

MIRIAN UENO

***EFEITO DA HIPERINSULINEMIA CRÔNICA NA REGULAÇÃO
DAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA EM TECIDOS
DE RATOS***

CAMPINAS

2001

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

MIRIAN UENO

***EFEITO DA HIPERINSULINEMIA CRÔNICA NA REGULAÇÃO
DAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA EM TECIDOS
DE RATOS***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de
Doutora em Ciências Básicas, área de concentração
Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. KLÉBER GOMES FRANCHINI

CAMPINAS

2001

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
Ue5e
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 51089
PROC 16.837/02
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 28/09/02
Nº CPD _____

CM00174444-3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

BIB ID 259956

Ue5e Ueno, Mirian
 Efeito da hiperinsulinemia crônica na regulação das etapas iniciais da ação insulínica em tecidos de ratos / Mirian Ueno. Campinas, SP: [s.n.], 2001.

 Orientadores : Mario José Abdalla Saad, Kléber Gomes Franchini
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Insulina. 2. Resistência à insulina. 3. Substratos do receptor . I. Mario José Abdalla Saad. II. Kléber Gomes Franchini. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): *Prof Dr. Mário José Abdalla Saad*

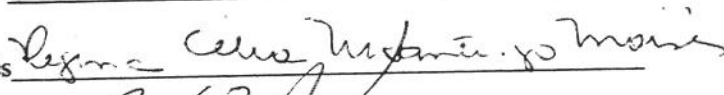


Membros:

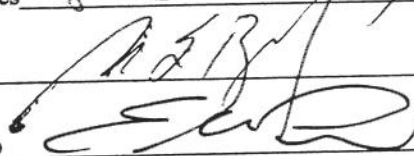
1. Profa. Dra. Carla R. de Oliveira Carvalho



2. Profa. Dra. Regina Célia Santiago Moisés



3. Prof. Dr. Sigisfredo Luis Brenelli



4. Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24.09.2001

000245985

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Gustavo, e aos meus pais, Julio e Vitória

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad pela orientação segura e competente, e pela oportunidade de aprender a fazer ciência de maneira séria e ao mesmo tempo divertida e muito agradável.

Ao Prof. Dr. Kléber Gomes Franchini pela orientação eficiente e por ter propiciado condições para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro e ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero pela colaboração, orientação e amizade na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Antonio R. Gontijo pela oportunidade de realizar parte deste trabalho em seu laboratório.

Às amigas Rosa, Esméria e Rosângela pela imensa ajuda nos experimentos, pelo apoio em todos os momentos, pela troca e transmissão de conhecimentos e pela inestimável amizade, tornando o dia-a-dia sempre melhor.

Às amigas Carla, Emiko, Fernanda, Maria Helena, e Priscila pela agradável convivência, e por compartilhar os momentos bons e os difíceis.

Aos amigos e colegas deste laboratório e de vários outros em que realizei meu trabalho, pelo auxílio e companheirismo.

Aos funcionários Inára, D. Neide, Adriana, Léscio, e especialmente à Renata e S. Luiz, não só pela ajuda competente e constante, mas também pela boa amizade.

Ao Gustavo, por sua compreensão e apoio durante a realização deste trabalho.

À FAPESP, pela concessão da bolsa.

	<i>Pág</i>
RESUMO.....	xxix
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. OBJETIVOS.....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1. Animais.....	49
3.2. Material.....	49
3.3. Soluções utilizadas.....	50
3.4. Procedimentos cirúrgicos.....	51
3.5. Infusão crônica.....	53
3.6. <i>Clamp</i> hiperinsulinêmico normoglicêmico.....	54
3.7. Extração dos tecidos.....	55
3.8. <i>Immunoblotting</i> ou <i>Westerblotting</i>	56
3.9. Imunoprecipitação.....	57
3.10. Determinação do glicogênio.....	57
3.11. Isolamento de ilhotas e de células pancreáticas.....	58
3.12. Secreção estática de insulina.....	58

3.13. Secreção dinâmica de insulina.....	59
3.14. Determinação da glicose plasmática.....	59
3.15. Determinação da insulina.....	60
3.16. Análise Estatística.....	60
4. RESULTADOS.....	61
4.1. Características gerais dos animais.....	63
4.2. Efeito da hiperinsulinemia crônica por 5 dias nas etapas iniciais da ação insulínica no fígado de ratos.....	66
4.3. Efeito da hiperinsulinemia crônica por 5 dias nas etapas iniciais da ação insulínica no músculo esquelético de ratos.....	73
4.4. Efeito da hiperinsulinemia crônica por 5 dias nas etapas iniciais da ação insulínica no coração de ratos.....	79
4.5. Efeito da hiperinsulinemia crônica por 5 dias nas etapas iniciais da ação insulínica no tecido adiposo de ratos.....	84
4.6. Efeito da hiperinsulinemia crônica por 5 dias nas etapas iniciais da ação insulínica em ilhotas de Langerhans isoladas.....	90
4.7. Efeito da hiperinsulinemia crônica por 5 dias nas etapas iniciais da ação insulínica em ilhotas de Langerhans isoladas.....	96
5. DISCUSSÃO.....	99
6. CONCLUSÕES.....	117
7. SUMMARY.....	121
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS

$[Ca^{+2}]_i$	cálcio intracelular
μCi	microCuri
αPY	antifosfotirosina
^{125}I	isótopo de iodo 125
AKT/PKB	proteína serina/treonina quinase B
ATP	adenosina trifosfato
cAMP	adenosina monofosfato cíclica
cDNA	DNA complementar
células Fao	células de hepatoma de ratos
DAG	diacilglicerol
DM 2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitól
EC ₅₀	concentração de glicose que produz a secreção semi-máxima de insulina
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ERK	subfamília da MAPK
GLUT4	transportador de glicose 4

GRB2	proteína ligadora do receptor para o fator de crescimento
GSK3	glicogênio sintetase 3 quinase
GTP	guanosina trifosfato
Hi5	infusão crônica de insulina por 5 dias
IR	receptor de insulina
IRS-1	substrato 1 do receptor de insulina
IRS-2	substrato 2 do receptor de insulina
IRS-3	substrato 3 do receptor de insulina
IRS-4	substrato 4 do receptor de insulina
IRSs	substratos do receptor de insulina
JAK2	proteína citoplasmática quinase da família Janus
kDa	quilo Daltons
MAPK	proteína quinase ativadora da mitogênese
p21ras	proteína de 21 kDa da família Ras
PDK1	quinase 1 dependente de fosfatidilinositol
PI 3-quinase	fosfatidilinositol 3-quinase
PIP ₃	fosfatidilinositol 3,4,5-fosfato
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C

PMSF	fluoreto de fenilmetil sulfonila
pp 185	proteína fosforilada de 185 kDa
PTP1B	proteína tirosina fosfatase 1 B
PY	fosfotirosina
Ras	proteína originalmente identificada como oncogene, tem participação na regulação do metabolismo e crescimento celular
RNA	ácido ribonucléico
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SH2	segunda homologia do src
SH3	terceira homologia do src
Shc	molécula adaptadora e substrato do receptor de insulina
SHP2	fosfotirosina fosfatase ativada pelo IRS-1 fosforilado em tirosina
SOS	Son-of-sevenless, fator de troca de nucleotídeo guanina
Src	oncogene originalmente definido como produto do sarcoma vírus Rous
Tris	tri(hidroximetil)-aminometano

LISTA DE TABELAS

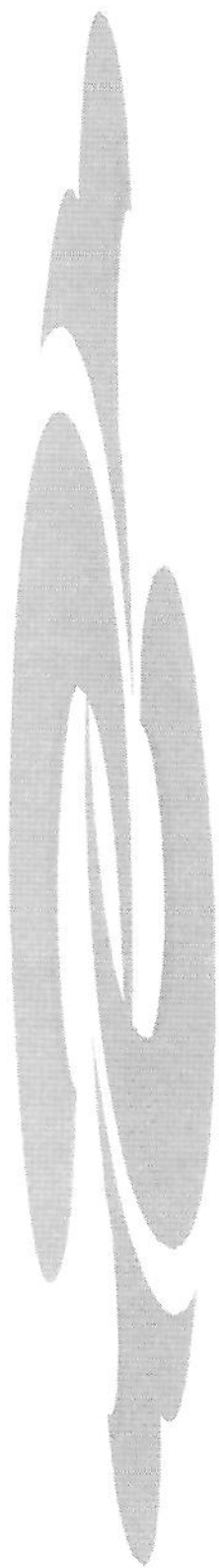
	<i>Pág</i>
TABELA 1 : Características dos animais.....	64

LISTA DE FIGURAS

		<i>Pág</i>
FIGURA 1 A:	Níveis séricos de insulina de jejum.....	65
FIGURA 1 B:	Níveis glicêmicos durante 5 dias de infusão crônica.....	65
FIGURA 1 C:	Utilização da glicose durante estudo de <i>clamp</i>	65
FIGURA 1 D:	Conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	65
FIGURA 2 (A E B):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no nível protéico e grau de fosforilação do IR em fígado de ratos.....	69
FIGURA 3 (A, B E C):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no nível protéico, grau de fosforilação do IRS-1 e sua associação com a PI 3-quinase em fígado de ratos	70
FIGURA 4 (A, B E C):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no nível protéico, grau de fosforilação do IRS-2 e sua associação com a PI 3-quinase em fígado de ratos	71
FIGURA 5 (A E B):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no grau de fosforilação da AKT e ERKs (1/2) em fígado de ratos.....	72
FIGURA 6 (A E B):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no nível protéico e grau de fosforilação do IR em músculo esquelético de ratos.....	75
FIGURA 7 (A, B E C):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no nível protéico, grau de fosforilação do IRS-1 e sua associação com a PI 3-quinase em músculo esquelético de ratos.....	76

FIGURA 8 (A, B E C):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no nível protéico, grau de fosforilação do IRS-2 e sua associação com a PI 3-quinase em músculo esquelético de ratos.....	77
FIGURA 9 (A E B):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no grau de fosforilação da AKT e ERKs (1/2) em músculo esquelético de ratos.....	78
FIGURA 10 (A E B):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no nível protéico e grau de fosforilação do IR em coração de ratos.....	80
FIGURA 11 (A, B E C):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no nível protéico, grau de fosforilação do IRS-1 e sua associação com a PI 3-quinase em coração de ratos.....	81
FIGURA 12 (A, B E C):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no nível protéico, grau de fosforilação do IRS-2 e sua associação com a PI 3-quinase em coração de ratos.....	82
FIGURA 13 (A E B):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no grau de fosforilação da AKT e ERKs (1/2) em coração de ratos....	83
FIGURA 14 (A E B):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no nível protéico e grau de fosforilação do IR em tecido adiposo de ratos.....	86
FIGURA 15 (A, B E C):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no nível protéico, grau de fosforilação do IRS-1 e sua associação com a PI 3-quinase em tecido adiposo de ratos.....	87
FIGURA 16 (A, B E C):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no nível protéico, grau de fosforilação do IRS-2 e sua associação com a PI 3-quinase em tecido adiposo de ratos.....	88

FIGURA 17 (A E B):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no grau de fosforilação da AKT e ERKs (1/2) em tecido adiposo de ratos.....	89
FIGURA 18 (A E B):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no nível protéico e grau de fosforilação do IR em ilhotas isoladas de ratos.....	91
FIGURA 19 (A, B E C):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no nível protéico, grau de fosforilação do IRS-1 e sua associação com a PI 3-quinase em ilhotas isoladas de ratos.....	92
FIGURA 20 (A, B E C):	Efeito da hiperinsulinemia crônica no nível protéico, grau de fosforilação do IRS-2 e sua associação com a PI 3-quinase em ilhotas isoladas de ratos.....	93
FIGURA 21:	Efeito da hiperinsulinemia crônica no grau de fosforilação das ERKs (1/2) em ilhotas isoladas de ratos.....	94
FIGURA 22:	Resumo das etapas iniciais da ação insulínica em tecidos de ratos submetidos à infusão crônica de insulina por 5 dias.....	95
FIGURA 23 (A E B):	Efeito da hiperinsulinemia crônica na secreção (estática e dinâmica de insulina) por ilhotas isoladas de ratos.....	97



RESUMO

A resistência à insulina, definida como uma resposta biológica subnormal a uma determinada concentração de insulina, é componente essencial da fisiopatologia ou etiopatogenia de importantes doenças como diabetes tipo 2, obesidade e hipertensão arterial. Em humanos e em modelos animais, a hiperinsulinemia produzida por "clamp" normoglicêmico por 3 a 5 dias é capaz de induzir resistência à insulina

A insulina, ao se ligar à subunidade α de seu receptor heterotetramérico, dá início a uma série de ações imediatas e tardias, metabólicas e promotoras de crescimento. Tais eventos ocorrem através da estimulação da subunidade β transmembrana do receptor, que se autofosforila e ativa a fosforilação de substratos endógenos intracelulares, conhecidos como substratos do receptor de insulina ou IRSs. Os principais substratos do receptor de insulina são o IRS-1 e IRS-2, que quando fosforilados em tirosina se ligam e ativam proteínas com porção SH2, como a PI 3-quinase. A ativação destas proteínas desencadeia a ativação de duas serina-quinases importantes que são a AKT e as ERKs (1/2), que são essenciais, respectivamente, para os efeitos metabólicos e de controle gênico do hormônio.

Neste estudo investigamos o nível protéico e grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina, dos substratos 1 e 2 do receptor (IRS-1 e IRS-2), a associação deles com a enzima PI 3-quinase, o grau de fosforilação em serina/treonina da AKT e a fosforilação das ERKs (1/2) em tecido hepático, muscular, cardíaco, adiposo, e em ilhotas de Langerhans isoladas de ratos submetidos ao *clamp* hiperinsulinêmico normoglicêmico por cinco dias (Hi5).

A infusão de insulina por cinco dias induziu aumento dos níveis séricos de insulina de jejum e reduziu em cerca de 40% a utilização de glicose mediada pela insulina.

No tecido hepático, a hiperinsulinemia crônica induziu, após estímulo agudo com insulina, redução do grau de fosforilação do receptor de insulina, do IRS-2, da associação deste substrato com a PI 3-quinase e da fosforilação da AKT. Não observamos diferença nos níveis protéicos do IR e de seus substratos (1 e 2), da fosforilação do IRS-1 e sua associação com a PI 3-quinase, e da fosforilação das ERKs (1/2), em ratos Hi5 comparado aos controles.

Quando estudamos o tecido muscular, após estímulo agudo com insulina, observamos uma diminuição significativa no grau de fosforilação do receptor de insulina, do IRS-1, na associação deste substrato com a PI 3-quinase e na fosforilação da AKT em ratos Hi5, em relação aos controles. Entretanto, a hiperinsulinemia crônica não alterou os níveis protéicos do IR, IRS-1, IRS-2, a fosforilação do IRS-2, a associação IRS-2/PI 3-quinase e a fosforilação das ERKs.

O tecido cardíaco de ratos Hi5 apresentou resultados similares ao músculo esquelético, com redução do nível protéico e fosforilação do IRS-1, da associação deste substrato com a PI 3-quinase e da fosforilação da AKT, após estímulo agudo com insulina. Não houve diferença no nível protéico e grau de fosforilação do receptor de insulina e do IRS-2, na associação IRS-2/PI 3-quinase, e na fosforilação das ERKs, entre os grupos controle e Hi5.

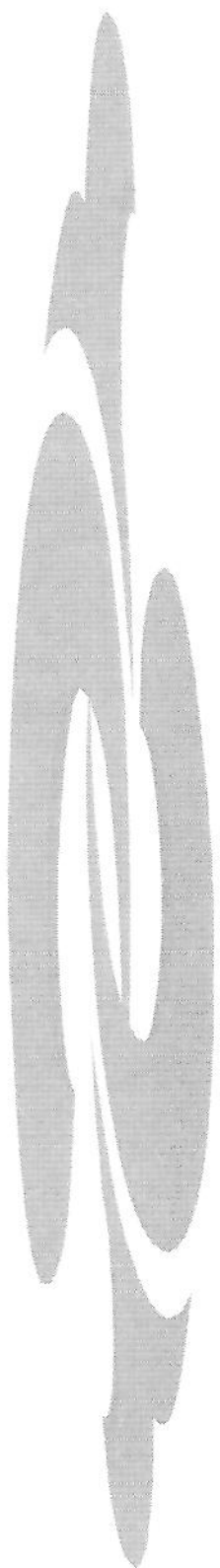
A hiperinsulinemia crônica por cinco dias não alterou o nível protéico e grau de fosforilação do receptor de insulina no tecido adiposo, comparado aos controles, mas induziu aumento do nível protéico, grau de fosforilação e associação com a PI 3-quinase dos substratos 1 e 2 do receptor de insulina. No estudo da AKT, observamos aumento da fosforilação no estado basal dos ratos do grupo Hi5. Também não foi observada alteração do grau de fosforilação das ERKs.

As ilhotas de Langerhans isoladas de ratos Hi5 apresentaram, como no tecido adiposo, aumento do nível protéico, grau de fosforilação e associação com a PI 3-quinase dos IRS-1 e -2, sem alterar o nível protéico e grau de fosforilação do receptor de insulina e das ERKs.

Em resumo, os resultados do nosso estudo demonstraram que a infusão crônica de insulina por 5 dias induziu resistência a esse hormônio, com diminuição de transmissão do sinal de insulina em fígado, músculo e coração, e incremento dessas vias em tecido adiposo e ilhotas. No fígado, a menor fosforilação/ativação da AKT foi conseqüente à menor fosforilação do IRS-2, e em músculo esquelético e cardíaco à menor fosforilação do IRS-1. Em tecido adiposo e ilhotas, os dois substratos do receptor de insulina, IRS-1 e IRS-2 aumentaram seus níveis e grau de fosforilação.

A hiperinsulinemia crônica por 5 dias modulou especificamente os efeitos metabólicos do hormônio, através da AKT, sendo que a via mitogênica, através das ERKs (1/2) não sofreu regulação em nenhum tecido estudado dos animais Hi5.

A regulação tecido-específica das vias de transmissão do sinal de insulina em ratos que receberam infusão desse hormônio por 5 dias, contribui para explicar os mecanismos moleculares de resistência à insulina nestes animais, e sugere também modelos de regulação que podem estar presentes na instalação de obesidade, hiperinsulinemia e resistência à insulina.



1. INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em humanos. Pode ser definido como uma síndrome de hiperglicemia crônica resultante da falta de produção de insulina e/ou de resistência à ação deste hormônio. Uma pequena parcela de pacientes apresenta diabetes mellitus tipo 1, causado por falência da célula β e se traduz por deficiência absoluta de insulina (NATHAN, 1993). O diabetes mellitus tipo 2 é a forma mais freqüente da doença, caracterizado por resistência à ação da insulina que não pode ser superada pela hipersecreção desse hormônio pela célula β pancreática (TAYLOR, 1999).

O diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) apresenta múltiplos defeitos na ação e secreção de insulina. O centro das investigações sobre sua etiologia tem sido definir se é uma alteração na secreção de insulina ou resistência à insulina, o defeito metabólico primário no desenvolvimento da doença (De FRONZO, 1997).

Estudos epidemiológicos recentes sugerem que em algumas populações, o defeito metabólico iniciante é um aumento na secreção de insulina, que induziria rapidamente uma resistência à ação deste hormônio (CUSIN et al., 1990a; CUSIN et al., 1990b; De FRONZO, 1992). Em humanos e em modelos animais, a hiperinsulinemia produzida por *clamp* normoglicêmico por 3 a 5 dias é capaz de induzir resistência à insulina (DEL PRATO et al., 1994). Entretanto, o mecanismo celular desta resistência hormonal, e a seqüência de alterações moleculares que ocorrem em diferentes tecidos durante uma hiperinsulinemia induzida, não foram ainda investigadas.

A insulina inicia suas ações a nível celular pela ligação a um receptor específico na membrana plasmática (FREYCHET et al., 1971; CUATRECASAS, 1972). O receptor de insulina (IR) é uma glicoproteína heterotetramérica constituído por duas subunidades α e duas subunidades β , cada uma com peso molecular de 135.000 e 95.000, respectivamente, ligadas por pontes dissulfeto (MASSAGUE et al., 1981; KASUGA et al., 1982a). A subunidade α é totalmente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade β é responsável pela transmissão do sinal, sendo uma proteína de localização transmembrânica.

Uma propriedade importante da subunidade β do receptor de insulina é ser uma proteína quinase, estimulada pela insulina, capaz de se autofosforilar e fosforilar outros substratos em aminoácidos tirosina (KASUGA et al., 1982b). As proteínas-quinases são

enzimas envolvidas na transferência de grupos fosfato do ATP para aminoácidos específicos de proteínas. Então, a insulina liga-se à subunidade α , há uma mudança conformacional do receptor e a atividade quinase da subunidade β é estimulada, levando a transferência de grupos fosfato do ATP para aminoácidos tirosina do receptor, promovendo um aumento da atividade quinase com a fosforilação de substratos protéicos intracelulares (KASUGA et al., 1982b; WHITE et al., 1984).

Para propagar o sinal, a maioria dos receptores tirosina-quinase, uma vez autofosforilados, ligam-se diretamente a proteínas SH2, assim chamadas por apresentarem homologia com o oncogene viral Src (CHEATHAM & KAHN, 1995). O receptor de insulina, diferente de outros receptores com atividade quinase, não se liga a proteínas com porção SH2, e transmite seu sinal através da fosforilação em tirosina de diferentes substratos. Assim, a insulina induz a fosforilação do receptor, que ativa a capacidade quinase do mesmo, o qual fosforila um ou mais dos seus substratos.

Há consideráveis evidências indicando que a atividade tirosina quinase do receptor de insulina é absolutamente essencial no processo de sinalização insulínica. Estudos de mutações *in vitro* no receptor de insulina, demonstraram que a capacidade do receptor sofrer autofosforilação se altera quando ocorre substituição da lisina na posição 1030 do receptor por outros aminoácidos (metionina, arginina ou alanina). Quando as mutações se expressam nas células, a ligação da insulina ocorre normalmente, porém seus receptores são inativos como quinases e sem eficiência para mediar seus efeitos no metabolismo celular. Baseando-se em analogia de reações com outras quinases, este aminoácido é provavelmente o sítio de ligação do ATP (ELLIS et al., 1986; CHOU et al., 1987; EBINA et al., 1987; WILDEN et al., 1992). Qualquer diminuição da atividade tirosina quinase do receptor é acompanhada por perda da capacidade de sinalizar os efeitos metabólicos e de crescimento. Comparando a síntese de glicogênio estimulada pela insulina em células expressando diferentes receptores (normais, receptores com 1, 2, ou 3 tirosinas mutantes nas posições 1158, 1162, e 1163, ou receptores totalmente inativos como quinases), verificou-se perda progressiva do efeito biológico e diminuição paralela da atividade quinase do receptor (WILDEN et al., 1992).

Com o objetivo de investigar possíveis substratos do receptor de insulina, diversos laboratórios utilizaram anticorpos antifosfotirosinas e identificaram em culturas de células e em tecidos, uma fosfoproteína estimulada por insulina, que foi denominada pp185 (WHITE et al., 1985; KADOWAKI et al., 1987). Um componente da pp185 foi purificado e clonado de várias fontes (ROTHENBERG et al., 1991; SUN et al., 1991; ARAKI et al., 1993). A proteína clonada foi chamada substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1). Este foi o primeiro e mais estudado substrato do receptor de insulina. A capacidade do IRS-1 ser fosforilado em tirosina, após estimulação insulínica, e de participar na transmissão do sinal, depende de uma característica estrutural, que é a presença de múltiplos sítios tirosina em localizações estratégicas. Com base em análise seqüencial, existem 22 sítios tirosina potenciais para fosforilação no IRS-1. Nove destes possuem uma de duas seqüências repetitivas: YMXM ou YXXM, onde Y é tirosina, M é metionina e X é qualquer outro aminoácido. Seguindo-se à estimulação insulínica, estas tirosinas, bem como outras tirosinas potenciais na molécula de IRS-1 são rapidamente fosforiladas, resultando em uma ligação do IRS-1 com proteínas específicas (WHITE & KAHN, 1994; KAHN, 1994).

Há 6 anos, outro constituinte da banda pp185, chamado IRS-2 foi também purificado, e a seqüência cDNA foi determinada, tendo aproximadamente 45% de homologia com o IRS-1. Parece que o IRS-2 atua sinergicamente com o IRS-1 na ativação da PI 3-quinase, tendo portanto um papel importante nos eventos que controlam o metabolismo de glicose (SUN et al., 1995).

Mais recentemente dois outros substratos dessa família, o IRS-3 e o IRS-4 foram descritos em tecidos adiposo e renal embrionário, respectivamente, mas não se detectou expressão dessas proteínas em outros tecidos, sugerindo um papel limitado e tecido específico na ação da insulina (LAVAN et al., 1997a; SMITH-HALL et al., 1997; LAVAN et al., 1997b).

Outras proteínas são fosforiladas em resposta à insulina, e entre elas estão Shc e JAK2 (SKOLNIK et al., 1993; OKADA et al., 1995; HARPUR et al., 1992; SAAD et al., 1996). As proteínas Shc (sh, pela homologia com src, e c pela similaridade com proteína do colágeno) e JAK2 (Janus kinase 2) parecem importantes para a transmissão do sinal insulínico em direção ao controle gênico, mas são irrelevantes no controle de ações metabólicas deste hormônio.

Em estudos *in vivo* em cultura de células e em tecidos animais, o IRS-1 e o IRS-2 fosforilados associam-se à enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase), ativando-a (FOLLI et al., 1992; SAAD et al., 1993). A enzima PI 3-quinase possui duas subunidades, uma catalítica de 110 kDa e outra regulatória de 85 kDa que contém duas porções SH2 e uma SH3 (CARPENTER & CANTLEY, 1990). Estudos recentes demonstram que a ativação da PI 3-quinase é essencial para o transporte de glicose e síntese de glicogênio (CHEATHAM et al., 1994).

A ativação da PI 3-quinase aumenta os níveis teciduais de fosfatidilinositol 3 fosfato, que é um intermediário essencial na ativação da serina-quinase AKT/PKB (proteína quinase B) (KOHN et al., 1996; KROOK et al., 1998). Estudos iniciais não mostraram observação uniforme sobre o papel da ativação da AKT na translocação do GLUT4 (transportadores de glicose). Entretanto, ficou estabelecido que esta serina-quinase é essencial para o transporte de glicose (KOHN et al., 1996; KROOK et al., 1998; TANTI et al., 1997), e há consenso que a ativação da AKT é uma etapa muito importante na ativação da glicogênio-sintetase e, portanto no armazenamento de glicogênio. A AKT é também implicada em ações mitogênicas da insulina. Portanto, na seqüência de eventos da ação insulínica, a ativação da PI 3-quinase induz a ativação da AKT, e determinações dos níveis de fosforilação em serina desta enzima, têm sido utilizadas como boa indicação da atividade da PI 3-quinase (KOHN et al., 1996; KROOK et al., 1998).

Então, a insulina estimula a fosforilação do IRS-1 e IRS-2 e, estes fosforilados, se ligam a outras moléculas de sinalização intracelular, propagando o sinal insulínico. Além da PI 3-quinase, outras proteínas com porção SH2 também interagem com o IRS-1 e IRS-2, como SHP2 (fosfotirosina fosfatase) (YAMAUCHI et al., 1995) e GRB2 (proteína ligadora do receptor para o fator de crescimento) (CHEATHAM & KAHN, 1995).

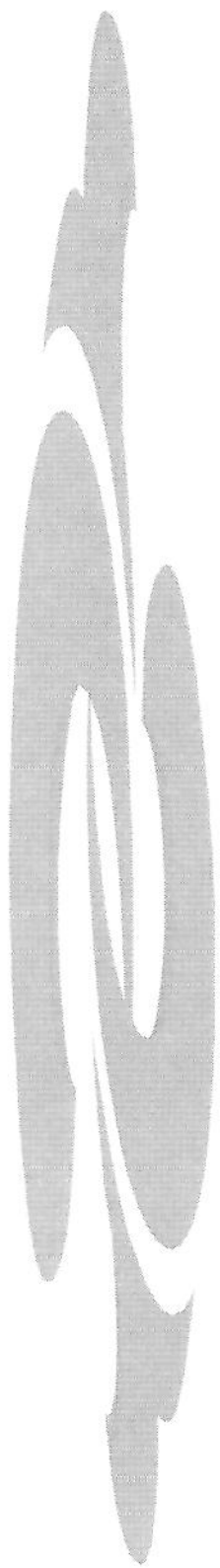
As proteínas IRS-1, IRS-2 e Shc, quando fosforiladas em tirosina, se ligam e ativam a GRB-2, e é através dessa via que a insulina ativa a MAPK (*mitogen activated protein kinase*). Para exercer esse efeito a GRB-2, age como uma molécula adaptadora que ativa a via p21ras/MAPK, ligando-se ao fator permutador de guanina chamado mSOS (son-of-sevenless). Por analogia, a interação do complexo GRB-2/mSOS aos substratos do receptor de insulina, pode mediar a estimulação da p21ras pela insulina. A proteína ras se

liga a Raf-1, a qual fosforila e ativa a MAPKK, que finalmente ativará a MAPK (WHITE & KAHN, 1994; JIANG et al., 1999; SKOLNIK et al., 1993). A MAPK possui diversas subfamílias, entre elas está a subfamília das ERKs (1/2) (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*), proteínas de 43 e 41 kDa, respectivamente (PEARSON et al., 2001).

Fica claro que os IRS-1 e 2 são proteínas de grande importância no processo de transmissão do sinal da insulina, localizadas estrategicamente na fase inicial desta sinalização e, atuando como ancoradouros/ativadores de proteínas como PI 3-quinase, SHP2 e GRB-2, ativam diversas enzimas com atividade serina-quinase, como a AKT e MAPK (ERKs). Portanto, o estudo da regulação do IRS-1 e IRS-2, de suas associações e da ativação da AKT e ERKs em tecidos de modelos animais de resistência à insulina, pode contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares pós-receptores de alteração de sensibilidade à insulina.

Em cultura de células, o tratamento crônico com insulina induz uma diminuição nos níveis e grau de fosforilação do receptor de insulina e IRS-1 e, na associação/ativação entre o IRS-1 e a PI 3-quinase (SAAD et al., 1994; SAAD et al., 1995).

