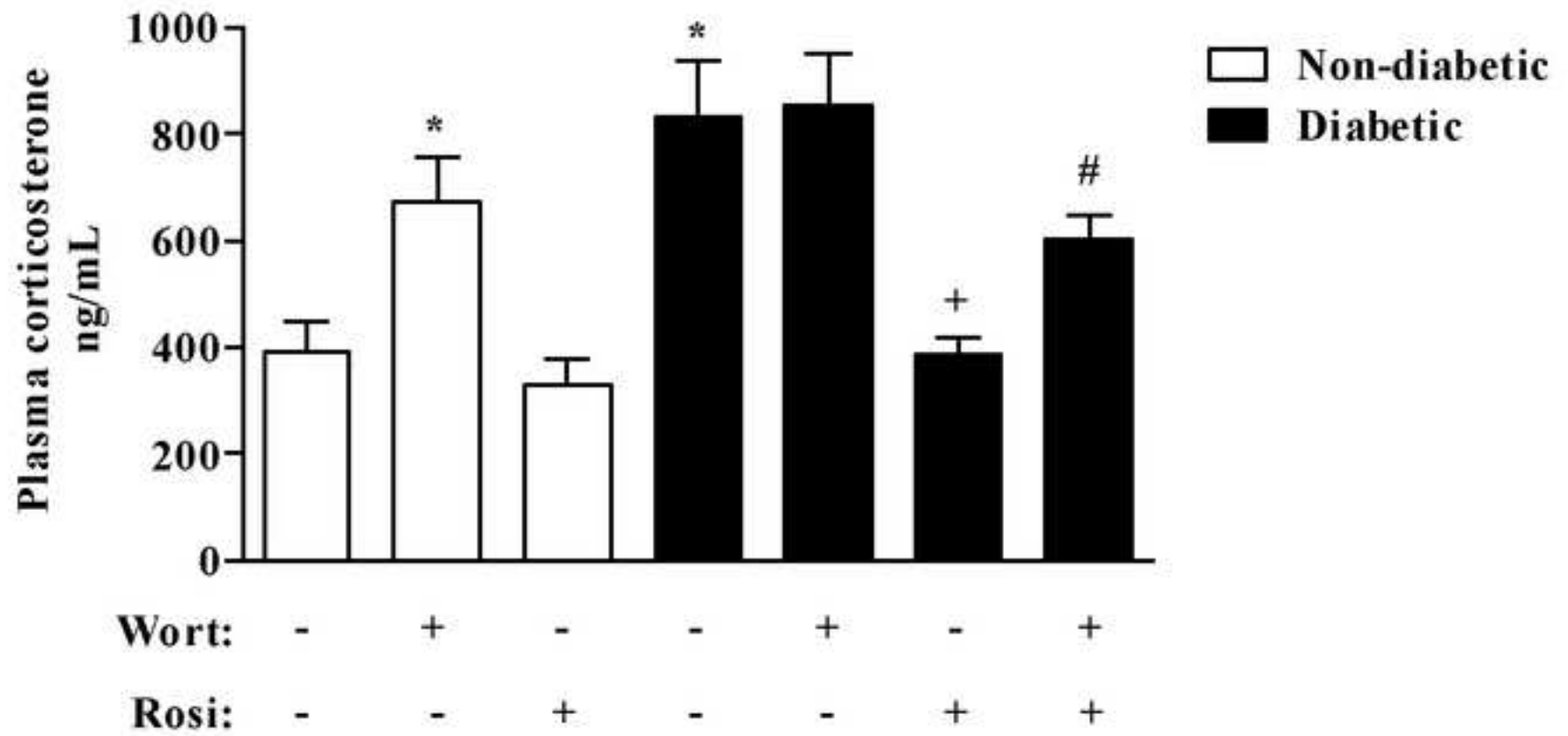


Figure 7
[Click here to download high resolution image](#)



Certification of english language edition

[Click here to download Supplementary Material: Certificado AJE.pdf](#)