

Camilo de Lellis Santos

**Alterações na expressão de Dexas1 mediada pela
cooperação entre STAT5 e GR contribuem para
modulação da secreção de insulina na gestação e
lactação**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana
Orientador: Prof. Dr. Silvana Bordin

**São Paulo
2010**

RESUMO

Lellis-Santos, C. Alterações na expressão de Dexras1 mediada pela cooperação entre STAT5 e GR contribuem para modulação da secreção de insulina na gestação e lactação. [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Não é claro como o receptor de glicocorticóide (GR) contrarregula a atividade do STAT5 na transição da gestação para a lactação. Dexras1 é uma pequena proteína G ativada por dexametasona (DEX), que regula morfologia celular, crescimento, etc. Neste estudo detectamos a expressão de Dexras1 em células beta de ilhotas pancreáticas. DEX induz a expressão de Dexras1 em células RINm5F, que está aumentada na gestação e diminuída na lactação. A expressão protéica de 11 β HSD1, enzima ativadora de glicocorticóides (GCs), segue esse perfil. A ligação tanto do GR como do STAT5, analisada por CHIP assay, ao promotor do gene da Dexras1 aumentada por DEX é revertida por prolactina (PRL), e está diminuída e aumentada na gestação e lactação, respectivamente. DEX induz a associação ao GR, fosforilação e translocação nuclear do STAT5b. O silenciamento gênico de Dexras1 promoveu aumento da secreção de insulina, e aumentou os níveis de pERK1/2, pCREB, pPKC δ e PKA. Sendo assim, a regulação de Dexras1 por PRL e GCs contribui para a secreção de insulina característica do periparto.

Palavras-chave - Dexras1. Ilhotas pancreáticas. Gestação. Lactação. Prolactina. Glicocorticóides.

ABSTRACT

Lellis-Santos, C. Alterations in Dexas1 expression mediated by STAT5 and GR cross-talk contribute to the modulation of insulin secretion during pregnancy and lactation. [These]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

It is not clear how glucocorticoid receptor (GR) counteracts STAT5 activity during the transition of pregnancy to lactation. Dexas1 is a small G protein activated by dexamethasone (DEX) that controls cell morphology, growth, etc. In the present study we detected Dexas1 expression in pancreatic beta cell. DEX induces Dexas1 expression in RINm5F cells, which is increased in pregnancy and decreased in lactation. The expression of 11 β HSD1, the glucocorticoids (GCs) activating enzyme, followed Dexas1 profile in pancreatic islet. Both GR and STAT5b bindings to Dexas1 gene promoter, analyzed by CHIP assay, are increased by DEX and PRL counteracts this effect. Both bindings are decreased in pregnancy and increased in lactation. DEX induces STAT5b association to GR, phosphorylation and nuclear translocation. Dexas1 knockdown using small interference RNA (si-RNA) promoted an increase in insulin secretion, as well as increased levels of pERK1/2, pCREB, pPKC δ and PKA. Thus, Dexas1 regulation by PRL and GCs contributes to insulin secretion during peripartum.

Key words - Dexas1. Pancreatic islets. Pregnancy. Lactation. Prolactin. Glucocorticoids.

1 INTRODUÇÃO

No final da gestação, a resistência à insulina característica deste período é normalmente compensada por importantes mudanças estruturais e funcionais na ilhota pancreática, a fim de suprir as necessidades do organismo materno de insulina (Rossi et al., 1993). Em meados do século passado já se observava a expansão do volume das ilhotas durante a gravidez (Hellman, 1960), resultado do aumento da taxa de proliferação de células β (Parsons et al. 1992). Em roedores, o aumento da proliferação ocorre ao redor do décimo dia de gestação, com pico ao redor do décimo quarto dia (Sorenson e Brelje, 1997; Kawai e Kishi, 1999), correspondente na mulher ao final do 2º trimestre.

Além da resposta compensatória resultante da resistência à insulina, vários hormônios associados à gravidez poderiam participar diretamente da regulação da função pancreática. As evidências acumuladas nos últimos 30 anos mostram que o lactogênio placentário (PL) e a prolactina (PRL) induzem as alterações morfofuncionais da ilhota pancreática observadas na gravidez, i.e., (1) aumento da atividade mitogênica; (2) redução da apoptose; e, (3) aumento da sensibilidade à glicose. (Brelje e Sorenson, 1997; Sorenson e Brelje, 2001; Nielsen et al., 2001). Essas alterações são, em última análise, o resultado de um ajuste complexo da atividade transcricional das células da ilhota, envolvendo a inibição ou estimulação da síntese de proteínas que medeiam os processos intracelulares (Bordin, 2004b).

Por sua vez, o aumento dos níveis de glicocorticóides (GC) tem efeitos antagônicos ao da PRL, caracterizados pela indução da apoptose e inibição da proliferação celular, da síntese e da secreção de insulina estimulada pela glicose

(Weinhaus et al., 2000; Shao et al., 2004). Em humanos, no terceiro trimestre as concentrações plasmáticas do cortisol aumentam até 3 vezes acima dos níveis pré-concepcionais. A maior parte desse aumento pode ser explicada pela duplicação das quantidades de globulina de ligação dos corticóides (CBG). Os níveis altos de estrogênio da gravidez são responsáveis pela elevação desta globulina que, por sua vez, é suficiente para explicar a redução do catabolismo do cortisol pelo fígado. O resultado é a duplicação da meia-vida do cortisol plasmático. A produção efetiva pela zona fasciculada também aumenta na gravidez. O efeito final dessas alterações é a elevação do cortisol plasmático livre, que praticamente duplica no final da gestação (Taylor e Lebovic, 2006). É importante destacar que, no período pós-parto, ocorre redução da massa da ilhota mesmo na presença de altos níveis de PRL circulante. '*In vitro*', as ações da PRL não são completamente revertidas pela retirada do hormônio, mas sim pela adição de dexametasona no meio de cultura. Estas observações sugerem que a reversão da adaptação funcional ocorrida durante gravidez envolve um controle sofisticado de regulação de expressão gênica mediada pela ação destes dois hormônios.

1.1 Via de sinalização ativada por prolactina

PRL utiliza um receptor de membrana ativado por membros da família das citocinas que transduz o sinal via JAK2-STAT5 para regular a expressão gênica. JAKs (*Janus Kinase*) são tirosinas quinases que estão pré-associadas com regiões próximas da membrana dos receptores de citocinas. A ligação da PRL ao receptor resulta na oligomerização das subunidades do receptor, que induz a aproximação das JAKs.

