**CHRISTINE MARINHO DE LEMOS** 

# EFEITO DO PD 153035, UM INIBIDOR TIROSINA QUINASE, NA SINALIZAÇÃO DA INSULINA E METABOLISMO DA GLICOSE

CAMPINAS

2006

### **CHRISTINE MARINHO DE LEMOS**

# EFEITO DO PD 153035, UM INIBIDOR TIROSINA QUINASE, NA SINALIZAÇÃO DA INSULINA E METABOLISMO DA GLICOSE

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD

### **CAMPINAS**

2006

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

L544e	<ul> <li>Lemos, Christine Marinho de Efeito do PD 153035, um inibidor tirosina quinase, na sinalização da insulina e metabolismo da glicose. / Christine Marinho de Lemos. Campinas, SP : [s.n.], 2006.</li> </ul>
	Orientador : Mario José Abdalla Saad Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
	1. Resistência à insulina. 2. Receptor de insulina. 3. Farmacoterapia. 4. Proteína-Tirosina Quinase. I. Saad, Mario José Abdalla. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
	(Slp/Fcm)

Título em ingles: Effect of PD 153035, a tyrosine kinase inhibitor, on insulin signaling and glucose metabolism.

Keywords:

- Insulin resistance
- Receptor, Insulin
- Protein-tirosine kinase
- Drug therapy

Área de concentração: Ciências básicas

Titulação: Mestrado em clinica médica

**Banca examinadora**: Prof<sup>o</sup>.Dr<sup>o</sup>. Mario José Abdalla Saad; Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Carla Roberta de Oliveira Carvalho; Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Lício Augusto Velloso.

Data da defesa: 06 - 07 - 2006

v

## DEDICATÓRIA

A meus pais, Cesar e Nancy, e ao meu irmão Marcus, exemplos de dedicação, perseverança e amor incondicional.

A meu marido Marcos, amor, amigo e companheiro, que soube compartilhar comigo esta difícil, mas compensadora etapa da minha vida.

A meu filho Guilherme, estrela guia, amor da minha vida, que diariamente me faz sentir a verdadeira felicidade.

À minhas queridas Isabella, Clara, Christian e Leonor por encherem a minha vida de amor e alegria. Agradeço ao Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad pela orientação segura, competente, paciente, e bem humorada .Agradeço pela oportunidade de aprender a fazer ciência de maneira séria e muito agradável.

Ao Prof. Kléber Gomes Franchini pela colaboração e incentivo acadêmico.

Às amigas Patykarol, Vivian e Silvana Rocco pela 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 Rosa Mourão e Juliana pelo apoio e colaboração.

À Patrícia O. Prada e Rodrigo Marin pela ajuda nos experimentos e transmissão de conhecimentos.

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

Aos funcionários do laboratório de biologia molecular, especialmente Sr Luiz Janeri e Sr Josimo Pinheiro, não só pelo auxílio e disponibilidade constantes mas também pela boa amizade.

Aos funcionários do Núcleo de medicina e cirurgia experimental pelo carinho, colaboração e disponibilidade constante, especialmente ao Márcio Alves da Cruz, que desenvolve um trabalho exemplar, cuidando dos nossos animais de laboratório.

Ao funcionário Alexandro Vieira Jacob pela ajuda durante a realização deste trabalho.

ix

Aos amigos da SPG-FCM Cristiane, Roberto, Renata e Eduardo Odoni pela paciência, pelo auxílo constante, palavras de incentivo e bom humor

À CAPES, pela concessão da bolsa.

	PÁG.
RESUMO	xxv
ABSTRACT	xxxi
1- INTRODUÇÃO	35
1.1- Sinalização da insulina	37
1.2- Proteínas tirosina quinases	42
1.3- Quinazolinas	43
1.4- PD 153035	44
2- OBJETIVOS	47
3- MATERIAL E MÉTODOS	51
4- RESULTADOS	63
5- DISCUSSÃO	91
6- CONCLUSÃO	101
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
8- ANEXOS	113

AMPK	proteína quinase ativada pelo AMP
μCi	microCuri
μΜ	micromolar
αΡΥ	antifosfotirosina
<sup>125</sup> I	isótopo de iodo 125
AKT/PKB	proteína serina/treonina quinase B
ATP	adenosina trifosfato
ADP	adenosina difosfato
AMP	adenosina monofosfato
cDNA	DNA complementar
Células A431	células de carcinoma epidermóide humano
DM 2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGF	fator de crescimento epidérmico
EGFR	receptor do fator do crescimento epidérmico
ERK	subfamília da MAPK
Fak	quinase de adesão focal
GLUT4	transportador de glicose 4
GRB2	proteína ligadora do receptor do fator de crescimento

GSK3	glicogênio sintetase 3
GTP	guanosina trifosfato
IC <sub>50</sub>	concentração média de inibição
IKK	quinase inibidora do fator nuclear κB
IkB	inibidores do κB
IMC	índice de massa corporal
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
JNK	c-jun N-terminal quinase
KDa	quilo Daltons
МАРК	proteína quinase ativadora da mitogênese
mTOR	proteína alvo da rapamicina em mamíferos
Nck	proteína adaptadora ligada às vias de crescimento
nM	nanomolar
PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
PDK1	quinase 1 dependente de fosfatidilinositol
PD 153035	6,7-dimetoxi-4-(N-3 bromofenil)aminoquinazolina
P <sup>21</sup> ras	proteína de 21 kda da família Ras
PI 3-quinase	fosfatidilinositol 3-quinase

PPL	propilenoglicol
PIP <sub>3</sub>	fosfatidilinositol 3,4,5-fosfato
РКА	proteína quinase A
РКС	proteína quinase C
рМ	picomolar
PMSF	fluoreto de fenilmetil sulfonila
pp185	proteína fosforilada de 185 kDa
РТК	proteína tirosina quinase
РҮ	fosfotirosina
p70s6K	p70 ribossomal S6 quinase
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	fator de troca dee nucleotídeo guanina
Src	oncogene originalmente definido como produto do sarcoma vírus Rous
Syp	fosfatase tirosina-específica
Tki	inibidor tirosina quinase
Tris	tri(hidroximetil)-aminometano

## PÁG.

Figura 1-Introdução	Mecanismo simplificado de transferência do fosfato terminal do ATP para o grupo OH fenólico do resíduo tirosina	42
Figura 2- Introdução	Estrutura básica da quinazolina (1) e seus isômeros (2 e 3)	43
Figura 3- Introdução	Estrutura química do PD153035	44
Figura 1(A e G)-	Características gerais dos animais	66
Figura 2 A-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação do IR em fígado de ratos	70
Figura 3 (A e B)-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação do IRS-1 e sua associação com a PI 3-quinase em fígado de ratos	71
Figura 4 (A e B)-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação do IRS-2 e sua associação com a PI 3-quinase em fígado de ratos	72
Figura 5 (A e B)-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação da AKT e ERKS (1/2) em fígado de ratos	73
Figura 5 (C e D)-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação da P70S6k e AMPK em fígado de ratos	74
Figura 5 (E e F)-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação da JNK e IκB em fígado de ratos	75
Figura 6A-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação do IR em músculo de ratos	77

Figura 7 (A e B)-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação do	
	IRS-1 e sua associação com a PI 3-quinase em	
	músculo de ratos	78
Figura 8 (A e B)-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação do	
	IRS-2 e sua associação com a PI 3-quinase em	
	músculo de ratos	79
Figura 9 (A e B)-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação da	
	AKT e ERKS (1/2) em músculo de ratos	80
Figura 9 (C e D)-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação da	
	P70S6k e AMPK em músculo de ratos	81
Figura 9 (E e F)-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação da	
	JNK e IkB em músculo de ratos	82
Figura 10 A-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação do IR	
	em Tecido adiposo de ratos	84
Figura 11 (A e B)-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação do	
	IRS-1 e sua associação com a PI 3-quinase em	
	tecido adiposo de ratos	85
Figura 12 (A e B)-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação do	
	IRS-2 e sua associação com a PI 3-quinase em	
	tecido adiposo de ratos	86
Figura 13 (A e B)-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação da	87
	AKT e ERKS (1/2) em tecido adiposo de ratos	
Figura 13 (C e D)-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação da	
	P70S6k e AMPK em tecido adiposo de ratos	88
Figura 13 (E e F)-	Efeito do PD 153035 no grau de fosforilação da	
	JNK е ІкВ em tecido adiposo de ratos	89

# RESUMO

Estudos recentes demonstraram que tratamentos prolongados com drogas inibidoras da atividade tirosina quinase (TKI) poderiam agir favoravelmente não só controlando crescimento e replicação celular, como também funções fisiológicas responsáveis por manter a homeostase da glicose. Porém, os efeitos diretos de PD 153035, um TKI, na regulação das etapas iniciais da ação da insulina não são conhecidos.

A insulina, ao se ligar à subunidade  $\alpha$  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  $\beta$  transmembrana do receptor, que 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 suas serinas-quinases importantes que são a AKT e as ERKs (1/2), que são essenciais, respectivamente, para os efeitos metabólicos e de controle gênico do homônio.

No presente estudo investigamos o efeito do tratamento com PD 153035, por 7 dias, na sensibilidade e sinalização da insulina em fígado, musculo e tecido adiposo de ratos Wistar. Foi investigado o 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, a fosforilação das ERKs (1/2), da p70s6k, da AMPK, da JNK e I $\kappa$ B $\alpha$  nos três tecidos.

Nenhuma diferença nos níveis glicêmicos foi observado durante o GTT entre os grupos tratado com PD 153035 e controle. As taxas de desaparecimento de glicose plasmática estavam altas nos animais tratados.

No fígado de ratos tratados com PD 153035, observamos um aumento da fosforilação em tirosina do IR, IRS-1 e do IRS-2 e um aumento da associação desses substratos com a PI 3-quinase. Porém uma diminuição significativa da fosforilação da AKT e da p70s6k foi observada, sem alteração no grau de fosforilação das ERKS (1/2). Não foi observado diferença significativa no grau de fosforilação da JNK, porém os animais tratados

apresentaram uma redução significativa nos níveis de  $I\kappa B\alpha$ . O grau de fosforilação da AMPK mostrou-se aumentado nos animais tratados.