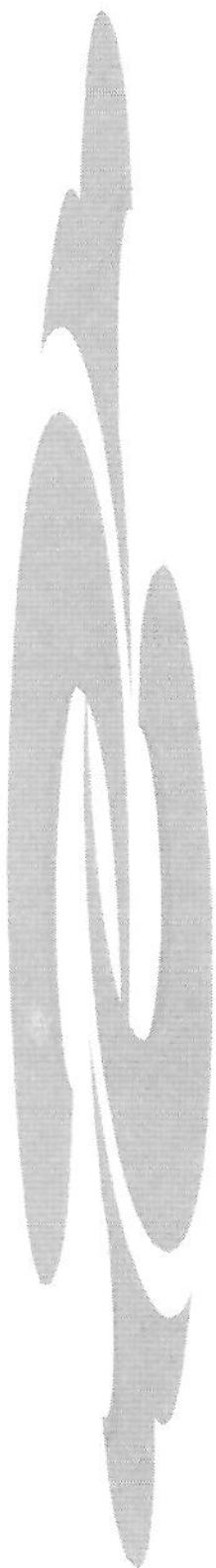
Estes dados são relevantes para muitas situações de resistência à insulina, porque demonstram que a hiperinsulinemia pode induzir alterações nas etapas da ação insulínica, podendo desempenhar um papel importante na dessensibilização à ação deste hormônio. Entretanto, o efeito da hiperinsulinemia nas etapas iniciais da ação insulínica em tecidos animais *in vivo* não foi ainda investigado.



2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Avaliar a sensibilidade à insulina em ratos submetidos a hiperinsulinemia crônica por cinco dias;
2. Investigar os níveis e grau de fosforilação do receptor de insulina, do IRS-1, do IRS-2, bem como a interação dos IRSs (1 e 2) com a PI 3-quinase, e a consequente ativação da AKT e das ERKs (1/2) em tecido hepático, muscular, cardíaco, adiposo, e em ilhotas de Langerhans isoladas de ratos submetidos a hiperinsulinemia crônica por cinco dias;
3. Avaliar a secreção de insulina pelas células β das ilhotas de Langerhans isoladas de ratos que receberam infusão crônica de insulina.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar-Hannover, pesando aproximadamente 250-300g, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP (CEMIB). Após o desmame, os animais receberam como alimentação, ração comercial (Nuvilab CR-1, da Nuvital).

Após realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram acomodados em gaiolas metabólicas individuais, em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), em ciclo de 12 horas luz e 12 horas de escuro, recebendo água e ração comercial *ad libitum*. Permaneceram em jejum 06 horas prévias aos experimentos.

3.2. MATERIAL

Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram adquiridos da *Bio-Rad* (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina e ditioneitol (DTT), triton X-100, tween 20, e glicerol foram fornecidos pela *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, Mo., USA). Proteína A com iodo radioativo (^{125}I) procedia da *Amersham* (Amersham, UK), e a Proteína A Sepharose 6 MB da *Pharmacia* (Uppsala, Suécia). A membrana de nitrocelulose (*Hybond ECL*, 0.45 μm) foi obtida da *Amersham* (Aylesbury, UK). O agente anestésico tiopental sódico foi adquirido da *Cristália* (Itapira/SP, Brasil) e a Insulina regular humana (Humulin R) da *Biobrás* (BH, Brasil). Os catéteres foram construídos com Tygon (Norton Performance Plastics CO, USA), polietileno (PE 50), obtido da *Clay Adams* (Parsipany, USA), polivinil (Silverwater B.C., Austrália). Os anticorpos policlonais anti-receptor de insulina, anti-IRS-1, anti-IRS-2, e os anticorpos monoclonais antifosfotirosina e anti-pERK, foram todos da *Santa Cruz Biotechnology* (CA, USA). Também foram utilizados os anticorpos policlonais anti-PI 3-quinase (p85) e anti-IRS-2 para *immunoblotting* da *Upstate Biotechnology* (Lake Placid, NY, USA), e o anticorpo anti-phospho-AKT (Ser473) da *New England Biolabs* (Beverly, MA, USA).

3.3. SOLUÇÕES UTILIZADAS

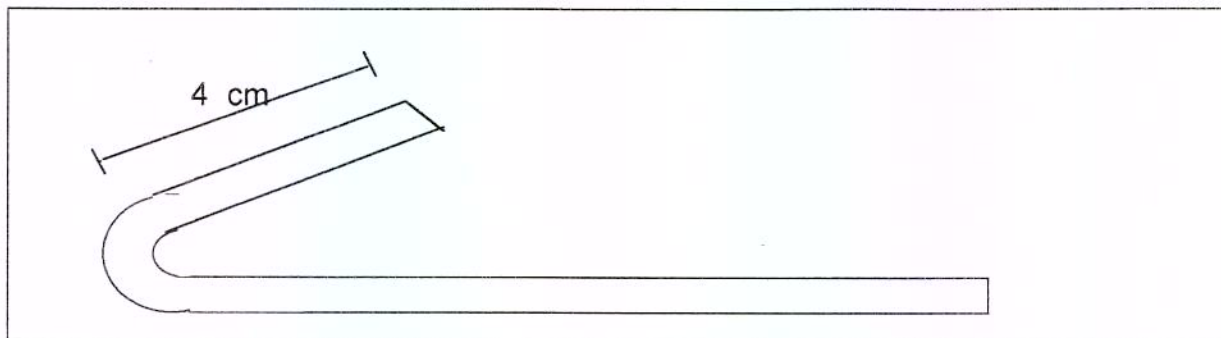
- **Solução tampão de extração (para imunoprecipitação e extrato total):** utilizada para a extração de proteínas celulares dos tecidos estudados, que foram posteriormente imunoprecipitadas. Contém: Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM (diluído em álcool etílico), triton X-100 1% e 0,1 mg/ml de aprotinina. A solução foi mantida a 4°C, sendo que o ortovanadato, o PMSF e a aprotinina foram acrescentados no momento do uso.
- **Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado:** contém: Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 2 mM e triton X-100 0,5%.
- **Tampão de Laemmli (5X):** usado para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese (SDS-PAGE), contém: azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%.
- **Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):** contém: Trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0,4%. Para uso, a solução foi diluída 1:4.
- **Solução tampão para transferência:** empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose, contém: Trisma base 25 mM, glicina 192 mM, Metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Foi estocada a 4°C.
- **Solução tampão para SDS-PAGE - Gel de resolução (*resolving*):** tampão composto de EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

- **Solução tampão para SDS-PAGE - Gel da fase de empilhamento (*stacking*) das proteínas:** contém: EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 50 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.
- **Solução Basal:** solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas, contém: Cloreto de sódio 150 mM, trisma base 10 mM, *Tween* 20 0,02%.
- **Solução bloqueadora:** utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose, após a transferência, contém: 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal.
- **Solução para anticorpos:** solução contendo anticorpos específicos que marcaram as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal. Os anticorpos utilizados foram: anticorpo antifosfotirosina, anticorpo anti-receptor de insulina (anti-IR), anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-PI 3-quinase, anti-pERK e anti-pAKT.
- **Solução com proteína A marcada com ^{125}I :** permite a visualização das bandas em autoradiografia, contém 0,1% de leite desnatado, dissolvido em solução basal com 2 μCi de proteína A ^{125}I .

3.4. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

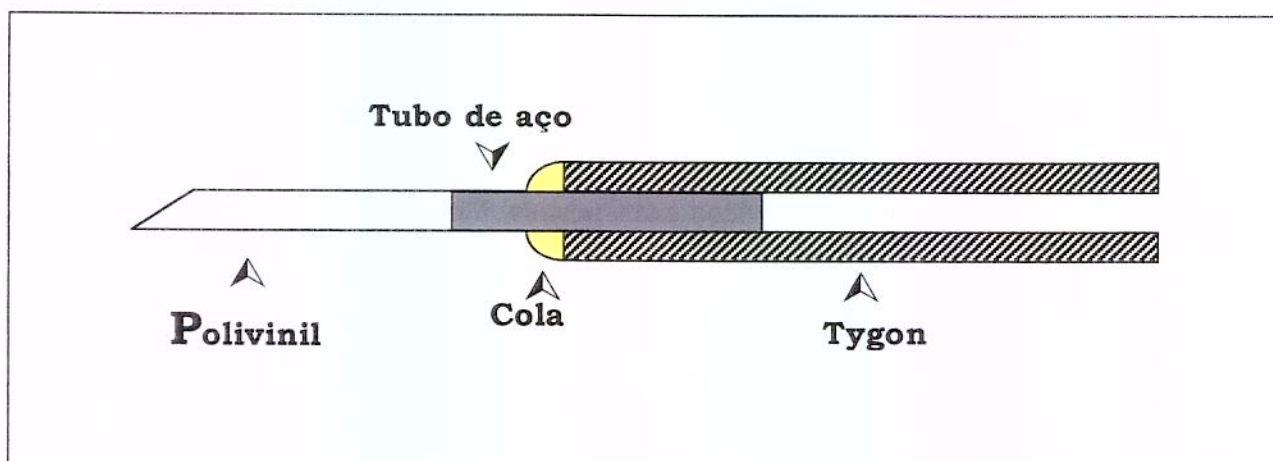
Os ratos foram anestesiados com mistura Cloridrato de Cetamina (Ketalar, Parke-Davis, Brasil) e Diazepam (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil). Esta mistura foi administrada na proporção de 10 mg de cloridrato de cetamina para 0,07 mg de diazepam, e a dose aplicada foi de 0,2 ml/100g de peso corporal do animal. Em seguida, foram submetidos a cirurgia para inserção de catéteres:

Catéter para infusão crônica (veia femoral direita): o catéter foi construído com polietileno (PE 50 - Clay Adams, Parsipany, USA), com 50 cm de comprimento e uma curvatura de $\sim 150^\circ$ foi induzida na extremidade venosa do tubo através de aquecimento e moldagem manual, como mostra a figura abaixo.



Esquema representativo de catéter venoso.

Catéter para coleta de amostras de sangue (artéria femoral direita): foi construído com tubo Tygon (Norton Performance Plastics CO, EUA) 50 cm de comprimento conectado, em uma das extremidades, a um tubo de polivinil (Silverwater B.C, Austrália) 0,5 x 0,8 polegadas - 5cm de comprimento. Para a conexão entre os dois tubos utilizaram-se tubos de aço de 1 cm de comprimento e diâmetro 22 gauge, inseridos no tubo de polivinil, após este ser tratado em acetona (Chemco Indústria e Comércio LTDA., Brasil) para facilitar a inserção. Após a inserção da extremidade reforçada do tubo de polivinil no Tygon, aplicou-se cola de contato Brascoplast Standard – (Brascola Ltda., Brasil) para fixar as superfícies justapostas dos dois tubos.



Esquema representativo de catéter arterial confeccionado.

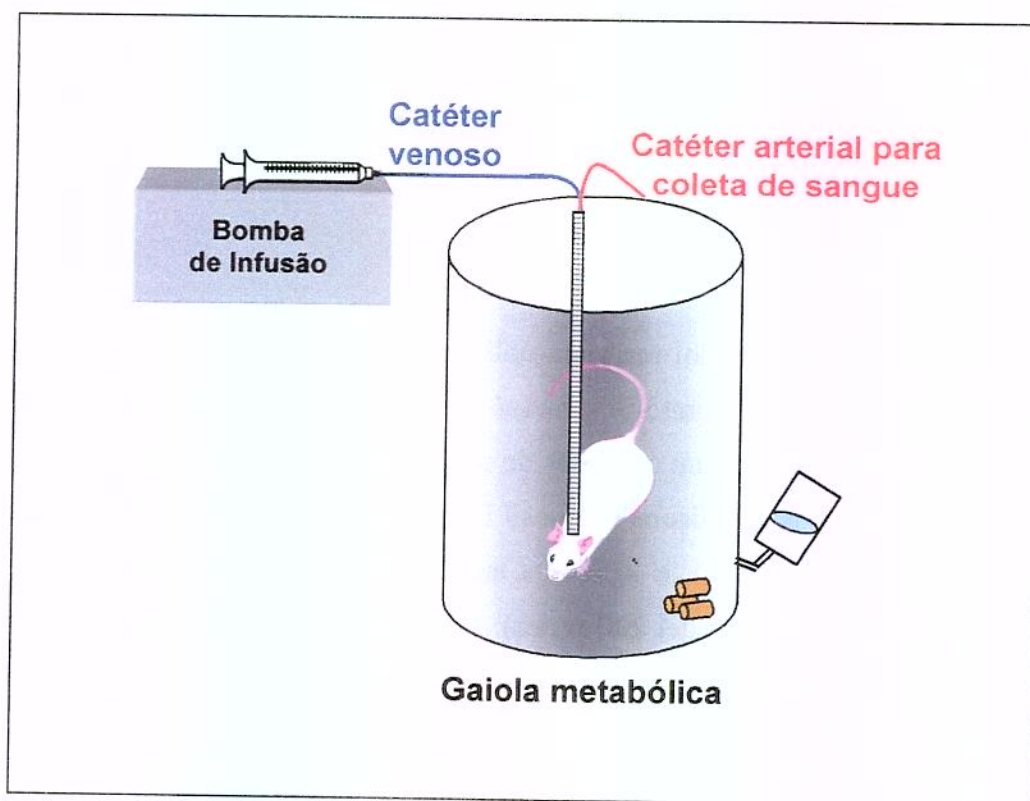
Ambos foram exteriorizados na região posterior do pescoço, onde foi implantado um botão metálico revestido com dacron (BardDeBakey Elastic Knit Fabric (C.R.Bard. Inc. USA) para evitar processo de rejeição, próprio para adaptação de uma espiral de aço (30 cm) que fez a proteção dos catéteres. Ao final da cirurgia, os ratos receberam 0,2 ml (1,7g em 3 ml) de antibiótico profilático intramuscular (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte – Fort Dodge Brasil), e foram alojados em gaiolas individuais para recuperação durante 2 dias, até o início dos experimentos).

3.5. INFUSÃO CRÔNICA

A infusão crônica foi realizada utilizando o catéter implantado na veia femoral que foi conectado a um pivô giratório - *swivel* (Instech, Plymouth Meeting, PA). O catéter venoso foi então conectado a um condutor de metal da estrutura do pivô que, por sua vez, eram conectados a tubos de silicone (Manosil Brand Silicone Rubber Tubing – Manostat – Division of Barnant Company), e ligados a seringas de 20 ml , montadas em bomba de infusão (KD Scientific Inc, model 200 series). Este sistema permitia a livre movimentação do animal simultaneamente à infusão contínua e coleta de sangue dos animais.

Antes de iniciar a infusão crônica de insulina, foi feita infusão contínua de salina (0,9 % - cerca de 18 ml/dia) durante 24 horas. Neste período realizou-se coleta de amostras de sangue através do catéter implantado na artéria femoral direita, para dosagem controle da glicemia.

Após 2 dias de medidas controles, iniciou-se infusão intravenosa de insulina ($1,25\text{mU.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$), numa velocidade de 0,75 ml/hora. Para prevenir a hipoglicemia nos ratos com infusão de insulina, foi utilizado como veículo solução de glicose 25%. Os ratos controles continuaram a receber infusão de salina.



Esquema representativo do sistema de infusão crônica

3.6. CLAMP HIPERINSULINÊMICO NORMOGLICÊMICO

Realizamos o *clamp* hiperinsulinêmico euglicêmico com a determinação de glicemias em intervalos de cinco minutos durante período de 2 horas. Foi administrada infusão contínua intravenosa de insulina regular ($3\text{mU.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) a partir do tempo zero, para aumentar a insulina plasmática e para manutenção do *steady-state* (90-120 min). Uma infusão de solução de glicose (10%) foi iniciada 5 minutos após o começo do experimento, e as taxas de infusão da glicose foram corrigidas a cada 5 minutos, se necessário, para manter a euglicemia entre 90 e 110 mg/dl.

3.7. EXTRAÇÃO DOS TECIDOS

Para o estudo das etapas iniciais da ação insulínica, após infusão crônica de insulina os animais foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental sódico (50 mg/kg peso), e submetidos à extração dos tecidos, logo após a perda dos reflexos corneano e caudal.

Inicialmente foi aberta a cavidade abdominal e retirados fragmentos dos tecidos a serem estudados (grupo negativo - sem estímulo agudo de insulina). Para os animais do grupo positivo (com estímulo agudo de insulina), foi injetada insulina regular na veia porta em concentração 10^{-5} M, ou seja, 1,5 U ou 60 µg de insulina. Após 30 segundos da injeção de insulina, retirava-se um fragmento de fígado, o qual era colocado imediatamente em tubo tipo *falcon* contendo tampão de extração, mantido todo o tempo no gelo. O tecido era homogeneizado durante 20 segundos com processador do tipo “polytron”, operado em velocidade máxima. Durante e após o procedimento, o material homogeneizado era mantido em banho de gelo para evitar a desfosforilação do receptor de insulina e seus substratos. Noventa segundos após a injeção de insulina era então retirado o fragmento do músculo gastrocnêmio, e trabalhado da mesma forma. E, 120 segundos após a injeção, retirava-se fragmento do tecido adiposo e coração, respectivamente, procedendo igualmente aos outros tecidos.

Para avaliação do grau de fosforilação das proteínas AKT e ERKs (1/2), retirava-se fragmento do fígado após 120 segundos da injeção de insulina, e fragmentos do tecido muscular, cardíaco e adiposo, após 5 minutos do estímulo agudo com insulina.

No final da extração, era adicionado triton X-100 1% em todas as amostras e mantidas em gelo. Após quarenta minutos, os materiais extraídos e homogeneizados foram submetidos à centrifugação. Utilizou-se a velocidade de 12000 rpm por 20 minutos a 4°C, para remover o material insolúvel, utilizando-se o sobrenadante para as etapas seguintes: uma parte foi utilizada para determinar a concentração protéica de cada amostra pelo método colorimétrico de biureto (BRADFORD, 1976); outra parte foi utilizada para avaliação do extrato total, ou seja, separação das proteínas em SDS-PAGE, com tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970), acrescido de DTT 200 mM, em proporção de 5:1, mantido

sempre a 4°C até o momento de submeter à fervura a 100°C durante 5 minutos, e posteriormente aplicados em gel de poliacrilamida; e finalmente outra parte foi utilizada para imunoprecipitação com anticorpos específicos.

3.8. IMMUNOBLOTTING OU WESTERNBLOTTING

Alíquotas contendo 200 µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 2 mm de espessura. No mesmo gel foi aplicado uma amostra padrão de proteínas, ou seja, o marcador de peso molecular com pesos moleculares conhecidos: miosina (205 kDa), beta galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (80 kDa) e ovalbumina (49 kDa). As proteínas apareciam sob coloração azul no gel de eletroforese e na membrana de nitrocelulose, permitindo a orientação quanto ao peso molecular das bandas observadas.

A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da *Bio Rad* (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 25 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (*stacking*) e 120 volts até o final do gel de resolução (*resolving*). A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da *Bio Rad*, e a solução tampão para transferência mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas (TOWBIN, STAEHLIN & GORDON, 1979), sob refrigeração contínua por gelo.

As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por 2 horas, a temperatura ambiente, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal por 3 sessões de 10 minutos, e incubadas com anticorpo antifosfotirosina diluído em solução tampão por 4 horas, a temperatura ambiente sob agitação constante, ou durante uma noite a 4°C. Foram então lavadas novamente com solução basal por 3 sessões de 10 minutos e incubadas a seguir em solução com proteína A, marcada com ^{125}I , durante 2 horas a temperatura ambiente. O excesso de proteína A foi lavado com solução basal e

então, as membranas expostas ao filme de RX (Kodak XAR - Rochester, NY), com intensificador (Cronex Lightning Plus - DuPont, Wilmington, DE) em cassete mantido a - 80°C. Após 12 - 48 horas, os filmes foram revelados na forma convencional.

A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das autoradiografias reveladas por densitometria ótica, utilizando um *scanner* (HP 3400) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation).

3.9. IMUNOPRECIPITAÇÃO

Volumes das amostras com a mesma concentração protéica foram utilizadas para imunoprecipitação com anticorpo anti-receptor de insulina, anti-IRS-1 e anti IRS-2, sendo que a determinação das proteínas seguiu as etapas descritas anteriormente no item 3.7. As amostras foram colocadas sob incubação durante 12-14 horas a 4°C, sob agitação contínua. Em seguida acrescentou-se proteína A-Shepharose 6MB em todas as amostras para precipitação do complexo antígeno/anticorpo, sendo mantidas em agitação contínua por mais duas horas. Após nova centrifugação por 15 minutos, a 12000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o material precipitado lavado por três vezes com a solução tampão específico para lavagem.

As proteínas precipitadas, a seguir, foram tratadas com tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) contendo 100 mM de DTT, aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. As proteínas foram então submetidas à eletroforese em SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose, seguindo as etapas descritas no item 3.8 (*Immunoblotting*). Nestes experimentos de imunoprecipitação, as membranas foram submetidas ao *blotting* com anticorpo antifosfotirosina e anti-PI 3-quinase.

3.10. DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO

Glicogênio muscular: Frações entre 25-35 mg do músculo diafragma foram imediatamente pesadas após retiradas dos animais e digeridas em banho a 100°C em 0,5 ml de KOH 1N durante 20 minutos. Foram adicionados 20µl de solução saturada de Na₂SO₄ e o glicogênio foi precipitado através de duas passagens de 2,5 ml de etanol à quente, seguida

de centrifugação, descartando-se o sobrenadante. O glicogênio precipitado foi ressuspenso em 4,0 ml de água e a determinação colorimétrica realizada em 1,0 ml de extrato, 20 µl de fenol a 80% e 2,0 ml de ácido sulfúrico concentrado, após fervura de 15 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 490 nm. Foram utilizadas soluções de calibração (HASSID & ABRAHAM, 1957).

Glicogênio hepático: As diferenças na determinação do glicogênio no tecido hepático, em relação ao tecido muscular, são as seguintes: as frações de tecido hepático retiradas pesaram aproximadamente 500 mg, portanto, com necessidade de digestão em 2 ml de solução KOH 30%. A precipitação do glicogênio hepático foi feita em 0,1 ml de Na₂SO₄, 7 ml de etanol e, após extração, o precipitado foi suspenso em 25 ml de água deionizada (HASSID & ABRAHAM, 1957).

3.11. ISOLAMENTO DE ILHOTAS E DE CÉLULAS PANCREÁTICAS:

A obtenção das ilhotas foi processada pelo método da digestão por collagenase de acordo com técnica estabelecida no Laboratório de Pâncreas Endócrino, descrita para animais adultos (BOSCHERO et al., 1995).

Em alguns experimentos, as ilhotas isoladas dos dois grupos foram estimuladas agudamente com insulina por 90 segundos, e submetidas a imunoprecipitação e *immunoblotting* com anticorpos específicos. Em outros experimentos, as ilhotas foram utilizadas para estudo da secreção estática e dinâmica de insulina (descrito a seguir).

3.12. SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA

Grupos de 4 a 5 ilhotas foram pré-incubados em solução de Krebs-bicarbonato por 30 min a 37°C e pH 7,4. A seguir, o meio de pré-incubação foi descartado e as ilhotas incubadas por período suplementar de 60 a 90 min, em banho-maria a 37°C e sob gaseamento constante com carbogênio, também em Krebs-bicarbonato contendo diferentes concentrações de glicose (2,8, 8,3, 11,1, 16,7 e 22,2mM). Após incubação, as ilhotas foram

retiradas do banho e mantidas em geladeira a 4 ± 1 °C, durante 15 min. A seguir, a solução de incubação foi retirada isenta de ilhotas e armazenada a -20°C para dosagem posterior da secreção de insulina por radioimensaio (SCOTT et al., 1981). Em seguida, foi calculado a concentração de glicose que determina 50% do efeito máximo da resposta secretória de insulina (EC_{50}).

3.13. SECREÇÃO DINÂMICA DE INSULINA:

Para análise da secreção dinâmica de insulina, 4 grupos contendo 100 ilhotas foram transferidos para 4 câmaras de perfusão contendo um filtro poroso (diâmetro do poro = 8µm) de acetato de celulose (Swinnex SX 000/300, Millipore, vol 0,25 ml); em seguida foram conectadas a um sistema perfusor. As soluções perfusoras, foram acondicionadas em *erlenmayers* de 150 ml, e mantidas a 37°C e equilibradas com carbogênio para manutenção do pH a 7,4, durante toda a perfusão. A razão de fluxo do sistema foi de 1,1 ml/min, impulsionado por uma bomba peristáltica de 4 canais (Ismatec SA, MS-REGLO, Modelo 7351-10). Torneiras de 3 vias, colocadas próximo aos *erlenmayers*, propiciaram as mudanças das soluções. Após o tempo de adaptação das ilhotas, 20 minutos com perfusão de solução 2,8 mM/l de glicose, a concentração de glicose foi então aumentada para 22,2 mM/l de glicose e mantida por 50 minutos. As amostras de perfusato foram coletadas a intervalos de 2 minutos, em banho de gelo (4°C) e armazenadas a -20°C. A insulina secretada também foi dosada por radioimunoensaio e expressa em pg/ilhota/minuto. A resposta à glicose durante a secreção dinâmica de insulina foi avaliada pelo cálculo da área sob a curva (insulina x tempo).

3.14. DETERMINAÇÃO DA GLICOSE PLASMÁTICA

A dosagem da glicose plasmática foi realizada pelo método enzimático colorimétrico de glicose oxidase (TRINDER, 1969). Os resultados foram expressos em mg/dl.

3.15. DETERMINAÇÃO DA INSULINA

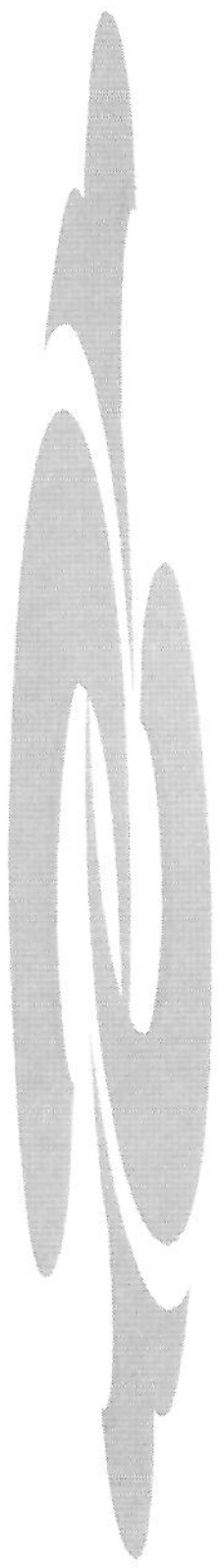
A insulina plasmática (amostras de sangue coletadas no 5º dia de infusão, com 6 horas de jejum), e a insulina secretada (experimentos de secreção estática e dinâmica) foram avaliadas por radioimunoensaio e, a curva padrão determinada com insulina de rato (SCOTT et al., 1981).

3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados comparativamente entre o grupo Controle e o grupo Hiperinsulinêmico (5 dias de infusão crônica de insulina). A análise estatística dos resultados empregou o Teste *t* de Student, não pareado, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$), sendo os resultados expressos como média \pm erro padrão da média ($X \pm E.P.M.$), e posteriormente representados em porcentagem de variação em relação aos controles, aos quais se atribuiu o valor de 100%.

Para análise da secreção estática de insulina pelas ilhotas isoladas, foram calculada curvas dose-resposta individuais para cada grupo estudado. Os valores da EC_{50} foram submetidos ao Teste com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$), sendo os resultados expressos como média \pm erro padrão da média ($X \pm E.P.M.$).

Para análise da secreção dinâmica de insulina pelas ilhotas isoladas, calculou-se a área sob a curva (insulina x tempo), e em seguida utilizou-se o Teste *t* de Student, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$), sendo os resultados expressos como média \pm erro padrão da média ($X \pm E.P.M.$).



4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS

A TABELA 1 resume os dados dos animais controles e dos animais hiperinsulinêmicos (Hi5), incluindo níveis séricos de insulina, níveis glicêmicos ao longo de 5 dias de infusão de insulina, a utilização da glicose no intervalo de 90 a 120 minutos do *clamp* euglicêmico no 5º dia, e o conteúdo de glicogênio hepático e muscular neste dia.

A FIGURA 1 A mostra os níveis plasmáticos de insulina, após período de jejum de cerca de 6 horas, em ratos controles (C) (receberam infusão de soro fisiológico), e em ratos hiperinsulinêmicos normoglicêmicos (Hi5) (receberam infusão crônica de insulina por 5 dias). Como esperado, os animais hiperinsulinêmicos apresentaram níveis elevados de insulina de jejum em relação aos seus controles ($p=0,000$).

Na FIGURA 1 B observamos que os níveis glicêmicos ao longo de 5 dias de infusão crônica de salina ou insulina, não apresentaram variação significativa, mantendo-se entre 90 e 100 mg/dl.

A FIGURA 1 C mostra a utilização de glicose durante o *clamp* hiperinsulinêmico normoglicêmico por 5 dias. Os ratos hiperinsulinêmicos apresentaram reduzida utilização da glicose induzida pela insulina durante o *clamp* ($C= 19 \pm 2$ vs $Hi5= 11 \pm 1$ mg.kg⁻¹.min⁻¹, $p=0,002$).

Considerando estes dados, constatamos que os animais submetidos à infusão crônica de insulina por 5 dias apresentaram um estado de resistência à insulina com níveis aumentados de insulina de jejum, associados a níveis normais de glicose plasmática e marcada diminuição na utilização da glicose.

As duas principais vias de distribuição da glicose são a não oxidativa (síntese de glicogênio) e oxidativa. Em estados de resistência insulínica, podemos encontrar alteração no armazenamento de glicose. Observamos na FIGURA 1 D que a hiperinsulinemia crônica reduziu significativamente o conteúdo de glicogênio hepático ($C= 3,00 \pm 0,3$ vs $Hi5= 2,25 \pm 0,15$ mg de glicogênio/100 mg de tecido, $p=0,036$), e glicogênio muscular ($C= 0,52 \pm 0,07$ vs $Hi5= 0,33 \pm 0,02$ mg de glicogênio/100 mg de tecido, $p=0,02$).

TABELA 1. Características dos animais

		CONTROLE	HIPERINSULINÊMICO
		(C)	(Hi5)
Insulinemia (ng/ml)		1,47 ± 0,24 (16)	3,56 ± 0,45 * (16)
	1º dia	90 ± 2 (20)	91 ± 2 (20)
	2º dia	93 ± 2 (20)	93 ± 1 (20)
Glicemia	3º dia	91 ± 1 (20)	92 ± 3 (20)
(mg/dl)	4º dia	92 ± 2 (20)	90 ± 2 (20)
	5º dia	95 ± 1 (20)	94 ± 1 (20)
Utilização da glicose		19 ± 2 (12)	11 ± 1 * (12)
	(mg. Kg⁻¹. min⁻¹)		
Glicogênio hepático		3,00 ± 0,3 (12)	2,25 ± 0,15 * (12)
	(mg/100 mg tecido)		
Glicogênio muscular		0,52 ± 0,07 (12)	0,33 ± 0,02 * (12)
	(mg/100 mg tecido)		

Os resultados são expressos em média ± erro padrão da média, e a significância expressa em * p<0,05. O número de animais é mostrado entre parênteses.