Estas se tornam secundariamente ativadas por fosforilação em tirosina e iniciam a cascata de sinalização através da fosforilação em resíduos de tirosina presentes em domínios citoplasmáticos do receptor e em proteínas associadas ao receptor. Esses domínios ancoram os STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), que são proteínas latentes no citoplasma, e após estímulo são recrutados através da interação entre os domínios SH2 (Src homology 2) e sequencias específicas fosfotirosinas do receptor. Há sete STATs descrito em mamíferos: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6. Uma vez recrutados, os STATs se fosforilam, dissociam-se do receptor e se dimerizam através da interação com os recíprocos domínios SH2. Enfim, adquirem uma atividade de ligação ao DNA, que induz a exposição do sinal de localização nuclear (NLS – *nuclear localization signal*), e a migração para o núcleo (Darnell, 1997; Heinrich et al., 2003) (Figura 1).

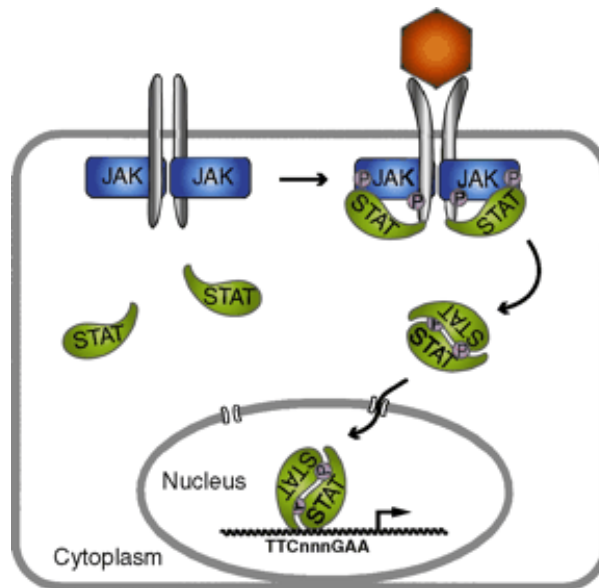
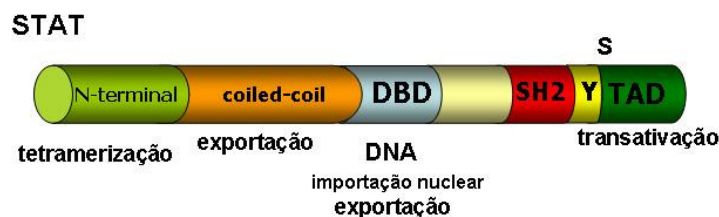


Figura 1 - Esquema representativo da sinalização canônica dos receptores de citocinas. A após ligação da PRL ao receptor, ocorre fosforilação da Jak2 que recruta, ancora e fosforila STAT5, que permite sua dimerização, migração e translocação para núcleo, onde se ligam a elementos responsivos ao STAT5.

Os STATs apresentam uma região N-terminal que contém uma sequência responsável pela dimerização e outros tipos de interações com proteínas, seguido de um domínio *coiled-coil* com sítios para ligação de exportação nuclear (NES – *nuclear export sequence*), um domínio de ligação ao DNA (DBD – *DNA binding domain*) que contém um NES rico em leucina para exportação mediada por CRM1 (*chromosomal replon maintenance 1*) e um NLS para importina- α 5. Além disso, a região C-terminal dos STATs é composta por um domínio SH2 seguido por um domínio de transativação (TAD – *Transactivation domain*) com um sítio para fosforilação em tirosina (Y) e um conservado sítio fosfoserina (S) que modula a interação dos STATs com outros co-fatores como HATs (*histone acetyl transferase*) e CBP/p300 (*CREB binding protein/p300*) (Rogatsky e Ivashkiv, 2006) (Figura 2a).

(A)



(B)

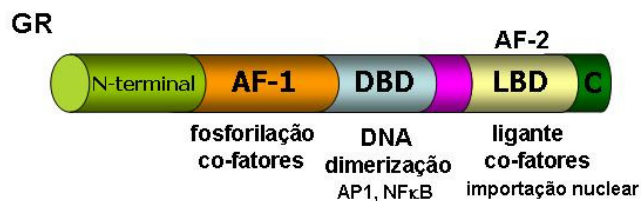


Figura 2 - Domínios funcionais do STAT5 e GR. (A) Na região N-terminal do STAT, encontra-se domínio *coiled-coil* que contém sequência reconhecida por proteínas de exportação nuclear. DBD é o domínio de ligação ao DNA e contém sítios para importação e exportação nuclear. Na região C-terminal localizam-se sítios para interação com proteínas (SH2), fosforilações em tirosina (Y) e serina (S), e para interação com fatores de transativação (TAD). **(B)** Na região N-terminal do GR encontra-se o principal sítio para interação com proteína (AF-1), seguido da região de ligação ao DNA, que contém sítios para dimerização, e enfim no domínio LBD ocorre a ligação do hormônio, associação de co-fatores e proteínas de importação nuclear.

Os STATs ligam-se a elementos responsivos aos STATs (STATRE – *STAT response element*) nas regiões promotoras de genes contendo a sequencia consenso TTCnnnGAA e modulam a transcrição (Masui et al., 2008; Lebaron et al., 2005; Nelson et al., 2004; Fleenor e Freemark, 2001).

STAT5 foi originalmente identificado em glândula mamária de ratas lactantes como mediador da atividade do promotor do gene da beta-caseína (Schmitt-Ney et al., 1991). Atualmente alguns genes foram descritos como regulados diretamente pela atividade do STAT5, tais como α 2-macroglobulina ([Dajee](#) et al., 1996); 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 ([Feltus](#) et al., 1999); transportador de glicose 2 (Petryk et a., 2000) e o gene da insulina (Fleenor e Freemark, 2001).

Existem 2 isoformas caracterizadas de STAT5, denominadas STAT5a e STAT5b. A geração de camundongos *Knockout* para os STAT5a e STAT5b mostrou que estas isoformas exercem função essencial na ação biológica da PRL (Liu et al., 1997; Teglundn et al., 1998) e também do GH, outro importante fator de crescimento para a célula β pancreática (Nielsen et al., 2001).

Na ilhota pancreática, o receptor de PRL (PRLR) está restrito à célula β e utiliza preferencialmente a via de sinalização JAK2/STAT5 (Polak et al., 1990; Sorenson e Stout, 1995). Para entender o papel fisiológico do PRLR, foram desenvolvidos camundongos deficientes do PRLR; estes apresentaram ilhotas com redução da massa, conteúdo de insulina e redução da secreção de insulina estimulada por glicose ([Freemark](#) et al., 2002). Entretanto, as primeiras observações de que o PRLR é necessário para o funcionamento adequado das ilhotas durante a gravidez foi demonstrado apenas recentemente (Huang et al., 2009). Neste trabalho foi

demonstrado que camundongos com *knockout* heterozigóticos apresentaram depuração de glicose diminuída, diminuição da secreção de insulina, hiperglicemia de jejum e baixos níveis de insulina. Além disso, o aumento do número e massa de células na ilhota, normais na gravidez, não ocorreram nestes animais.

1.2 Via de sinalização ativada por glicocorticóides

Os glicocorticóides tem grande efeito anti-proliferativo em diferentes tipos celulares, e por isto é amplamente usado como agente imuno-supressor e anti-inflamatório. Além disso, estes hormônios estão envolvidos com o metabolismo intermediário, manutenção das propriedades do tônus cardiovascular e atividades do sistema nervoso como: cognição, humor e sono.