Quando estudamos o tecido muscular, após estímulo agudo com insulina observamos uma diminuição significativa no grau de fosforilação do receptor de insulina nos animais tratados com PD 153035. Entretanto, nesses animais, pudemos observar após estímulo agudo com insulina, que a fosforilção em tirosina do IRS-1 aumentou significativamente. O aumento da fosforilação do IRS-1 foi acompanhada pelo aumento na associação IRS-1/ PI 3-quinase e pelo aumento no grau de fosforilação da AKT e da p70s6k.  $\alpha$ . O grau de fosforilação da AMPK mostrou-se aumentado nos animais tratados. Não foi observada alteração no grau de fosforilação das ERKs (1/2) neste tecido. Foi observado uma redução do grau de fosforilação das serinas quinases JNK e I $\kappa$ B $\alpha$  no músculo dos animais tratados.

Os animais que receberam tratamento crônico com PD 153035 por 7 dias apresentaram uma redução da adiposidade visceral, bem como uma perda de peso em relação ao grupo controle. Observamos nesses animais uma redução significativa no grau de fosforilação do IR e do IRS-1 no tecido adiposo. A associação IRS-1/PI 3-quinase mostrou uma redução significativa. A fosforilação da AKT e da P70s6k mostrou-se significativamente reduzida nos animais tratados. Entretanto observamos um aumento significativo da fosforilação do IRS-2 após estímulo insulínico agudo, porém acompanhado pela redução significativa na associação IRS-2/PI 3-quinase. Não observamos diferença nos níveis de fosforilação das ERKs. Observamos que o grau de fosforilação da proteína AMPK aumentou significativamente no ratos que receberam tratamento com PD 153035. Foi observado uma redução significativa do grau de fosforilação da JNK e IκBα no tecido adiposo dos animais tratados.

Sumariamente, o tratamento com PD 153035 por 7 dias aumentou a fosforilação em tirosina do IR, IRS-1 e IRS-2 no fígado, apesar da fosforilação da AKT apresentar-se reduzida neste tecido. No músculo dos animais tratados com PD 153035 observamos que a droga melhora a sinalização da insulina, provavelmente pela redução da atividade das serinas quinases JNK, IKKβ e mTOR. No tecido adiposo a droga induziu resistência à

insulina, acompanhada de redução no ganho de peso e redução da adiposidade visceral, possivelmente pelo aumento da secreção de adiponectina pelos adipócitos.

Em conclusão, os resultados do nosso estudo demonstram que o tratamento com PD 153035 aumentou a sensibilidade à insulina, por aumento da adiponectina, aumento da AMPK em fígado, músculo e adiposo, e aumentada via IRS/PI3K/AKT em músculo.

## ABSTRACT

It has been recently demonstrated that long-term treatment with some of tyrosine kinase inhibitor (*TKI*) drugs, might favorably act at steps in controlling not only cell growth and replication, but also physiological functions responsible for maintaining glucose homeostasis. However, the direct effects of PD 153035, a TKI, in the regulation of the early steps of insulin action are not known.

Insulin initiates its growth and metabolic promoting effects by biding 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 ERK family (1/2) of MAPK.

In the present study, we investigated the effect of treatment with PD 153035, for 7 days, on insulin sensitivity and insulin signaling in liver, muscle and adipose tissue of Wistar rats. It was investigated the tyrosine phosphorylation of IR, IRS-1 and IRS-2, their association with PI 3-kinase, and Akt serine/threonie phosphorylation , ERKs (1/2) phosphorylation, p70s6k, AMPK, JNK and I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, in the three tissues.

No differences in fasting plasma glucose levels were observed in animals treated with PD 153035. Plasma glucose disappearance rates were higher in treated animals

In the liver of rats treated with PD 153035, we observed an increased IR, IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorilation and an increased association of these substracs with PI 3-quinase. However a significant decrease of AKT and of the p70s6k phosphorylation was observed too, without alteration in ERKs phosphorylation levels (1/2). No significant difference was observed in JNk phosphorylation levels, however IkB showed a reduced phosphorylation in the liver of these animals. AMPK showed a significant increased phosphorylation in treated animals.

When we studied muscle, insulin-induced IR tyrosine phosphorylation showed significantly reduced in these animals, however treating rats with PD153035 significantly increased the insulin-induced IRS-1 phosphorylation in the muscle. The increased phosphorylation of IRS-1 was accompanied by increase in IRS-1/PI3-kinase association and Akt and p70s6k phosphorylation were higher in treated animals after insulin stimulation. AMPK showed a significant increased phosphorylation in treated animals. There was no significant changes in ERKs (/2) phosphorylation in this tissue. Reduced phosphorylation of serine-kinases as c-jun N terminal (Jnk) and I $\kappa$ k $\beta$  was observed.

The animals that received chronic treatment with PD 153035 for 7 days had presented a reduction in visceral fat mass, as well as a loss of weight, regarding the control group We observed in these animals a significant decreased IR and IRS-1 tyrosine phosphorylation in the adipose tissue. The association IRS-1/PI3-kinase showed a significant reduction. AKT and P70s6K phosphorylation showed significantly decreased in treated animals. However we observe a significant increased phosphorylarion of insulin-induced IRS-2 phosphorylation, but the association IRS-2/PI 3-kinase showed a significant reduction. We did not observe any difference in phosphorylation levels of ERKs (1/ 2). AMPK phosphorylarion increased significantly in animals that received treatment with PD 153035. Reduced phosphorylation of JNK and Ikk $\beta\alpha$  was observed in adipose tissue of treated animals.

In summary, our results demonstrated that in 7 days of treatment with PD 153035 increased tyrosine phosphorylation of IR/IRS-1/IRS-2 in the liver were observed, in spite of AKT phosphorylation had decreased in this tissue. In muscle of animals treated with PD 153035 we observed that the drug had improved the insulin signalling, probably by reduction of the serine kinase activity JNK,  $I\kappa K\beta$  and mTOR. In the adipose tissue, the drug induced insulin resistance, accompanied of visceral fat mass reduction as well as a loss of weight, probably due to an increased adiponectin secretion by fat cels.

In conclusion, the results of our study demonstrate that the treatment with PD 153035 increased the insulin sensibility, by increased levels of adiponectin, increased AMPK in liver, muscle and adipose tissue, and increased IRS/PI3K/AKT pathway in muscle.

# 1- INTRODUÇÃO
#### 1.1- Sinalização insulínica

Desde a descoberta da insulina há oitenta anos, consideráveis esforços têm sido dedicados na tentativa de se entender os mecanismos moleculares da ação deste hormônio. A importância dedicada ao estudo da ação insulínica justifica-se pela prevalência da resistência à insulina e, pelo fato desta, ter relevante papel na patogênese de muitas doenças, incluindo obesidade, diabetes mellitus e hipertensão arterial.

A insulina é o principal hormônio anabólico que regula o metabolismo intermédiário, além de participar de processos de crescimento e diferenciação celular. No período pós-prandial, é secretada pelas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas em resposta a níveis circulantes elevados de glicose e aminoácidos. Regula de forma importante o metabolismo de proteínas, lipídios e glicose. Os efeitos glicorregulatórios da insulina dependem principalmente de suas ações no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. No fígado, a insulina estimula a síntese e deposição de glicogênio e inibe a gliconeogênese e glicogenólise, o que reduz a produção hepática de glicose. Estimula ainda a síntese hepática de lipídios. Na célula muscular e no adipócito, a insulina é importante para promover a captação de glicose, sua utilização como fonte energética bem como a estocagem do excedente, quer na forma de glicogênio, quer na forma de gordura, após sua transformação na via da lipogênese. A captação de glicose nestes tecidos depende da estimulação pela insulina da translocação do transportador de glicose GLUT4 para a superfície da célula. A insulina ainda reduz a liberação de ácidos graxos no tecido adiposo.

Apesar dos múltiplos efeitos metabólicos da insulina, o termo "resistência á insulina "usualmente se refere a sua ação sobre a homeostase glicêmica (SAAD, 1994; FERRANNINI et al., 1999). Em 1978, Kahn definiu os termos resistência, sensibilidade e não responsividade à insulina. Existe resistência à insulina quando concentrações normais do hormônio produzem uma resposta biológica menor que o normal. A resistência pode advir de diferentes mecanismos: redução da sensibilidade ao hormônio, o que leva a um deslocamento para a direita da curva dose-resposta, com manutenção da resposta máxima; menor responsividade, acarretando redução da resposta máxima ao hormônio; combinação de menor sensibilidade e menor responsividade. Segundo o autor, é importante fazer estas

distinções, pois os mecanismos moleculares que produzem as diferentes formas de resistência podem variar. A resistência à ação da insulina poderia se dever a uma anormalidade na transdução do sinal, isto é, a eventos pós-receptor, na interação do hormônio a seu receptor ou a mesmo a eventos anteriores a este passo (MEYEROVITCH et al, 1989).

Para a ação da insulina, a cascata de eventos se inicia pela ligação do hormônio a seu receptor. O receptor de insulina (IR) é uma glicoproteína da família dos receptores de fatores de crescimento. Possui duas subunidades a extracelulares ligadas por pontes de dissulfeto a duas subunidades ß transmembrana, estas possuindo uma atividade intrínseca de tirosina quinase. Cada subunidade  $\alpha$  tem Mr (peso molecular aparente) 135.000, enquanto o Mr de cada subunidade  $\beta$  é de 95.000. A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$ estimula a atividade enzimática de uma das subunidades β e promove a fosforilação de vários resíduos de tirosina (Tyr) na subunidade β. Esta autofosforilação ativa o receptor, o qual pode então fosforilar substratos intracelulares específicos. O IR pode ser considerado como uma enzima tirosina quinase controlada/estimulada pela insulina. Sua atividade quinásica é fundamental para todos os efeitos insulínicos, os quais ocorrem quando a ausência de autofosforição torna o receptor biologicamente inativo. Enquanto a fosforilação em resíduos de tirosina ativa o receptor, a fosforilação em resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr) o inativa. Há evidências de que estas fosforilações em Ser/Thr sejam estimuladas por AMP cíclico e promovidas pela proteína quinase C (PKC). Por inativarem o receptor elas têm sido consideradas um potencial mecanismo regulador/modulador dos efeitos da insulina (SAAD, 1994; CHEATHAM & KAHN, 1995; ZIERATH & WALLBERG-HENRIKSSON, 2002).