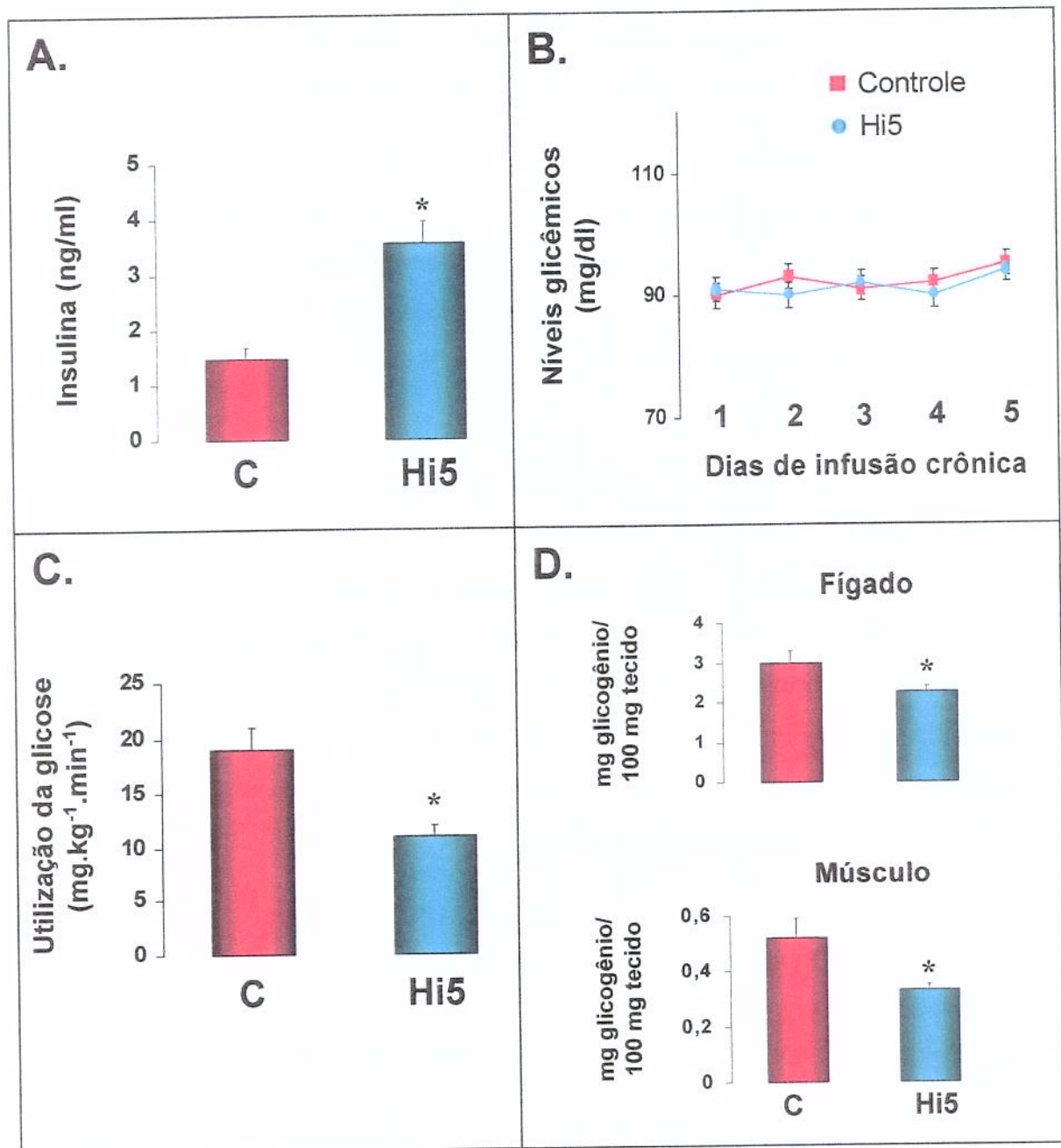


FIGURA 1. A. Níveis séricos de insulina de jejum. B. Médias dos níveis glicêmicos durante 5 dias de infusão crônica. C. Utilização da glicose induzida pela insulina durante estudo de *clamp* em ratos controle (C) e ratos submetidos à infusão crônica de insulina (Hi5). D. Conteúdo de glicogênio hepático e muscular. Os valores são expressos como média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

4.2. EFEITO DA HIPERINSULINEMIA CRÔNICA POR 5 DIAS NAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA NO FÍGADO DE RATOS:

Não houve alteração no nível protéico do receptor de insulina, no fígado dos ratos submetidos à infusão crônica de insulina por 5 dias, como determinado pelo *immunoblotting* com anticorpo contra a porção COOH-terminal do receptor de insulina. A FIGURA 2 A mostra que o nível tecidual do receptor de insulina, avaliado por densitometria ótica de 12 experimentos foi de $90 \pm 6 \%$ no grupo Hi5, e $100 \pm 4 \%$ no grupo controle ($p = 0,179$).

Em amostras de fígado, previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-receptor de insulina e submetidas a *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina, observamos que no estado basal (sem estímulo agudo com insulina) não houve diferença entre os grupo Hi5 e controle ($C = 35 \pm 8$ vs **Hi5** = $17 \pm 5 \%$, $p = 0,08$; $n = 12$). Após estímulo agudo com insulina, houve aumento significativo do grau de fosforilação da subunidade β do receptor insulina dos dois grupos em estudo, comparado ao estado basal. Entretanto, esse aumento da fosforilação do receptor foi aproximadamente 30% menor nos animais Hi5 comparados aos animais controles ($C = 100 \pm 4$ vs **Hi5** = $70 \pm 4 \%$, $p = 0,000$; $n = 12$) (FIGURA 2 B).

Utilizando anticorpos específicos anti-IRS-1, observamos que o nível desta proteína não se alterou após infusão crônica com insulina por 5 dias, em relação aos controles ($C = 100 \pm 6$ vs **Hi5** = $87 \pm 7 \%$, $p = 0,181$; $n = 14$) (FIGURA 3 A).

Avaliando o grau de fosforilação deste substrato, observamos que no estado basal, os resultados foram similares para o grupo controle e Hi5 ($C = 48 \pm 9$ vs **Hi5** = $42 \pm 9 \%$, $p = 0,574$; $n = 12$). Após estímulo agudo com insulina, observamos um aumento similar no grau de fosforilação do IRS-1 nos dois grupos de animais estudados, comparado ao estado basal (FIGURA 3 B). Assim, o grau de fosforilação do IRS-1 induzido por insulina não apresentou diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo Hi5 ($C = 100 \pm 5$ vs **Hi5** = $96 \pm 9 \%$, $p = 0,714$; $n = 12$).

Tendo em vista a importância da associação das proteínas IRSs com a enzima PI 3-quinase no transporte de glicose e síntese de glicogênio, estudou-se esta associação através da incubação das membranas cujas amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 ou anti-IRS-2, e em seguida submetidas à *immunoblotting* com anticorpo específico contra a subunidade regulatória de 85 kDa da PI 3-quinase. Estudos anteriores (BACKER *et al.*, 1992; FOLLI *et al.*, 1993; ARAKI *et al.*, 1994) demonstraram a existência de uma interação relativamente estável e de alta afinidade entre o IRS-1 e a subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase, de tal forma que ambas as proteínas podem ser co-precipitadas com anticorpos específicos contra qualquer uma delas. Observamos na FIGURA 3 C, que no estado basal o grau de associação IRS-1/PI 3-quinase foi similar entre os dois grupos ($C = 54 \pm 5$ vs $Hi5 = 48 \pm 5$ %, $p = 0,486$; $n = 12$), e que após estímulo agudo com insulina, também não houve alteração da associação deste substrato à PI 3-quinase nos ratos do grupo Hi5 comparado aos controles ($C = 100 \pm 4$ vs $Hi5 = 105 \pm 6$ %, $p = 0,455$; $n = 12$).

O nível protéico do IRS-2 em fígado, determinado por *immunoblotting* com anticorpo específico para este substrato foi similar em ratos submetidos a hiperinsulinemia crônica por 5 dias e em ratos controles (FIGURA 4 A). A densitometria ótica de 8 experimentos demonstrou que a quantidade de IRS-2 foi de 100 ± 5 % para os controles, e 98 ± 6 % para os Hi5 ($p = 0,224$).

Diferente dos resultados da fosforilação do IRS-1, quando as amostras de tecido hepático foram imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2, e incubadas com anticorpo antifosfotirosina, observamos após estímulo agudo com insulina, redução no grau de fosforilação do IRS-2, nos ratos do grupo Hi5, em relação aos controles ($C = 100 \pm 5$ vs $Hi5 = 73 \pm 5$ %, $p = 0,003$; $n = 8$) (FIGURA 4 B). No estado basal não houve diferença entre os dois grupos ($C = 47 \pm 9$ vs $Hi5 = 39 \pm 11$ %, $p = 0,597$; $n = 8$).

A associação do IRS-2 à PI 3-quinase, antes do estímulo com insulina, foi similar nos grupos Hi5 e controle ($C = 52 \pm 10$ vs $Hi5 = 49 \pm 8$ %, $p = 0,791$; $n = 10$), e a redução do grau de fosforilação deste substrato foi acompanhada de diminuição da associação IRS-2/PI 3-quinase nos ratos Hi5, quando comparado aos controles ($C = 100 \pm 7$ vs $Hi5 = 71 \pm 8$ %, $p = 0,016$; $n = 10$) (FIGURA 4 C).

Como já citado, a serina/treonina quinase AKT ou proteína quinase B, recentemente tem sido foco de intensa pesquisa, pelo papel crucial na transmissão de múltiplas vias de sinalização e agindo como mediador da ativação da PI 3-quinase, sendo fundamental na mediação de muitas das ações metabólicas da insulina. Investigamos também a fosforilação desta serina/treonina quinase no fígado de animais hiperinsulinêmicos. Para isso, realizamos *immunoblotting* utilizando anticorpo anti-pAKT (Akt Ser473). Em nosso estudo, observamos que no estado basal a fosforilação da AKT foi similar nos dois grupos (C= 19 ± 1 vs **Hi5**= 8 ± 5 %, $p = 0,06$; $n = 6$), e que após estímulo agudo com insulina, os animais do grupo Hi5 apresentaram significativa redução da fosforilação da AKT, comparado aos animais controles (C= 100 ± 3 vs **Hi5**= 71 ± 2 %, $p = 0,000$; $n = 6$) (FIGURA 5 A).

Uma vez que as diversas serinas quinases sensíveis à insulina, principalmente a família das MAP-quinases, exercem importante papel na via de controle mitogênico, avaliamos a fosforilação de uma subfamília da MAP-quinase, as proteínas ERKs (1/2). Quando amostras de fígado foram submetidas ao *immunoblotting* com anticorpo anti-pERK, observamos por densitometria ótica de 6 experimentos, que não houve diferença significativa entre os animais Hi5 e os controles, tanto no estado basal (C= 84 ± 5 vs **Hi5**= 75 ± 5 %, $p = 0,0,104$), como após estímulo agudo com insulina (C= 100 ± 3 vs **Hi5**= 88 ± 7 %, $p = 0,084$) (FIGURA 5 B).

Fígado

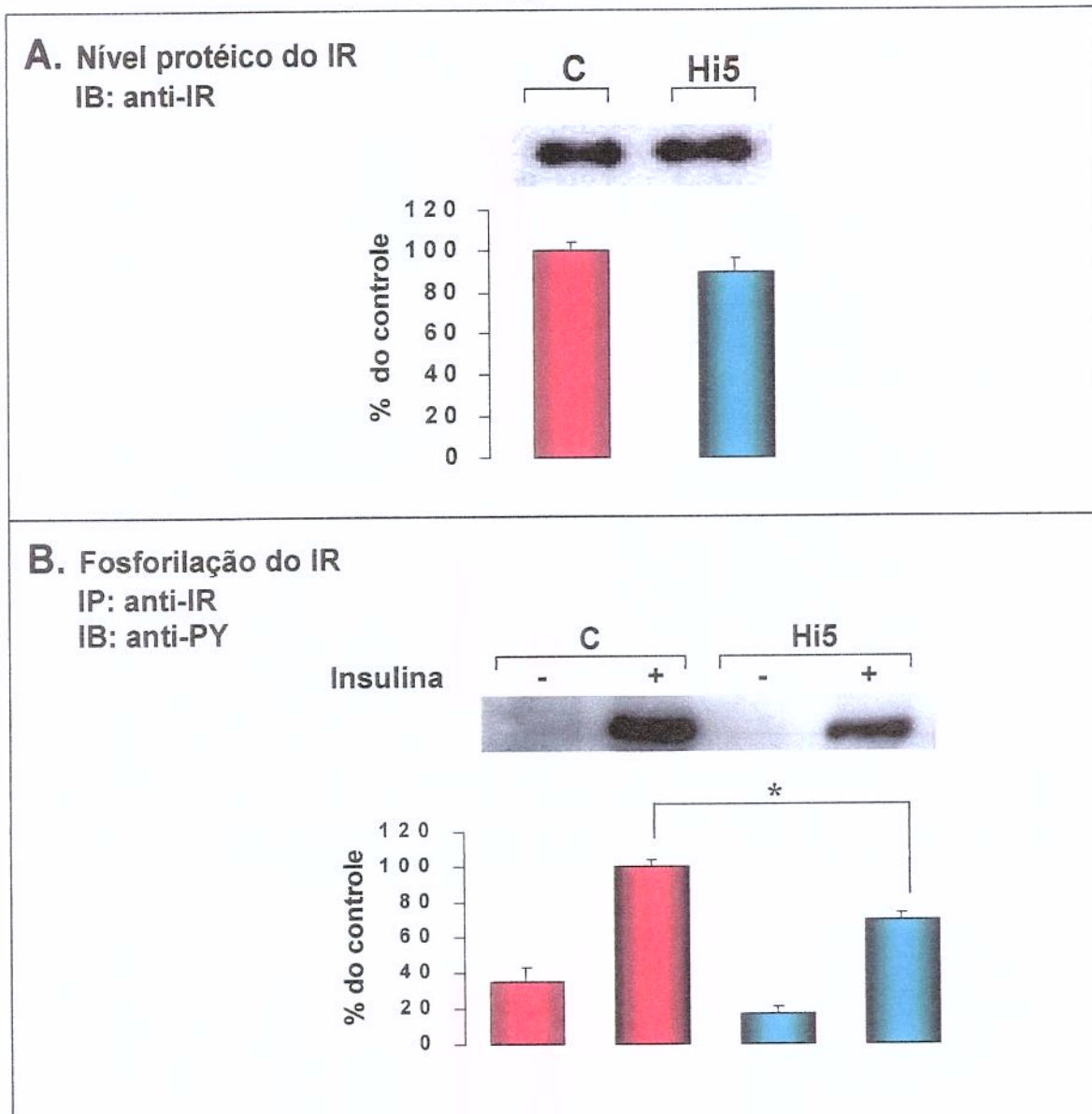


FIGURA 2. A. Avaliação do nível protéico do IR em tecido hepático de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de fígado foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IR. B. Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IR em fígado, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de fígado foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

Fígado

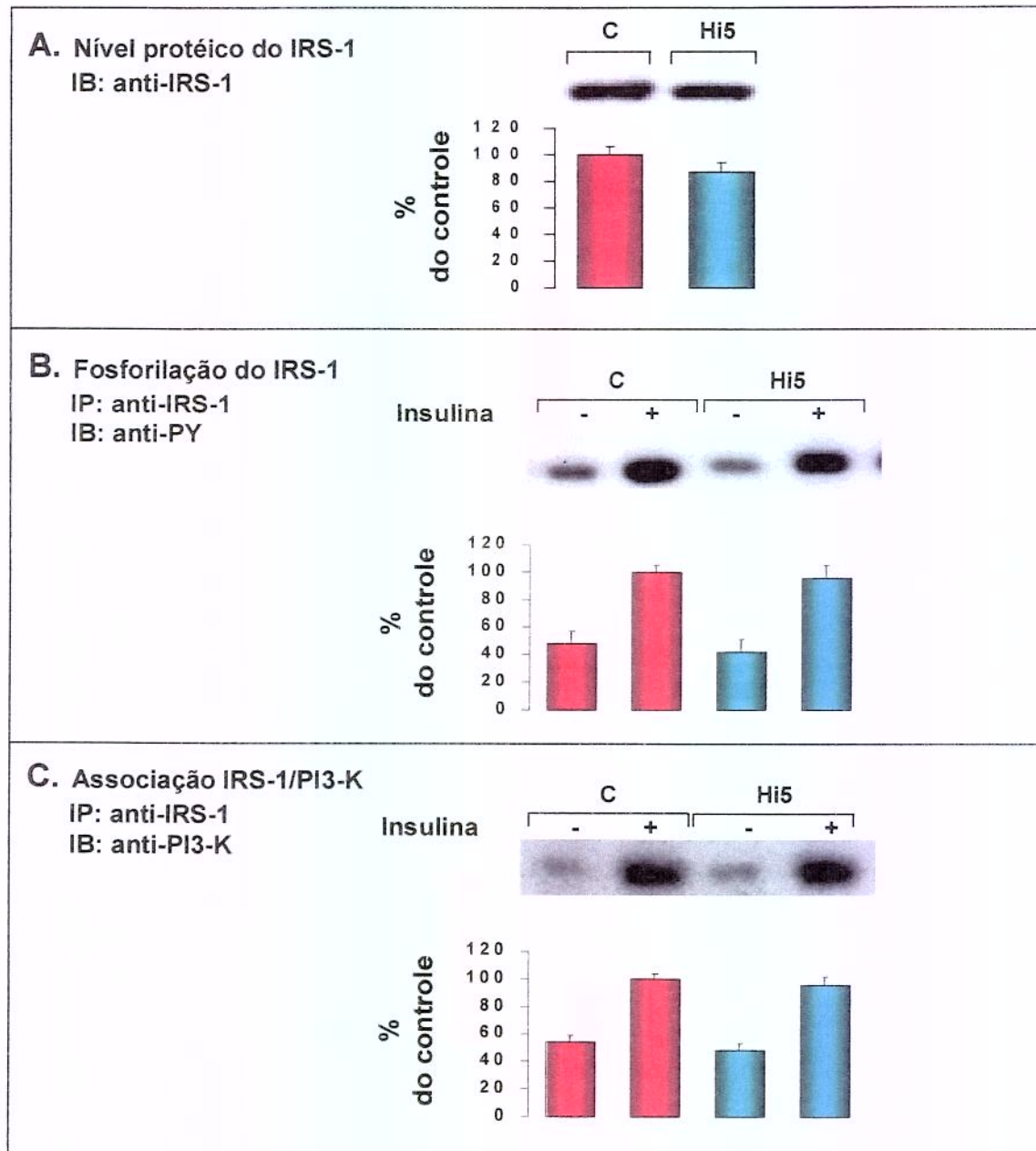


FIGURA 3. A. Avaliação do nível protéico do IRS-1 em tecido hepático de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de fígado foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1. B. Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em fígado, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de fígado foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. C. Avaliação da associação IRS-1/PI3-K em fígado, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

Fígado

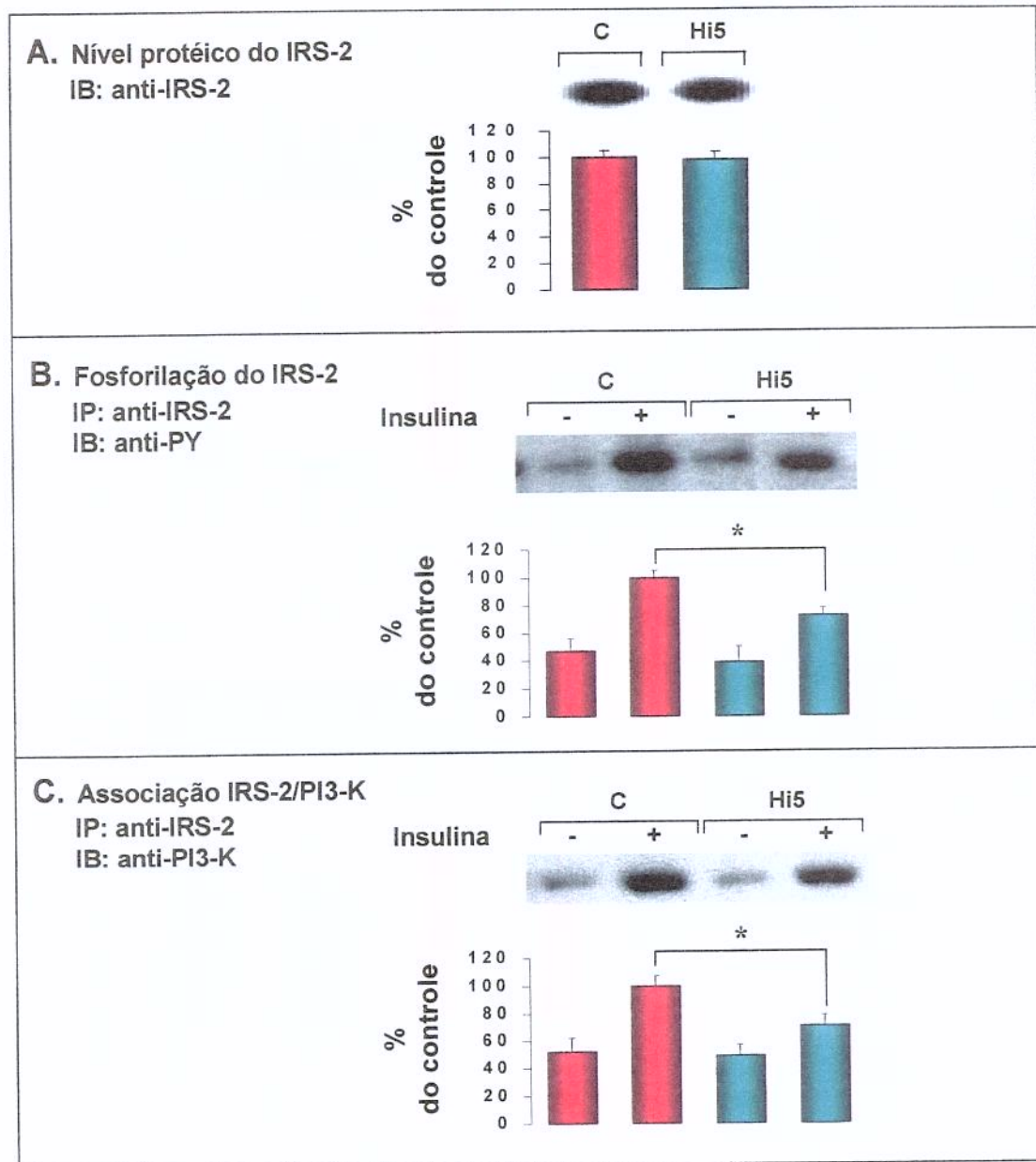


FIGURA 4. A. Avaliação do nível protéico do IRS-2 em tecido hepático de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de fígado foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-2. B. Avaliação do grau de fosforilação do IRS-2 em fígado, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de fígado foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. C. Avaliação da associação IRS-2/PI3-K em fígado, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

Fígado

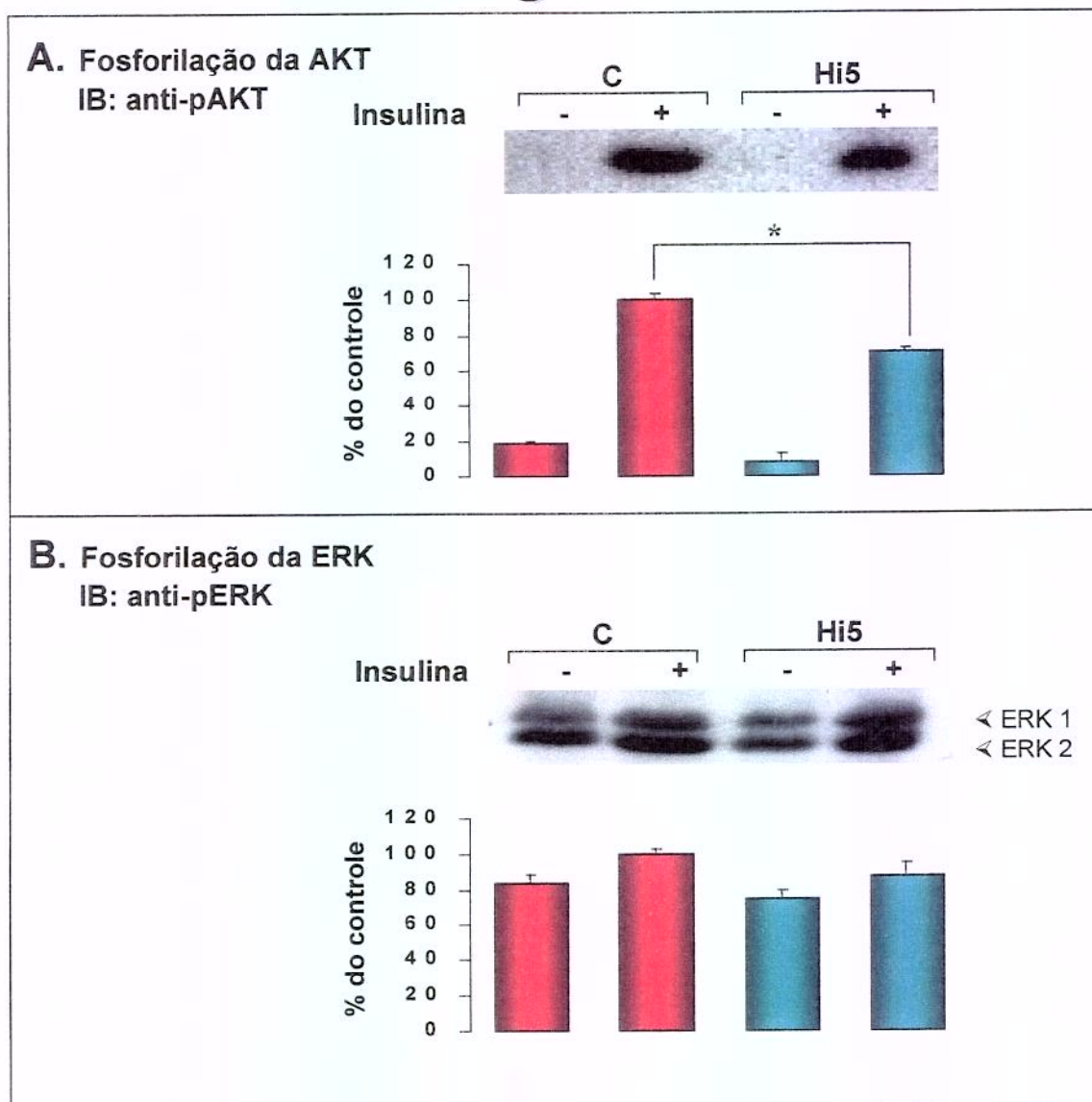


FIGURA 5. A. Avaliação do grau de fosforilação da AKT em fígado, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina, de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de fígado foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-pAKT. B. Avaliação do grau de fosforilação das ERKs (1/2) em fígado, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de fígado foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-pERK. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como *p<0,05.

4.3. EFEITO DA HIPERINSULINEMIA CRÔNICA POR 5 DIAS NAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS:

De maneira semelhante ao tecido hepático, quando se realizou *immunoblotting* das amostras de tecido muscular com anticorpo anti-receptor de insulina, o grupo Hi5 não apresentou diferença significativa no nível protéico do receptor, em relação ao controle ($C= 100 \pm 5$ vs $Hi5= 107 \pm 8$ %, $p = 0,467$; $n = 12$) (FIGURA 6 A). No estado basal, o grau de fosforilação do IR foi similar nos dois grupos ($C= 16 \pm 5$ vs $Hi5= 24 \pm 7$ %, $p = 0,333$; $n = 12$), e após estímulo agudo com insulina, a hiperinsulinemia crônica induziu menor aumento do grau de fosforilação do receptor, quando comparado ao grupo controle ($C= 100 \pm 5$ vs $Hi5= 76 \pm 6$ %, $p = 0,003$; $n = 12$) (FIGURA 6 B).

Os ratos do grupo Hi5 não diferiram dos controles, quanto ao nível tecidual de IRS-1 no músculo ($C= 100 \pm 6$ % vs $Hi5= 100 \pm 7$ %, $p = 0,979$; $n = 8$) (FIGURA 7 A).

Ao contrário do que foi observado no fígado, o *clamp* hiperinsulinêmico normoglicêmico por 5 dias induziu a redução de 22% na fosforilação em tirosina do IRS-1, após o estímulo agudo com insulina, em relação aos animais que receberam salina ($C= 100 \pm 3$ vs $H= 78 \pm 8$ %, $p = 0,020$; $n = 8$), sem alteração da fosforilação deste substrato no estado basal, entre os dois grupos ($C= 17 \pm 8$ vs $H= 30 \pm 7$ %, $p = 0,275$; $n = 8$) (FIGURA 7 B).

Quando avaliamos a associação IRS-1/PI 3-quinase, observamos que não houve diferença entre o grupo Hi5 e controle, no estado basal ($C= 17 \pm 5$ vs $Hi5= 28 \pm 5$ %, $p = 0,339$; $n = 8$), mas após estímulo agudo com insulina houve redução desta associação no músculo esquelético dos animais do grupo Hi5, em relação aos controles ($C= 100 \pm 4$ vs $Hi5= 59 \pm 8$ %, $p = 0,000$; $n = 8$) (FIGURA 7 C).

No *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-2, não houve alteração no nível tecidual desta proteína, comparando os grupos controle e Hi5 ($C= 100 \pm 6$ vs $Hi5= 97 \pm 11$ %, $p = 0,816$; $n = 6$) (FIGURA 8 A). O grau de fosforilação do IRS-2 no grupo Hi5 não difere do controle no estado basal ($C= 27 \pm 10$ vs $Hi5= 38 \pm 11$ %, $p = 0,476$), e após estímulo agudo com insulina ($C= 100 \pm 8$ vs $Hi5= 110 \pm 12$ %, $p = 0,473$) (FIGURA 8 B).

Em concordância com os resultados acima, a associação IRS-2/PI3-quinase no grupo Hi5, mostrou-se similar a do grupo controle, no estado basal ($C = 59 \pm 12$ vs $Hi5 = 79 \pm 13$ %, $p = 0,285$), e também sem alteração entre os grupos após estímulo agudo com insulina ($C = 100 \pm 8$ vs $Hi5 = 108 \pm 14$ %, $p = 0,631$) (FIGURA 8 C).

Quando realizamos *immunoblotting* para estudo da fosforilação da AKT/PKB, observamos no estado basal que não houve diferença significativa entre os animais controle e Hi5, ($C = 3 \pm 2$ vs $Hi5 = 6 \pm 1$ %, $p = 0,209$; $n = 6$), e que após estímulo agudo com insulina, houve redução na fosforilação desta serina-quinase no grupo Hi5, comparado ao grupo controle ($C = 100 \pm 2$ vs $Hi5 = 80 \pm 7$ %, $p = 0,04$; $n = 6$) (FIGURA 9 A).