Os efeitos biológicos dos glicocorticóides são mediados pelo receptor de glicocorticóide (GR), um fator de transcrição que, após ativado pela ligação ao hormônio, pode regular a transcrição de genes responsivos. O gene GR humano, localizado no cromossomo 5, é regulado por vários elementos no promotor e codifica no mínimo dois diferentes transcritos por processamento alternativo na região 3', denominados GR α e GR β . Lu e Cidlowski (2005) demonstraram que vários GR α são traduzidos a partir de no mínimo 8 sítios de inicialização, gerando múltiplas isoformas do GR α denominadas GR α A, B, C1-C3 e D1-D3. Na ausência do glicocorticóide, GR localiza-se no citoplasma como parte de um grande complexo hetero-oligomérico que contem as HSPs (*heat shocks proteins*) 90, 70, 50 e 20, e imunofilinas, bem como outras proteínas. Após passagem pela membrana citoplasmática, foi demonstrado que transformações de glicocorticóides hidroxilados na posição β , catalisada pela enzima

11 β -hidroxiesteróide-desidrogenase (11 β -HSD), determinam o efeito dos GCs em tecidos alvos. Até o momento duas isoformas desta enzima, a 11 β -HSD-1 e a 11 β -HSD-2, foram descritas detalhadamente (Oppermann et al., 1997). A 11 β -HSD-1 age como uma redutase dependente de NADPH em tecidos de roedores e catalisa a conversão de 11-dehidrocorticosterona em corticosterona (Low et al., 1994). A 11 β -HSD-2 é uma desidrogenase dependente de NAD⁺ de alta afinidade ($K_m \sim 10$ nM), que, em tecidos de roedores, catalisa a conversão corticosterona para cortisona, sua forma de baixa atividade (Mune et al., 1995).

Após ligação do hormônio, GR sofre alteração conformacional, dissocia-se das HSPs, dimeriza-se e migra para o núcleo após ter exposto o NLS. No núcleo interage diretamente com elementos responsivos aos glicocorticóides (GRE – *glucocorticoid response element*) que são sequencias consensus GGTAAnnTGTCT (Van Der Laan et al., 2008; Schoneveld et al., 2004; Adler et al., 1992) (Figura 3). Essa interação com os elementos responsivos ocorre de três maneiras distintas: (i) simples, pelo reconhecimento de sítios de sequencias palindrômicas ou semi-sítios; (ii) composta, de GREs “gerados” pela ligação do GR a outros fatores de transcrição que podem não ser elementos responsivos convencionais; e (iii) ancorados, ligação a GREs que são elementos responsivos para outros fatores de transcrição, que ao se ligarem ao DNA carregam consigo o GR.

O GR contém dois domínios de fatores de transativação (AF-1 e AF-2) na região N-terminal e domínio de ligação do ligante, respectivamente, que permitem a interação com outras proteínas, além de sítios de dimerização e ligação ao AP1 (*activator protein*) e NF κ B (*nuclear factor κ B*) na região DBD (Chrousos e Kino, 2005) (Figura 2b).

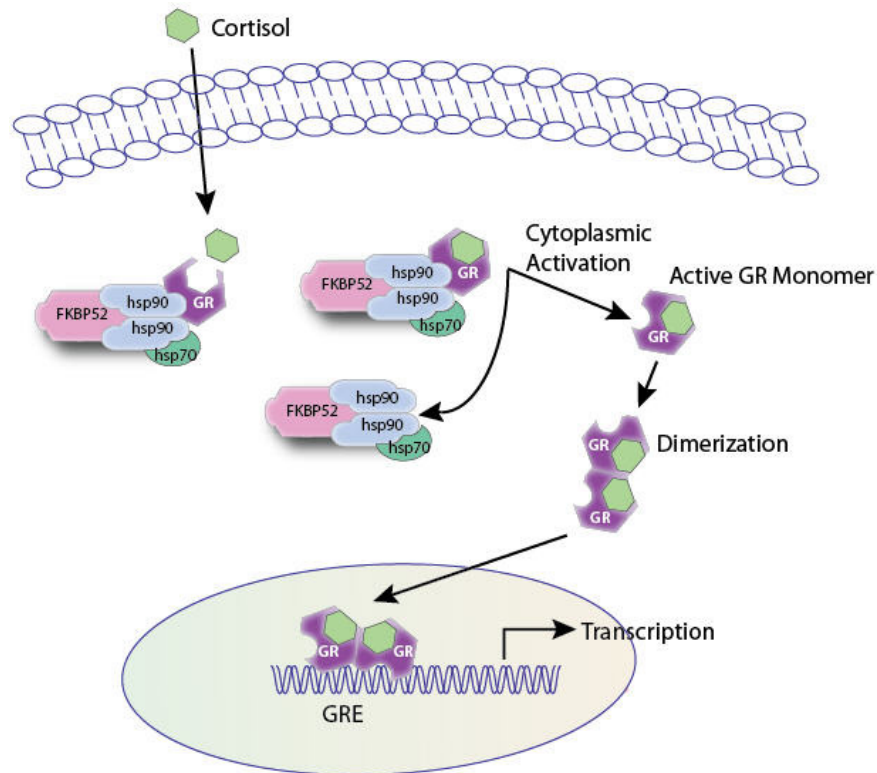


Figura 3 - Esquema representativo da ativação do GR pelos GCs. Após passar livremente pela membrana plasmática, o GC se liga ao GR, que se desliga do complexo formado pelas HSPs. O GR se dimeriza, migra para o núcleo e se liga a elementos responsivos aos GCs.

O GR foi primeiramente descrito em células do timo de rato (Munck, Wira, Young, Mosher, Hallahan, Bell, 1972) e foi identificado pela primeira vez em ilhota pancreática expressando exclusivamente no citoplasma e núcleo da célula β (Fischer et al., 1990). Foi demonstrado por Gesina et al. (2006) que camundongos *knockout* heterozigótico para GR apresentam aumento da fração da célula β na ilhota,

confirmando os dados de que os glicocorticóides exercem efeito negativo sobre o crescimento e proliferação das células β .

1.3 Cross-talk entre diferentes vias de sinalização intracelular

A ativação de diferentes vias de sinalização intracelular mediada por hormônios ou citocinas específicos é um esquema comum necessário para o desencadeamento da resposta celular. Entretanto, uma série de evidências tem demonstrado que a inibição individual de cada via não é suficiente para suprimir completamente os efeitos biológicos das citocinas, indicando assim que, frequentemente, ocorre a cooperação entre a via JAK-STAT e outras vias de sinalização intracelular. Além da comprovada interação entre as vias JAK-STAT e a via da PI3K-AKT em vários tecidos (Yokogami et al., 2000; Kraus et al., 2002; Hsu et al., 2004), há também evidências de que os STATs interagem com os receptores intracelulares de GC (GR) e alteram sua atividade (Stöcklin et al., 1996; Zhang et al., 1997).