A partir do receptor de membrana ativado, o sinal insulínico se propaga para o citoplasma através da ação do IR sobre seus substratos intracelulares, denominados de substratos do receptor de insulina (IRSs). Para a interação do IR com seus substratos citoplasmáticos, o domínio PTB ("phosphotyrosine binding") do substrato reconhece as fosfotirosinas do receptor, quando estas estão na seqüência de aminoácidos NPXpY, ou seja asparagina – prolina – qualquer aminoácido – fosfotirosina. Desta interação transitória resulta a fosforilação do substrato pelo receptor tirosina quinase. Os substratos do IR são

considerados moléculas acopladoras, por estarem em posição intermediária entre o IR e outras proteínas citoplasmáticas portadoras de domínios SH2 (src homology 2), que são importantes na propagação do sinal. Em outras palavras, durante sua interação com o IR, os IRSs são fosforilados em vários resíduos de tirosina, o que cria sítios de ligação para várias proteínas portadoras do domínio SH2 (VIRKAMÄKI et al., 1999).

Diversos substratos do IR já foram descritos, os quais incluem o IRS-1, IRS-2, o IRS-3, IRS-4, considerados os mais específico da via insulínica, três isoformas de proteínas Shc, além das proteínas p62<sup>dok</sup> e Gab-1. Há evidências de que as diferentes isoformas de IRSs apresentam especificidade para diferentes tecidos. Os estudos indicaram que as isoformas 3 e 4 têm papel menor na sinalização insulínica. O IRS-1 é a forma mais importante no músculo, mas tem importância também no fígado e tecido adiposo, enquanto o IRS-2 tem impacto no fígado, músculo e tecido adiposo. O primeiro substrato do IR descoberto, o foi na forma de uma proteína que tinha sua fosforilação em Tyr estimulada pela insulina e que migrava no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) como uma grande banda com Mr de 185.000, tendo sido por isto denominada de proteína pp185. Posteriormente, foi descrito ser o IRS-1 o principal componente da pp185, sendo o outro constituinte o IRS-2 (VIRKAMÄKI et al., 1999; UENO et al., 2000; SYKIOTIS & PAPAVASSILIOU, 2001).

O IRS-1 migra no SDS-PAGE com Mr ao redor de 160.000 quando não fosforilado e ao redor de 180.000 quando fosforilado. Apresenta diversos sítios potenciais de fosforilação, tanto em tirosinas como também em serina e treonina. Assim como descrito para o receptor, as fosforilções em Tyr são essenciais para a continuidade da transmissão do sinal, enquanto as fosforilações em Ser/Thr inibem as fosforilações em Tyr, inibindo a propagação do sinal. É interessante que fosforilação em serina no IRS-1 existe mesmo em condições basais e aumenta por estimulação com insulina. Este fato corrobora a visão de que as fosforilações em Ser/Thr atuam como um mecanismo de "feed-back" que regula a sinalização insulínica. Entretanto, alguns sítios de fosforilação em serina no IRS-1 têm outra função importante. Eles estão próximos aos domínios PTB e, quando fosforilados, protegem o IRS-1 da ação das tirosino-fosfatases, que retiram o fosfato dos resíduos de tirosina. Assim, a fosforilação em resíduos específicos de Ser mantém o substrato em sua forma ativa, assegurando a propagação do sinal (CHEATHAM & KAHN, 1995; SYKIOTIS & PAPAVASSLIOU, 2001).

Como já comentado, após a fosforilação em diversos resíduos de tirosina, os IRSs atuam como proteínas acopladoras para uma série de moléculas efetoras, portadoras de domínios SH2, como Grb2, Nck e Syp, além da subunidade regulatória da enzima fosfatidil inositol 3-quinase (PI3-K ou p85). A ligação da subunidade p85 da PI3-K ao IRS-1 estimula a atividade quinásica da subunidade catalítica p110. A ativação da via da PI3-K é essencial para a expressão dos efeitos metabólicos da insulina. Por outro lado, seus efeitos mitogênicos e sobre a transcrição gênica também têm a participação desta via, mas dependem principalmente de uma outra via, a via da MAPK ("mitogen activated protein kinase"), cuja ativação tem a participação do IRS-1 e da Shc como substratos do IR e do Grb2 como proteína efetora (SYKIOTIS & PAPAVASSILIOU, 2001). A Grb-2 é uma proteína citoplasmática que contém duas porções SH3 e uma SH2, sendo esta última o sítio de ligação à tirosina 895 do IRS-1. A Grb-2 age como uma molécula adaptadora que une o fator permutador de guanina chamada SOS (son-of-sevenless), a fosfoproteínas como o receptor do EGF e o IRS-1. O complexo Grb/mSOS ativa a p21ras, estimulando a ligação de GTP. Por analogia, a interação do complexo GRB/mSOS ao IRS-1 pode mediar a estimulação da p21ras pela insulina (WHITE & KAHN, 1994).

Foi demonstrado que a ativação da PI3-K é essencial para diversos efeitos metabólicos da insulina, os quais foram abolidos quando a ativação da PI3-K foi impedida farmacologicamente, ou pelo uso de animais geneticamente modificados. Entre esses efeitos biológicos que dependem da PI3-K estão a captação de glicose e a translocação das vesículas de GLUT-4 (a principal proteína transportadora de glicose que é regulada pela insulina) para a membrana plasmática, antilipólise, ativação da lipogênese e da síntese de glicogênio, estimulação da síntese de DNA e proteínas (CHEATHAM et al., 1994; CLARKE et al., 1994; VIRKAMÄKI et al., 1999).

A PI3-K ativada pela associação com o IRS-1 fosforilado (ou outros substratos do IR fosforilados, como o IRS-2), é recrutada para a membrana plasmática onde atua sobre fosfatidil inositóis de membrana, fosforilando-os na posição D-3 do anel do inositol. Seus principais substratos são o fosfatidil inositol (PI), fosfatidil inositol-4-fosfato (PI-4-P) e

fosfatidil inositol-4,5-bifosfato (PI-3,4-P<sub>2</sub>) e os principais produtos são, respectivamente, PI-3-P, PI-3,4-P<sub>2</sub> e PI-3,4,5-P<sub>3</sub>. Existem proteínas-quinases dependentes destes fosfoinositóis, principalmente do PI-3,4,5-P<sub>3</sub>, as quais são então ativadas. Estas enzimas são denominadas dependentes de fosfoinositóis (PDKs). As PDK1 e 2 estão estimulam a proteína quinase B (PKB), também chamada Akt, que é uma serina-quinase (CHEATHAM & KAHN, 1995; BEVAN, 2001).

A partir da ativação da Akt/PKB, a via pode seguir caminhos diversos, cada qual sendo responsável pelo encaminhamento em direção a diferentes ações da insulina, como síntese de glicogênio, ácidos graxos e proteínas, anti-apoptose e transporte de glicose. Por exemplo, para estimulação da síntese de glicogênio, a Akt/PKB catalisa a fosforilação em serina da glicogênio sintetase kinase 3 (GSK3), inativando a enzima e, consequentemente, ativando a glicogênio sintetase, já que esta última é inativada pela fosforilação. (SAAD, 1994; VIRKAMÄKI et al., 1999; BEVAN, 2001).

Existem ainda controvérsias sobre os passos envolvidos na estimulação da exocitose e da translocação das vesículass de GLUT-4. Uma das possibilidades sendo investigada é de que além da Akt/PKB, a PDK1 também ative membros atípicos da família da PKC (zeta e lambda), que também participam da translocação das vesículas. De qualquer forma, os mecanismos distais que conectam a ativação destas enzimas à migração das vesículas ainda não estão esclarecidos. Além disto, outros autores ainda consideram que a via da PI3-K, embora essencial, não seria suficiente para promover a translocação, havendo necessidade de interação com uma via paralela, também iniciada pela atividade tirosina quinase do IR (PESSIN & SALTIEL, 2000 WATSON & PESSIN, 2001).

Os passos iniciais da cascata de transdução do sinal insulínico descritos acima representa um sítio potencial de resistência à ação do hormônio e os locais bem como os mecanismos celulares responsáveis têm sido largamente pesquisados. A elucidação dos eventos moleculares envolvidos na fisiopatologia da resistência representaria um grande avanço na busca de intervenções capazes de impedir e/ou reverter as anomalias.

#### **1.2-** Proteínas Tirosina Quinases (PTKs)

As proteínas tirosinas quinases (PTKs) são um grupo de enzimas que catalisam a transferência do fosfato terminal ( $\gamma$ -fosfato) do ATP para o grupo OH fenólico de resíduos tirosina específicos (FIGURA 1.)



Figura 1- Mecanismo simplificado de transferência do fosfato terminal do ATP para o grupo OH fenólico do resíduo tirosina.

Essas enzimas, tanto aquelas associadas aos receptores transmembrana (receptores de tirosina quinase – EGF) como aquelas de localização citosólica (FAK, Src), participam do controle diversas funções celulares. A estrutura geral dos receptores tirosina quinases pode ser avaliada à partir da estrutura do receptor de insulina (IR), descrito anteriormente . As tirosinas quinases citosólicas têm estruturas semelhantes no sítio tirosina quinases e módulos funcionais nas regiões N e C-terminal.