Os resultados de *immunoblotting* com anticorpo anti-pERK em tecido muscular, foram semelhantes aos do fígado, não havendo alteração quando comparados os animais do grupo controle e Hi5, antes ($C = 85 \pm 1$ vs $Hi5 = 71 \pm 10$ %, $p = 0,227$; $n = 6$) e após estímulo agudo com insulina ($C = 100 \pm 4$ vs $Hi5 = 89 \pm 8$ %, $p = 0,232$; $n = 6$) (FIGURA 9 B).

Músculo

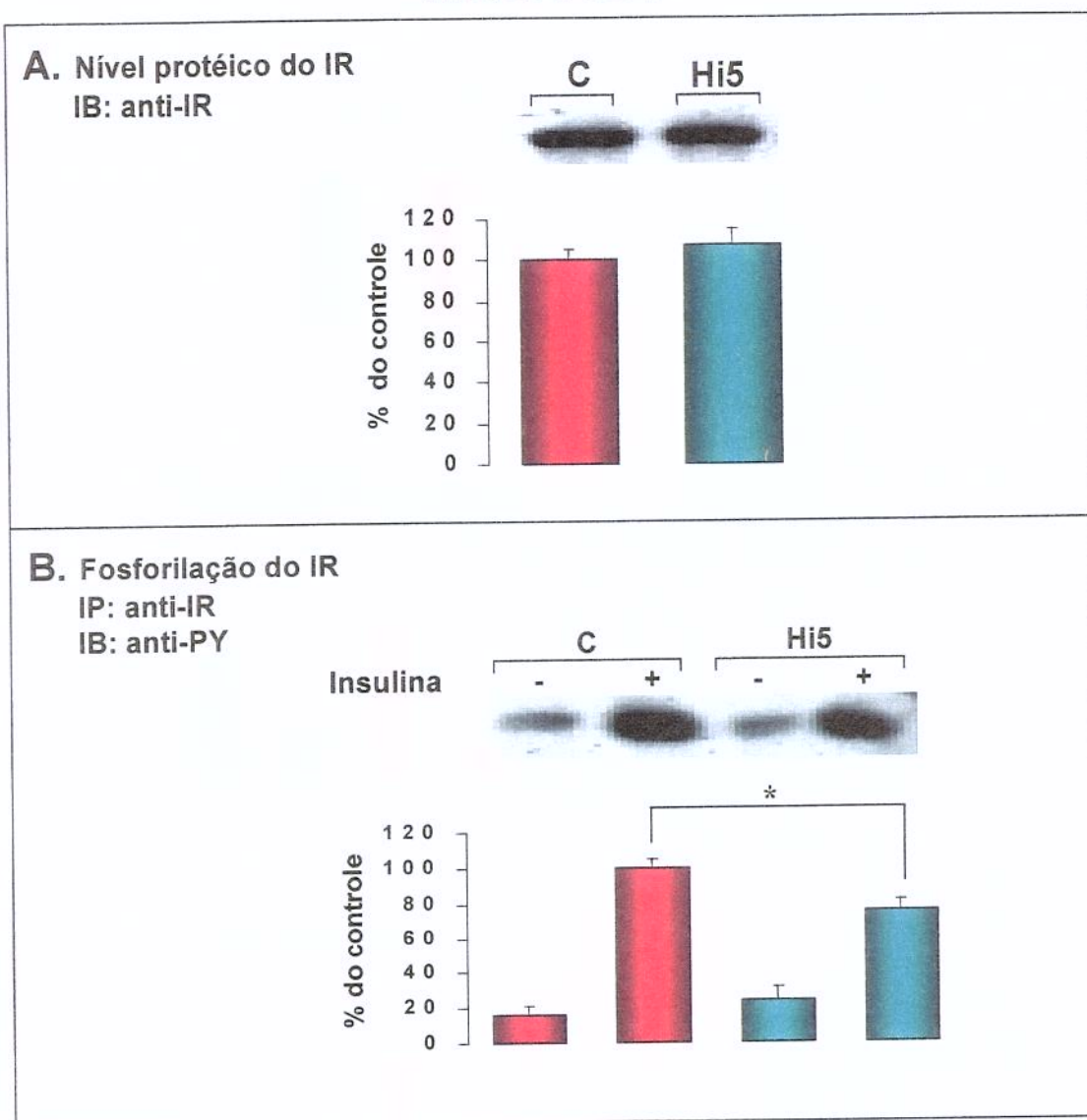


FIGURA 6. A. Avaliação do nível protéico do IR em tecido muscular de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de músculo foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IR. B. Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IR em músculo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de músculo foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

Músculo

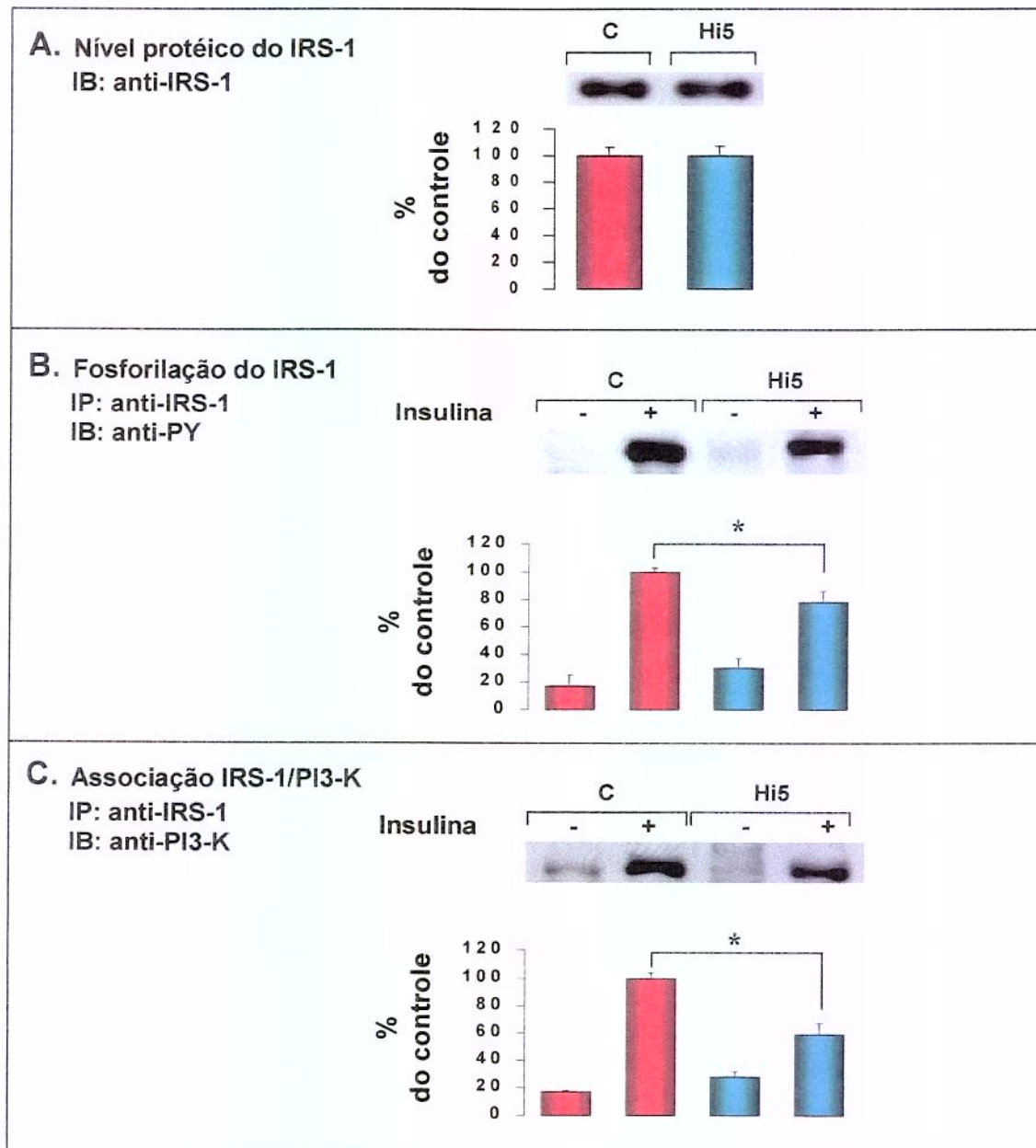


FIGURA 7. A. Avaliação do nível protéico do IRS-1 em tecido muscular de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de músculo foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1. B. Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em músculo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de músculo foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. C. Avaliação da associação IRS-1/PI3-K em músculo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

Músculo

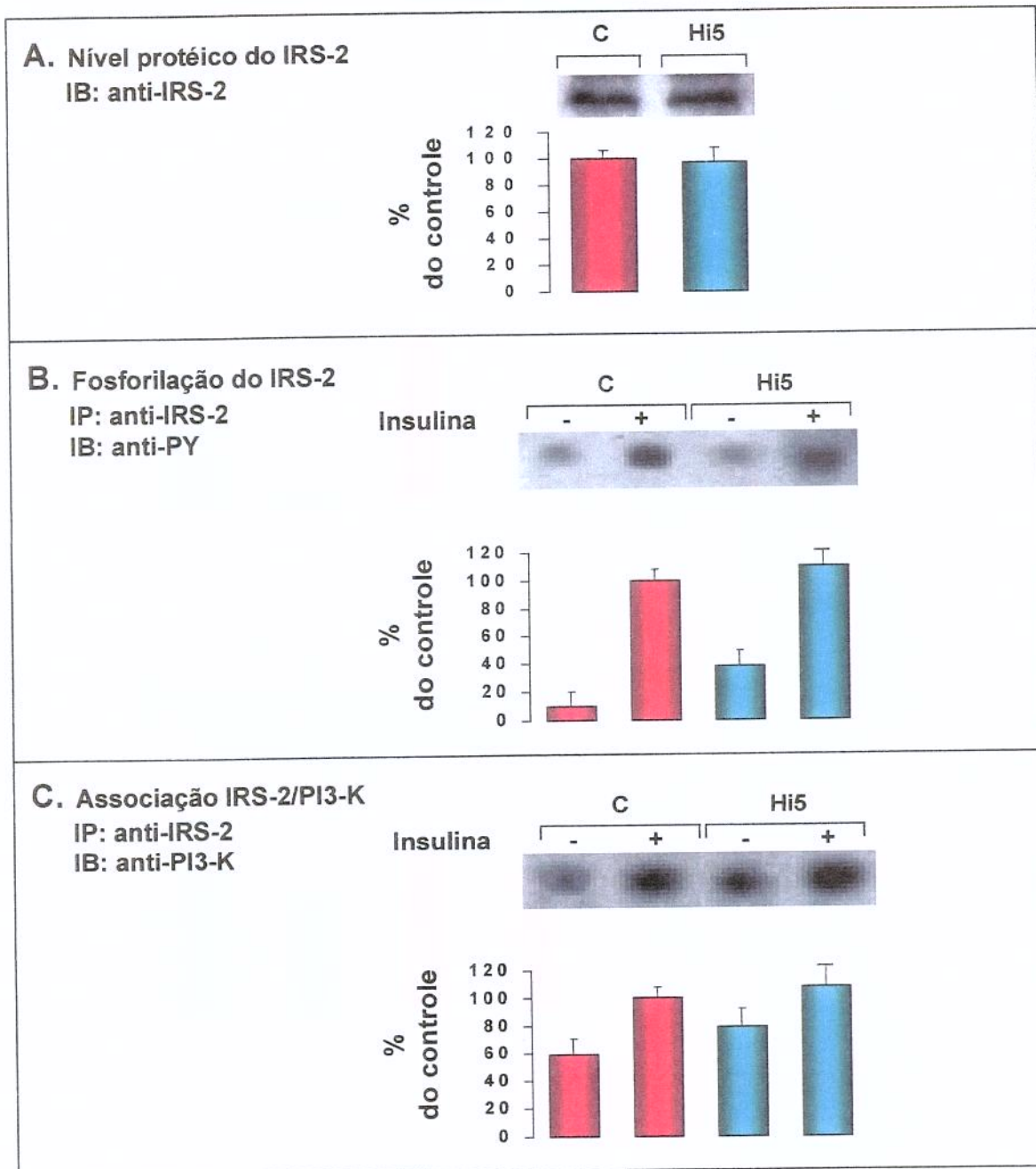


FIGURA 8. A. Avaliação do nível protéico do IRS-2 em tecido muscular de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de músculo foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-2. B. Avaliação do grau de fosforilação do IRS-2 em músculo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de músculo foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. C. Avaliação da associação IRS-2/PI3-K em músculo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

Músculo

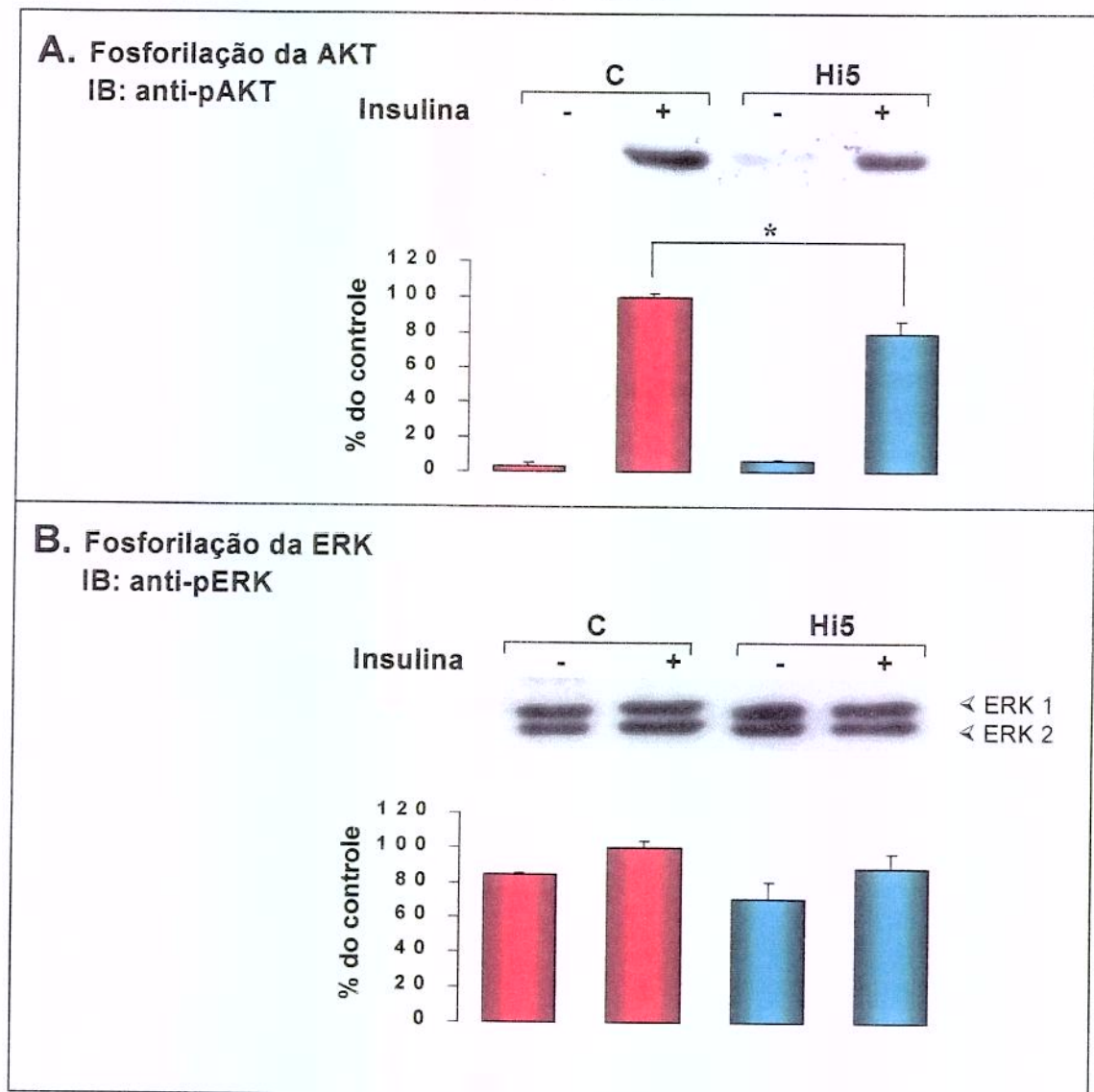


FIGURA 9. A. Avaliação do grau de fosforilação da AKT em músculo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina, de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de músculo foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-pAKT. B. Avaliação do grau de fosforilação das ERKs (1/2) em músculo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de músculo foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-pERK. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

4.4. EFEITO DA HIPERINSULINEMIA CRÔNICA POR 5 DIAS NAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA NO TECIDO CARDÍACO DE RATOS:

A FIGURA 10 (A e B) mostra que não houve alteração do nível protéico do receptor de insulina ($C = 100 \pm 6$ vs $Hi5 = 90 \pm 4$ %, $p=0,185$; $n = 9$), e do grau de fosforilação do receptor, após estímulo agudo com insulina, no coração de ratos Hi5 comparado com ratos do grupo controle ($C = 100 \pm 4$ vs $Hi5 = 107 \pm 5$ %, $p=0,287$; $n = 11$).

No estudo dos substratos do receptor de insulina, o músculo cardíaco apresentou resultados similares aos encontrados no músculo esquelético.

Quando as amostras de coração foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1, houve redução significativa do nível protéico desta proteína nos animais hiperinsulinêmicos, comparado aos controles ($C = 100 \pm 4$ vs $Hi5 = 79 \pm 7$ %, $p=0,026$; $n = 6$) (FIGURA 11 A). O mesmo foi encontrado quando investigamos o grau de fosforilação do IRS-1, e a associação deste substrato à enzima PI 3-quinase, após estímulo agudo com insulina. Observamos redução de cerca de 50% na fosforilação ($C = 100 \pm 10$ vs $Hi5 = 51 \pm 5$ %, $p=0,000$; $n = 10$), e 30% na associação IRS-1/PI 3-quinase, no grupo Hi5 comparado ao controle ($C = 100 \pm 7$ vs $Hi5 = 73 \pm 6$ %, $p=0,009$; $n = 10$) (FIGURAS 11 B e C).

Em relação ao IRS-2, não houve diferença quanto ao nível protéico desta proteína no coração de ratos que receberam infusão crônica de insulina, em relação aos ratos do grupo controle ($C = 100 \pm 6$ vs $Hi5 = 95 \pm 10$ %, $p=0,673$; $n = 11$) (FIGURA 12 A). A densitometria ótica demonstrou que também não houve alteração quanto ao grau de fosforilação deste substrato, e sua associação com a PI 3-quinase, após estímulo agudo com insulina ($C = 100 \pm 12$ vs $Hi5 = 98 \pm 8$ %, $p=0,892$; $n = 6$; $C = 100 \pm 5$ vs $Hi5 = 89 \pm 8$ %, $p=0,263$; $n = 8$, respectivamente) (FIGURAS 12 B e C).

Ainda de maneira semelhante ao músculo esquelético, observamos que o grau de fosforilação da AKT, após estímulo agudo com insulina, está reduzido nos animais Hi5, comparado aos controles ($C = 100 \pm 3$ vs $Hi5 = 80 \pm 4$ %, $p=0,003$; $n = 6$) (FIGURA 13 A). E que o grau de fosforilação das ERKs (1/2), nos ratos do grupo Hi5 e controle não apresentam diferença, após estímulo agudo com insulina ($C = 100 \pm 12$ vs $Hi5 = 103 \pm 8$ %, $p=0,839$; $n = 7$) (FIGURA 13 B).

Coração

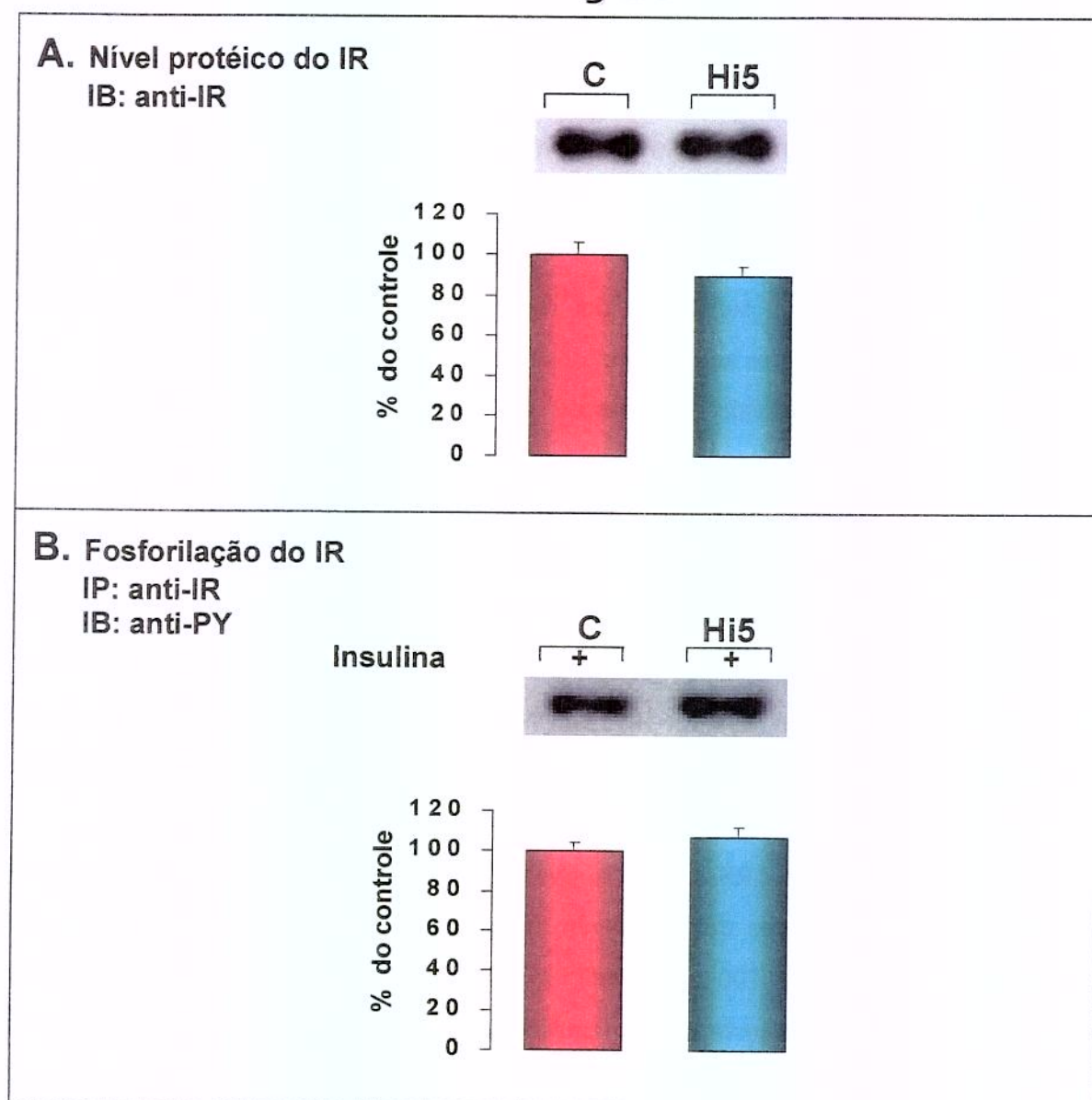


FIGURA 10. A. Avaliação do nível protéico do IR em tecido cardíaco de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de coração foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IR. B. Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IR em tecido cardíaco, após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de coração foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como $*p < 0,05$.

Coração

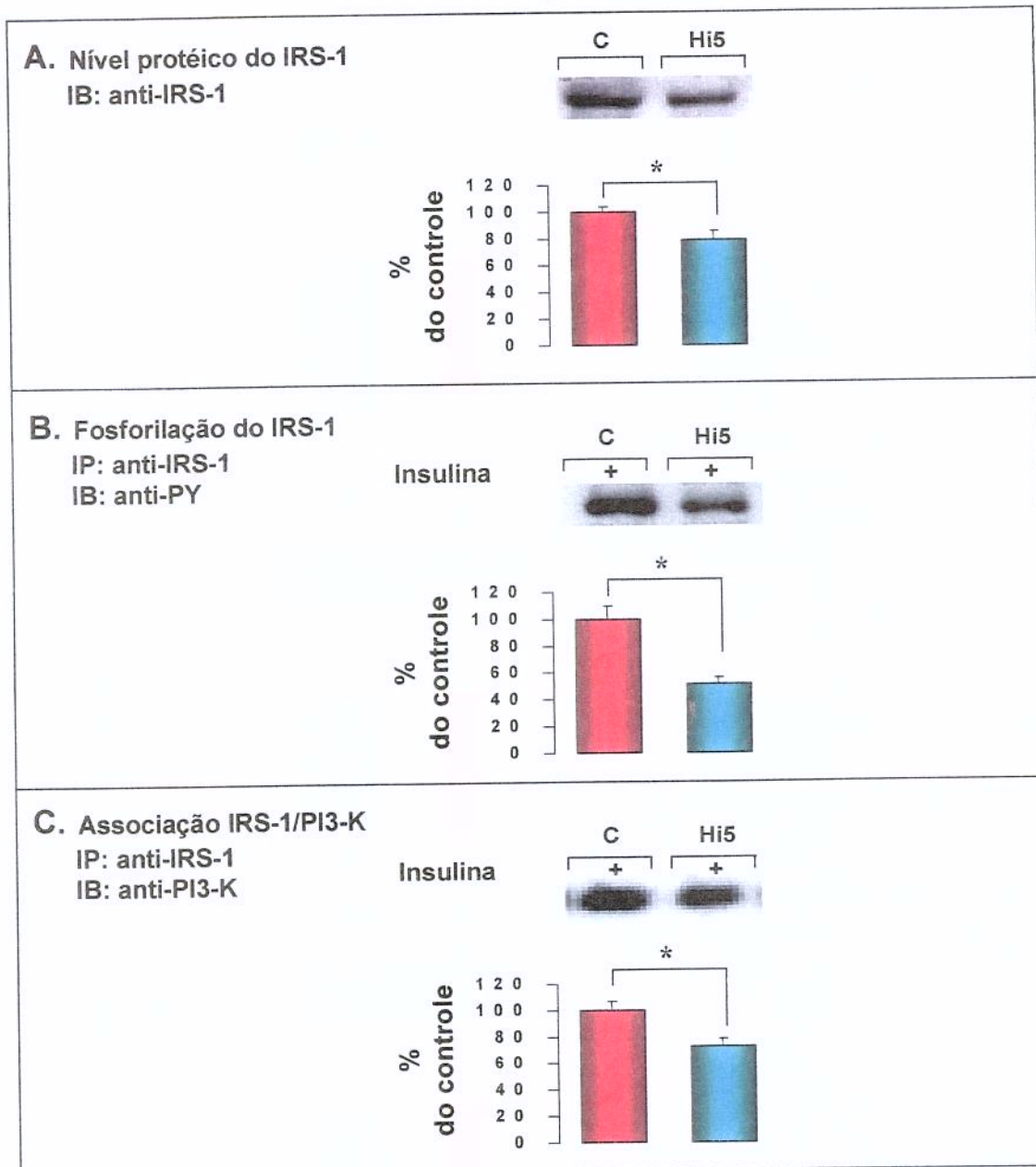


FIGURA 11 A. Avaliação do nível protéico do IRS-1 em tecido cardíaco de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de coração foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1. B. Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em tecido cardíaco, após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de coração foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. C. Avaliação da associação IRS-1/PI3-K em tecido cardíaco, após (+) estímulo agudo com insulina. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

Coração

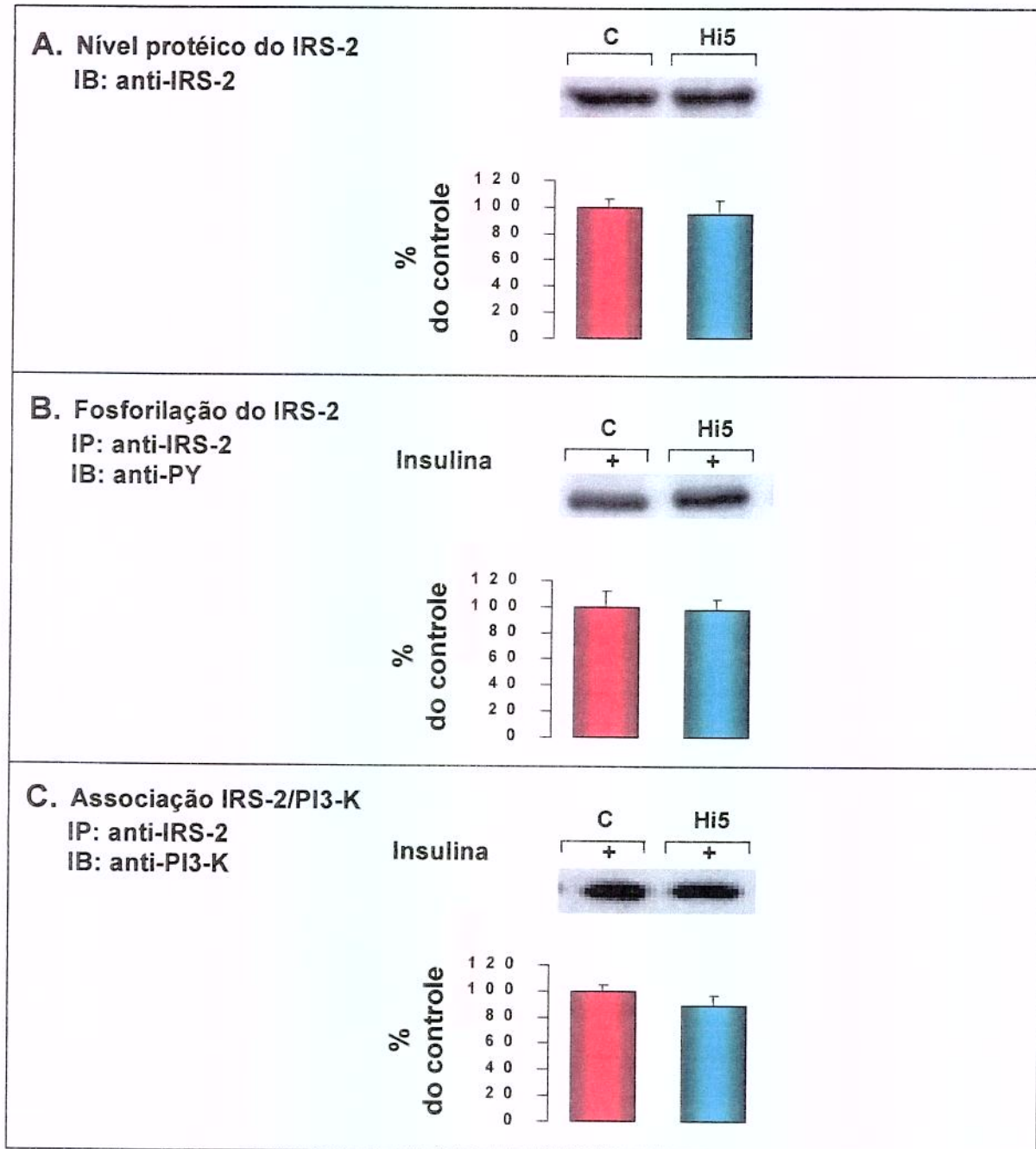


FIGURA 12. A. Avaliação do nível protéico do IRS-2 em tecido cardíaco de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de coração foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-2. B. Avaliação do grau de fosforilação do IRS-2 em tecido cardíaco, após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de coração foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. C. Avaliação da associação IRS-2/PI3-K em tecido cardíaco, após (+) estímulo agudo com insulina. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