Por exemplo, a estimulação por IL6 induz a ativação do STAT3, que age como um potente co-ativador transcricional do GR (Zhang *et al.*, 1997). Os glicocorticóides também potencializam as ações da IL6 (Takeda et al., 1998), o que explica a conhecida ação sinérgica entre estes dois importantes mediadores das respostas inflamatória e imunológica. GR interage fisicamente *in vivo* com a porção N-terminal do STAT5 e contribui para regulação da expressão de genes envolvidos com a maturação e tamanho corpóreo (Engblom et al., 2007). Além disso, foi demonstrado associação e interação do STAT5 e GR na regulação do promotor do gene da β -caseína (Kabotyanski et al., 2006). Em células linfóides, foi demonstrado que GR reprime a

expressão de bcl-X por recrutar o STAT5b ao promotor P4 (Rocha-Viegas et al., 2006). GR ativa diretamente o gene TLR2 (*Toll-like receptor 2*), que depende da ação cooperativa com o STAT5. Em células A549, o TLR2 é sinergicamente ativado por TNF α (*Tumor necrosis factor α*), mas o tratamento com o antagonista do GR (RU486), a superexpressão da forma dominante negativa do STAT5, a remoção do domínio AF-1, ou a mutação do sítio de ligação no promotor do TLR anulam a resposta sinérgica (Hermoso et al., 2004).

Além desses mecanismos clássicos de interação proteína:proteína entre GR e STAT3 ou STAT5, foi demonstrado que GR, através da ligação de co-fatores ao domínio AF-1, coopera com o STAT1 na ativação da transcrição do gene Fc γ RI (*high-affinity receptor for IgG1*) (Aittomäki et al., 2000). Em células NK3.3 e células T primárias, os GCs também agem inibindo a fosforilação do STAT4 induzida por IL-12, suprimindo assim a expressão de IFN γ e IRF1 (Franchimont et al., 2000). Semelhante ao descrito para o STAT5, também é possível que o GR interaja com o STAT6 na regulação do promotor do gene beta caseína, na medida em que este apresenta elemento responsivo que difere em apenas um nucleotídeo da sequencia consenso (TTCnnnnGAA) (Chida et al., 1998).

Apesar da reconhecida importância do STAT5 e do GR como mediadores intracelulares centrais das respostas da célula β à gestação, até o momento não há relatos sobre as possíveis interações entre estes fatores em células β pancreáticas. Além disto, ainda é desconhecido os mecanismos pelos quais ocorrem os efeitos antagônicos entre GCs e PRL.

1.4 Proteínas Gs e controle da secreção de insulina

Os receptores acoplados à proteína G (GPCR- *G-protein-coupled receptors*) estão envolvidos em muitas funções das ilhotas pancreáticas. O GPCR age transmitindo a informação de um estímulo extracelular para proteínas G sinalizadoras intracelulares que são formadas por 3 subunidades: α , β e γ . Um grande número de proteínas G foi identificado, incluindo Gs, Gi e Gq, que agem estimulando ou inibindo a atividade de enzimas. Assim, a Gs (estimulatória) ativa a adenilato ciclase (AC), resultando no aumento da produção de cAMP, com subsequente ativação da proteína quinase A (PKA – *protein Kinase A*) e da família Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*) de fatores trocadores de nucleotídeo guanina regulados por cAMP, os quais apresentam múltiplos fatores à jusante. Gi age inibindo a AC via $G_{\alpha i}$, mas também age via $G_{\beta\gamma}$, sobre a fosfolipase C- β (PLC β - *phospholipase C β*), canais de K^+ , AC e PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*). A via da Gq estimula PLC β a produzir IP3 (*inositol 1,4,5 – trifosfato*) e DAG (*diacylglicerol*), onde IP3 promove a liberação de Ca^{+2} do retículo endoplasmático e DAG ativa a PKC (Winzell e Ahrén, 2007).

Muitas moléculas estimulam ou inibem a secreção de insulina nas ilhotas pancreáticas via GPCR. Os estimuladores tais como GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*), GIP-1 (*glucose-dependent insulinotropic polypeptide*), noradrenalina via receptor β_2 , glucagon, VIP (*vasoactive intestinal polypeptide*), entre outros, utilizam Gs para estimular a AC. Por sua vez, a secreção de insulina é inibida por neuropeptídeo Y via receptor Y1, noradrenalina via receptor α_2 , somatostatina via receptor sstr2 e endocanabinóide via receptor CB1, através da atividade inibitória sobre a AC pela Gi.

Além da participação das proteínas Gs na secreção de insulina, uma recente revisão de Wang e Thurmond (2009) relatou que a atividade de pequenas proteínas Gs, tais como da família Ras, Rho e Rab, interagem com o citoesqueleto e proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), regulando assim a secreção de insulina.

Ras são proteínas da família de pequenas proteínas (frequentemente 20-25kDa) ligadoras do nucleotídeo guanina, e exercem papel central em múltiplas vias de sinalização celular regulando proliferação celular, diferenciação e apoptose. Proteínas Ras funcionam como molécula conversora do sinal de transdução alternando entre as formas ligada ao GTP (ativa) e ligada ao GDP (inativa). O principal mecanismo pelo qual as células controlam a atividade da Ras é através da regulação das interações de proteínas Ras com fatores de troca do nucleotídeo guanina (GEFs), o qual promove a troca de GTP para GDP ativando Ras, e proteínas ativadores de GTPase (GAPs), as quais estimulam a atividade intrínseca GTPase das Ras, resultando na hidrólise do GTP ligado e então inativando a proteína Ras (Tu e Wu, 1999).

Dexas1, também conhecido como AGS1 ou RASD1, é um membro da superfamília de pequenas proteínas G Ras que apresenta similaridades ao grupo de proteínas Ras envolvido com crescimento celular, diferenciação e transformação (Kempainen e Behrend, 1998; Cismowski et al., 1999). AGS1/RASD1 é uma proteína relacionada a família Ras denominada Rhes/TEM2 (RASD2), que compartilha 60% de similaridade na sequência de aminoácidos com AGS1/RASD1, e que aparentemente formam um subgrupo distinto dentro do grupo das proteínas Ras. Dexas1 foi identificada pela primeira vez em linhagem de células do corticotrofo (células AtT-20)

como sendo um mRNA induzido por curto período de estímulo com dexametasona (Kemppainen e Behrend, 1998), e subsequentemente como um ativador da sinalização de proteína G heterotrimérica independente do receptor (Cismowski et al., 1999; Takesono et al., 1999). Alguns trabalhos descreveram a participação da Dexras1 no controle da NO sintase neuronal (nNOS) (Fang et al., 2000), da adenilato ciclase (Graham et al. 2004), de canais GIRK (Takesono et al., 2002), de ERK1/2 (Graham et al., 2002) e de PKC delta (Nguyen e Watts, 2006). Até o presente momento não há descrição da expressão de Dexras1 no pâncreas endócrino, e tampouco o papel exercido por essa proteína na fisiologia da célula beta pancreática.