Atualmente sabe-se que as proteínas tirosina quinases estão amplamente envolvidas em mecanismos de transdução de sinais específicos gerados na célula, bem como na patogenia de diversas doenças como o câncer e do coração. Neste contexto, a disponibilidade de compostos quinazolínicos com propriedades inibidoras de tirosina quinase permitiu propor estudos com o intuito de avaliar a potencialidade desses fármacos (MARIN, 2003).

A expressão acentuada da atividade tirosina quinase do receptor do fator do crescimento epidérmico ("Epidermal Growth Factor Receptor – EGF") pode resultar numa proliferação celular desordenada com a formação de tumores malignos . Por essa razão, inibidores da atividade tirosina quinase do receptor EGF são potenciais agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer). Resultados preliminares demonstraram que algumas quinazolinas, compostos sintéticos, que apresentem potência e atividade específica, apresentam essas propriedades (FRY et al, 1994).

## 1.3- Quinazolina

A quinazolina (1) é uma 1,3-benzodiazina com a mesma estrutura das bases pirimidínicas (Uracila, Timina e Citosina) presentes nos ácidos nucleicos. O nome quinazolina foi proposto devido a estes compostos serem isômeros com as cinolinas (2) e quinoxalinas (3) (figura 2)( MARIN R.M.,2003).



Figura 2- Estrutura básica da quinazolina (1) e seus isômeros (2 e 3).

Compostos quinazolínicos têm estruturas semelhante aos derivados purínicos ATP, ADP, AMP e a própria adenosina. Inclusive a ação inibidora de tirosina quinase tem por base a ocupação dos sítios de acoplamento do ATP por estes compostos nas referidas enzimas, provocando a inibição da atividade quinase das mesmas (REWCASTLE, G.W. et al, 1995)

Os derivados de quinazolinas têm efeitos pleiotrópicos, com capacidade de afetar as funções e atividades de receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos (BOLOGNESI, M. L. et al. 2001), fosfodiesterases (TAKASE, Y et al. 1994; WATANABE, N et al. 2000; UKITA, T et al. 2001), tirosina quinases (LEVITZKI, A 1999) e descoberto mais recentemente de adenosina quinases (COWART M et al. 2001). Nos últimos anos, os estudos com derivados quinazolínicos tiveram grande progresso no combate das doenças proliferativas como o câncer, baseados principalmente na propriedade inibidora de tirosina quinases destes compostos.

#### 1.4- PD153035

As 4-anilinoquinazolinas foram descobertas há 12 anos (FRY et al, 1994;) sendo que a 6,7-dimetoxi – 4 – (N- 3 bromofenil) aminoquinazolina (PD153035, figura 3) foi o primeiro composto identificado como inibidor competitivo do ATP em células A-431 (IC<sub>50</sub> de 0,025 nM), com elevada potência e alta especificidade sobre a atividade do receptor EGF (FRY et al, 1994).



Figura 3- Estrutura química do PD153035 (ROCCO et al, 2005)

A potência de inibição, em todas as séries de compostos sintetizados e avaliados, parece estar associada aos grupos de substituintes doadores de elétrons nas posições 6 e/ou 7 da quinazolina (OMe, OEt e  $NH_2$ ) e com halogênios (principalmente Br e Cl) como substituintes na posição *meta* do anel anilina. O grupo anilina *meta*-substituído apresentou-se como o melhor substituinte para a posição 4 do sistema quinazolínico (Bridges *et al*, 1996).

Assim como outros compostos quinazolínicos, o PD153035 vem demonstrando uma atividade diferenciada. Estudo realizado com derivados de anilinoquinazolinas, dentre elas a PD153035, indicou efeitos desses compostos sobre a função de corações isolados de ratos semelhantes àqueles da adenosina. Os compostos provocaram aumento da pressão sistólica do ventrículo de corações isolados e bradicardia, proporcional a dose utilizada (MARIN, 2003). Apesar de não haver estudos correlacionando o uso da PD153035 e homeostase glicídica, pesquisas abordando outros quimioterápicos, inibidores da atividade tirosina quinase surgiram recentemente, apontando como benéfica a ação desses compostos na homeostase glicídica. No entanto, a utilização de quinazolinas e seus derivados no estudo do metabolismo da glicose e sinalização da insulina ainda é pouco ou nada explorado, abrindo uma nova perspectiva para o estudo da atividade desses fármacos.

Estudo recente demonstrou uma correlação entre o uso de quimioterápico, inibidores da atividade tirosina quinase, e melhora do quadro aterosclerótico na aorta de ratos diabéticos. Neste estudo, o Diabetes Mellitus foi induzido por injeção de streptozotocina em ratos com 6 semanas de vida. Esses animais foram tratados com Imatinib. A droga foi utilizada como um inibidor tirosina quinase do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). O tratamento durou 20 semanas. O resultado mostrou que o tratamento com Imatinib preveniu o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas e expressão de citocinas inflamatórias induzidas pelo diabetes na aorta, retardando o desenvolvimento da aterosclerose, especificamente no contexto do Diabetes Mellitus. Importante salientar a importância deste estudo, pois o diabetes mellitus permanece como fator de risco independente para desenvolvimento da aterosclerose 0 (LASSILA et al, 2004).

Veneri e colaboradores em 2005, fizeram um relato de caso de uma paciente de 70 anos de idade, nulípara, portadora de diabetes do tipo 2desde 62 anos, que sofreu regressão do doença durante tratamento de leucemia mielóide crônica com Imatinib. Aqui, o Imatinib foi usado como quimioterápico, inibidor tirosina quinase do BCR-ABL. Durante o tratamento com Imatinib, os níveis de glicose sangüínea cairam progressivamente, bem como as doses de insulina .O tratamento com Imatinib foi iniciado em março de 2004. Em junho de 2004, o tratamento do diabetes com insulina foi descontinuado. Em julho de 2004 a paciente estava apresentando um diabetes mellitus considerado leve. Durante os meses subsequentes, a regressão do diabetes do tipo 2 foi confirmada. Durante o tratamento, não houve mudança na dieta, na atividade física, peso e IMC da paciente. Estes dados são relevantes para muitas situações de resistência à insulina, porque demonstram que drogas que afetam mecanismos que são alvo de agentes antineoplásicos modulam positivamente a homeostase glicídica.

Nos últimos anos observou-se um grande progresso no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na manutenção da homeostase glicídica, bem como nos que geram o desenvolvimento da resistência à insulina e diabetes mellitus. Estudos recentes têm demonstrado que a resistência à insulina é consequência de defeitos na sinalização da insulina após a ligação deste hormônio ao seu receptor (HUNTER & GARVEY, 1998) evidenciando a importância da ativação de tirosina quinases em processos de resistência à insulina e diabetes mellitus do tipo II.. Neste contexto, a interferência na via de sinalização da insulina e metabolismo da glicose por meio de um composto quinazolínico como PD153035 teria grande relevância, já que é conhecido a existência de drogas que afetando mecanismos antineoplásicos, melhoraram o metabolismo glicídico (VENERI ET AL, 2005).

# 2- OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

1- Avaliar os efeitos de composto quinazolínico PD153035, administrado por 1 semana, no metabolismo da glicose e nas etapas iniciais da sinalização insulínica, no tecido hepático, muscular e adiposo de ratos normais.

# 3- MATERIAL E MÉTODOS

#### ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, com idade entre 6 a 9 semanas, pesando aproximadamente 150-300g, fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp (CEMIB).

Os animais foram acomodados em gaiolas plásticas, contendo 5 ratos por gaiola e mantidos ( $22 \pm 1^{\circ}$ .C), em ciclo de 12 horas de luz (06h-18h) e 12 horas de escuro (18h –6h), recebendo água e ração comercial Nuvital® (Nuvilab) *ad libitum*.

Os animais tiveram a alimentação suspensa por 12h-14h antes dos experimentos, com oferta de água à vontade.

## GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos:

- a) 10 ratos que recebiam tratamento com PD153035 Grupo tratado
- b) 5 ratos que recebiam tratamento com o veículo: propilenoglicol (PPL) Grupo controle

Os ratos foram submetidos ao tratamento crônico com PD 153035, através de gavagem diária de 30mg da droga/Kg de peso corporal do animal. Essa dose e concentração correspondiam a 1 ml da droga, volume esse administrado diariamente por animal. O volume igual (1ml) de propilenoglicol (PPL) foi administrado no grupo controle. Esse procedimento foi feito no período da manhã durante 7 dias que antecederam ao estudo e no momento do experimento.

#### MATERIAL

Os reagentes e os aparelhos para eletroforese em dodecil sulfato de sódio e gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond,CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfnilfluoreto (PMSF), aprotinina e ditiotreitol (DTT), Triton X-100, tween 20 e glicerol foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). Insulina regular (Humulin R-Lilly) fornecida pela Biobrás. A proteína A com iodo radioativo (I-125) fornecida pela Amershan (UK). A membrana de nitrocelulose utilizada (BA85, 0,2m) são da Scheider e Schuell. A proteína A Sepharose 6 MB da Pharmacia (Uppsala, Suécia). O agente anestésico tiopental sódico (Abbott), foi adquirido pela Cristália (Itapira/SP, Brasil). Os anticorpos policionais anti-receptor de insulina, anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-IkB os anticorpos monoclonais antifosfotirosina, anti p-Erk e anti p-Jnk foram todos da Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Também foram utilizados os anticorpos policionais anti-PI-3 quinase (p85), anti-phospho Akt (ser 473), da Upstate biotechnology Inc (UBI). Foram utilizados ainda os anticorpos policionais anti-AMPK- $\alpha$  e anti-phospho p70-s6k kinase (thr421/ser424) da Cell Signalling Technology Inc., MA, USA). A droga PD153035 e o veículo propilenoglicol – P.A – RO (Ecibra), foram gentilmente cedidos pelos Drs. Kléber Gomes Franchini, Silvana Ap. Rocco, Marcelo Mantovani M. de Azevedo e Rodrigo Miguel Marin (Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular – FCM - Unicamp/SP).

# SOLUÇÕES EMPREGADAS NOS DIVERSOS EXPERIMENTOS

#### 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 100mM, 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 acrescidos no momento do uso.

#### Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado:

Contém: Trisma base 100mM, 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 pF7,0, glicerol 50% e SDS 10%.

## Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida

(SDS-PAGE):

Contém: Trisma base 200mM, glicina 1,52M, 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, Metano 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Foi estocada a 4º 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 de 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 transferências de 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( Molico®) 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 soro albumina bovino (BSA) e azida sódica 0,02% diluídos em solução basal.

# Solução de proteína A marcada com <sup>125</sup>I:

Solução que contém proteína A com I<sup>125</sup> para marcação dos anticorpos específicos, o que permite a visualização das bandas em auto radiografia. Contém: 0,1% de albumina dissolvida em solução basal com  $2\mu$ Ci de proteína A<sup>125</sup>I.

# MÉTODOS

# **Procedimentos com animais:**

# Gavagem:

Foi utilizado seringa descartável de 10ml (Injex), agulha descartável (BD 1,20x40-18 G 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub>) e um tubo de polietileno (O.D:1,70mm-0,067") com 10 cm de comprimento, para montar o sistema de gavagem. A agulha deve ter a ponta cortada e ajustada por uma lixa elétrica, a fim de que o tubo de polietileno se encaixe perfeitamente. O equipamento para gavagem está pronto quando o tubo de polietileno está acoplado na agulha e esta se encontra firmemente acoplada na seringa.

Foram utilizados dois equipamentos de gavagem: um para os animais tratados outro para os animais controle. Diariamente cada animal teve seu tubo de polietileno descartado após o uso.

O método de gavagem usado foi simples e rápido, evitando o estresse do animal. Inicialmente as duas seringas foram completadas uma com PD153035 e a outra com PPL. Depois, a dose de 1 ml foi administrada da seguinte maneira: imobilizando o animal pelo dorso e introduzindo o tubo de polietileno delicadamente pelo canto da mandíbula , sobre a língua e sendo deslocado através do esôfago. O êmbolo da seringa só era pressionado, quando o tubo estava bem locado no esôfago do animal. Esse procedimento durava poucos segundos e era feito diariamente sem a necessidade do uso de anestésicos.

# Procedimentos com animais para extração das proteínas teciduais, após estímulo insulínico in vivo.

Os experimentos iniciaram-se entre 9 horas e 10 horas da manhã. Após jejum alimentar, não hídrico, de 12-14 horas, os animais foram submetidos à anestesia por administração intraperitoneal de solução contendo tiopental sódico (50 mg/Kg de peso corporal) e utilizados após a abolição do reflexo corneano, caudal e retirada à dor da pata. A cavidade abdominal foi então aberta e a veia porta exposta. Os animais controle negativo (sem insulina [-]), receberam 0,5 ml de solução salina (NaCl 0,9%).Para os animais do grupo positivo (com estímulo de insulina), foi injetada insulina regular na veia porta em concentração 10<sup>-5</sup> M de insulina. Após 30 segundos da injeção de insulina, retirou-se um fragmento do figado, o qual foi colocado imediatamente em tubo tipo falcon contendo tampão de extração, mantido todo tempo no gelo. O tecido foi homogeneizado por 20 segundos com processador tipo "polytron", operado em velocidade máxima. Cerca de 90 segundos após a injeção, um fragmento de músculo gastrocnemius foi retirado e homogeneizado como descrito para tecido hepático e o mesmo procedimento foi feito 120" após a injeção, para remoção do tecido adiposo (epididimal). Em experimentos preliminares (SAAD et al., 1992), demonstrou-se que a fosforilação máxima do IRS-1, após infusão de insulina na veia porta, ocorria entre 30 e 60 segundos no figado, e entre 1 e 4 minutos em músculo, a concentrações de  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  M de insulina, respectivamente.

Para avaliação do grau de fosforilação das proteínas, retirou-se fragmento do fígado após 120 minutos da injeção de insulina, e fragmentos do tecido muscular e adiposo após 4 e 5 minutos do estímulo agudo com insulina, respectivamente.

No final da extração, foi adicionado Triton X-100 1% em todas as amostras e mantidas em gelo. Após 40 minutos, os materiais extraídos e homogeneizados foram submetidos a centrifugação.

Os extratos foram centrifugados a 12.000 rpm, a 4°C por 20 minutos para remoção do material insolúvel. Parte do sobrenadante foi utilizada para determinação da concentração de proteínas . Foram utilizados 20  $\mu$ l do sobrenadante para a quantificação proteica de cada amostra, através do método de biureto. O sobrenadante foi utilizado como amostra para imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1,IRS-2 e anti-IR.; outra parte foi utilizada para avaliação do extrato total, ou seja, separação das proteínas em SDS-page. Para aplicação no SDS-PAGE, o sobrenadante foi armazenado em alíquotas com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970), acrescido de DTT 200mM, na proporção de 1:5 (400  $\mu$ l do sobrenadante em 100  $\mu$ l do tampão de Laemmli com DTT), mantidos sempre a 4°C até a aplicação no gel de poliacrilamida. As amostras aliquotadas na solução de Laemmli com DTT que restaram do experimento foram armazenados no biofreezer a -80°C para serem usadas posteriormente.

# Análise proteica por immunoblotting ou westernblotting

As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo DTT 100mM e aquecidas em água fervente por 5 minutos. Para os extratos totais, alíquotas com 200µg de proteínas por amostra foram aplicadas sobre o gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 2 mm de espessura. Tem como padrão um marcador de peso molecular (Fermentas, SM 0671) com valores estabelecidos em 170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 33 kDa, 24 kDa,17 kDa, 11 kDa. O marcador em 72 kDa aparecia em cor vermelha e os demais pesos apareciam em azul, no gel de poliacrilamida 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 separads no SDS-PAGE, foram transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da Bio Rad, e a solução tampão para transferência mantido em voltagem constante 120 volts por 2 horas, 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 das proteínas. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal por 3 sessões de 5 minutos , e incubadas com anticorpos anti-fosfotirosina, anti p-Erk, anti p-Jnk,, anti-phospho Akt (ser 473), anti-AMPK- $\alpha$  e anti-phospho p70-s6k kinase (thr421/ser424) e anti-phospho p-I $\kappa$ B, diluídos em tampão para anticorpos, durante uma noite, a 4°C sob agitação constante. No dia seguinte, foram lavadas novamente com solução basal 3 sessões de 5 minutos e incubadas a seguirem solução com proteína A, marcada com I, durante 2 horas a temperatura ambiente. O excesso de proteína A foi lavado com solução basal em 3 sessões de 10 minutos e então, as membranas são colocadas para secar. Após secarem e serem embaladas adequadamente em filme plástico, as membranas são expostas ao filme de RX (Kodak XAR – Rochester, NY), com intensificador (Cronex Lightning plus – Dupont, Wilmington, DE) em cassete mantido a –80°C. Após 5 a 7 dias, os filmes foram revelados na forma convencional.

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

#### Imunoprecitação

Volumes das amostras com a mesma concentração protéica (normalizadas) foram utilizadas para imunoprecipitação, com o volume do anticorpo fixado em 12 µl/amostra. Foi utilizado anticorpo anti-receptor de insulina, anti-IRS-1 e anti-IRS2, sendo que a determinação das proteínas seguiu as etapas descritas anteriormente no ítem (ref extração). As amostras foram colocadas sob incubação durante 12 a 14 horas a 4°C, sob agitação contínua. Em seguida acrescentou-se 50 µl de proteína A Sepharose 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 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o material precipitado lavado três vezes com 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 a membrana de nitrocelulose, seguindo as etapas descritas anteriormente. Nestes experimentos de imunoprecipitação, as membranas foram submetidas ao *blotting* com anticorpo antifosfotirosina e anti-PI-3 quinase (p85).

# Procedimentos com animais para avaliação de parâmetros metabólicos

Experimentos como *ITT* (insulin tolerance test), *GTT* (glucose tolerance test) e colheta de sangue para dosagens posteriores de insulina plasmática e adiponectina plasmática, foram realizados no 3<sup>0</sup>. dia de tratamento dos animais com PD 153035. Os experimentos foram realizados após jejum alimentar, não hídrico, de 6-8 horas, os animais foram submetidos à anestesia por administração intraperitoneal de solução contendo tiopental sódico (50 mg/Kg de peso corporal) e utilizados após a abolição do reflexo corneano, caudal e retirada à dor da pata.

A avaliação da adiposidade visceral foi realizada no 7°. dia de tratamento seguindo os mesmo protocolo descrito acima.

# A DOSAGEM DE INSULINA

A insulina plasmática foi avaliada por radioimunoensaio (RIE) e a curva padrão confeccionada com insulina de rato (SCOTT et al, 1981).

#### HOMA (homeostasis model assessment)

Métodos para determinação da resistência à insulina e da capacidade funcional das células beta assentado em medidas estáticas, ou instantâneas, de um ou mais constituintes plasmáticos (Oliveira et al, 2005). HOMA foi calculado empregando a fórmula: insulina/22.5exp(-ln glicose) (MATTHEWS et al, 1985), utilizando níveis de insulina e glicose basais determinados no 3°. dia de tratamento.

# **TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT, Insulin Tolerance Test)**

Os animais forma pesados e deixados em jejum noturno de 12 a 14 horas. Antes de iniciarmos o experimento, os animais foram anestesiados, em seguida tiveram coletada pequena amostra de sangue por secção da cauda para medir a glicemia basal. Foram colocadas gotas de sangue na glicofita (fitas Accu-Chek advantage II-Roche) que foi introduzida no glicosímetro (monitor de glicemia Accu-Chek Advantage-Roche) para leitura (em mg/dl).

Dosada a glicemia basal considerada o "tempo zero", a etapa seguinte foi calcular a dose de insulina a ser administrada nos animais. O cálculo foi de acordo com o peso de cada animal. Após a administração da insulina por via intraperitoneal, as glicemias foram dosadas nos tempos 5<sup>c</sup>, 10<sup>c</sup>, 15<sup>c</sup>, 20<sup>c</sup>, 25<sup>c</sup> e 30<sup>c</sup> seguintes. Após o procedimento, os animais receberam glicose à 25% para recuperação.