Coração

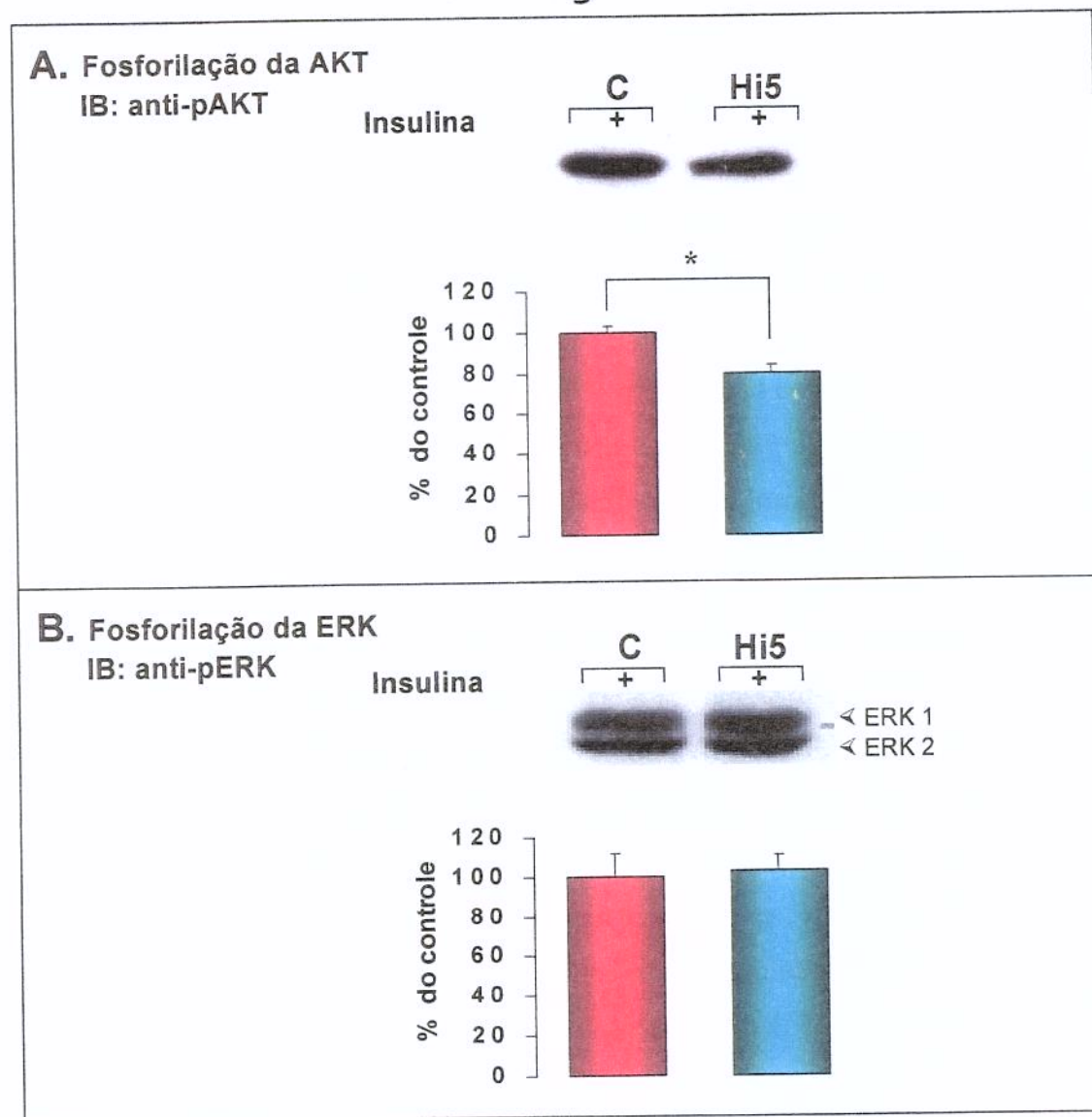


FIGURA 13. A. Avaliação do grau de fosforilação da AKT em tecido cardíaco, após (+) estímulo agudo com insulina, de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de coração foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-pAKT. B. Avaliação do grau de fosforilação das ERKs (1/2) em tecido cardíaco, após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de coração foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-pERK. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

4.5. EFEITO DA HIPERINSULINEMIA CRÔNICA POR 5 DIAS NAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA NO TECIDO ADIPOSEO:

Quando analisamos o nível protéico do receptor de insulina neste tecido, encontramos resultados similares entre o grupo controle e o grupo Hi5 ($C = 100 \pm 7$ vs $Hi5 = 104 \pm 8$ %, $p = 0,711$; $n = 10$) (FIGURA 14 A). Diferente dos demais tecidos estudados, em amostras de tecido adiposo do grupo Hi5, observamos no estado basal, um aumento da fosforilação do receptor de insulina, embora sem diferença estatística, comparado ao grupo controle ($C = 3 \pm 2$ vs $Hi5 = 14 \pm 8$ %, $p = 0,212$; $n = 6$). A densitometria ótica de 6 experimentos demonstrou que não houve alteração do grau de fosforilação do IR, após estímulo agudo com insulina entre os dois grupos estudados ($C = 100 \pm 11$ vs $Hi5 = 84 \pm 18$ %, $p = 0,458$; $n = 10$) (FIGURA 14 B)

Na avaliação dos substratos do receptor de insulina, encontramos resultados surpreendentes. A FIGURA 15 A mostra aumento significativo do nível protéico do IRS-1 no grupo Hi5, quando comparado ao controle ($C = 100 \pm 4$ vs $Hi5 = 274 \pm 13$ %, $p = 0,000$; $n = 6$). Já no estado basal, o grupo Hi5 apresentou aumento da fosforilação do IRS-1, em relação ao controle ($C = 45 \pm 6$ vs $Hi5 = 139 \pm 36$ %, $p = 0,030$; $n = 6$). A densitometria ótica de 6 experimentos demonstrou, após estímulo agudo com insulina, aumento marcante deste substrato no grupo Hi5, quando comparado ao controle ($C = 100 \pm 7$ vs $Hi5 = 352 \pm 21$ %, $p = 0,000$; $n = 6$) (FIGURAS 15 A e B, respectivamente).

Quanto à associação da proteína IRS-1 com a enzima PI 3-quinase no tecido adiposo, também foi observado aumento da associação deste substrato, antes ($C = 23 \pm 5$ vs $Hi5 = 124 \pm 27$ %, $p = 0,003$; $n = 6$) e após estímulo agudo com insulina ($C = 100 \pm 8$ vs $Hi5 = 180 \pm 17$ %, $p = 0,001$; $n = 6$), nos ratos do grupo Hi5, comparado ao controle (FIGURAS 15 C).

De maneira semelhante aos resultados obtidos do substrato-1 do receptor de insulina no tecido adiposo, observamos aumento significativo do nível protéico do IRS-2 no grupo Hi5 ($C = 100 \pm 17$ vs $Hi5 = 207 \pm 9$ %, $p = 0,000$; $n = 6$) (FIGURA 16 A). Embora observamos um aumento da fosforilação deste substrato no estado basal de ratos Hi5, a

densitometria ótica de 6 experimentos demonstrou que não houve diferença significativa entre os dois grupos em estudo ($C = 49 \pm 28$ vs $Hi5 = 99 \pm 9$ %, $p=0,120$; $n = 6$). Após estímulo agudo com insulina, observamos aumento do grau de fosforilação do IRS-2 em ratos do grupo Hi5, comparado ao grupo controle ($C = 100 \pm 39$ vs $Hi5 = 228 \pm 33$ %, $p=0,031$; $n = 6$) (FIGURA 16 B).

Em relação à associação IRS-2/PI 3-quinase, observamos aumento no grupo Hi5, comparado ao controle, antes ($C = 51 \pm 11$ vs $Hi5 = 103 \pm 9$ %, $p=0,004$; $n = 6$), e após estímulo agudo com insulina ($C = 100 \pm 2$ vs $Hi5 = 163 \pm 10$ %, $p=0,000$; $n = 6$) (FIGURAS 16 C).

No estado basal, apesar do aumento na fosforilação da AKT no tecido adiposo de ratos Hi5, comparado ao controle ($C = 12 \pm 4$ vs $Hi5 = 41 \pm 7$ %, $p=0,004$; $n = 7$), não houve diferença significativa na fosforilação desta serina-quinase, após estímulo agudo com insulina ($C = 100 \pm 11$ vs $Hi5 = 104 \pm 14$ %, $p=0,826$) (FIGURA 17 A).

A avaliação do grau de fosforilação das ERKs (1/2) neste tecido foi semelhante aos demais, os resultados do grupo Hi5 e controle foram similares, antes ($C = 73 \pm 8$ vs $Hi5 = 91 \pm 6$ %, $p=0,104$; $n = 7$), e após estímulo agudo com insulina ($C = 100 \pm 10$ vs $Hi5 = 97 \pm 6$ %, $p=0,774$; $n = 7$), (FIGURA 17 B).

Tecido Adiposo

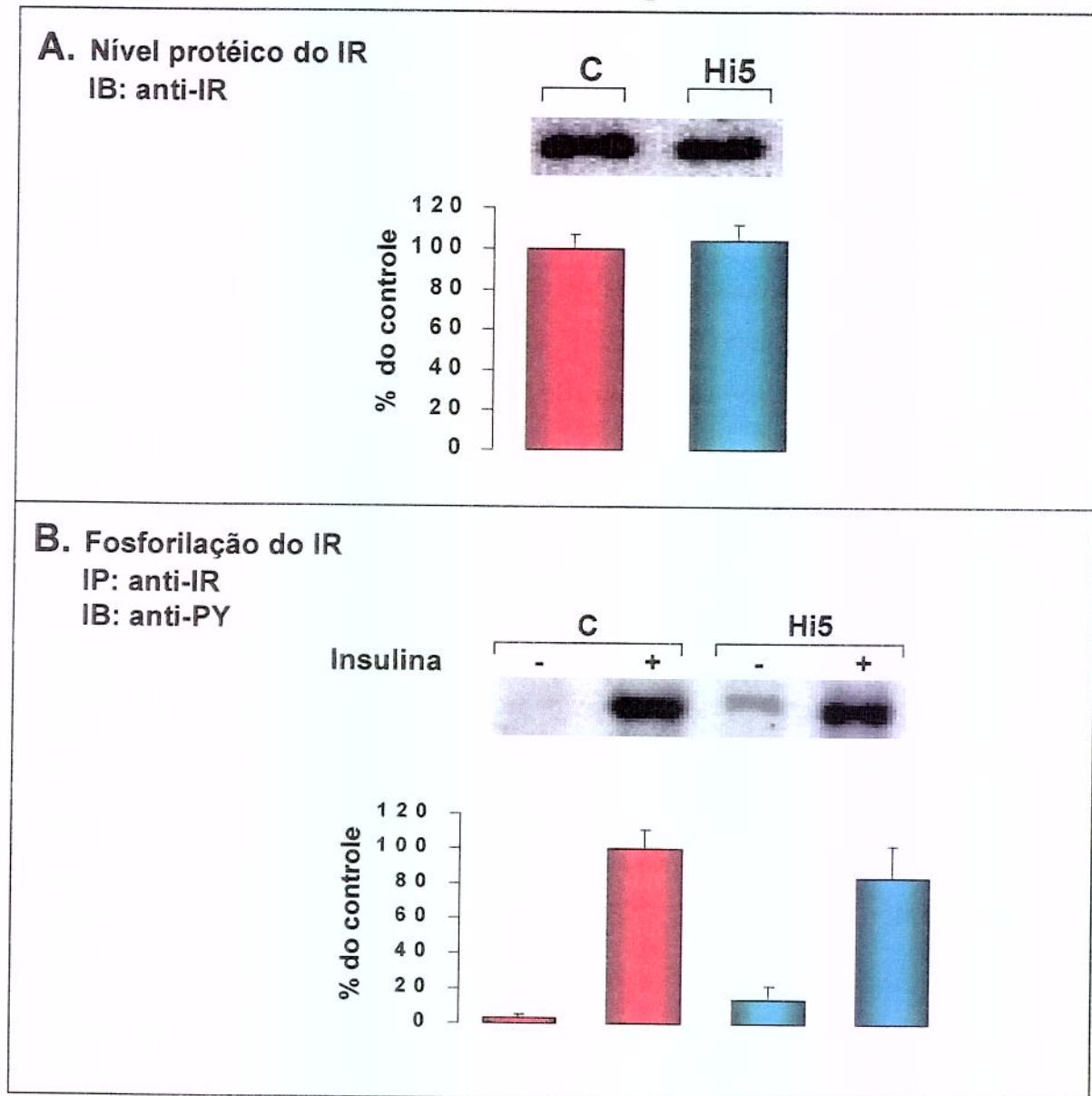


FIGURA 14. A. Avaliação do nível protéico do IR em tecido adiposo de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de gordura foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IR. B. Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IR em tecido adiposo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de gordura foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

Tecido adiposo

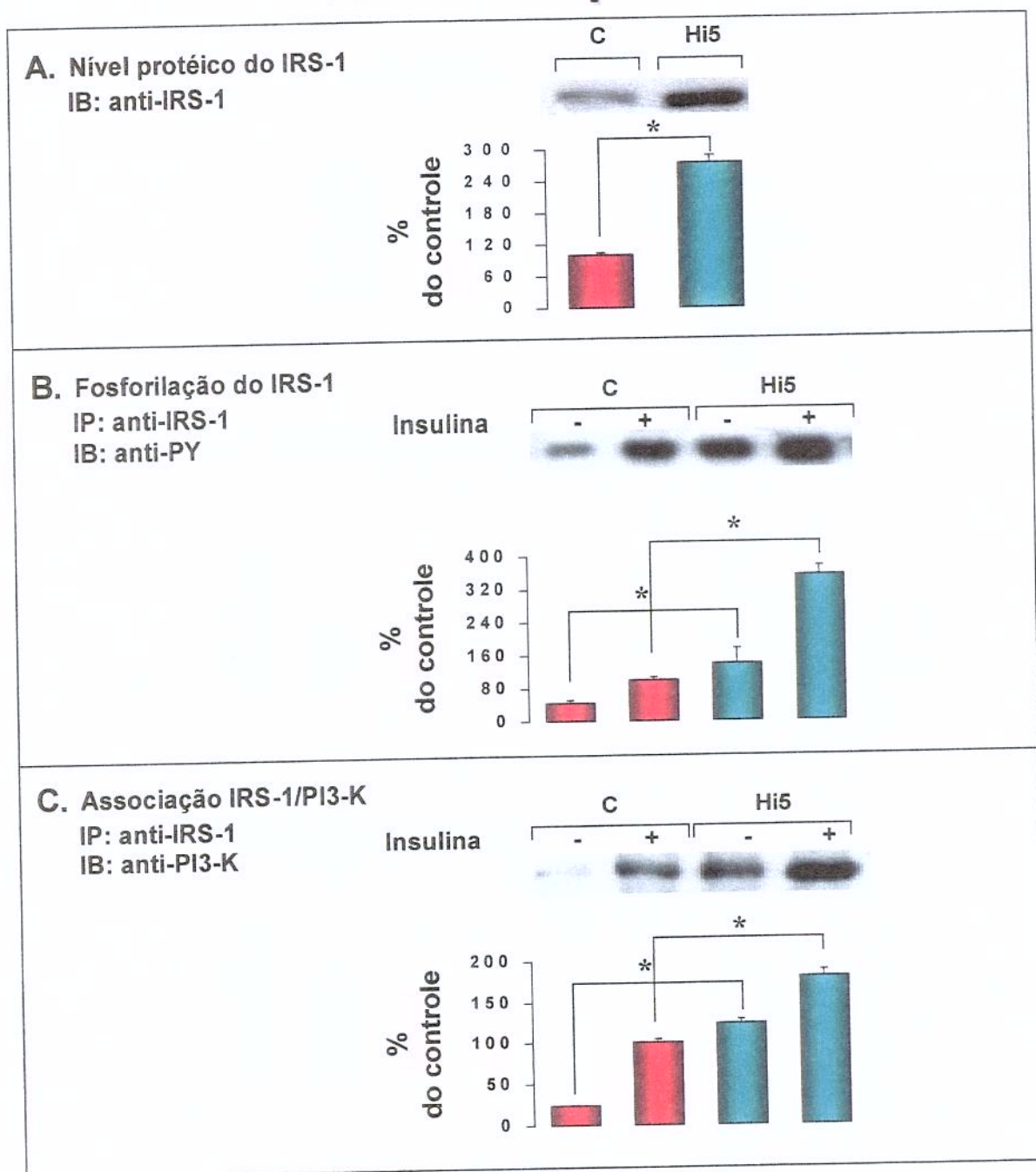


FIGURA 15. A. Avaliação do nível protéico do IRS-1 em tecido adiposo de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de gordura foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1. B. Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em tecido adiposo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de gordura foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. C. Avaliação da associação IRS-1/PI3-K em tecido adiposo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0.05$.

Tecido adiposo

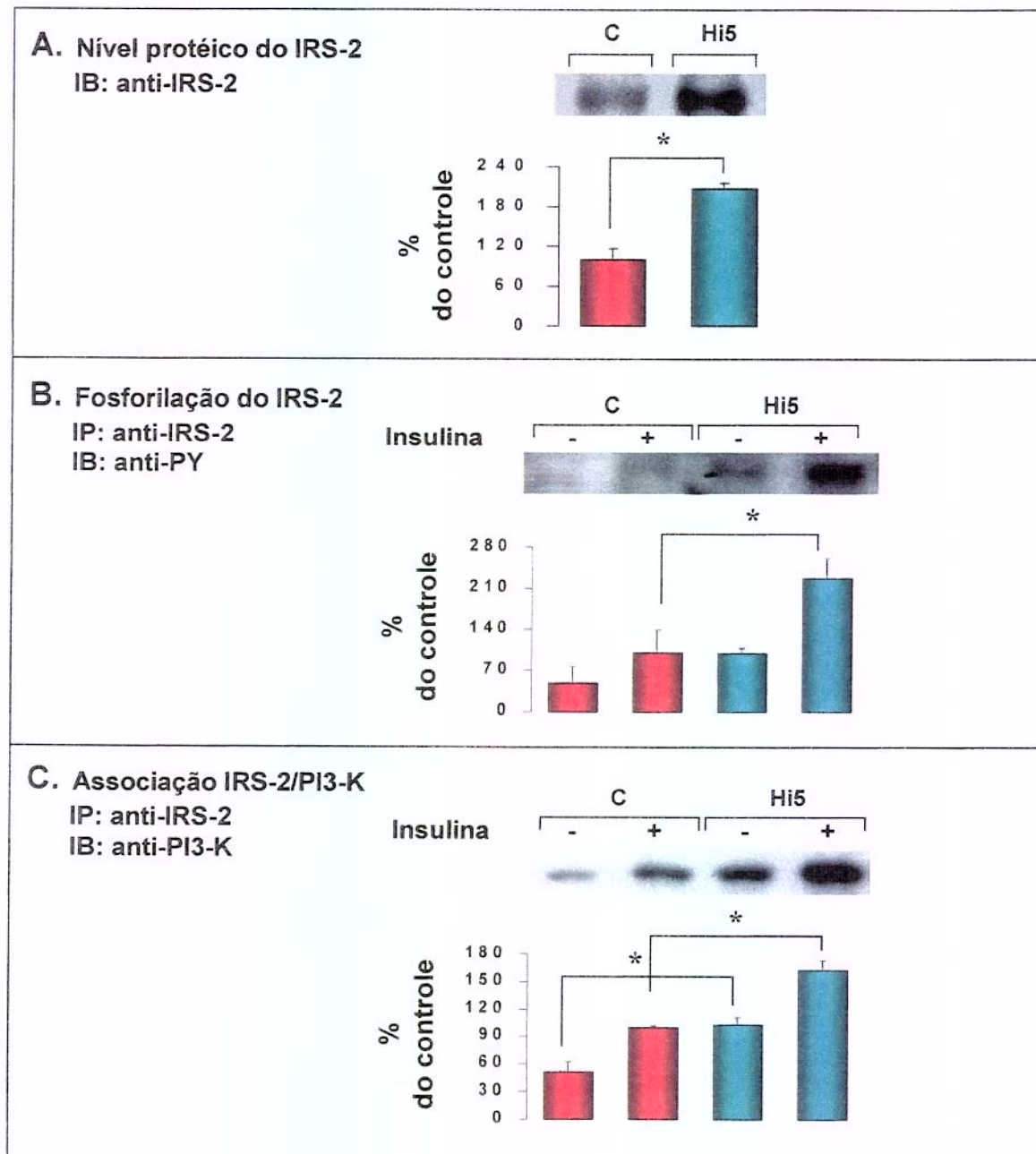


FIGURA 16. A. Avaliação do nível protéico do IRS-2 em tecido adiposo de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de gordura foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-2. B. Avaliação do grau de fosforilação do IRS-2 em tecido adiposo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de gordura foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. C. Avaliação da associação IRS-2/PI3-K em tecido adiposo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

Tecido adiposo

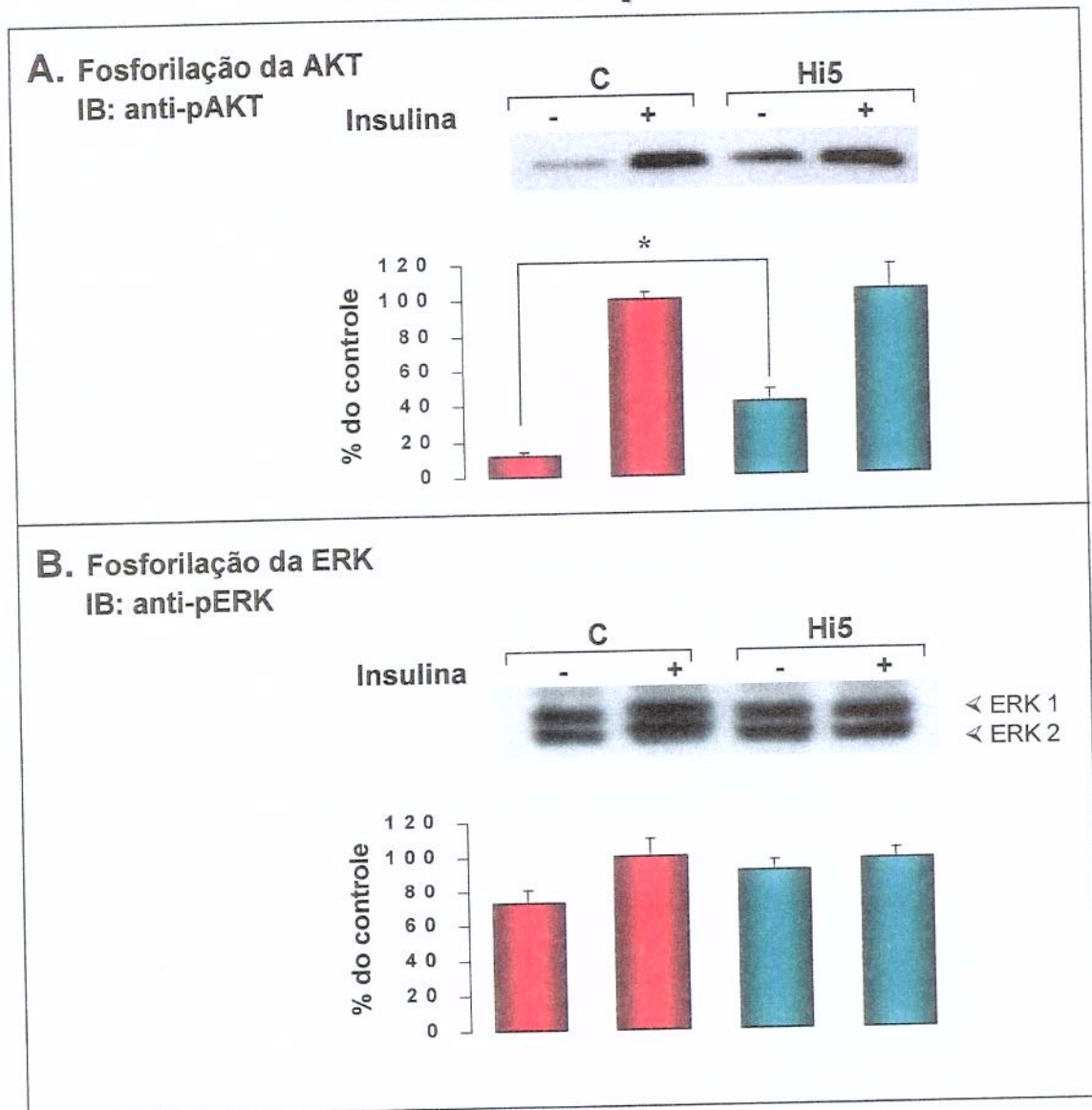


FIGURA 17. A. Avaliação do grau de fosforilação da AKT em tecido adiposo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina, de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras de gordura foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-pAKT. B. Avaliação do grau de fosforilação das ERKs (1/2) em tecido adiposo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de gordura foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-pERK. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

4.6. EFEITO DA HIPERINSULINEMIA CRÔNICA POR 5 DIAS NAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA EM ILHOTAS DE LANGERHANS ISOLADAS:

Em amostras contendo cerca de 350 ilhotas de Langerhans isoladas, submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-receptor de insulina, a infusão de insulina por 5 dias não alterou o nível protéico do receptor, comparado ao controle ($C= 100 \pm 5$ vs $Hi5= 98 \pm 10$ %, $p=0,864$; $n = 4$) (FIGURA 18 A).

Semelhante ao nível protéico do receptor de insulina, observamos que não houve alteração do grau de fosforilação do receptor, antes ($C= 5 \pm 3$ vs $Hi5= 12 \pm 7$ %, $p=0,393$; $n = 4$), e após estímulo agudo com insulina ($C= 100 \pm 68$ vs $Hi5= 84 \pm 8$ %, $p=0,207$; $n = 4$) nos dois grupos em estudo, controle e Hi5 (FIGURA 18 B).

A densitometria ótica de 4 experimentos demonstrou que o nível protéico do IRS-1 nos animais hiperinsulinêmicos está aumentado em relação aos controles ($C= 100 \pm 11$ vs $Hi5= 137 \pm 9$ %, $p=0,040$) (FIGURA 19 A). O grau de fosforilação do IRS-1, no estado basal, foi similar entre os dois grupos estudados ($C= 17 \pm 7$ vs $Hi5= 21 \pm 8$ %, $p=0,720$; $n = 4$), mas após estímulo agudo com insulina, observamos aumento da fosforilação deste substrato em ilhotas isoladas de ratos Hi5, em relação aos controles ($C= 100 \pm 8$ vs $Hi5= 150 \pm 11$ %, $p=0,010$; $n = 4$) (FIGURA 19 B).

Quando as amostras contendo ilhotas isoladas foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e posteriormente submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-PI 3-quinase, observamos que o grupo Hi5 não apresentou alteração da associação IRS-1/PI 3-quinase, comparado ao controle, no estado basal ($C= 40 \pm 7$ vs $Hi5= 42 \pm 11$ %, $p=0,883$; $n = 4$), e após estímulo agudo com insulina, aumentou a associação ($C= 100 \pm 8$ vs $Hi5= 128 \pm 8$ %, $p=0,04$; $n = 4$) (FIGURA 19 C).

A hiperinsulinemia crônica também aumentou o nível protéico do IRS-2 ($C= 100 \pm 5$ vs $Hi5= 126 \pm 7$ %, $p=0,04$; $n = 3$), sua fosforilação ($C= 100 \pm 8$ vs $Hi5= 132 \pm 7$ %, $p=0,04$; $n = 3$) e sua associação com a PI 3-quinase ($C= 100 \pm 8$ vs $Hi5= 130 \pm 6$ %, $p=0,04$; $n = 3$), após estímulo agudo com insulina, comparado com os animais do grupo controle (FIGURAS 20 A, B e C, respectivamente).

De maneira similar aos demais tecidos estudados, também não houve diferença da fosforilação das proteínas ERKs (1/2), no estado basal (C= 83 ± 19 vs Hi5= 71 ± 28 %, $p=0,730$; $n = 6$), e após estímulo agudo com insulina (C= 100 ± 18 vs Hi5= 94 ± 10 %, $p=0,777$; $n = 6$), comparando ilhotas isoladas de ratos Hi5 e controle (FIGURA 21).