CONCLUSÕES

Em células beta pancreática, dexametasona induz a translocação nuclear do receptor de glicocorticóide em curto tempo. Esse glicocorticóide também é capaz de promover translocação nuclear e fosforilação em tirosina do STAT5, fosforilação esta provavelmente responsável pela formação do heterodímero GR:STAT5b.

Durante a gestação, a diminuição da expressão da proteína 11 β HSD1 na ilhota pancreática pode diminuir a atividade dos glicocorticóides, o que contribuiria para diminuição da ligação do GR ao promotor da *Dexras1*, e conseqüente diminuição da expressão dessa proteína. Como o bloqueio da expressão da *Dexras1* causou aumento da secreção e de proteínas relacionadas com a secreção de insulina, é possível que essa diminuição contribua para o aumento da secreção observado nesse período. Embora prolactina diminua a ligação do receptor de glicocorticóide na presença de dexametasona, é possível que durante a lactação, com o aumento da expressão da proteína 11 β HSD1, ocorra maior ativação transcricional desse receptor permitindo o aumento da expressão de *Dexras1* e conseqüente inibição da secreção e proliferação da célula beta.

A técnica de ChIPassay foi padronizada e estabelecida como rotina no laboratório, além disso permitiu a análise da regulação direta de genes pelos fatores de transcrição estudados.

REFERÊNCIAS*

Adler AJ, Danielsen M, Robins DM. Androgen-specific gene activation via a consensus glucocorticoid response element is determined by interaction with nonreceptor factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec 15;89(24):11660-3.

Aittomäki S, Pesu M, Groner B, Jänne OA, Palvimo JJ, Silvennoinen O. Cooperation among Stat1, glucocorticoid receptor, and PU.1 in transcriptional activation of the high-affinity Fc gamma receptor I in monocytes. *J Immunol* 2000 Jun 1;164(11):5689-97.

Anhê GF, Torrão AS, Nogueira TC, Caperuto LC, Amaral ME, Medina MC, Azevedo-Martins AK, Carpinelli AR, Carvalho CR, Curi R, Boschero AC, Bordin S. ERK3 associates with MAP2 and is involved in glucose-induced insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Jun 7;251(1-2):33-41.

Anhê GF, Nogueira TC, Nicoletti-Carvalho JE, Lellis-Santos C, Barbosa HC, Cipolla-Neto J, Bosqueiro JR, Boschero AC, Bordin S. Signal transducer and activator of transcription 3-regulated sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 expression by prolactin and glucocorticoids is involved in the adaptation of insulin secretory response during the peripartum period. *J Endocrinol*. 2007 Oct;195(1):17-27.

Arumugam R, Horowitz E, Lu D, Collier JJ, Ronnebaum S, Fleenor D, Freemark M. The interplay of prolactin and the glucocorticoids in the regulation of beta-cell gene expression, fatty acid oxidation, and glucose-stimulated insulin secretion: implications for carbohydrate metabolism in pregnancy. *Endocrinology*. 2008 Nov;149(11):5401-14.

Bind E, Kleyner Y, Skowronska-Krawczyk D, Bien E, Dynlacht BD, Sánchez I. A novel mechanism for mitogen-activated protein kinase localization. *Mol Biol Cell*. 2004 Oct;15(10):4457-66.

Biola A, Lefebvre P, Perrin-Wolff M, Sturm M, Bertoglio J, Pallardy M. Interleukin-2 inhibits glucocorticoid receptor transcriptional activity through a mechanism involving STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) but not AP-1. *Mol Endocrinol*. 2001 Jul;15(7):1062-76.

Bordin S, Amaral ME, Anhê GF, Delghingaro-Augusto V, Cunha DA, Nicoletti-Carvalho JE, Boschero AC. Prolactin-modulated gene expression profiles in pancreatic islets from adult female rats. *Mol Cell Endocrinol*. 2004a. 220:41-50.

Bordin S. Increased expression of several genes and phosphorylation of STAT3, ERK1/2 and AKT1 in pancreatic islets from pregnant rats. In: Annual meeting of the EASD Islet Study Group; 2004; Prien. Chiemsee:: European Association for the Study of Diabetes; 2004b. p. 36.

* De acordo com:
International Committee of Medical Journals
Editors. Uniform requirements for Manuscripts submitted to
Biomedical Journal:
Sample references. Available from:
<http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Bordin S, Boschero AC, Carneiro EM, Atwater I. Ionic mechanisms involved in the regulation of insulin secretion by muscarinic agonists. *J Membr Biol.* 1995 Nov;148(2):177-84.

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* 1991 Jan 10;349(6305):117-27.

Brelje TC, Sorenson RL. The physiological roles of prolactin, growth hormone and placental lactogen in the regulation of islet β -cell proliferation. In: Sarvetnik N, editor. *Pancreatic growth and regeneration.* New York: Karger Landes Systems; 1997. p. 1–30.

Brogan MD, Behrend EN, Kempainen RJ. Regulation of Dexras1 expression by endogenous steroids. *Neuroendocrinology.* 2001 Oct;74(4):244-50.

Cella N, Groner B, Hynes NE. Characterization of Stat5a and Stat5b homodimers and heterodimers and their association with the glucocorticoid receptor in mammary cells. *Mol Cell Biol.* 1998 Apr;18(4):1783-92.

Challis JR, Connor K. Glucocorticoids, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: mother, fetus, or both? *Endocrinology.* 2009 Mar;150(3):1073-4.

Chida D, Wakao H, Yoshimura A, Miyajima A. Transcriptional regulation of the beta-casein gene by cytokines: cross-talk between STAT5 and other signaling molecules. *Mol Endocrinol.* 1998 Nov;12(11):1792-806.

Chrousos GP, Kino T. Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci STKE.* 2005 Oct 4(304):pe48.

Cismowski MJ, Ma C, Ribas C, Xie X, Spruyt M, Lizano JS, Lanier SM, Duzic E. Activation of heterotrimeric G-protein signaling by a ras-related protein. Implications for signal integration. *J Biol Chem.* 2000 Aug 4;275(31):23421-4.

Dajee M, Kazansky AV, Raught B, Hocke GM, Fey GH, Richards JS. Prolactin induction of the alpha 2-Macroglobulin gene in rat ovarian granulosa cells: stat 5 activation and binding to the interleukin-6 response element. *Mol Endocrinol.* 1996 Feb;10(2):171-84.

Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science.* 1997 Sep 12;277(5332):1630-5. Review.

Das PM, Ramachandran K, vanWert J, Singal R. Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques.* 2004 Dec;37(6):961-9. Review.

Eckert B, Schwaninger M, Knepel W. Calcium-mobilizing insulin secretagogues stimulate transcription that is directed by the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate/calcium response element in a pancreatic islet beta-cell line. *Endocrinology.* 1996 Jan;137(1):225-33.