O *Kitt*, foi calculado pela vertente da linha de regressão do logaritmo da glicose sanguínea em oposição ao tempo. Para análise dos dados utilizamos o método ANOVA.

# **TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT, Glucose Tolerance Test)**

Os animais formam pesados e deixados em jejum noturno de 12 a 14 horas. Antes de iniciarmos o experimento, os animais foram anestesiados, em seguida tiveram coletada pequena amostra de sangue por secção da cauda para medir a glicemia basal. Foram colocadas gotas de sangue na glicofita (fitas Accu-Chek advantage II-Roche) que foi introduzida no glicosímetro (monitor de glicemia Accu-Chek Advantage-Roche) para leitura (em mg/dl).

Dosada a glicemia basal considerada o "tempo zero", a etapa seguinte foi calcular a dose de glicose à 25% (2g de glicose por Kg de animal) a ser injetada nos animais. O cálculo foi de acordo com o peso de cada animal. Após a administração da glicose à 25% por via intraperitoneal, as glicemias foram dosadas nos tempos 15<sup>°</sup>, 30<sup>°</sup>, 60<sup>°</sup> e 120<sup>°</sup> seguintes.

A taxa de tolerância à glicose (GTT), foi avaliada pelo cálculo da média das áreas. Foi usado o *software* Microcal (TM) Origin® Working Mode 6,0 (Microcal software, Inc – Northampton, MA/USA). Para análise dos dados utilizamos o método ANOVA.

## A DOSAGEM DE ADIPONECTINA

A adiponectina foi avaliada por radioimunoensaio (RIE), utilizando o kit fornecido pela Linco Research, Inc (USA)., de acordo com o protocolo do Kit.

# QUANTIFICAÇÃO DA ADIPOSIDADE VISCERAL

Após jejum alimentar, não hídrico, de 12-14 horas, os animais foram submetidos à anestesia por administração intraperitoneal de solução contendo tiopental sódico (50 mg/Kg de peso corporal) e utilizados após a abolição do reflexo corneano, caudal e retirada à dor da pata. A cavidade abdominal é aberta. É então removida a gordura epidimal (bilateral) e o tecido adiposo retroperitoneal. Após pesadas, os dados foram analisados pelo *software* Microcal (TM) Origin® Working Mode 6,0 (Microcal software, Inc – Northampton, MA/USA). Para análise dos dados utilizamos o método ANOVA.

# 4- RESULTADOS

#### 4.1- Características gerais dos animais

A FIGURA 1 A mostra a média do ganho de peso dos animais controle e PD, no período de pré e pós tratamento (7 dias de tratamento). Os ratos tratados com PD 153035 apresentaram perda de peso significativa durante o período de tratamento, em relação ao grupo controle (C=5,7  $\pm$  1,30,n=10 vs PD= -2,9  $\pm$  2,45, p=0,006, n=10).

A FIGURA 1 B, mostra o decaimento da glicemia em relação ao valor basal (100%), a cada tempo do ITT. Um significante aumento na sensibilidade à insulina foi observado nos animais do grupo PD 153035, o qual mostrou um aumento de ~50% no i.v. K*itt.* (C: 4,12 ± 0,65, *n*=8; PD=7,10 ± 1,66, p,0,01, *n*=9).

A FIGURA 1 C, mostra os níveis plasmáticos de insulina, após período de jejum de cerca de 6 horas. Não houve variação significativa entre os grupos. O mesmo resultado foi observado no HOMA (FIGURA 1 D).

A FIGURA 1 E mostra as alterações glicêmicas durante o GTT. Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e PD durante o GTT.

A FIGURA 1 F mostra a quantidade (em gramas) de tecido adiposo dos grupos estudados. Observamos que os animais do grupo PD153035 apresentaram uma redução significativa de tecido adiposo visceral em relação ao grupo controle (C:  $1,9 \pm 0,80$ , n=10 vs PD:  $1,2 \pm 0,53$ , p=0,03, n=10).

A FIGURA 1G mostra os níveis plasmáticos de adiponectina, após período de jejum de cerca de 8 horas. Observamos que os animais do grupo PD 153035 apresentaram um aumento significativo dos níveis séricos de adiponectina em relação ao grupo controle (C:  $3,582 \pm 0,78$ , n=21 vs PD:  $4,229 \pm 0,21$ , p=0,02, n=24).

Considerando estes dados, constatamos que os animais submetidos a tratamento com a droga PD153035 apresentaram melhora da sensibilidade à insulina, sem alteração significativa dos níveis de insulina de jejum, associados a níveis normais de glicose plasmática, perda de peso e redução da adiposidade visceral.



Figura 1A- Médias de ganho de peso dos grupos. B. Kitt – decaimento da glicose C. Níveis séricos de insulina de jejum. D. Índice HOMA. E. GTT - Médias dos níveis glicêmico. F. Médias de adiposidade visceral. G. Níveis séricos de adiponectina. Os valores são expressos como média ± EPM, e a significância expressa como \*p<0,05.</p>

#### 4.2- Análise das etapas iniciais da ação insulínica no fígado de ratos

Em amostras de fígado, previamente imunoprecipitadas com anticorpo antireceptor de insulina e submetidas a *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina, observamos que no estado basal (sem estímulo agudo de insulina) não houve diferença entre os grupos controle e PD. Após estímulo agudo com insulina, houve aumento significativo do grau de fosforilação da subunidade  $\beta$  do receptor de insulina dos dois grupos em estudo (C: 100 ± 6,4% vs PD: 181,82 ± 4,63%, p = 0,00467; *n*=16), comparado ao estado basal (FIGURA 2 A).

Utilizando anticorpos específicos anti-IRS-1, observamos que o grau de fosforilação deste substrato no estado basal aumentou nos dois grupos (basal: C:  $62,31 \pm 9,38\%$  vs PD:  $141,21 \pm 11,96\%$ , p = 0,01807, n= 8). 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 (C:  $100 \pm 14,59\%$  vs PD: $344,5 \pm 11,73\%$ , p = 0,00292, *n*=16) (FIGURA 3.A).

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., ARAKI et al., 1994) demonstraram a existência de uma interação relativamente estável e de alta afinidade entre 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.B, que o grau de associação aumentou significativamente nos dois grupos, tanto no estado basal como após estímulo insulínico (Basal: C: 46,50 ± 9,45% vs PD:  $125,91 \pm 9,03\%$ , p<0,05, n=8, Estimulado: C:  $100 \pm 6,8\%$  vs PD:  $204,86 \pm 6,92\%$ , p<0,05, *n*=16).

Não diferente dos resultados da fosforilação do IRS-1, quando as amostras do tecido hepático foram imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2, e incubadas com anticorpo antifosfotirosina, observamos um aumento na fosforilação tanto no estado basal quanto após estímulo insulínico nos dois grupos estudados (Basal: C:  $301,86 \pm 17,13\%$  vs PD:  $163,33 \pm 22,79\%$ , p<0,05, n=8, Estimulado: C:  $100 \pm 17,05\%$  vs PD:  $301,86 \pm 17,13\%$ , p<0,05, *n*=16). (FIGURA 4 A).

A associação do IRS-2 à PI 3-quinase, no estado basal não mostrou diferença estatisticamente significante entre os grupos. Após estímulo insulínico ocorreu um aumento significativo da fosforilação nos dois grupos estudados (C:  $100 \pm 20,49\%$  vs PD:  $219,81 \pm 17,43\%$ , p<0,05, *n*=16). (FIGURA 4.B).

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 dos animais controle e PD. Para isso, realizamos *immunoblotting* utilizando anticorpo anti-pAKT (AKT Ser473). Observamos uma redução significativa no grau de fosforilação da pAKT nos ratos do grupo PD, em relação aos controle, após estímulo com insulina (C:  $100 \pm 1,11\%$  vs PD:  $62,79 \pm 2,053\%$ , p=0,0197, n=11). No estado basal não houve diferença entre os dois grupos (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, avalianos a fosforilação de uma subfamília da MAP-quinase, as proteínas ERKs (1/2). Quando amostras do fígado foram submetidas ao immunoblotting com anticorpo anti-pERK, observamos por densitometria ótica, que o grau de fosforilação da Erk no estado basal mostrou-se significantemente reduzido no grupo PD (C: 51,05  $\pm$  3,29% vs PD: 24,18  $\pm$ 1,36%, p=0,00871, *n*=8), porém após estímulo insulínico agudo, não houve diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo PD. (FIGURA 5 B).

A proteína p70<sup>s6k</sup> participa do controle translacional de transcrição do RNAm. A p70<sup>s6k</sup> tem sido identificada como uma das moléculas efetoras finais da via da PI 3-quinase. No entanto, ainda se desconhece as kinases que fazem link emtre a PI 3-quinase e a p70<sup>s6k</sup> (PULLEN et al, 1998). Devido ao seu papel de destaque na via metabólica, esta proteína também foi investigada. Para tanto realizamos *immunoblotting* utilizando anticorpo anti-p-p70<sup>s6k</sup>. Avaliando o grau de fosforilação pudemos observar uma redução significativa no fígado dos animais tratados com PD, após estímulo insulínico (C:  $100 \pm 3,63\%$  vs PD:  $53,54 \pm 6,66\%$ , p = 0,001308, n=16). No estado basal, houve uma redução da fosforilação no grupo PD, porém sem diferença estatística com o grupo controle (FIGURA 5.C). Estes resultados apresentam semelhança aos resultados obtidos com a proteína AKT neste tecido.