Ilhotas isoladas

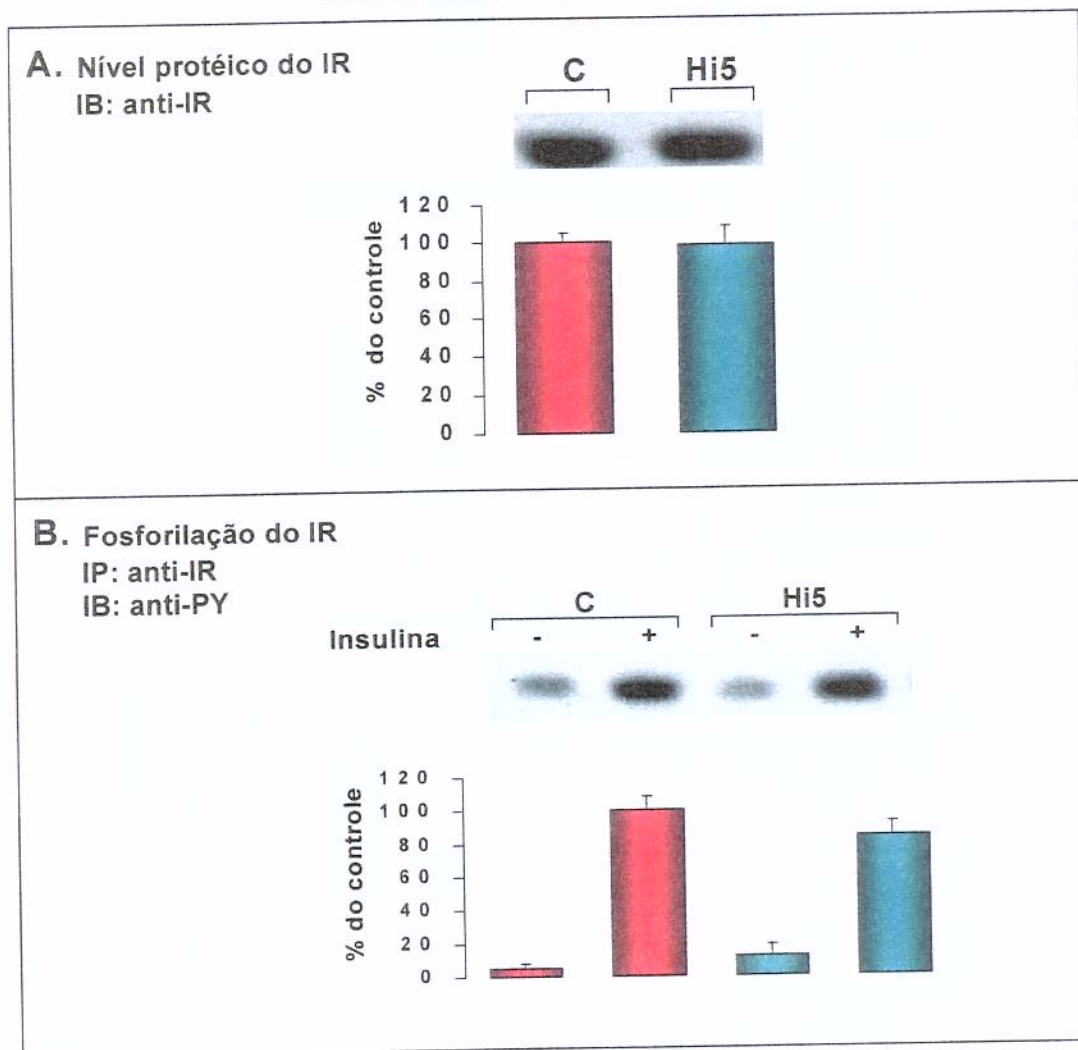


FIGURA 18. A. Avaliação do nível protéico do IR em ilhotas isoladas de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras contendo cerca de 350 ilhotas foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IR. B. Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IR em ilhotas, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras contendo cerca de 350 ilhotas foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

Ilhotas isoladas

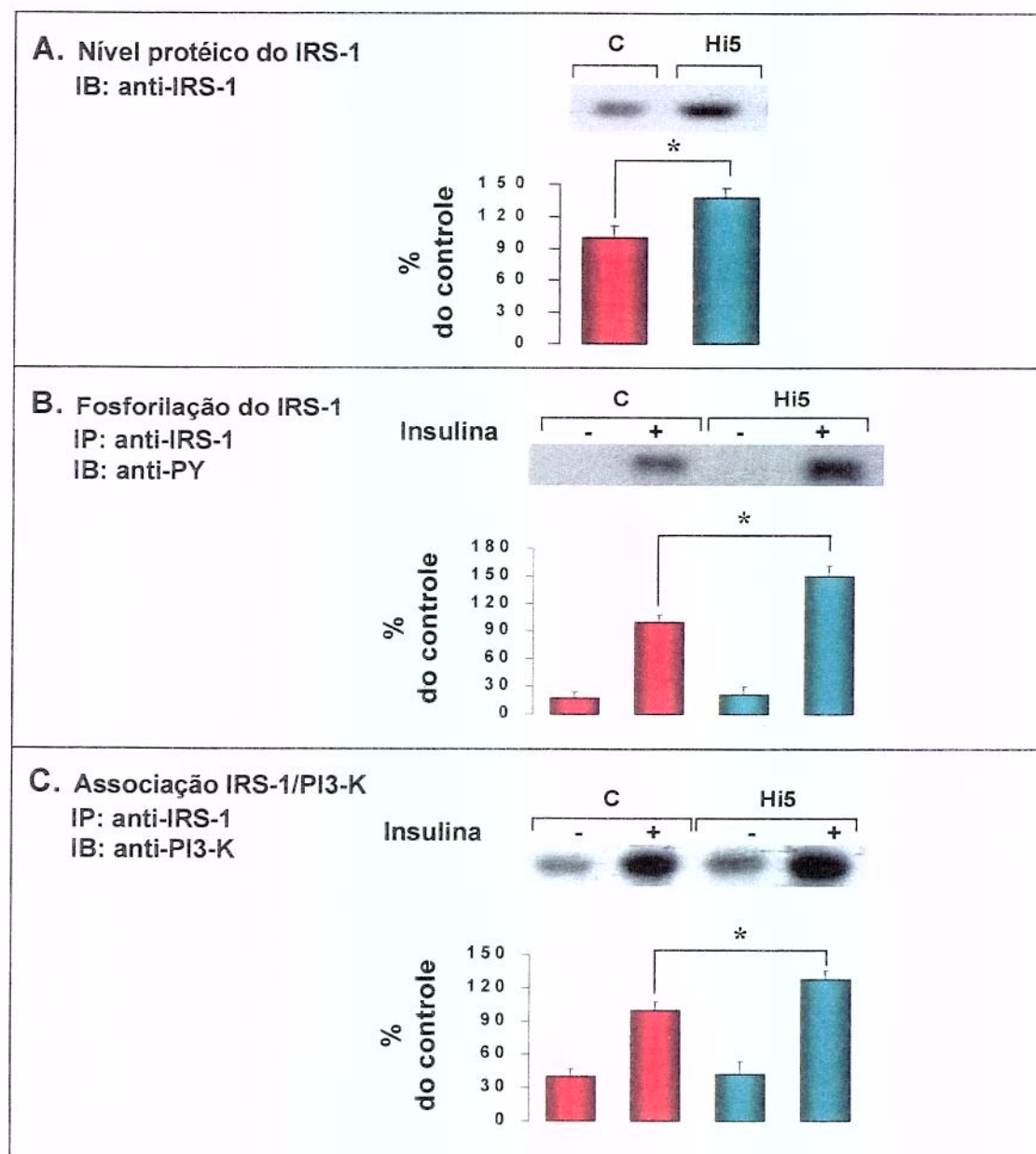


FIGURA 19. A. Avaliação do nível protéico do IRS-1 em ilhotas isoladas de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras contendo cerca de 350 ilhotas foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1. B. Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em ilhotas, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de ilhotas isoladas foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. C. Avaliação da associação IRS-1/PI3-K em ilhotas, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

Ilhotas isoladas

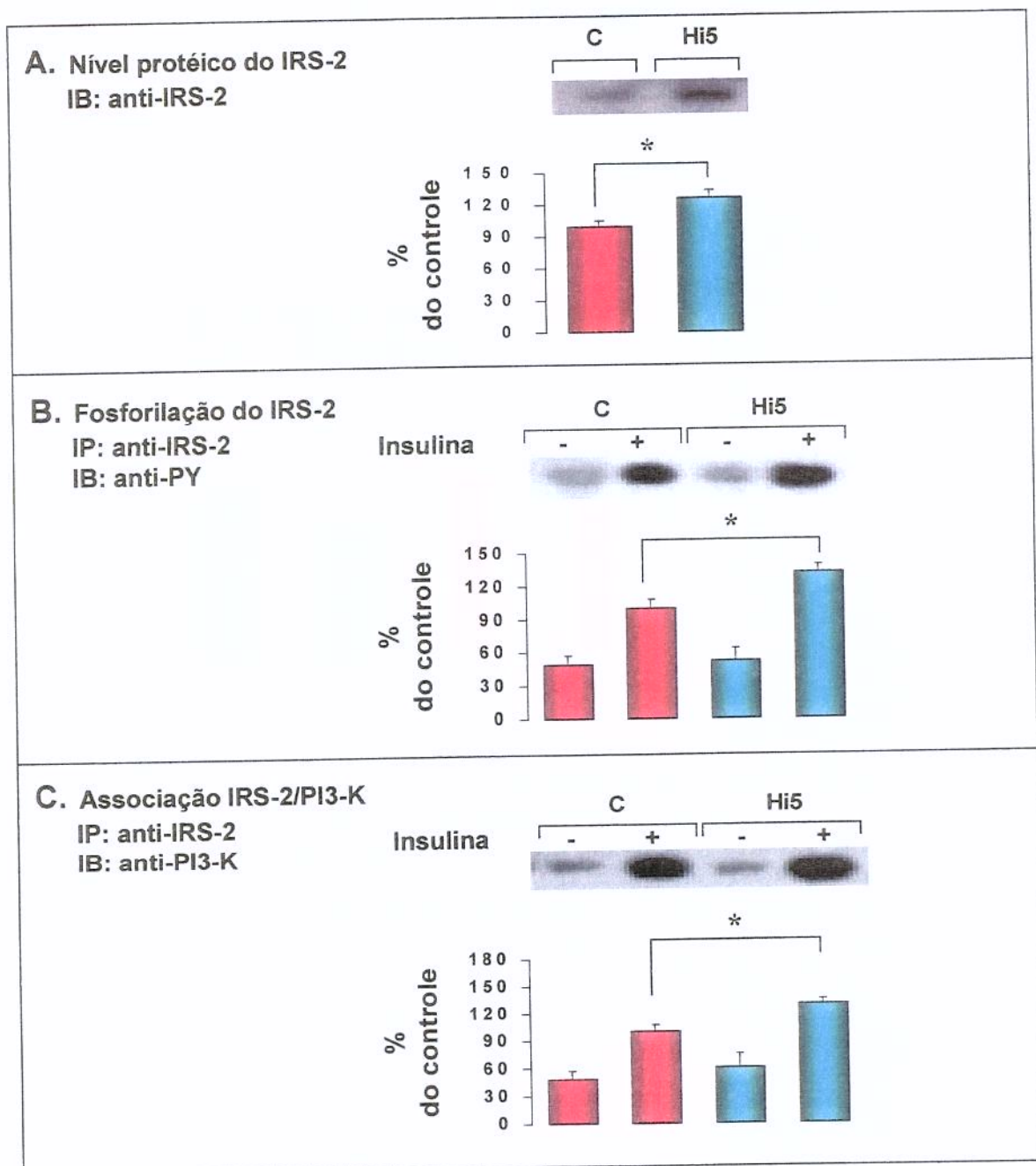


FIGURA 20. A. Avaliação do nível protéico do IRS-2 em ilhotas isoladas de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras contendo cerca de 350 ilhotas foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-2. B. Avaliação do grau de fosforilação do IRS-2 em ilhotas, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras de ilhotas isoladas foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. C. Avaliação da associação IRS-2/PI3-K em ilhotas, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

Ilhotas isoladas

Fosforilação da ERK
IB: anti-pERK

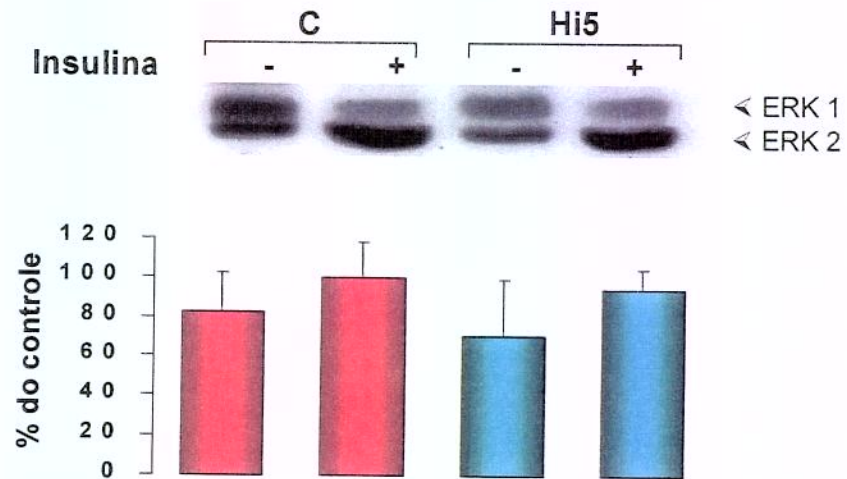


FIGURA 21. Avaliação do grau de fosforilação das ERKs (1/2) em ilhotas isoladas, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina, de ratos controle (C) e hiperinsulinêmico (Hi5). Amostras contendo 350 ilhotas isoladas foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-pERK. Os valores são expressos como % média \pm EPM, e a significância expressa como * $p < 0.05$.

RESUMO

	Fígado	Músculo	Coração	T. Adiposo	Ilhotas
IR	↔	↔	↔	↔	↔
IR/PY	↓	↓	↔	↔	↔
IRS-1	↔	↔	↓	↑	↑
IRS-1/PY	↔	↓	↓	↑	↑
IRS-1/PI3K	↔	↓	↓	↑	↑
IRS-2	↔	↔	↔	↑	↑
IRS-2/PY	↓	↔	↔	↑	↑
IRS-2/PI3K	↓	↔	↔	↑	↑
pAKT	↓	↓	↓	↔	----
pERKs (1/2)	↔	↔	↔	↔	↔

FIGURA 22. Resumo das etapas iniciais da ação insulínica em tecidos de ratos submetidos à infusão crônica de insulina por 5 dias.

4.7. EFEITO DA HIPERINSULINEMIA CRÔNICA POR 5 DIAS NA SECREÇÃO DE INSULINA POR ILHOTAS DE LANGERHANS ISOLADAS:

A Secreção Estática foi avaliada frente a diferentes concentrações de glicose 2,8, 8,3, 11,1, 16,7 e 22,2 mM.

Nos dois grupos, a relação entre concentração da glicose e secreção de insulina foi sigmoidal (FIGURA 23 A). A liberação de insulina nas concentrações de 2,8 mM e 8,3 mM de glicose foi similar nos dois grupos (C= $0,74 \pm 0,3$ ng/ilhota/h vs Hi5= $1,44 \pm 0,5$ ng/ilhota/h, $p=0,250$; $n = 10$) (C= $1,66 \pm 0,5$ ng/ilhota/h vs Hi5= $3,0 \pm 0,8$ ng/ilhota/h, $p=0,173$; $n = 10$), respectivamente. Nas concentrações de 11,1 e 16,7 mM de glicose, as ilhotas do grupo Hi5 mostraram significativamente maior liberação de insulina, comparadas ao grupo controle (C= $4,8 \pm 0,7$ ng/ilhota/h vs Hi5= $10,6 \pm 2,0$ ng/ilhota/h, $p=0,013$; $n = 10$) (C= $6,4 \pm 0,5$ ng/ilhota/h vs Hi5= $11,6 \pm 0,8$ ng/ilhota/h, $p=0,000$; $n = 10$), respectivamente. A liberação máxima de insulina, obtida com 22,2 mM de glicose foi $10,2 \pm 1,6$ ng/ilhota/h, para o grupo controle e $12,2$ ng/ilhota/h para o grupo Hi5 ($p=0,299$; $n = 10$).

Os valores para metade da resposta máxima de insulina (EC_{50}) foram $11,2 \pm 0,09$ mM para o grupo controle e $10,6 \pm 0,22$ mM de glicose para o grupo Hi5, mostrando um deslocamento para a esquerda da curva dose-resposta do grupo Hi5, comparada ao grupo controle ($p=0,02$; $n=10$ para cada grupo).

Quanto à Secreção Dinâmica (FIGURA 23B), observamos que em baixa concentração de glicose (2,8 mM), a secreção de insulina foi similar nos dois grupos. A média da secreção nos primeiros 20 minutos do período de perfusão foi $3,5 \pm 1,0$ pg/ilhota/ml⁻¹ para o grupo controle, e $3,95 \pm 1,0$ pg/ilhota/ml⁻¹ para o grupo Hi5. Nos dois grupos de ratos, a perfusão de glicose na concentração 22,2 mM induziu uma secreção insulínica bifásica típica com uma rápida liberação da primeira-fase, entretanto a secreção do hormônio foi precoce e mais acentuada no grupo Hi5, mantendo esta diferença até 50 minutos de perfusão com glicose 22,2 mM.

O cálculo da área sob a curva do grupo Hi5 foi significativamente maior em relação à área do grupo controle (C= 2592 ± 109 , $n = 4$ câmaras vs Hi5= 3340 ± 138 , $n = 5$ câmaras; $p=0,005$).

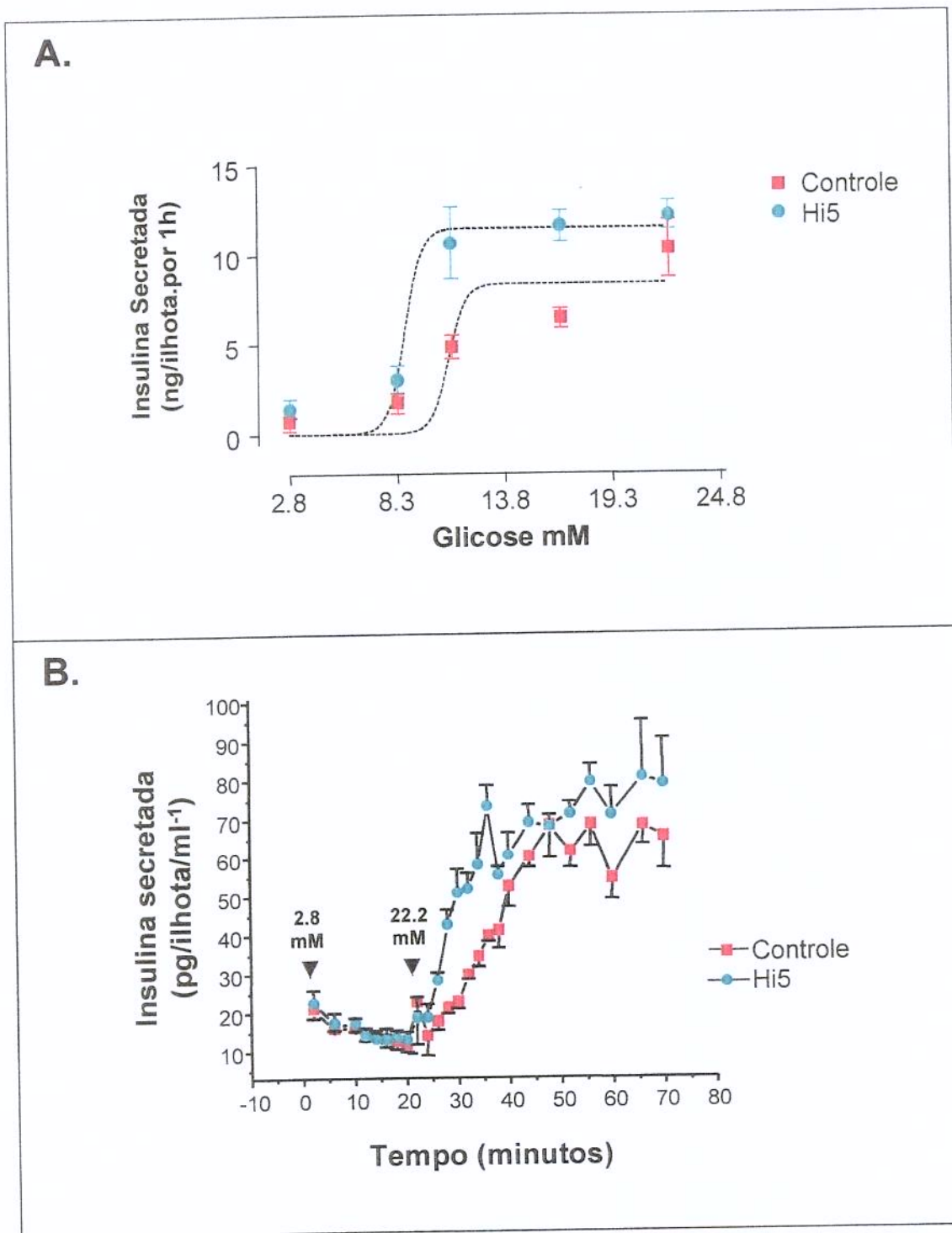
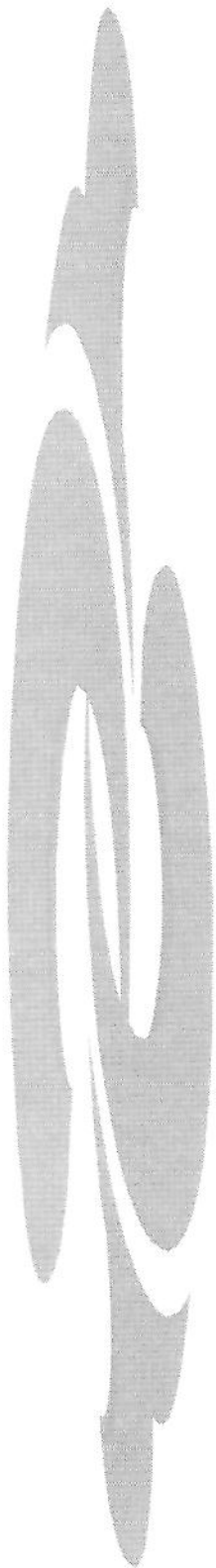


FIGURA 23. A. Secreção de insulina estimulada por glicose de ilhotas de Langerhans isoladas ($n=10$ em cada concentração) de ratos controle e hiperinsulinêmico (Hi5). B. Cinética da liberação de insulina estimulada por glicose de ilhotas de Langerhans isoladas ($n=20$) de ratos controle e Hi5. Os valores são expressos como média \pm EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$.



5. DISCUSSÃO

A insulina é o principal hormônio regulador do metabolismo de nutrientes. Em resposta ao aumento da concentração sérica de glicose sanguínea, as células β das ilhotas pancreáticas liberam a insulina na corrente circulatória, que é conduzida aos tecidos alvos.

Em praticamente todos os mamíferos, os efeitos glicorregulatórios da insulina são predominantemente exercidos nos três tecidos de maior importância na homeostase da glicose: hepático, muscular e adiposo. No fígado, a insulina estimula o armazenamento de glicogênio e inibe a gliconeogênese e a glicogenólise. Nos tecidos periféricos (músculo e gordura), a insulina estimula a captação, armazenamento e utilização da glicose (FELIG & BERGMAN, 1990). Somando-se a estes efeitos principais, a insulina também estimula o metabolismo de glicose em outros tecidos que têm pequeno ou nenhum papel na homeostase da glicose como um todo. A insulina age nestes tecidos como fator de crescimento, e de alguma maneira, modifica ou aumenta a função de outros reguladores do metabolismo destas células (KAHN et al., 1993; BIRNANBAUM et al., 1993).

A resistência à insulina, definida como uma resposta biológica subnormal a uma determinada concentração desse hormônio, é componente essencial da fisiopatologia ou etiopatogenia de importantes doenças com alta prevalência na população como obesidade, diabetes tipo 2 e hipertensão arterial.

Nos últimos 15 anos, a investigação etiológica do diabetes tipo 2 concentrou-se em definir se o defeito primário destes pacientes é alteração de secreção ou de sensibilidade à insulina. Neste sentido, procurou-se investigar secreção e ação insulínicas em parentes em primeiro grau de diabéticos tipo 2 ou em populações com alto risco de desenvolver a doença, antes da hiperglicemia se estabelecer, permitindo uma análise independente do efeito tóxico da glicose (DeFRONZO, 1997).

Em populações étnicas de alto-risco para o desenvolvimento do DM 2 (*Native Americans, Mexican-Americans e Pacific Islanders*), caracterizadas por hiperinsulinemia, resistência à insulina e obesidade, a secreção de insulina está aumentada, e tanto os níveis plasmáticos de insulina de jejum como os níveis de insulina estimulados por glicose, estão elevados durante os primeiros estágios da história natural da doença. A maioria das evidências disponíveis sugere que nestas populações, a resistência insulínica é a primeira

alteração e que a função aumentada da célula β representa uma adaptação compensatória para o defeito da ação insulínica (DeFRONZO, 1997). Além disso, estudos recentes usando *clamp* de insulina euglicêmico têm demonstrado que a progressão da tolerância à glicose normal para reduzida está associada com o desenvolvimento de resistência à insulina grave, enquanto as concentrações de insulina plasmática, tanto de jejum como em resposta a uma sobrecarga de glicose, estão marcadamente aumentadas, sugerindo que a resistência à insulina, inicia o desenvolvimento de diabetes tipo 2 nestas populações (DeFRONZO, 1988; DeFRONZO, 1992; LILLIOJA et al., 1988; LILLIOJA et al., 1991).

Entretanto, em índios Pima, em resposta à administração oral ou intravenosa de glicose, observam-se níveis de insulina plasmática significativamente maiores que na população de caucasianos, com uma relação linear e paralela entre secreção e sensibilidade à insulina (LILLIOJA, et al., 1991). Tais resultados sugerem que a hipersecreção de insulina primária, mas não compensatória, pelas células β pancreáticas pode representar um defeito basicamente genético responsável pelo diabetes tipo 2 nesta população (DeFRONZO, 1997). Adicionalmente, estudos demonstraram que a hiperinsulinemia de jejum e pós-prandial antecede o desenvolvimento da resistência à insulina em indivíduos com obesidade no princípio da adolescência (LeSTUNFF & BOUGNERES, 1994), e em vários modelos animais de obesidade e diabetes (JEANRENAUD, 1994).

DEL PRATO et al., em 1994, demonstraram que a hiperinsulinemia euglicêmica fisiológica, por 3-5 dias, pode induzir resistência à insulina em indivíduos jovens saudáveis, com tolerância à glicose normal e sem história familiar de diabetes tipo 2. Esta resistência induzida pela hiperinsulinemia foi explicada por um defeito na metabolização não oxidativa de glicose, principalmente na síntese de glicogênio no músculo. Resultados similares também foram descritos por CUSIN e colaboradores (1990).

A observação de que a manutenção de uma situação de hiperinsulinemia pode induzir resistência à insulina, sugere uma nova hipótese para explicar a patogênese do diabetes tipo 2 em certas populações. Nesta hipótese, a hipersecreção de insulina primária representa um distúrbio com base genética, e a resistência à insulina desenvolve-se secundariamente a dessensibilização à ação deste hormônio (JEANRENAUD, 1994).

Entretanto, independente da alteração inicial, é certo que a hiperinsulinemia, compensatória ou primária, está presente em parentes em primeiro grau de pacientes com diabetes tipo 2, e em populações com alto risco de diabetes, e pode induzir ou agravar a resistência a esse hormônio. Porém, o mecanismo molecular dessa dessensibilização ainda não foi investigado em tecidos animais, e pode envolver as etapas iniciais da ação molecular da insulina.

A insulina inicia suas ações metabólicas e promotoras de crescimento quando se liga à subunidade α extracelular de seu receptor tetramérico, estimulando assim a capacidade tirosina quinase na subunidade β . Isto leva a uma mudança conformacional do receptor que ativa tirosinas específicas nesta subunidade, aumentando a atividade tirosina quinase dirigida a substratos endógenos intracelulares. Estas proteínas citoplasmáticas são coletivamente denominadas IRSs (substratos do receptor de insulina), cujo primeiro componente descrito, e melhor estudado até o momento é chamado substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) (SUN et al., 1991; SUN et al., 1992). Em 1995, descreveu-se o IRS-2, que foi também purificado, e teve seu cDNA determinado, tendo aproximadamente 45% de homologia com o IRS-1. Parece que o IRS-2 atua sinergicamente com o IRS-1 na ativação da PI 3-quinase, tendo portanto um papel importante nos eventos que controlam o transporte de glicose (SUN et al., 1995).

Os IRSs (1 e 2) fosforilados associam-se à enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase), ativando-a (FOLLI et al., 1992; SAAD et al., 1993). A associação/ativação da PI 3-quinase ativa em seguida, a enzima serina/treonina-quinase AKT que parece exercer papel importante no controle do metabolismo de glicose (KOHN et al., 1996; KROOK et al., 1998). Outra serina-quinase ativada nas etapas iniciais da ação insulínica, distal aos IRSs, é a MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), que possui diversas subfamílias, entre elas as ERKs (1/2). Esta via regula principalmente efeitos mitogênicos da insulina (PEARSON et al., 2001 a e b).

A investigação destas etapas iniciais da ação insulínica em animais com resistência a esse hormônio pode contribuir para o esclarecimento dos mecanismos moleculares de resistência à insulina.

Inicialmente, os estudos experimentais sobre o processo de sinalização insulínica utilizavam receptores parcialmente purificados, e a atividade tirosina quinase era determinada *in vitro*, em direção a substratos exógenos tais como histonas (ROTHENBERG et al., 1990). Embora tais procedimentos fossem úteis na compreensão da fisiologia do receptor, eles estavam sujeitos a artifícios bioquímicos resultantes da homogeneização do tecido e da purificação do receptor, como proteólise e desfosforilação, em razão de fosfatases contaminantes presentes no meio (KATHURIA et al., 1986). A remoção do receptor da membrana plasmática também interfere nas interações com outros componentes celulares, podendo influenciar em sua atividade tirosina quinase (FEHLMAN et al., 1985). Finalmente, há diferenças importantes na atividade quinase do receptor, quando estudada *in vitro*, dependendo do substrato exógeno utilizado (ROTHENBERG et al., 1990).

A metodologia utilizada neste trabalho, estimulação *in vivo* (fígado, músculo, coração e tecido adiposo) e *in vitro* (ilhotas de Langerhans isoladas) com insulina, extração e homogeneização dos tecidos em tampões com inibidores de fosfatases e proteases ou em condições apropriadas para imunoprecipitação, e posterior *immunoblotting* com anticorpos específicos, permitiu uma avaliação das etapas iniciais da ação insulínica em importantes tecidos para a homeostase da glicose (SAAD et al., 1989).

Com este protocolo experimental foi realizado um estudo direto da fosforilação em tirosina do IR, IRS-1 e IRS-2, bem como a associação destes substratos com a PI 3-quinase, e a fosforilação em serina/treonina da AKT, e ERKs (1/2) em ratos submetidos ao *clamp* hiperinsulinêmico normoglicêmico por cinco dias.

A técnica do “*clamp* hiperinsulinêmico normoglicêmico” é considerada como “padrão ouro” para a quantificação da sensibilidade à insulina *in vivo*, pois este método determina diretamente os efeitos da insulina na utilização de glicose sob condições constantes (*steady state*). A técnica consiste em aumentar agudamente a concentração de insulina plasmática, mantê-la elevada através da infusão contínua do hormônio, com concentração constante da glicose plasmática em níveis basais, através de uma infusão variável de glicose (DeFRONZO et al., 1979).

Como descrito anteriormente, em humanos e em modelos animais, a hiperinsulinemia causada pelo *clamp* normoglicêmico por 3 a 5 dias é capaz de induzir resistência à insulina (DEL PRATO et al., 1994). Entretanto, o mecanismo celular desta resistência hormonal, e as alterações moleculares que ocorrem em diferentes tecidos durante uma hiperinsulinemia induzida, não foram ainda investigadas.