Engblom D, Kornfeld JW, Schwake L, Tronche F, Reimann A, Beug H, Hennighausen L, Moriggl R, Schütz G. Direct glucocorticoid receptor-Stat5 interaction in hepatocytes controls body size and maturation-related gene expression. *Genes Dev.* 2007 May 15;21(10):1157-62.

Falk JD, Vargiu P, Foye PE, Usui H, Perez J, Danielson PE, Lerner DL, Bernal J, Sutcliffe JG. Rhes: A striatal-specific Ras homolog related to Dexas1. *J Neurosci Res.* 1999 Sep 15;57(6):782-8.

Fang M, Jaffrey SR, Sawa A, Ye K, Luo X, Snyder SH. Dexas1: a G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON. *Neuron* 2000 Oct;28(1):183-93.

Feltus FA, Groner B, Melner MH. Stat5-mediated regulation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene: activation by prolactin. *Mol Endocrinol.* 1999 Jul;13(7):1084-93.

Fernandez-Mejia C, Medina-Martinez O, Martinez-Perez L, Goodman PA. The human insulin gene contains multiple transcriptional elements that respond to glucocorticoids. *Pancreas.* 1999 May;18(4):336-41.

Fischer B, Rausch U, Wollny P, Westphal H, Seitz J, Aumüller G. Immunohistochemical localization of the glucocorticoid receptor in pancreatic beta-cells of the rat. *Endocrinology.* 1990 May;126(5):2635-41.

Fleenor DE, Freemark M. Prolactin induction of insulin gene transcription: roles of glucose and signal transducer and activator of transcription 5. *Endocrinology.* 2001 Jul;142(7):2805-10.

Franchimont D, Galon J, Gadina M, Visconti R, Zhou Y, Aringer M, Frucht DM, Chrousos GP, O'Shea JJ. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *J Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):1768-74.

Freemark M, Avril I, Fleenor D, Driscoll P, Petro A, Opara E, Kendall W, Oden J, Bridges S, Binart N, Breant B, Kelly PA. Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *Endocrinology.* 2002 143:1378–1385.

Galsgaard ED, Nielsen JH, Møldrup A. Regulation of prolactin receptor (PRLR) gene expression in insulin-producing cells. Prolactin and growth hormone activate one of the rat prlr gene promoters via STAT5a and STAT5b. *J Biol Chem.* 1999 Jun 25;274(26):18686-92.

Gesina E, Blondeau B, Milet A, Le Nin I, Duchene B, Czernichow P, Scharfmann R, Tronche F, Breant B. Glucocorticoid signalling affects pancreatic development through both direct and indirect effects. *Diabetologia*. 2006 Dec;49(12):2939-47.

Gilmour DS, Lis JT. RNA polymerase II interacts with the promoter region of the noninduced hsp70 gene in *Drosophila melanogaster* cells. *Mol Cell Biol*. 1986 Nov;6(11):3984-9, 1986.

Graham TE, Key TA, Kilpatrick K, Dorin RI. Dexras1/AGS-1, a steroid hormone-induced guanosine triphosphate-binding protein, inhibits 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-stimulated secretion in AtT-20 corticotroph cells. *Endocrinology*. 2001 Jun;142(6):2631-40.

Graham TE, Prossnitz ER, Dorin RI. Dexras1/AGS-1 inhibits signal transduction from the Gi-coupled formyl peptide receptor to Erk-1/2 MAP kinases. *J Biol Chem*. 2002 Mar 29;277(13):10876-82.

Graham TE, Qiao Z, Dorin RI. Dexras1 inhibits adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Apr 2;316(2):307-12.

Gremlich S, Roduit R, Thorens B. Dexamethasone induces posttranslational degradation of GLUT2 and inhibition of insulin secretion in isolated pancreatic beta cells - Comparison with the effects of fatty acids. *J Biol Chem*. 1997 Feb 7;272(6):3216-22.

Gunawardana SC, Rocheleau JV, Head WS, Piston DW. Mechanisms of time-dependent potentiation of insulin release: involvement of nitric oxide synthase. *Diabetes*. 2006 Apr;55(4):1029-33.

Haché RJ, Tse R, Reich T, Savory JG, Lefebvre YA. Nucleocytoplasmic trafficking of steroid-free glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*. 1999 Jan 15;274(3):1432-9.

Haffner MC, Jurgeit A, Berlato C, Geley S, Parajuli N, Yoshimura A, Doppler W. Interaction and functional interference of glucocorticoid receptor and SOCS1. *J Biol Chem*. 2008 Aug 8;283(32):22089-96.

Hamamdžić D, Duzić E, Sherlock JD, Lanier SM. Regulation of alpha(2)-adrenergic receptor expression and signaling in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol*. 1995 Jul;269(1 Pt 1):E162-71.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochem J*. 2003 Aug 15;374(Pt 1):1-20. Review.

Hellman B. The islets of Langerhans in the rat during pregnancy and lactation, with special reference to the changes in the B/A cell ratio. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1960 39:331-42.

Hennighausen L, Robinson GW. Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. *Genes Dev.* 2008 Mar 15;22(6):711-21. Review.

Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes.* 2000 Nov;49(11):1751-60. Review.

Hermoso MA, Matsuguchi T, Smoak K, Cidlowski JA. Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha cooperatively regulate toll-like receptor 2 gene expression. *Mol Cell Biol.* 2004 Jun;24(11):4743-56.

Holz GG 4th, Leech CA, Habener JF. Activation of a cAMP-regulated Ca(2+)-signaling pathway in pancreatic beta-cells by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1. *J Biol Chem.* 1995 Jul 28;270(30):17749-57.

Horie-Inoue K, Takayama K, Bono HU, Ouchi Y, Okazaki Y, Inoue S. Identification of novel steroid target genes through the combination of bioinformatics and functional analysis of hormone response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jan 6;339(1):99-106.

Hsu JH, Shi Y, Frost P, Yan H, Hoang B, Sharma S, Gera J, Lichtenstein A. Interleukin-6 activates phosphoinositol-3' kinase in multiple myeloma tumor cells by signaling through RAS-dependent and, separately, through p85-dependent pathways. *Oncogene.* 2004 23(19):3368-3375.

Htun H, Barsony J, Renyi I, Gould DL, Hager GL. Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 May 14;93(10):4845-50.

Huang C, Snider F, Cross JC. Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of β -cell mass during pregnancy. *Endocrinology.* 2009 Apr;150(4):1618-26.

Iwanir S, Reuveny E. Adrenaline-induced hyperpolarization of mouse pancreatic islet cells is mediated by G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels. *Pflugers Arch.* 2008 Sep;456(6):1097-108.

Julien C, Coulombe P, Meloche S. Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression. *J Biol Chem.* 2003 Oct 24;278(43):42615-24.