A AMP-activates protein kinase (AMPK) é uma treonina quinase que tem um papel chave na regulação do metabolismo de carboidratos e gorduras, servindo como um sensor metabólico que responde a alterações no equilíbrio energético celular e ao stress. Devido ao sua importância na homeostase orgânica, avaliamos o grau de fosforilação desta proteína. Quando amostras do fígado foram submetidas ao immunoblotting com anticorpo anti-pAMPK, observamos um aumento significante da fosforilação no fígado de animais tratados com PD, tanto estado basal, quanto estimulado pela insulina (Basal: C:  $53,23 \pm 16,66\%$  vs PD:  $121,03 \pm 10,09\%$ , p<0,05, n=8, Estimulado: C:  $100 \pm 9,78\%$  vs PD:  $135,5 \pm 5,69\%$ , p<0,05, n=16). (FIGURA 5 D).

Muitos mecanismos podem contribuir para a desregulação dos mecanismos que controlam o sinal insulínico, incluindo a fosforilação em serina das proteínas IRSs por proteínas quinases tais como a c-jun-N-terminal kinase (JNK). JNK é um membro da família MAPK e pode ser ativada pelo TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  A JNK tem papel como um sensor nas condições de stress celular e inflamatório. A ativação da JNK induz a fosforilação inibitória em serina 307 (Ser <sup>307</sup>) do IRS-1,causando resistência à insulina por inativação da transmissão do sinal insulínico (Prada et al, 2005, Hostamisligil, 2003).Tendo em vista a importância da sua ação metabólica, investigamos também a fosforilação desta kinase. Os resultados de *immunobloting* com anticorpo ant-pJNK em tecido hepático, não mostrou diferença significativa entre os grupos estudados. (FIGURA 5.E)

O NFκB é ativado pelas proteínas IκB e IκBkinase (IKK). A fosforilação da IκB, um importante passo na ativação do NFκB, é mediado peka IKK. A ativação da IKK inicia a fosforilação da IκB em resíduos serina na porção NH2-terminal específica. Uma vez fosforilada, a I $\kappa$ B será degradada e o NF $\kappa$ B liberado para o núcleo onde induzirá a transcrição de genes proinflamatórios (Tak & Firestein, 2001). A ativação desta via sabidamente reduz o sinal insulínico. Por essa razão, estudamos a fosforilação da proteína I $\kappa$ B nos animais do grupo controle e PD. Observamos uma diminuição significativa no grau de fosforilação da I $\kappa$ B nos grupos de animais tratados com PD (C: 67,62 ± 3,68% vs PD: 23,33 ± 3,22%, p<0,05, *n*=8 )(FIGURA 5F).

- A. Fosforilação do IR
  - IP: anti-IR





\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 2 A- Avaliação do grau de fosforilação em turosina do IR em fígado, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras do fígado foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR, e submetidas à immunoblotting com anticorpo antifosfotirosina. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como \*p<0,05.</p>



\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 3 A- Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em fígado , antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de fígado foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti IRS-1, e submetidas à immunoblotting com anticorpo antifosfotirosina. B. Avaliação da associação IRS-1/PI3-K em fígado, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como \*p<0,05.</p>


B. Associação IRS-2/PI3-K

**IP: anti-IRS-2** 

A. Fosforilação do IRS-2

**IP: anti-IRS-2** 

\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 4 A- Avaliação do grau de fosforilação do IRS-2 em fígado , antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de fígado foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti IRS-2, e submetidas à immunoblotting com anticorpo antifosfotirosina. B. Avaliação da associação IRS-2/PI3-K em fígado, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como \*p<0,05.</p>



\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

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



## C. Fosforilação da p70s6k IB: anti-p-p70s6k

## D. Fosforilação da AMPK IB: anti-pAMPK

\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 5 C- Avaliação do grau de fosforilação da p70s6k em fígado , antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de fígado foram submetidas a immunoblotting com anticorpo anti-p-p70s6k D. Avaliação do grau de fosforilação da AMPKem fígado, antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de fígado foram submetidas a immunoblotting com anticorpo ant-pAMPK. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como \*p<0,05.</p>



\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 5 E- Avaliação do grau de fosforilação da JNK em fígado. Amostras de fígado foram submetidas a immunoblotting com anticorpo anti-pJNK F. Avaliação do grau de fosforilação da IκB em fígado. Amostras de fígado foram submetidas a immunoblotting com anticorpo ant-p IκB. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como \*p<0,05.</p>

#### 4.3- Análise das etapas iniciais da ação insulínica no músculo esquelético de ratos

Diferente do tecido hepático, quando se realizou o immunoblotting das amostras de tecido muscular com anticorpo anti-receptor de insulina, o observou-se uma significativa redução no grau de fosforilação do IR após estímulo insulínico (C:100  $\pm$  5,03% vs PD: 31,93  $\pm$  5,23%, p<0,05, *n*=16) (FIGURA6.A).

O grau de fosforilação do IRS-1 não difere no estado basal, porém aumenta significativamente após estímulo insulínico (C:100  $\pm$  9,86% vs PD: 150,1765  $\pm$  8,2636%, p<0,05, *n*=16) (FIGURA 7A). Já a associação IRS-1/PI3-quinase mostrou-se aumentada

após estímulo insulínico no grupo dos animais tratados com PD 153035 em comparação com o grupo controle (C:100  $\pm$  10,19% vs PD: 204,13  $\pm$  10,77%, p<0,05, *n*=16) (FIGURA7.B).

Houve um aumento na fosforilação em tirosina do IRS-2 no estado basal (C:27,25  $\pm$  2,475% vs PD: 96,66  $\pm$  9,39%, p<0,05, *n*=8) e após estímulo insulínico (C:100  $\pm$  8,78% vs PD: 163,09  $\pm$  16,22%, p<0,05, *n*=16) (FIGURA 8.A). Em concordância com os resultados acima, a associação IRS-2/PI3-quinase mostrou-se aumentada nos animais tratados com PD 153035, tanto no estado basal (C:41,78  $\pm$  4,83% vs PD: 83,61  $\pm$  6,41%, p<0,05, *n*=8) como após estímulo insulínico (C:100  $\pm$  13,98% vs PD: 213,18  $\pm$  16,55%, p<0,05, *n*=16) (FIGURA 8.B).

Nós analisamos a fosforilação da AKT/PKB no extrato total de tecido muscular esquelético nos animais do grupo controle e PD. Baseado na imunoreatividade, os animais tratados com PD, apresentaram um aumento da fosforilação da Akt no músculo, após estímulo insulínico agudo (C:100  $\pm$  33,43% vs PD: 284,26  $\pm$  17,20%, p<0,05, *n*=11) e uma tendência a diminuição na fosforilação da AKT no estado basal. (FIGURA9A).

Os resultados do immunoblotting com anticorpo anti-pERK em tecido muscular, mostraram que os grupos tiveram resultados similares, não havendo diferença significativa entre os grupos controle e PD (FIGURA 9.B.)

No estado basal, a fosforilação da proteína p70s6k apresentou-se significativamente reduzida nos animais que receberam PD 153035 (C:22,71 ± 3,76% vs PD: 7,80 ± 0,370%, p<0,05, n=16). No entanto, após estímulo insulínico agudo, houve um aumento significativo da fosforilação da p70s6k no músculo dos animais tratados (C:100 ± 3,35% vs PD: 130,15 ± 3,74%, p<0,05, n=16) (FIGURA9C).

A fosforilação em treonina da AMPK mostrou-se aumentada no grupo tratado com PD, após estímulo insulínico agudo (C:100  $\pm$  8,19 vs PD: 178,30  $\pm$  23,77%, p<0,05, n=16)(FIGURA 9D)

Foi analisado a fosforilação da JNK em tecido muscular dos dois grupos. Foi observado uma diminuição da fosforilação da JNK nos animais tratados com PD, (C:52,51  $\pm$  3,44% vs PD: 20,49  $\pm$  3,58%, p<0,05, *n*=16)(FIGURA 9E)

Em concordância com os dados acima, a fosforilação da proteína I $\kappa$ B, mostrou-se significativamente reduzida nos animais tratados com PD 153035 (C:100 ± 9,2% vs PD: 72,94 ± 5,04%, p<0,05, *n*=16.)(FIGURA 9.F)

### A. Fosforilação do IR

### IP: anti-IR

### **IB: anti-PY**



\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 6 A- Avaliação do grau de fosforilação em turosina do IR em músculo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras do músculo foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR, e submetidas à immunoblotting com anticorpo antifosfotirosina. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como \*p<0,05.</p>



\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 7 A- Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em músculo, antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de músculo foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti IRS-1, e submetidas à immunoblotting com anticorpo antifosfotirosina. B. 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.</p>



\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 8 A- Avaliação do grau de fosforilação do IRS-2 em músculo, antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de músculo foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti IRS-2, e submetidas à immunoblotting com anticorpo antifosfotirosina. B. Avaliação da associação IRS-2/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.</p>

## A. Fosforilação da AKT IB: anti-pAKT

## B. Fosforilação da ERK IB: anti-pERK



\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 9 A- Avaliação do grau de fosforilação da AKT em músculo , antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de músculo foram submetidas a immunoblotting com anticorpo ant-pAKT. **B**. Avaliação do grau de fosforilação das ERKs (1/2) em músculo, antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de músculoforam submetidas a immunoblotting com anticorpo ant-pERK. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como \*p < 0



D. Fosforilação da AMPK

**IB: anti-pAMPK** 

## C. Fosforilação da p70s6k IB: anti-p-p70s6k

\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 9 C- Avaliação do grau de fosforilação da p70s6k em músculo , antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de músculo foram submetidas a immunoblotting com anticorpo anti-p-p70s6k D. Avaliação do grau de fosforilação da AMPKem músculo, antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de músculo foram submetidas a immunoblotting com anticorpo ant-pAMPK. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como \*p<0,05.</p>



\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 9 E- Avaliação do grau de fosforilação da JNK em músculo. Amostras de músculo foram submetidas a immunoblotting com anticorpo anti-pJNK F. Avaliação do grau de fosforilação da IκB em músculo. Amostras de músculo foram submetidas a immunoblotting com anticorpo ant-p IκB. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como \*p<0,05.</p>

#### 4.4- Análise das etapas iniciais da ação insulínica no tecido adiposo de ratos

A densitometria ótica de 3 experimentos demonstrou que houve redução do grau de fosforilação do IR nos animais tratados com PD 153035, após estímulo insulínico agudo (C:100  $\pm$  5,34 vs PD: 35,11  $\pm$  9,19%, p<0,05, *n*=16)(FIGURA 10.A).