Observamos que a infusão crônica de insulina por cinco dias em ratos, induziu um aumento dos níveis séricos de insulina de jejum, de aproximadamente 2,5 vezes, e reduziu em cerca de 40% a utilização de glicose mediada pela insulina.

Apesar da quantidade semelhante de receptores de insulina no tecido hepático, em animais controles e hiperinsulinêmicos (Hi5), encontramos diminuição de 30% no grau de fosforilação do receptor de insulina em ratos que receberam infusão crônica do hormônio. Interessantemente, não observamos neste tecido, alteração no nível protéico, grau de fosforilação do IRS-1, e sua associação com a enzima PI 3-quinase nos animais Hi5, comparados aos controles.

SAAD et al., em 1995, demonstraram que a hiperinsulinemia crônica (100nM de insulina) em cultura de células de hepatoma de ratos (células Fao) por 24 horas, induziu a redução do nível protéico e de fosforilação em tirosina do receptor de insulina e do IRS-1, bem como a associação deste substrato com a PI 3-quinase. Entretanto, a análise metodológica pode contribuir para explicar essa discrepância de resultados. No estudo em cultura de células a concentração de insulina utilizada foi 10^{-7} M, que induz efeito máximo do hormônio, e é muito maior que a hiperinsulinemia observada nos animais do presente estudo. Assim, os níveis bem menores de insulina que atingiram o fígado, o tempo maior de infusão de insulina, e especificidades teciduais do órgão em comparação à cultura de células podem explicar as diferenças em relação à regulação do IRS-1 descrita em cultura de células e o presente estudo.

Ao contrário do IRS-1, a hiperinsulinemia crônica por cinco dias induziu redução de aproximadamente 30% na fosforilação do IRS-2 e na associação deste com a PI 3-quinase.

A associação do complexo p85/p110 da PI 3-quinase aos substratos do receptor de insulina, resulta na produção de fosfatidilinositol 3,4,5-fosfato (PIP₃), levando a ativação da PDK1 (quinase 1 dependente de fosfatidilinositol), a qual fosforila e ativa a AKT, (também denominada proteína quinase B -PKB ou Rac) uma proteína serina/treonina quinase com peso molecular 60 kDa, que é estimulada por um amplo número de receptores tirosina quinase (KHON et al., 1995; BURGERING & COFFER, 1995; FRANKE et al., 1995; DIDICHENKO et al., 1996, KLIPPEL et al., 1996). A AKT parece ter um papel importante na regulação da sobrevivência da célula, e tem sido implicada nas vias de sinalização que levam à utilização da glicose (YAO & COOPER, 1995; KOHN et al., 1996; TANTI et al., 1997). Esta serina/treonina quinase medeia a ação da insulina para a síntese de glicogênio no tecido hepático, através da GSK-3 (glicogênio sintetase 3 quinase) (CROSS et al., 1995).

A hiperinsulinemia crônica por cinco dias também induziu a redução da fosforilação da AKT em aproximadamente 30%, após estímulo agudo, em fígado de ratos, sugerindo possível contribuição na resistência à insulina observada nestes animais. Em concordância com o papel relevante da AKT na síntese de glicogênio, observamos redução no conteúdo hepático de glicogênio nos animais Hi5. As duas principais vias de distribuição da glicose intracelular são a não oxidativa (principalmente síntese de glicogênio) e oxidativa. Alteração no armazenamento de glicose é uma característica encontrada em estados de resistência insulínica, incluindo obesidade, diabetes, e a combinação de obesidade com diabetes (CUSIN et al., 1990).

Os resultados observados neste estudo, redução no conteúdo de glicogênio hepático, associado à redução da fosforilação do IRS-2, com conseqüente diminuição da associação IRS-2/PI 3-quinase e da fosforilação da serina-quinase AKT, sem alteração da fosforilação do IRS-1 no fígado de animais Hi5, sugerem que o IRS-2 no fígado é mais importante que o IRS-1 na regulação da AKT.

Estudos recentes utilizando camundongos *knockout* IRS-1^{-/-} e IRS-2^{-/-}, estabeleceram o papel desses substratos na sinalização insulínica que reduz a produção hepática de glicose (PREVIS et al., 2000). A infusão de insulina reduziu em aproximadamente 60% a produção hepática de glicose em camundongos controle e IRS-1^{-/-},

mas não se observou essa esperada diminuição em camundongos IRS-2^{-/-}. Esses dados sugerem que a deleção do IRS-2 altera profundamente o metabolismo hepático de carboidratos *in vivo*, incluindo alterações na produção de glicose e síntese de glicogênio. Por outro lado, animais sem IRS-1 apresentam resposta à insulina no metabolismo hepático de glicose relativamente preservada, confirmando a preponderância do IRS-2 como substrato essencial do receptor de insulina no fígado, em vias direcionadas ao controle glicêmico.

A associação destas informações com os nossos dados, nos permite sugerir que a modulação do IRS-2 induzida pela hiperinsulinemia crônica foi suficiente para a redução de ativação da AKT, contribuindo decisivamente para a instalação da resistência à insulina no fígado dos animais Hi5.

Observamos que não houve alteração significativa do grau de fosforilação das ERKs (1/2), uma subfamília da MAPK, com importante papel na via mitogênica, após estímulo com insulina, nos ratos hiperinsulinêmicos, em relação aos ratos controle.

Assim como no tecido hepático, no músculo esquelético, não houve alteração do nível protéico do receptor de insulina, mas houve redução de 25% no grau de fosforilação em tirosinas do receptor, após estímulo agudo com o hormônio, nos animais do grupo Hi5, comparados ao grupo controle. Entretanto, a avaliação dos substratos do receptor de insulina no músculo esquelético foi curiosa comparada a do fígado, pois comportaram-se de maneira contrária, com diminuição de aproximadamente 25% na fosforilação do IRS-1 e conseqüente redução de sua associação com a enzima PI 3-quinase em 40%, sem alteração do grau de fosforilação do IRS-2 e sua associação à PI 3-quinase, nos ratos Hi5. Não houve alteração nos níveis protéicos de ambos os substratos estudados, em animais que receberam infusão crônica de insulina.

De forma semelhante ao estudo das proteínas serina/treonina-quinase no fígado, observamos no músculo esquelético, redução de cerca de 20% na fosforilação da AKT nos animais tratados por cinco dias com insulina, em relação aos animais controles. A AKT tem sido relacionada com a regulação da translocação de GLUT4, transportador de glicose insulino-sensível, expresso em músculo (CZECH & CORVERA, 1999), além de exercer importante papel no armazenamento de glicogênio neste tecido (KOHN et al., 1996).

Em concordância com a redução do grau de fosforilação do IRS-1, e associação deste à PI 3-quinase, e diminuição da fosforilação da AKT no músculo esquelético, observamos também redução significativa no conteúdo de glicogênio muscular. Como descrito acima, parece haver uma associação entre resistência à insulina e redução no armazenamento de glicose. LILLIOJA et al. (1986), demonstraram que o menor armazenamento de glicose representa um importante fator na resistência à insulina *in vivo* em obesos com tolerância à glicose normal ou levemente alterada. Estes resultados são similares também aos encontrados por GOLAY et al. (1988), que demonstraram que o desenvolvimento da obesidade, com tolerância à glicose normal ou reduzida, era caracterizada por uma importante alteração no armazenamento de glicose, sob condições hiperinsulinêmicas euglicêmicas. Estes resultados demonstram que a redução da ação da insulina na síntese de glicogênio, pode representar também uma característica e uma alteração inicial no desenvolvimento da resistência insulínica tanto em indivíduos obesos quanto em pacientes com diabetes tipo 2 (DeFRONZO, 1997; CLINE et al., 1999).

Todas estas observações são consistentes com os resultados encontrados por PREVIS e colaboradores (2000), que demonstraram que a deleção do IRS-1 causa um marcante prejuízo na síntese de glicogênio estimulada pela insulina no músculo, e ao contrário, a deleção do IRS-2 exerce discreto efeito na síntese de glicogênio estimulada por insulina neste tecido. Resultados similares foram encontrados no trabalho de HIGAKI et al. (1999), que mostraram que o IRS-2 não é necessário para estimular o transporte de glicose no músculo esquelético, em resposta à insulina. YAMAUCHI e colaboradores (1996), também demonstraram que o IRS-1 tem um papel central nas ações biológicas da insulina no músculo, e que a resistência insulínica no camundongo deficiente em IRS-1 é principalmente devido à resistência no músculo. KIDO et al. (2000), recentemente demonstraram que o camundongo heterozigoto com deleção combinada ($IR^{+/-}/IRS-1^{+/-}$) desenvolve grave resistência à insulina no músculo, acompanhada de redução na ativação da PI 3-quinase estimulada pela insulina, e em contraste, as alterações no músculo de camundongos ($IR^{+/-}/IRS-2^{+/-}$), são bem discretas.

A associação destas observações sugere que *in vivo* o IRS-1 exerce papel mais importante que o IRS-2, na regulação do metabolismo de carboidratos no músculo (PREVIS et al., 2000).

Não houve alteração significativa no grau de fosforilação da ERKs (1/2), quando comparado os dois grupos, antes ou após estímulo agudo com insulina. Este dado sugere que a via mitogênica de transmissão do sinal de insulina é preservada em músculo de animais Hi5.

Apesar da hiperinsulinemia crônica não induzir diferença significativa no grau de fosforilação do receptor de insulina e em seu nível protéico, no músculo cardíaco, induziu resultados muito similares aos do músculo esquelético, em relação aos substratos do IR.

Observamos redução de cerca de 45% no grau de fosforilação do IRS-1, e aproximadamente 30% na sua associação à PI 3-quinase, com diminuição de 20% no nível protéico deste substrato em ratos hiperinsulinêmicos comparados aos controles. Não houve diferença no nível protéico, grau de fosforilação do IRS-2 e sua associação com a PI 3-quinase, entre os dois grupos estudados, no tecido cardíaco. Como observado em músculo esquelético, nossos resultados demonstraram redução de aproximadamente 20% na fosforilação da AKT em coração de ratos hiperinsulinêmicos, em relação aos controles. A fosforilação/ativação dessa serina quinase, está envolvida com o transporte de glicose, através da regulação do GLUT4 (KOHN et al., 1996) nesse tecido, e com a síntese de glicogênio, através da GSK3 (CROSS et al., 1995). A redução do grau de fosforilação da AKT no coração de ratos Hi5 deve estar envolvida com a resistência à insulina neste tecido.

Esse efeito da hiperinsulinemia, regulando de maneira similar as vias de transmissão do sinal de insulina em musculatura esquelética e cardíaca deve resultar em resistência à insulina nessas duas musculaturas. Em concordância, estudos em animais obesos, com resistência à insulina e hiperinsulinemia, demonstram redução de captação de glicose, paralelamente, em musculatura esquelética e cardíaca, acompanhada de redução da interação IRS-1/PI 3-quinase nessas musculaturas (KOLTER et al., 1997; FOLLI et al., 1993).

Os mecanismos responsáveis pela redução do grau de fosforilação em tirosina dos substratos do receptor de insulina nessa situação de hiperinsulinemia não estão totalmente estabelecidos. Um mecanismo regulatório importante das etapas iniciais da ação insulínica ocorre através da fosforilação do receptor de insulina e de seus substratos, em aminoácidos serina e (ou) treonina (WHITE, 1997). Esta fosforilação reduz de maneira importante a capacidade de fosforilação em aminoácidos tirosina após estímulo com insulina no receptor (TAKAYAMA *et al.*, 1988), e no IRS-1 (TANTI *et al.*, 1994), dificultando a transmissão do sinal insulínico. Estudo recente, utilizando cultura de células Fao, mostra que a hiperinsulinemia crônica pode induzir o aumento de fosforilação em serina/treonina do receptor de insulina, e seus principais substratos (IRS-1 e 2) (PAZ *et al.*, 1997). Diversas enzimas com capacidade serina quinase como a própria PI 3-quinase, a MAP quinase, a proteína quinase-C (PKC), e a proteína quinase-A (PKA) podem fosforilar o receptor, o IRS-1, e (ou) o IRS-2 em serina ou treonina, induzindo tais alterações (WHITE & KAHN, 1994).

A PKC é um candidato potencial com relevância fisiológica, exercendo papel importante na transmissão do sinal de vários hormônios, fatores de crescimento, e neurotransmissores (CHIN *et al.*, 1993; De VENTE *et al.*, 1996; BOSSENMAIER *et al.*, 1997). Sua ativação ocorre em resposta ao aumento de diacilglicerol (DAG), produtos de fosfatidilinositol, e exposição a agentes indutores de tumores (HUG & SARRE, 1993).

Em adição, AVIGNON *et al.* (1996), demonstraram que a hiperinsulinemia (observada em algumas linhagens de rato como diabético tipo 2 Goto-Kakizaki e Zucker) contribui para o aumento dos níveis de diacilglicerol e aumento da ativação da PKC. ISHIZUKA e colaboradores. (1990), também demonstraram que a insulina induz um rápido aumento no conteúdo de diacilglicerol em músculos incubados, levando a atividade elevada da PKC. Parece então, que a hiperinsulinemia pode induzir o aumento da formação de diacilglicerol (DAG), e conseqüentemente maior atividade da proteína-quinase C. Assim, é possível que o aumento do DAG e da PKC possam induzir a fosforilação do IRS-1 e (ou) IRS-2 em serina e treonina, tornando-os menos receptivos à fosforilação em tirosina, nos diferentes tecidos, explicando sua menor fosforilação e dificultando a interação dos substratos intracelulares com a PI 3-quinase, no modelo de hiperinsulinemia crônica por cinco dias.

Nestes 3 tecidos estudados a menor sensibilidade à insulina foi acompanhada, inicialmente, de reduções dissociadas do grau de fosforilação dos substratos do receptor. Em fígado, houve redução de fosforilação do IRS-2 e em músculo esquelético e cardíaco, do IRS-1. Essa dissociação de fosforilação entre substratos do IR foi descrita em células com mutações em tirosinas na região de autofosforilação do receptor (OUWENS et al., 1994) e em cultura de células tratadas com dexametasona e *wortmannin* (GIORGINO & SMITH, 1995; LI & GOLDSTEIN, 1996).

O mecanismo dessa transmissão diferenciada do sinal de insulina, com especificidade tecidual, não é completamente conhecido. Tanto o IRS-1 quanto o IRS-2 ligam-se à região justamembrana do receptor, que contém a tirosina 972, sugerindo que possa haver uma competição entre esses substratos (WARD et al., 1996). Nesse sentido, o estado prévio de fosforilação do substrato em serina pode torná-lo menos competitivo para se ligar ao receptor. Outro fator importante que deve ser considerado na avaliação dessa competição é a quantidade dessas proteínas expressas em diferentes tecidos. No nosso estudo, este último fator não teve nenhum papel na regulação diferencial, porque os níveis de IR, IRS-1 e IRS-2 não variaram em fígado e músculo de animais hiperinsulinêmicos.

Assim, é possível que o grau de fosforilação em serina desses substratos possa contribuir para explicar a menor fosforilação do IRS-2 em fígado, e do IRS-1 em músculo esquelético e cardíaco. Além da fosforilação em serina/treonina, o receptor de insulina e seus substratos são também regulados pelas fosfotirosinas fosfatases, que por desfosforilarem tais proteínas, inibem a transmissão do sinal de insulina. Entretanto, o efeito da infusão crônica de insulina na modulação dessas fosfatases não foi ainda investigado, mas deve ser destacado que em modelos animais de obesidade, que apresentam hiperinsulinemia, observa-se aumento dos níveis de PTP1B (proteína tirosina fosfatase), que é uma fosfatase importante na regulação da ação insulínica (AHMAD & GOLDSTEIN, 1995; TAO et al., 2001).

O tecido adiposo mostrou uma regulação distinta e bastante interessante em relação aos demais tecidos estudados. A hiperinsulinemia crônica por cinco dias não alterou o nível protéico e grau de fosforilação do receptor de insulina, entretanto induziu aumento no nível protéico e grau de fosforilação dos IRSs -1 e -2, e na associação destes substratos

com a PI 3-quinase, após o estímulo agudo com insulina. No estado basal houve aumento no grau de fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS-1 e 2), na associação destes com a PI 3-quinase, e na fosforilação da AKT, dos ratos Hi5 comparados aos controles.

Esse aumento de sensibilidade à insulina, demonstrado nas vias de transmissão do sinal em tecido adiposo, está em concordância com estudos prévios, que mostraram maior efetividade da insulina em tecido adiposo em situações similares (CUSIN et al., 1990 a e b).

CUSIN e colaboradores (1990a), observaram que a hiperinsulinemia induzida por infusão crônica de insulina, em poucos dias, induz aumento da utilização de glicose, lipogênese com acúmulo de gordura no tecido adiposo e fígado, e resistência à insulina no músculo. Em estudo posterior CUSIN et al., (1990b) demonstraram que o aumento de sensibilidade à insulina em animais que receberam infusão crônica do hormônio era acompanhado por uma elevação de RNAm e conteúdo protéico de GLUT4 no tecido adiposo, mas não em músculo esquelético.

Esse efeito da hiperinsulinemia dissociando a ação insulínica em tecido adiposo e músculo é também observado em modelos animais de obesidade e hiperinsulinemia. Assim, GUERRE-MILLO & LAVAU (1987), demonstraram que ratos obesos Zucker (*fa/fa*) com apenas 16 dias de vida apresentaram transporte de glicose aumentado no tecido adiposo, quando a insulinemia basal era ainda normal. ROHNER-JEANRENAUD & JEANRENAUD (1985) observaram que apesar da insulinemia basal normal em ratos *fa/fa* com 17 dias de vida, a secreção de insulina induzida por substratos estava aumentada. Com 30 dias de vida, os ratos obesos (*fa/fa*) apresentaram: hiperinsulinemia basal, aumento da utilização da glicose e do número de transportadores dessa hexose no tecido adiposo, e resistência à insulina no músculo (GUERRE-MILLO et al., 1985; KRIEF et al., 1988).

Nossos resultados demonstram que a infusão crônica de insulina modula positivamente as vias de transmissão do sinal desse hormônio em tecido adiposo, diferente de fígado, músculo e coração, induzindo uma situação que favorece o armazenamento de energia, podendo inclusive ter implicações fisiopatológicas para instalação de obesidade e

resistência à insulina em outras situações de hiperinsulinemia. O mecanismo molecular dessa regulação é desconhecido, mas pode envolver desativação de fosfatases ou serina quinases no tecido adiposo, ou ativação dessas enzimas em fígado, músculo e coração.

Recentemente, vários estudos têm mostrado que a cascata de sinalização da insulina pode ter um importante papel no desenvolvimento e regulação das ilhotas de células β (VELLOSO et al., 1995), as quais apresentam-se com função e/ou crescimento alterado na ausência do receptor de insulina, IRS-1 ou IRS-2 (WITHERS et al., 1998; KULKARNI et al., 1999a; KULKARNI et al., 1999b). Adicionalmente, a secreção de insulina estimulada pela insulina em células β é mediada pelo receptor de insulina e IRS-1 funcionais (ASPINWALL et al., 2000).

Para estudar as etapas iniciais da ação insulínica em ilhotas de Langerhans isoladas, utilizamos um protocolo experimental diferente, onde as ilhotas foram obtidas pelo método da digestão por collagenase de animais controle e Hi5, e em seguida foram incubadas com insulina por 90 segundos, para serem então submetidas ao *immunoblotting* com anticorpos específicos. Em outros experimentos o isolamento das ilhotas foi similar e investigou-se a secreção de insulina induzida por glicose.

Observamos que a hiperinsulinemia crônica não alterou o nível protéico e grau de fosforilação do receptor de insulina em ilhotas de ratos Hi5, mas aumentou significativamente os níveis protéicos de IRS-1 e IRS-2, bem como o grau de fosforilação destes substratos, em relação às ilhotas de ratos controles. A associação IRSs/PI 3-quinase também mostrou-se aumentada em ilhotas de ratos Hi5.

E, finalmente, de maneira semelhante aos demais tecidos estudados, a hiperinsulinemia crônica não alterou a fosforilação das proteínas ERKs (1/2), após estímulo agudo com o hormônio, nas ilhotas de Langerhans isoladas, comparadas ao controles.

Esses resultados são interessantes, e mostram que a hiperinsulinemia crônica regula de maneira distinta as etapas iniciais da ação insulínica nos diferentes tecidos.

A ativação das vias de transmissão do sinal de insulina na célula β induz um aumento na síntese de insulina, com controle transcricional e traducional, aumentando o conteúdo celular liberável desse hormônio em culturas primárias ou clonais de células β (XU, G. et al., 1998; XU & ROTHENBERG, 1998). Em células clonais sem expressão do IRS-1, o conteúdo de insulina é reduzido, bem como a secreção desse hormônio induzida por glicose (KULKARNI et al., 1998).

ASPINWALL et al. (1999), investigaram o efeito da insulina exógena no controle de secreção desse hormônio em células β isoladas, através da avaliação da amperometria. Os resultados demonstraram que a insulina induz secreção deste hormônio, amplificada pela estimulação com glicose, em paralelo a um aumento do Ca^{+2} intracelular. Recentemente, demonstrou-se que a hiperexpressão do IRS-1 e do IR, em célula β clonal, aumenta os níveis de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e a secreção de insulina (XU et al., 1999), em concordância com o estudo descrito acima.

Os estudos em camundongos que não expressam o IR, IRS-1 e IRS-2 também contribuíram para um melhor entendimento do papel das vias de transmissão do sinal de insulina na sua secreção.

Em camundongos que não expressam, especificamente, o receptor de insulina nas células β , observa-se menor secreção de insulina induzida por glicose e intolerância a carboidratos (KULKARNI et al., 1999a). Camundongos com ausência de IRS-2 apresentam redução de aproximadamente 50% na massa de célula β , e instalação precoce de um quadro de diabetes mellitus (WITHERS et al., 1998). A ausência de expressão do IRS-1 induz resistência à insulina e hiperinsulinemia em camundongos. Entretanto a investigação funcional das células β destes animais mostra alterações importantes na secreção de insulina induzida por glicose ou arginina associada à redução na expressão de insulina (KULKARNI et al., 1999b).

Estudo recente amplia essas informações, demonstrando que o tratamento com insulina exógena aumenta o $[Ca^{2+}]_i$, devido a liberação de estoques intracelulares, especialmente do retículo endoplasmático, em processo mediado por IRS-1 e PI 3-quinase (ASPINWALL et al., 2000).

Assim, as proteínas envolvidas na via de transmissão do sinal de insulina parecem importantes para a integridade funcional da célula β , e o aumento dos níveis protéicos e maior grau de fosforilação do IRS-1 e IRS-2 bem como maior associação destes com a PI 3-quinase em ilhotas de animais Hi5, podem contribuir para explicar alterações funcionais na secreção de insulina induzida por glicose, observado por diferentes metodologias.

Inicialmente, no estudo da função secretória das ilhotas de Langerhans isoladas, observamos que a hiperinsulinemia crônica induziu aumento na secreção de insulina em resposta a concentrações de glicose de 11,1 e 16,7 mM. A análise da EC_{50} mostra um desvio para esquerda da curva dose-resposta das ilhotas de animais que receberam infusão crônica de insulina, indicando maior sensibilidade dessas ilhotas à glicose.

Quanto à secreção dinâmica, observamos que em concentrações sub-limíares de glicose (2,8 mM), a secreção de insulina foi similar nos dois grupos. Em concentrações supra-limíares de glicose (22,2 mM) ocorreu uma secreção insulínica bifásica típica, com uma rápida liberação de insulina na primeira-fase após cerca de 15 minutos, nos dois grupos. Entretanto, o padrão de secreção de insulina das ilhotas Hi5 foi precoce e mais acentuado, quando comparado ao grupo controle, mantendo esta diferença até 50 minutos de perfusão com solução 22,2 mM de glicose, confirmando a maior sensibilidade dessas ilhotas à glicose. A secreção insulínica, em um padrão bifásico, com uma “explosão” na liberação de insulina dentro dos primeiros minutos, seguida por um aumento gradual de secreção, que persiste ao longo do estímulo hiperglicêmico, é bem estabelecida tanto em humanos (DeFRONZO et al., 1979) quanto em animais (CURRY et al., 1968).

Nossos resultados, demonstrando que a hiperinsulinemia crônica aumenta a expressão dos substratos do receptor de insulina, paralelo a uma maior sensibilidade da ilhota na secreção de insulina induzida por glicose, sugerem um efeito de retro-alimentação

positiva da insulina na ilhota. Essa regulação pode ter implicações em fases iniciais de instalação de obesidade. Assim, em diferentes modelos animais de obesidade, a hiperinsulinemia é marcante quando os animais são muito jovens, e se mantém mesmo depois de instalada a resistência à insulina (ROHNER-JEANRENAUD & JEANRENAUD, 1985; GUERRE-MILLO et al., 1985; KRIEF et al., 1988). Com a retro-alimentação positiva sugerida por nosso estudo, é possível apresentar a hipótese de que a hiperinsulinemia gera maior eficiência da ilhota para secretar insulina, induzir obesidade e até para manter resistência à insulina sem alteração de tolerância à glicose.

Em resumo, os resultados do nosso estudo demonstram que a infusão crônica de insulina por 5 dias induziu resistência a esse hormônio, com diminuição de transmissão do sinal de insulina em fígado, músculo e coração, e incremento dessas vias em tecido adiposo e ilhotas. No fígado, a menor fosforilação/ativação da AKT foi conseqüente a menor fosforilação do IRS-2, e em músculo esquelético e cardíaco a menor fosforilação do IRS-1. Em tecido adiposo e ilhotas, os dois substratos do receptor de insulina, IRS-1 e IRS-2 aumentaram seus níveis e grau de fosforilação.

A hiperinsulinemia crônica por 5 dias modulou especificamente os efeitos metabólicos do hormônio, através da AKT, sendo que a via mitogênica, através das ERKs (1/2) não sofreu regulação em nenhum tecido estudado dos animais Hi5.

A regulação tecido-específica das vias de transmissão do sinal de insulina em ratos que receberam infusão desse hormônio por 5 dias, contribui para explicar os mecanismos moleculares de resistência à insulina nestes animais, e sugerem também modelos de regulação que podem estar presentes na instalação de obesidade, hiperinsulinemia e resistência à insulina.

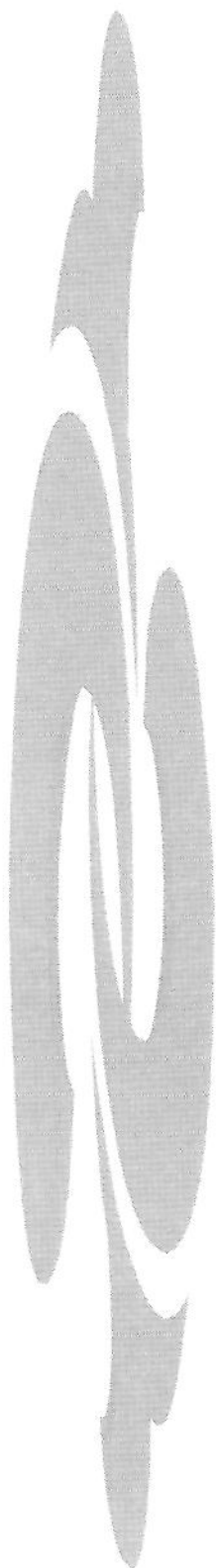


6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho demonstraram que:

- * O *clamp* hiperinsulinêmico normoglicêmico por 5 dias induziu um aumento dos níveis séricos de insulina de jejum e reduziu a utilização de glicose mediada pela insulina.
- * No tecido hepático, a hiperinsulinemia crônica induziu a diminuição do grau de fosforilação do IR e IRS-2, a associação IRS-2/PI 3-quinase e a fosforilação da AKT, após estímulo agudo com insulina.
- * No tecido muscular esquelético, após estímulo agudo com insulina, ocorreu redução do grau de fosforilação do IR e do IRS-1, da associação IRS-1/PI 3-quinase e da fosforilação da AKT em ratos que receberam infusão de insulina por 5 dias.
- * A regulação das etapas iniciais da ação insulínica no músculo cardíaco foi similar ao músculo esquelético, com diminuição do nível protéico e grau de fosforilação do IRS-1, da associação IRS-1/PI 3-quinase e da fosforilação da AKT em ratos hiperinsulinêmicos, após estímulo agudo com insulina.
- * No tecido adiposo, a hiperinsulinemia crônica induziu um aumento do nível protéico, grau de fosforilação e associação com a PI 3-quinase dos substratos 1 e 2 do receptor de insulina, após estímulo agudo com o hormônio, e um aumento da fosforilação no estado basal da AKT.
- * De maneira similar ao tecido adiposo, houve aumento do nível protéico, grau de fosforilação e associação com a PI 3-quinase dos IRS-1 e 2, após estímulo agudo com o hormônio, nas ilhotas de Langerhans isoladas de ratos hiperinsulinêmicos.

- * A hiperinsulinemia crônica modulou especificamente os efeitos metabólicos do hormônio, através da AKT, sendo que a via mitogênica, através das ERKs (1/2) não sofreu regulação em nenhum tecido estudado dos animais Hi5.
- * A regulação tecido-específica das vias de transmissão do sinal de insulina em ratos submetidos ao *clamp* hiperinsulinêmico normoglicêmico por 5 dias, contribui para explicar os mecanismos moleculares de resistência à insulina nestes animais, e sugerem também modelos de regulação que podem estar presentes na instalação de obesidade, hiperinsulinemia e resistência à insulina.



7. SUMMARY

Insulin resistance, defined as subnormal response to a given concentration of insulin, is an important component in the pathophysiology of diseases with high prevalence in the population as obesity, diabetes mellitus type 2 and hypertension. The chronic euglycemic hyperinsulinemia for as 3-5 days can induce insulin resistance.

Insulin initiates its growth and metabolic promoting effects by binding to its receptor at the plasma membrane, which has tyrosine-kinase activity, and is able to autophosphorylates and phosphorylates cytoplasmatic proteins called insulin receptor substrates (IRSs). The main substrates of insulin receptor are IRS-1 and IRS-2, which when phosphorylated in tyrosine bind and activate several proteins, including phosphatidylinositol (PI) 3-kinase. These initial steps lead to the activation of two serine/threonine kinases – AKT and the ERK family (1/2) of MAPK.

In this study we investigated the levels and phosphorylation of the insulin receptor, IRS-1 and IRS-2, their association with PI 3-kinase, and the phosphorylation of AKT and ERKs (1/2) in liver, muscle, heart, adipose tissue and in isolated pancreatic islets of rats with chronic euglycemic hyperinsulinemia for 5 days (Hi5).

The 5 days of euglycemic hyperinsulinemia increased the fasting plasma insulin concentration and decreased the whole-body insulin-mediated glucose disposal. However, the insulin secretion in response to glucose in isolated islets was increased in hyperinsulinemic rats compared to controls.