Kabotyanski EB, Huetter M, Xian W, Rijnkels M, Rosen JM. Integration of prolactin and glucocorticoid signaling at the beta-casein promoter and enhancer by ordered recruitment of specific transcription factors and chromatin modifiers. *Mol endocrinol.* 2006 Oct;20(10):2355-68.

Kawai M, Kishi K. Adaptation of pancreatic islet b-cells during the last third of pregnancy: regulation of b-cell function and proliferation by lactogenic hormones in rats. *Eur J Endocrinol.* 1999 Oct;141(4):419-25.

Kemppainen RJ, Behrend EN. Dexamethasone rapidly induces a novel ras superfamily member-related gene in AtT-20 cells. *J Biol Chem.* 1998 Feb 6; 273(6):3129-31.

Kemppainen RJ, Cox E, Behrend EN, Brogan MD, Ammons JM. Identification of a glucocorticoid response element in the 3'-flanking region of the human Dexas1 gene. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jun 19;1627(2-3):85-9.

Khan A, Cao HL, Landau BR. Glucose-6-phosphatase activity in islets from ob/ob and lean mice and the effect of dexamethasone. *Endocrinology.* 1995 May;136(5):1934-8.

Kraus D, Fasshauer M, Ott V, Meier B, Jost M, Klein HH, Klein J. Leptin secretion and negative autocrine crosstalk with insulin in brown adipocytes. *J Endocrinol.* 2002 175(1):185-191.

Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, v. 16, p. 35-39, 1967.

Lajoix AD, Reggio H, Chardès T, Péraldi-Roux S, Tribillac F, Roye M, Dietz S, Broca C, Manteghetti M, Ribes G, Wollheim CB, Gross RA. neuronal isoform of nitric oxide synthase expressed in pancreatic beta-cells controls insulin secretion. *Diabetes.* 2001 Jun;50(6):1311-23. Erratum in: *Diabetes* 2001 Sep;50(9):2177-8.

Lau KF, Chan WM, Perkinton MS, Tudor EL, Chang RC, Chan HY, Mcloughlin DM, Miller CC. Dexas1 interacts with FE65 to regulate FE65-amyloid precursor protein-dependent transcription. *J Biol Chem.* 2008 Dec 12;283(50):34728-37.

Lebaron MJ, Xie J, Rui H. Evaluation of genome-wide chromatin library of Stat5 binding sites in human breast cancer. *Mol Cancer.* 2005Feb 1;4(1):6.

Liu X, Roninson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev.* 1997; 11:179–186.

Lipson LG, Sharp GW. Insulin release in pregnancy: studies on adenylate cyclase, phosphodiesterase, protein kinase, and phosphoprotein phosphatase in isolated rat islets of Langerhans. *Endocrinology.* 1978 Oct;103(4):1272-80.

Longuet C, Broca C, Costes S, Hani EH, Bataille D, Dalle S. Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans. *Endocrinology.* 2005 Feb;146(2):643-54.

Low SC, Chapman KE, Edwards CR, Seckl JR. 'Liver-type' 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase cDNA encodes reductase but not dehydrogenase activity in intact mammalian COS-7 cells. *J Mol Endocrinol*. 1994 Oct;13(2):167-74.

Lu NZ, Cidlowski JA. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell*. 2005 Apr 29;18(3):331-42.

Malaisse WJ, Garcia-Morales P, Dufrane SP, Sener A, Valverde I. Forskolin-induced activation of adenylate cyclase, cyclic adenosine monophosphate production and insulin release in rat pancreatic islets. *Endocrinology*. 1984 Nov;115(5):2015-20.

Masui N, Tani-Ichi S, Maki K, Ikuta K. Transcriptional activation of mouse TCR Jgamma4 germline promoter by STAT5. *Mol Immunol*. 2008 Feb;45(3):849-55.

Møldrup A, Billestrup N, Nielsen JH. Rat insulinoma cells express both a 115-kDa growth hormone receptor and a 95-kDa prolactin receptor structurally related to the hepatic receptors. *J Biol Chem*. 1990 May 25;265(15):8686-90.

Munck A, Wira C, Young DA, Mosher KM, Hallahan C, Bell PA. Glucocorticoid-receptor complexes and the earliest steps in the action of glucocorticoids on thymus cells. *J Steroid Biochem*. 1972 Apr;3(3):567-78.

Mune T, Rogerson FM, Nikkilä H, Agarwal AK, White PC. Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat Genet*. 1995 Aug;10(4):394-9.

Nelson EA, Walker SR, Alvarez JV, Frank DA. Isolation of unique STAT5 targets by chromatin immunoprecipitation-based gene identification. *J Biol Chem*. 2004 Dec 24;279(52):54724-30.

Nguyen CH, Watts VJ. Dexamethasone-induced Ras protein 1 negatively regulates protein kinase C delta: implications for adenylyl cyclase 2 signaling. *Mol Pharmacol*. 2006 May;69(5):1763-71.

Nguyen CH, Watts VJ. Dexras1 blocks receptor-mediated heterologous sensitization of adenylyl cyclase 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jul 8;332(3):913-20.

Nielsen JH, Galsgaard ED, Moldrup A, Friedrichsen BN, Billestrup N, Hansen JA, Lee YC, Carlsson C. Regulation of β -cell mass by hormones and growth factors. *Diabetes*. 2001 50 (Suppl 1):S25-S29.

Nishi M, Kawata M. Brain corticosteroid receptor dynamics and trafficking: Implications from live cell imaging. *Neuroscientist*. 2006 Apr;12(2):119-33.

Nishi M, Takenaka N, Morita N, Ito T, Ozawa H, Kawata M. Real-time imaging of glucocorticoid receptor dynamics in living neurons and glial cells in comparison with non-neural cells. *Eur J Neurosci*. 1999 Jun;11(6):1927-36.

Ogawa H, Satoshi I, Tsuji FI, Yasuda K, Umesono K. Localization, trafficking, and temperature-dependence of the Aequorea green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 5;92(25):11899-903.

Oppermann UC, Persson B, Jörnvall H. Function, gene organization and protein structures of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms *Eur J Biochem*. 1997 Oct 15;249(2):355-60. Review.

Párrizas M, Boj SF, Luco RF, Maestro MA, Ferrer J. Chromatin immunoprecipitation using isolated islets of Langerhans. *Methods Mol Med*. 2003;83:61-71

Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology*. 1992 130(3):1459-66.

Petryk A, Fleenor D, Driscoll P, Freemark M. Prolactin induction of insulin gene expression: the roles of glucose and glucose transporter-2. *J Endocrinol*. 2000 Mar;164(3):277-86.

Philippe J, Giordano E, Gjinovci A, Meda P. Cyclic adenosine monophosphate prevents the glucocorticoid-mediated inhibition of insulin gene expression in rodent islet cells. *J Clin Invest*. 1992 Dec;90(6):2228-33.

Polak M, Scharfmann R, Band E, Haour F, Postel-Vinay MC, Czernichow P. Demonstration of lactogenic receptors in rat endocrine pancreases by quantitative autoradiography. *Diabetes*. 1990 39:1045-1049.

Rocha-Viegas L, Vicent GP, Barañao JL, Beato M, Pecci A. Glucocorticoids repress bcl-X expression in lymphoid cells by recruiting STAT5B to the P4 promoter. *J Biol Chem*. 2006 Nov 10;281(45):33959-70.

Rogatsky I, Ivashkiv LB. Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens*. 2006 Jul;68(1):1-12. Review.

Rossi G, Sherwin RS, Penzias AS, Lapaczewski P, Jacob RJ, Shulman GI, Diamond MP. Temporal changes in insulin resistance and secretion in 24h fasted conscious pregnant rats. *Am J Physiol*. 1993 Dec;265(6 Pt 1):E845-51.

Schmitt-Ney M, Doppler W, Ball RK, Groner B. Beta-casein gene promoter activity is regulated by the hormone-mediated relief of transcriptional repression and a mammary-gland-specific nuclear factor. *Mol Cell Biol*. 1991 Jul;11(7):3745-55.

Schoneveld OJ, Gaemers IC, Lamers WH. Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Oct 21;1680(2):114-28.

Shao J, Qiao L, Friedman JE. Prolactin, progesterone, and dexamethasone coordinately and adversely regulate glucokinase and cAMP/PDE cascades in MIN6 beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Feb;286(2):E304-10.

Snyder M, Huang XY, Zhang JJ. Identification of novel direct Stat3 target genes for control of growth and differentiation. *J Biol Chem*. 2008 Feb 15;283(7):3791-8.

Sorenson RL, Brelje TC. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res*. 1997 Jun;29(6):301-7. Review.

Sorenson RL, Brelje TC. Differences in the regulation of pancreatic islets by prolactin, growth hormone and placental lactogen. In: Horseman N, editor. *Prolactin*. Boston: Kluwer; 2001. p.297–316.

Sorenson RL, Stout LE. Prolactin receptors and JAK2 in islets of Langerhans: an immunohistochemical analysis. *Endocrinology*. 1995 Sep;136(9):4092-8.

Spencer VA, Sun JM, Li L, Davie JR. Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods*. 2003 Sep;31(1):67-75.

Stöcklin E, Wissler M, Gouilleux F, Groner B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature*. 1996 383(6602):726-8.

Stoecklin E, Wissler M, Moriggl R, Groner B. Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol*. 1997 Nov;17(11):6708-16.

Stout LE, Svensson AM, Sorenson RL. Prolactin regulation of islet-derived INS-1 cells: characteristics and immunocytochemical analysis of STAT5 translocation. *Endocrinology*. 1997 Apr;138(4):1592-603.

Swali A, Walker EA, Lavery GG, Tomlinson JW, Stewart PM. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 regulates insulin and glucagon secretion in pancreatic islets. *Diabetologia*. 2008 Nov;51(11):2003-11.

Takahashi H, Umeda N, Tsutsumi Y, Fukumura R, Ohkaze H, Sujino M, Van Der Horst G, Yasui A, Inouye ST, Fujimori A, Ohhata T, Araki R, Abe M. Mouse dexamethasone-induced RAS protein 1 gene is expressed in a circadian rhythmic manner in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003 Jan 31;110(1):1-6.

Takeda T, Kurachi H, Yamamoto T, Nishio Y, Nakatsuji Y, Morishige KI, Miyake A, Murata Y. Crosstalk between the interleukin-6 (IL-6)-JAK-STAT and the glucocorticoid-nuclear receptor pathway: synergistic activation of IL-6 response element by IL-6 and glucocorticoid. *J Endocrinol.* 1998 159(2):323-30.

Takesono A, Nowak MW, Cismowski M, Duzic E, Lanier SM. Activator of G-protein signaling 1 blocks GIRK channel activation by a G-protein-coupled receptor: apparent disruption of receptor signaling complexes. *J Biol Chem.* 2002 Apr 19;277(16):13827-30.

Taylor RN, Lebovic DI. Endocrinologia da gestação. In: Greespan FS, Gardner DG, editors. *Endocrinologia básica e clínica.* Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2006. p. 523-540.

Teglund S, Mckay C, Schuetz E, Van Deursen Jm, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell.* 1998 May 29;93(5):841-50.

Tronche F, Opherck C, Moriggl R, Kellendonk C, Reimann A, Schwake L, Reichardt HM, Stangl K, Gau D, Hoeflich A, Beug H, Schmid W, Schütz G. Glucocorticoid receptor function in hepatocytes is essential to promote postnatal body growth. *Genes Dev.* 2004 Mar 1;18(5):492-7.

Tu Y, Wu C. Cloning, expression and characterization of a novel human Ras-related protein that is regulated by glucocorticoid hormone. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec 23;1489(2-3):452-6.

Uchida T, Iwashita N, Ohara-Imaizumi M, Ogihara T, Nagai S, Choi JB, Tamura Y, Tada N, Kawamori R, Nakayama KI, Nagamatsu S, Watada H. Protein kinase Cdelta plays a non-redundant role in insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem.* 2007 Jan 26;282(4):2707-16.

Van Der Laan S, Sarabdjitsingh RA, Van Batenburg MF, Lachize SB, Li H, Dijkmans TF, Vreugdenhil E, De Kloet ER, Meijer OC. Chromatin immunoprecipitation scanning identifies glucocorticoid receptor binding regions in the proximal promoter of a ubiquitously expressed glucocorticoid target gene in brain. *J Neurochem.* 2008 Sep;106(6):2515-23.

Wang Z, Thurmond DC. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis – roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci.* 2009 Apr 1;122(Pt 7):893-903.

Webster JI, Carlstedt-Duke J. Involvement of multidrug resistance proteins (MDR) in the modulation of glucocorticoid response. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002 Nov;82(4-5):277-88.

Weinhaus AJ, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL. Dexamethasone counteracts the effect of Prolactin on islet function: implications for islet regulation in late pregnancy. *Endocrinology*. 2000 Apr;141(4):1384-93.

Weinhaus AJ, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL. Role of cAMP in upregulation of insulin secretion during the adaptation of islets of Langerhans to pregnancy. *Diabetes*. 1998 Sep;47(9):1426-35.

Winzell MS, Ahrén B. G-protein-coupled receptors and islet function— Implications for treatment of type 2 diabetes. *Pharmacol Ther*. 2007 Dec;116(3):437-48. Epub 2007 Aug 29. Review.

Wyszomierski SL, Yeh J, Rosen JM. Glucocorticoid receptor/signal transducer and activator of transcription 5(STAT5) interactions enhance STAT5 activation by prolonging STAT5 DNA binding and tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol*. 1999 Feb;13(2):330-43.

Yokogami K, Wakisaka S, Avruch J, Reeves SA. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol*. 2000 Jan 13;10(1):47-50.

Zhang Z, Jones S, Haggood JS, Fuentes NL, Fuller GM. STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol Chem*. 1997 272(49):30607-10.