In liver of Hi5 rats there was a decrease of insulin-stimulated receptor autophosphorylation, without change in the insulin receptor protein levels. The chronic hyperinsulinemia did not change the protein level, the phosphorylation status of IRS-1 and its association with PI 3-kinase, although there was a decrease in the phosphorylation of IRS-2, its association with PI 3-kinase and the phosphorylation of AKT in this tissue. The IRS-2 protein level and the phosphorylation of ERKs (1/2) were similar in Hi5 and control rats.

Chronic insulin infusion for 5 days did not significantly change the level of IR, IRS-1 and IRS-2 protein in muscle. After stimulation with insulin, phosphorylation of the insulin receptor, IRS-1, the association IRS-1/PI 3-kinase and the phosphorylation AKT were reduced in Hi5 rats compared to the controls. However, there was no change in the insulin-stimulated IRS-2 phosphorylation, IRS-2/PI 3-kinase association and phosphorylation of ERKs (1/2).

The protein level and the insulin-stimulated autophosphorylation of the insulin receptor were similar in the heart in both the Hi5 and control rats. Following stimulation with insulin, the chronic hyperinsulinemia induced a decrease in the IRS-1 protein level, and as in muscle, also decreased the IRS-1 phosphorylation, the IRS-1/PI 3-kinase association and phosphorylation of AKT, without changing the level, the phosphorylation of IRS-2, its association with PI 3-kinase, and the phosphorylation of ERKs (1/2), compared to the controls.

In the adipose tissue, the chronic hyperinsulinemia did not change the protein level and the phosphorylation status of insulin receptor, before and after stimulation with insulin. In contrast, there was an increase in the IRSs protein levels, phosphorylation and association with PI 3-kinase before and after stimulation with insulin, in the Hi5 rats compared to the controls. Basal AKT phosphorylation was higher in Hi5 rats compared to control group. There was no change in ERKs (1/2) phosphorylation in the adipose tissue of Hi5 rats compared to the controls.

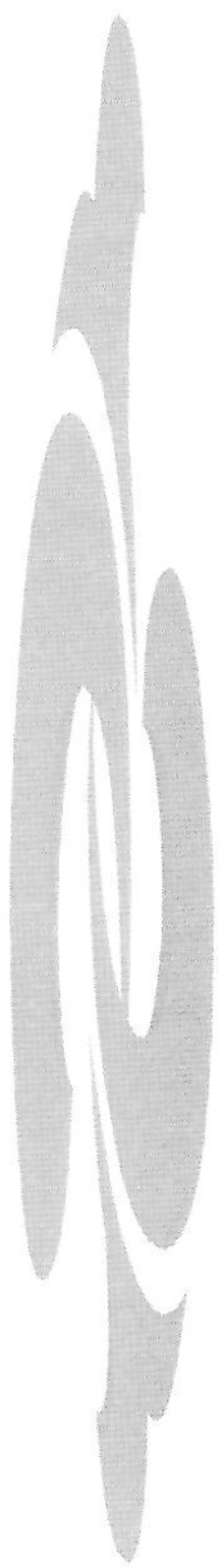
Similarly, no significant change occurred in the protein level and phosphorylation of the insulin receptor in isolated islets from Hi5 rats when compared to the controls. However, the chronic hyperinsulinemia increased the protein levels, phosphorylation and associations with PI 3-kinase of the IRS-1 and 2, after stimulation with insulin, compared to the controls. The insulin-stimulated phosphorylation of ERK was similar in isolated islets in both the Hi5 and control rats.

In summary, our results demonstrated that 5 days of euglycemic hyperinsulinemia induced insulin resistance, with a decrease in insulin signal transductional in liver, muscle and heart, and an increase in these pathways in adipose tissue and isolated

islets. In liver, the reduced phosphorylation/activation of AKT was consequence of reduced IRS-2 phosphorylation, and in muscle and heart due to reduced IRS-1 phosphorylation. In adipose tissue and islets, the protein levels and phosphorylation status of the two insulin receptor substrates, IRS-1 and IRS-2, were increased.

The chronic hyperinsulinemia modulated specifically the metabolic pathway through AKT. However, the mitogenic pathway, through ERKs (1/2) did not undergo regulation in neither of tissues studied from animals Hi5.

The tissue-specific regulation of insulin signal transductional pathways in rats with chronic insulin infusion during 5 days, contribute to explain the molecular mechanisms of insulin resistance in these animals, and also suggest models of regulation which can be present in the early stages of obesity, hyperinsulinemia and insulin resistance.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, F. & GOLDSTEIN, B.J. – Alterations in specific protein-tyrosine phosphatases accompany insulin resistance of streptozotocin diabetes. **Am.J.Physiol.**, 268:E932-E940, 1995.
- ARAKI, E.; SUN, X.J.; HAAG, B.L.; CHUANG, L.M.; ZHANG, Y.; YANG-FENG, T.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. - Human skeletal muscle insulin receptor substrate-1: characterization of the cDNA, gene and chromosomal localization. **Diabetes**, 42:1041-1054, 1993.
- ASPINWALL, C.A.; LAKEY, J.R.; KENNEDY, R.T. – Insulin-stimulated insulin secretion in single pancreatic beta cells. **J.Biol.Chem.**, 274:6360-6365, 1999.
- ASPINWALL, C.A.; QIAN, W-J.; ROPER, M.G.; KULKARNI, R.N.; KAHN, C.R.; KENNEDY, R.T. – Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca^{2+} stores in insulin-stimulated insulin secretion in β cells. **J.Biol.Chem.**, 275:22331-22338, 2000.
- AVIGNON, A.; YAMADA, K.; ZHOU, X.; SPENCER, B.; CARDONA, O.; SABASIDDIQUE, S.; GALLOWAY, L.; STANDAERT, M.L.; FARESE, R.V. – Chronic activation of protein kinase C in soleus muscles and others tissues of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki (GK), obese/aged, and obese/Zucker rats. A mechanism for inhibiting glycogen synthesis. **Diabetes**, 45(10):1396-1404, 1996.
- BIRNANBAUM, M., - The insulin-sensitive glucose transporter. **Int.Rev.Cytol.**, 137: 239-297, 1993.
- BOSCHERO, A.C.; SZPAK-GLASMAN, M.; CARNEIRO, E.M.; BORDIN, S.; PAUL, I.; ROJAS, E.;ATWATER, I. – Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. **Am.J.Physiol.**, 268:E336-E342, 1995.
- BOSSENMAIER, B.; MOSTHAF, L.; MISCHAK, H.; ULLRICH, A.; HÄRING, H.U. - Protein kinase C isoforms $\beta 1$ and $\beta 2$ inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor. **Diabetologia**, 40:863-866, 1997.

- BRADFORD, M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Anal.Biochem.**, 72:248-154, 1976.
- BURGERING, B.M.T. & COFFER, P.J. - Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. **Nature**, 376:599-602, 1995.
- CARPENTER, C.L. & CANTLEY, I.C. - Phosphoinositide kinases. **Biochem.**, 29:11147-11156, 1990.
- CHEATHAM, B. & KAHN, C.R. - Insulin action and the insulin signalling network. **Endocr. Rev.**, 16:117-138, 1995.
- CHEATHAM, B.; VLAHOS, C.J.; CHEATHAM, L.; WANG, L.; BLENIS, J. AND KAHN, C.R. - Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. **Mol.Cel.Biol.**, 14:4902-4911, 1994.
- CHIN, J.E.; DICKENS, M.; TAVARES, J.M.; ROTH, R.A. - Overexpression of protein kinase C isoenzymes α , β I, γ , and θ in cells overexpressing the insulin receptor. **J.Biol.Chem.**, 268:6338-6347, 1993.
- CHOU, C.K.; DULL, T.J.; RUSSEL, D.S.; GHERZI, R.; LEWOHL, D.; ULLRICH, A. & ROSEN, O.M. - Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack proein tyrosine kinse activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. **J.Biol.Chem.**, 262:1842-1847, 1987.
- CLINE, G.W.; PETERSEN, K.F.; KRSSAK, M.; SHEN, J.; HUNDAL, R.S.; TRAJANOSKI, Z.; INZUCCHI, S.; DRESNER, A.; ROTHMAN, D.L.; SHULMAN, G.I. - Imapaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. **N.Engl.J.Med.**, 341:240-246, 1999.

- CROSS, D.A.; ALESSI, D.R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMINGS, B.A. – Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, 378: 785-789, 1995.
- CUATRECASAS, P. - Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 69:1277-1281, 1972.
- CURRY, D.L.; BENNETT, L.L.; GRODSKY, G.M. – dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. **Endocrinology**, 83:572-584, 1968.
- CUSIN, I.; TERRETTAZ, J.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; JEANRENAUD, B. - Metabolic consequences of hyperinsulinaemia imposed on normal rats on glucose handling by white adipose tissue, muscles and liver. **Biochem.J.**, 267:99-103, 1990a.
- CUSIN, I.; TERRETTAZ, J.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; ZARJEVSKI, N.; ASIMACOPOULOS-JEANNET, F.; JEANRENAUD, B. - Hyperinsulinemia increases the amount of GLUT4 mRNA in white adipose tissue and decreases that of muscles: a clue for increased fat depot and insulin resistance. **Endocrinology**, 127:3246-3248, 1990b.
- CZECH, M.P. & CORVERA, S. – Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **J.Biol.Chem.**, 274:1865-1868, 1999.
- De VENTE, J.E.; CAREY, J.O.; BRYANT, W.O.; PETTIT, G.J.; WAYS, D.K. - Transcriptional regulation of insulin receptor substrate 1 by protein kinase C. **J.Biol.Chem.**, 271:32276-32280, 1996.
- DeFRONZO, R.A. – Lilly Lecture: the triumvirate: β -cell, muscle, liver: a collusion responsible for NIDDM. **Diabetes**, 37:667-687, 1988.
- DeFRONZO, R.A. - Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. **Diabetologia**, 35:389-397, 1992.
- DeFRONZO, R.A. - Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. **Diabetes Reviews**, 5:(3)177-269, 1997.

- DeFRONZO, R.A.; TOBIN, J.D.; ANDRES, R. – Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. **Am.J.Physiol.**, 6:E214-E223, 1979.
- DEL PRATO, S.; LEONETTI, E.; SIMONSON, D.C.; SHEEHAN, P.; MATSUDA, M., DeFRONZO, R.A. - Effect of sustained physiologic hyperinsulinemia and hyperglycaemia on insulin secretion and insulin sensitivity in man. **Diabetologia**, 37:1025-1035, 1994.
- DIDICHENKO, S.A.; TILTON, B.; HEMMINGS, B.A.; BALLMER-HOFER, K.; THELEN, M. - Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47phox by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase. **Curr.Biol.**, 6:1271-1278, 1996.
- EBINA, Y.; ARAKI, E.; TAIRA, M.; SHIMADA, F.; MORI, M.; CRAIK, C.S.; SIDDLE, K.; PIERCE, S.B.; ROTH, R.A.; RUTTER, W.J. - Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, 84:704-708, 1987.
- EBINA, Y.; ELLIS, L.; JARNAGIN, K. - The human insulin receptor cDNA: The structure basis for hormone-activated transmembrane signalling. **Cell**, 40:7447-7458, 1985.
- ELLIS, L.; CLAUSER, E.; MORGAN, D.O.; EDERY, M.; ROTH, R.A.; RUTTER, W.J. - Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. **Cell**, 45:721-732, 1986.
- FEHLMAN, M.; PERYRON J.; SAMSON, M.; VAN OBBERGHEN, E.; BRANDENBURG, D. & BROSSETE, N.- Molecular association between major histocompatibility complex class I antigens and insulin receptors in mouse liver membranes. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**. 82:8634-8637, 1985.
- FELIG, P. & BERGMAN, M. - Integrated physiology of carbohydrate metabolism. In: Rifkin, H. & Porte, D., eds. - **Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus**. 4.ed. Elsevier, New York, 1990.

- FOLLI, F.; SAAD, M.J.A; BACKER, J.M.; KAHN, C.R. - Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with IRS-1 in liver and muscle of the intact rat. **J.Biol.Chem.**, 267:22171-22177, 1992.
- FOLLI, F.; SAAD, M.J.A; BACKER, J.M.; KAHN, C.R. - Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animals models of insulin resistance and insulin-deficient Diabetes Mellitus. **J.Clin.Invest.**, 92:1787-1794, 1993.
- FRANKE, T.F.; YANG, S.I.; CHAN, T.O.; DATTA, K.; KAZLAUSKAS, A.; MORRISON, D.K.; KAPLAN, D.R.; TSICHLIS, P.N. - The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF activated phosphatidylinositol 3-kinase. **Cell**, 81:727-736, 1995.
- FREYCHET, P.; ROTH, J. & NEVILLE JR, D.M. - Insulin receptor in the liver: Specific binding of [125I] insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, 68:1833-1837, 1971.
- GIORGINO, F. & SMITH, R.J. - Dexamethasone enhances insulin-like growth factor-I effects on muscle cell proliferation. Role of specific intracellular signaling. **J.Clin.Invest.**, 96:1473-1483, 1995.
- GOLAY, A.; FELBER, J.P.; JEQUIER, E.; DeFRONZO, R.A.; FERRANNINI, E. - Metabolic basis of obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Metab.Rev.**, 4:727-747, 1988.
- GUERRE-MILLO, M. & LAVAU, M. - Insulin binding and action on glucose metabolism in adipocytes from 16-day-old normoinsulinemic obese Zucker rats. **Diabetes Metab.**, 13:561-562, 1987.
- GUERRE-MILLO, M.; LAVAU, M.; HORNE, J.S.; WARDZALA, J. - Proposed mechanism for increased insulin-mediated glucose transport in adipose cells from young, obese Zucker rats. **J.Biol.Chem.**, 260:2197-2201, 1985.

- HARPUR, A.G.; ANDRES, A.C.; ZIEMIECKI, A.; ASTON, R.R.; WILKS, A.F. - JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. **Oncogene**, 7:1347-1350, 1992.
- HASSID, W.Z. & ABRAHAM, S. - Chemical procedures for analysis of polysaccharides. **Methods Enzymol.**, 3:34-36, 1957.
- HIGAKI, Y.; WOJTASZEWSKI, J.F.P.; HIRSHMAN, M.F.; WITHERS, D.J.; TOWERY, H.; WHITE, M.F.; GOODYEAR, L.J. - Insulin receptor substrate-2 is not necessary for insulin- and exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle. **J.Biol.Chem.**, 274:20791-20795, 1999.
- HUG, H. & SARRE, T.F. - Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? **Biochem.J.**, 291:329-343, 1993.
- ISHIZUKA, T.; COOPER, D.R.; HERNANDEZ, H.; BUCKLEY, D.; STANDAERT, M.; FARESE, R.V. - Effects of insulin on diacylglycerol-protein kinase C signaling in rat diaphragm and soleus muscles and relationship to glucose transport. **Diabetes**, 39(2):181-190, 1990.
- JEANRENAUD, B. - Central nervous system and peripheral abnormalities: clues to the understanding of obesity and NIDDM. **Diabetologia**, 37:S170-S178, 1994.
- JIANG, Z.Y.; LIN, YOU-WEI; CLEMONT, A.; FEENER, E.P.; HEIN, K.D.; IGARASHI, M.; YAMAMUCHI, T.; WHITE, M.F.; KING, G.L. - Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. **The Journal of Clinical Investigation**, 104:447-457, 1999.
- KADOWAKI, T.; KOYASU, S.; NISHIDA, E.; TOBE, K.; IZUMI, T.; TAKAKU, F.; SAKAI, H.; YAHARA, I.; KASUGA, M. - Tyrosine phosphorylation of common and specific sets of cellular proteins rapidly induced by insulin, insulin-like growth factor I, and epidermal growth factor in an intact cell. **J.Biol.Chem.**, 262:7342-7350, 1987.

- KAHN, C.R. - Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. **Diabetes**, 43:1066-1084, 1994.
- KAHN, C.R.; WHITE, M.F.; SHOELSON, S.E.; BACKER, J.M.; ARAKI, E.; CHEATHAM, B.; CSERMELY, P.; FOLLI, F.; GOLDSTEIN, B.J.; HUERTAS, P.; ROTHENBERG, P.L.; SAAD, M.J.A.; SIDDLE, K.; SUN, X.-J.; WILDEN, P.A.; YAMADA, K.; KAHN, S.A. - The insulin receptor and its substrate: molecular determinants of early events in insulin action. **Recent Progress in Hormone Research**, 48:291-339, 1993.
- KASUGA, M.; HEDO, J.A.; YAMADA, K.M. & KAHN, C.R. - Struture of insulin receptor and its subunits. **J.Biol.Chem.**, 257:10392-10399, 1982a.
- KASUGA, M.; KARLSSON, F.A. & KAHN, C.R. - Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science**, 215:185-187, 1982b.
- KATHURIA, S.; HARTMAN, S.; GRUNFELD, C.; RAMACHANDRAN, J. & FUJITA, YAMAGUCHI, Y. - Differential sensitivity of two functions of the insulin receptor to the associated proteolysis: Kinase action and hormone binding. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**. 83:8570-8574 ,1986.
- KIDO, Y.; BURKS, D.J.; WITHERS, D.; BRÜNING, J.C.; KAHN, C.R.; WHITE, M.F.; ACCILI, D. - Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. **J.Clin.Invest.**, 105:199-205, 2000.
- KLIPPEL, A.; RHEINHARD, C.; KAVANAUGH, M.; APELL, G.; ESCOBEDO, M.A.; WILLIAMS, L.T. - Membrane localization of phsophatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transduction kinase pathway. **Moll.Cell.Biol.**, 16:4117-4127, 1996.
- KOHN, A.D.; SUMMERS, S.A.; BIRNBAUM, M.J.; ROTH, R.A. - Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-Li adipocytes stimulates glucoses uptake and glucose transporter 4 translocation. **J.Biol.Chem.**, 271:31372-31378, 1996.

- KOLTER, T.; UPHUES, I.; ECKEL, J. – Molecular analysis of insulin resistance in isolated ventricular cardiomyocytes of obese Zucker rats. **Am.J.Physiol.**, 273:E59-E67, 1997.
- KRIEF, S.; BAZIN, R.; DUPUY, F.; LAVAU, M. – Increased in vivo glucose utilization in 30-day-old obese Zucker rat: role of white adipose tissue. **Am.J.Physiol.**, E342-E348, 1988.
- KROOK, A.; ROTH, R.A.; JIANG, X.J.; ZIERATH, J.R.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. – Insulin-stimulated AKT kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. **Diabetes**, 47:1281-1286, 1998.
- KULKARNI, R.N.; BRÜNING, J.C.; WINNAY, J.N.; POSTIC, C.; MAGNUSON, M.A.; KAHN, C.R. – Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic β cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. **Cell**, 96:329-339, 1999a.
- KULKARNI, R.N.; WINNAY, J.N.; BRÜNING, J.C.; HANAHAN, D. – **Diabetes.**, 47:A57-, 1998.
- KULKARNI, R.N.; WINNAY, J.N.; DANIELS, M.; BRÜNING, J.C.; FLIER, S.N.; HANAHAN, D.; KAHN, C.R. – Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured β -cells lines. **J.Clin.Invest.**, 104:R69-R75, 1999b.
- LAEMMLI, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (Lond.)**, 227:680-685, 1970.
- LAVAN, B.E.; FANTIN, V.R.; CHANG, E.T.; LANE, W.S.; KELLER, S.R.; LIENHARD, G.E. – A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. **J.Biol.Chem.**, 272:21403-21407, 1997b.

- LAVAN, B.E.; LANE, W.S.; LIENHARD, G.E. - The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. **J.Biol.Chem.**, 272:11439-11443, 1997a.
- Le STUNFF, C. & BOUGNERES, P. - Early changes in postprandial insulin secretion, not in insulin sensitivity, characterize juvenile obesity. **Diabetes**, 43:969-702, 1994.
- LI, P.M. & GOLDSTEIN, B.J. - Differential regulation of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS Wortmannin in intact cells. **Biochem.Biophys.Res.Comm.**, 223:80-84, 1996.
- LILLIOJA S.; MOTT, D.M.; HOWARD, B.V.; BENNETT, P.H.; YKI-JARVINEN, H.; FREYMOND, D.; NYOMBA, B.L.; ZURLO, F.; SWINBURN, B; BOGARDUS, C. - Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action: longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians. **N.Engl.J.Med.**, 318:1217-1225, 1988.
- LILLIOJA S.; NYOMBA, B.L.; SAAD, M.F.; FERRARO, R.; CASTILLO, C.; BENNETT, P.H.; BOGARDUS, C. - Exaggerated early insulin release and insulin resistance in a diabetes-prone population: a metabolic comparison of Pima Indians and Caucasians. **J.Clin.Endocrinol.Metab.**, 73:866-876, 1991.
- LILLIOJA, A.; MOTT, D.M.; ZAWADZKI, J.K.; YOUNG, A.A.; ABBOTT, W.G.; BOGARDUS, C. - Glucose storage is a major determinant of in vivo "insulin resistance" in subjects with normal glucose tolerance. **J.Clin.Endocrinol.Metab.**, 62:922-927, 1986.
- MASSAGUE, J.P.; PILCH, P.F. & CZECH, M.P. - Eletrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unit stoichiometries. **Proc.Nat.Acad.Sci.USA.**, 77:7137-7141, 1981.
- NATHAN, D.M. - Long-term complications of diabetes mellitus. **New Eng.J.Med.**, 328:1676-1685, 1993.

- OKADA, S.; YAMAUCHI, K.; PESSIN, J.E. - Shc isoform-specific tyrosine phosphorylation by the insulin and epidermal growth factor receptors. **J.Biol.Chem.**, 270:20737-20741, 1995.
- OUWENS, D.M.; van der ZON, G.C.; PRONK, J.L.Bos; MOLLER, W.; CHEATHAM, B.; KAHN, C.R.; MAASSEN, J.A. - A mutant insulin receptor induces formation of a Shc-growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) complex and p21ras-GTP without detectable interaction of insulin receptor substrate 1 (IRS1) with Grb2. Evidence for IRS1-independent p21ras-GTP formation. **J.Biol.Chem.**, 269:33116-33122, 1994.
- PAZ, K.; HEMI, R.; LeROITH, D.; KARASIK, A.; ELHANANY, E.; KANETY, H.; ZICK, Y. - A molecular basis for insulin resistance. **J.Biol.Chem.**, 272:29911-29918, 1997.
- PEARSON, G.; ROBINSON, F.; GIBSON, T.B.; XU, B.-E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M.H. - Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, 22:153-183, 2001a.
- PEARSON, L.L.; CASTLE, B.E.; KEHRY, M.R. - CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. **Int.Immunol.**, 13:273-283, 2001b.
- PREVIS, S.F.; WITHERS, D.J.; REN, J.-M.; WHITE, M.F.; SHULMAN, G.I. - Contrasting effects of IRS-1 *versus* IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism *in vivo*. **J.Biol.Chem.**, 275:38990-38994, 2000.
- ROHNER-JEANRENAUD, F. & JEANRENAUD, B. - Involvement of the cholinergic system in insulin and glucagon oversecretion of genetic preobesity. **Endocrinology**, 116:830-834, 1985.
- ROSEN, O.M. - After insulin binds. **Science**, 237:1452-1458, 1987.

- ROTHENBERG, P.L.; LANE, W.S.; KARASIK, A.; BACKER, J.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. - Purification and partial sequence analysis of pp185, the major cellular substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. **J.Biol.Chem.**, 266:8302-8311, 1991.
- ROTHENBERG, P.L.; WHITE, M.F. & KAHN, C.R. - The insulin receptor tyrosine kinase. In: Cuatrecasas p, Jacobs S, eds. **Handbook of Experimental Pharmacology**, Vol. 92. Berlin: Springer-verlag, 209-243, 1990.
- SAAD, M. J. A.; FOLLI, F. & KAHN, C. R. - Insulin and dexamethasone regulate insulin receptors, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in Fao hepatoma cells. **Endocrinology**, 136:1579-1588, 1995.
- SAAD, M.J.A.; CARVALHO, C.R.O.; THIRONE, A.C.P.; VELLOSO, L.A. - Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **J.Biol.Chem.**, 271:22100-22104, 1996.
- SAAD, M.J.A.; FOLLI, F.; ARAKI, E.; HASHIMOTO, N.; CSERMELY, P. & KAHN, C.R. - Regulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-F442A adipocytes. Effects of differentiation, insulin, and dexamethasone. - **Mol. Endocrinol.**, 8:545-557, 1994.
- SAAD, M.J.A.; FOLLI, F.; KAHN, J. & KAHN, C.R. - Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. **J.Clin.Invest.**, 92:2065-2072, 1993.
- SAAD, M.J.A.; PIMENTA, W.P.; PACCOLA, G.M.G.F. - Effect of glucose ingestion on peripheral glucose metabolism in normal man. **Diabete & Met.**, 15:5-10, 1989.
- SCOTT, A.M.; ATWATER, I. & ROJAS, E. - A method for the simultaneous measurement of insulin release and B-cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. **Diabetologia**, 21:470-475, 1981.

- SKOLNIK, E.Y.; LEE, C.H.; BATZER, A.; VICENTINI, L.M.; ZHOU, M.; DALY, R.; MYERS, M.J.JR.; BACKER, J.M.; ULRICH, A.; WHITE, M.F.; SCHLESSINGER, J. - The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS and Shc: implications for insulin control of *ras* signalling. **EMBO J.**, 12:1929-1936, 1993.
- SMITH-HALL, J.; PONS, S.; PATTI, M.E.; BURKS, D.J.; YENUSH, L.; SUN, X.L.; KAHN, C.R.; WHITE, M.F. - The 60 kDa receptor substrate functions like in IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells. **Biochemistry**, 36(27):8304-8310, 1997.
- SUN, X. J.; WANG, L. M., PATTI, M. A.; BRUNING, J. C.; HAAG, B.; JOHSON, R. S. & KAHN, C. R. - Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. **Nature**, 337:173-177, 1995.
- SUN, X.J.; MIRALPEIX, M.; MYERS, M.G.Jr.; GLASHEEN, E.; BACKER, J.M.; KAHN, C.R. & WHITE, M.F. Expression and function of IRS-1 in signal transmission. **J.Biol.Chem.**, 266:22662-22672, 1992.
- SUN, X.J.; ROTHENBERG, P.A.; KAHN, C.R. & AL. - Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, 352:73-77, 1991.
- TAKAYAMA, S.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. - Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. **J.Biol.Chem.**, 263:3440-77, 1988.
- TANTI, J.-F.; GREMEAUX, T.; VAN OBBERGHEN, E.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. - Insulin receptor substrate-1 is phosphorylated by serine kinase activity of phosphatidylinositol 3-kinase. **Biochem.J.**, 304:17-21, 1994.
- TANTI, J.F.; GRILLO, S.; GRÉMEAUX, T.; COFFER, P.J.; VAN OBBERGHEN, E.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. - Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation adipocytes. **Endocrinology**, 138:2005-2010, 1997.

- TAO, J.; MALBON, C.C. & WANG, H.YU. – Insulin stimulates tyrosine phosphorylation and inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B *in vivo*. **J.Biol.Chem.**, 276:29520-29525, 2001.
- TAYLOR, S.I. – Deconstructing type 2 diabetes. **Cell**, 97:9-12, 1999.
- TOWBIN, H.; STAEBLIN, J. & GORDON, J. - Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, 76:4350-4354, 1979.
- TRINDER, P. - Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **J.Clin.Path.** 22:158-161, 1969.
- VELLOSO, L.A.; CARNEIRO, E.M.; CREPALDI, S.C.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J. – Glucose- and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and its primary substrates IRS-1 and IRS-2 in rat pancreatic islets. **FEBS Lett.**, 377:353-357, 1995.
- WARD, C.W.; GOUGH, K.H.; RASHKE, M.; WAN, S.S.; TRIBBICK, G.; WANG, J.-XIN – Systematic mapping of potential binding sites for Shc and Grb2 SH2 domains on insulin receptor substrate-1 and the receptors for insulin, epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor. **J.Biol.Chem.**, 271:5603-5609, 1996.
- WHITE, M.F. – The insulin signaling system and the IRS proteins. **Diabetologia**, 40:S2-S17, 1997.
- WHITE, M.F. & KAHN, C.R. - The insulin signalling system. **J.Biol.Chem.**, 269:1-4, 1994.
- WHITE, M.F.; HARING, H.U.; KASUGA, M.; KAHN, C.R. - Kinetic properties and sites of autophosphorylation of the partially purified receptor from hepatoma cells. **J.Biol.Chem.**; 259:255-264, 1984.
- WHITE, M.F.; MARON, R. & KAHN, C.R. - Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr=185,000 protein in intact cells. **Nature**, 318:183-186, 1985.

- WILDEN, P.A.; KAHN, C.R.; SIDDLE, K. & WHITE, M.F. - Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic functions. **J.Biol.Chem.**, 267:16660-16668, 1992.
- WITHERS, D.J.; GUTIERREZ, J.S.; TOWERY, H.; BURKS, D.J.; REN, J.-M.; PREVIS, S.; ZHANG, Y.; BERNAL, D.; PONS, S.; SHULMAN, G.I.; BONNER-WEIR, S.; WHITE, M.F. - Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**, 391:900-904, 1998.
- XU, G.; MARSHALL, C.A.; LIN, T.-A.; KWON, G.; MUNIVENKATAPPA, R.B.; HILL, J.R.; LAWRENCE, J.C.; JR., MCDANIEL, M.L. - Insulin mediates glucose-stimulated phosphorylation of PHAS-I by pancreatic beta cells. **J.Biol.Chem.**, 273:4485-4491, 1998.
- XU, G.G. & ROTHENBERG, P.L. - Insulin receptor signaling in the β -cell influences insulin gene expression and insulin content. **Diabetes**, 47:1243-1252, 1998.
- XU, G.G.; GAO, Z.Y.; BORGE, P.D.; JR.; WOLF, B.A. - Insulin receptor substrate 1-induced inhibition of endoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake in β -cells. **J.Biol.Chem.**, 274:18067-18074, 1999.
- YAMAUCHI, K.; RIBON, V.; SALTIEL, A.R.; PESSIN, J.E. - Identification of the major SHPTP2-binding protein that is tyrosine-phosphorylated in response to insulin. **J.Biol.Chem.**, 270(30):17716-17722, 1995.
- YAMAUCHI, T.; TOBE, K.; TAMEMOTO, H.; UEKI, K.; KABURAGI, Y.; YAMAMOTO-HONDA, R.; TAKAHASHI, Y.; YOSHIZAWA, F.; AIZAWA, S.; AKANUMA, Y.; SONENBERG, N.; YAZAKI, Y.; KADOWAKI, T. - Insulin signaling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. **Moll.Cell.Biology**, 16:3074-3084, 1996.
- YAO, R. & COOPER, G.M. - Requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. **Science**, 267:2003-2006, 1995.