A FIGURA 11.A mostra diminuição significativa do grau de fosforilação do IRS-1 após estímulo insulínico em animais tratados com PD (C:100  $\pm$  3,87% vs PD: 55, 40  $\pm$  3,46%, p<0,05, *n*=16).

Quanto a associação da proteína IRS-1 com a enzima PI 3-quinase no tecido adiposo, também foi observado diminuição da associação deste substrato após estímulo insulínico (C:100  $\pm$  12,37% vs PD: 44,58  $\pm$  1,85%, p<0,05, *n*=16.(FIGURA 11.B).

Ainda na avaliação dos substratos do receptor de insulina, encontramos resultados surpreendentes. A FIGURA 12.A mostra aumento significativo no grau de fosforilação em tirosina do IRS-2 após estímulo insulínico nos animais tratados com PD153035 (C:100  $\pm$  8,32% vs PD: 175,84  $\pm$  17,06%, p<0,05, n=16), enquanto que em relação à associação IRS-2/PI 3-quinase, observamos redução no grupo tratado com PD, após estímulo insulínico agudo. (C:100  $\pm$  14,8% vs PD: 42,42  $\pm$  4,66%, p<0,05, n=16 (FIGURA 12.B).

No estado basal houve uma tendência a aumento na fosforilação da AKT no tecido adiposo. No entanto, após estímulo agudo com insulina, observamos uma redução significativa da fosforilação nos animais tratados com PD 153035 (C:100  $\pm$  10,12 vs PD: 38,36  $\pm$  3,51%, p<0,05, *n*=11) (FIGURA 13.A).

A avaliação do grau de fosforilação das ERKs (1/2) neste tecido foi semelhante ao tecido muscular, os resultados do grupo controle e PD foram similares no estado basal e estimulado com insulina (FIGURA 13.B).

Os resultados em relação a proteína p70s6k neste tecido estão semelhantes aos da proteína AKT, ou seja, sem alteração significativa no estado basal, porém após estímulo agudo com insulina, observamos uma redução significativa da fosforilação nos animais tratados com PD 153035(C:100  $\pm$  4,41 vs PD: 57,79 $\pm$  4,49%, p<0,05, *n*=16.) (FIGURA 13.C).

A FIGURA 13.D mostra que o grau de fosforilação da AMPK aumentou significativamente no tecido adiposo dos animais tratados com PD, após estímulo insulínico (C:100  $\pm$  21,87 vs PD: 371,48  $\pm$  27,59%, p<0,05, *n*=16).

A FIGURA 13.E mostra que houve redução significativa do grau de fosforilação da JNK (C:60,51 ± 8,28% vs PD: 29,10 ± 2,549%, p<0,05, n=16).De acordo com os resultados acima, a proteína I $\kappa$ B apresentou uma redução significativa no grau de fosforilação nos animais tratados com PD 153035 (C:100 ± 8,47 vs PD: 63,88 ± 7,53%, p<0,05, n=16)(FIGURA 13.F).

### A. Fosforilação do IR

**IP: anti-IR** 

**IB: anti-PY** 



\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 10 A- Avaliação do grau de fosforilação em turosina do IR em tec. adiposo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Amostras do tec. adiposo foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR, e submetidas à immunoblotting com anticorpo antifosfotirosina. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como \*p<0,05.</p>



\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 11 A- Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em tec. adiposo, antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de tec. adiposo foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti IRS-1, e submetidas à immunoblotting com anticorpo antifosfotirosina. B. Avaliação da associação IRS-1/PI3-K em tec. adiposo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como \*p<0,05.</p>



\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 12 A- Avaliação do grau de fosforilação do IRS-2 em tec. adiposo, antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de tec. adiposo foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti IRS-2, e submetidas à immunoblotting com anticorpo antifosfotirosina. B. Avaliação da associação IRS-2/PI3-K em tec. adiposo, antes (-) e após (+) estímulo agudo com insulina. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como \*p<0,05.</p>



A. Fosforilação da AKT IB: anti-p AKT

B. Fosforilação da ERK IB: anti-p ERK

\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 13 A- Avaliação do grau de fosforilação da AKT em tec. adiposo, antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de tec. adiposo foram submetidas a immunoblotting com anticorpo ant-pAKT. B. Avaliação do grau de fosforilação das ERKs (1/2) em tec. adiposo, antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de tec. adiposo foram submetidas a immunoblotting com anticorpo ant-pERK. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como \*p<0</p>

# C. Fosforilação da p70s6k IB: anti-p-p70s6k

# D. Fosforilação da AMPK IB: anti-p AMPK



\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 13 C- Avaliação do grau de fosforilação da p70s6k em tec. adiposo, antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de tec. adiposo foram submetidas a immunoblotting com anticorpo anti-p-p70s6k D. Avaliação do grau de fosforilação da AMPKem tec. adiposo, antes (-) e após (+) estímulo insulínico agudo com insulina. Amostras de tec. adiposo foram submetidas a immunoblotting com anticorpo ant-pAMPK. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como \*p<0,05.</p>



\* p<0,05 no estado basal (-) \*\* p<0,05 após estímulo insulínico agudo (+)

Figura 13 E- Avaliação do grau de fosforilação da JNK em tec. adiposo,. Amostras de tec. adiposo foram submetidas a immunoblotting com anticorpo anti-pJNK F. Avaliação do grau de fosforilação da IκB em tec. adiposo. Amostras de tec. adiposo foram submetidas a immunoblotting com anticorpo ant-p IκB. Os valores são expressos como % média ± EPM, e a significância expressa como \*p<0,05.</p>

# 5- DISCUSSÃO

A molécula PD153035 foi sintetizada como uma de uma série de compostos quinazolínicos avaliados como inibidores da atividade tirosina quinase. PD 153035 inibe a atividade tirosina quinase do receptor EGF em concentrações de  $29 \pm 5,1$  pM. PD153035 mostrou-se um potente inibidor enzimático.

Derivados quinazolínicos tiveram grande progresso no combate das doenças proliferativas como o câncer, baseados principalmente na propriedade inibidora de tirosina quinases destes compostos. Hoje são conhecidos fármacos, com atividade antineoplásica, que melhoraram o metabolismo glicídico (VENERI et al, 2005).

No presente estudo avaliamos o efeito do compostos quinazolínico PD 153035, com propriedades inibidoras de tirosina quinase, no metabolismo da glicose e sinalização da insulina, em ratos normais, submetidos a tratamento crônico por 7 dias.

A insulina é o principal hormônio regulador do metabolismo de nutrientes. Em resposta ao aumento da concentração sérica de glicose sanguínea, as células  $\beta$  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, inibe a glicogenólise e a neoglicogênese. Nos tecidos periféricos (músculo e gordura), a insulina estimula a captação, armazenamento e utilização de glicose. Somando-se a estes efeitos principais, a insulina também estimula o metabolismo da 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 insulina inicia suas ações metabólicas e promotoras de crescimento quando se liga à subunidade  $\alpha$  extracelular de seu receptor tetramérico, estimulando assim a capacidade tirosina quinase na subunidade  $\beta$ . Isto leva a fosforilação em tirosina de substratos endógenos intracelulares. Estas proteínas citoplasmáticas são coletivamente

chamadas substratos do receptor de insulina (IRSs), e o melhor estudado até o momento é o 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 ativaçãoda 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 (PI3-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 da 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 e 2). Esta via regula principalmente efeitos mitogênicos da insulina (PEARSON et al., 2001 a e b). A insulina aumenta a captação de glicose nas células, em parte pela translocação do GLUT 4 do compartimento intracelular até a membrana plasmática no músculo e tecido adiposo. Abordagens experimentais distintas levaram a conclusão que PI 3-quinase é necessária para a translocação do GLUT 4 (CHEATHAM et al., 1994; OKADA et al., 1994).

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 artificios 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* (figado, músculo e tecido adiposo) 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-1e IRS-2, bem como a associação destes substratos com a PI 3-quinase, e a fosforilação em serina/treonina da AKT, ERKs (1e2),p70s6k, AMPK, JNK e I $\kappa$ k $\beta$ - $\alpha$  em animais tratados com inibidor de tirosina-quinase PD 153035.

Os animais que receberam o composto PD153035 por 7 dias exibiram características metabólicas de melhora da sensibilidade à insulina. A ação da PD 153035 leva a uma situação caracterizada por níveis normais de insulina plasmática e sem alterações significativas nos níveis glicêmicos durante o GTT. Mais importante, após e administração oral de PD153035, a melhora na sensibilidade a insulina foi demonstrada, por um aumento na velocidade de desaparecimento de glicose durante o ITT. O mecanismo molecular responsável pela melhora na sensibilidade de insulina induzida por PD153035 não está completamente entendido.

Observamos que o tratamento com PD 153035 por sete dias em ratos, induziu um aumento na fosforilação em tirosina do IR, IRS-1 e IRS-2 em tecido hepático, sendo que nos IRSs houve um aumento da fosforilação basal e após insulina, enquanto o IR apresentou um aumento da fosforilação significativo associado ao estímulo insulínico. A associação dos IRSs com a enzima PI 3-quinase foi igualmente aumentada Esses dados demonstram que a droga modulou positivamente o sinal insulínico, nas fases iniciais da transdução do sinal no figado. Interessante, que observamos neste tecido, uma redução de cerca de 40% na fosforilação da AKT após estímulo insulínico, nos animais tratados com PD 153035, em relação aos animais controles. Concomitantemente observamos um aumento significativo da fosforilação da AMPK, sugerindo que uma via independente da insulina estaria interferindo na manutenção da homeostase glicídica no figado. No tecido hepático foi observado uma redução significativa da fosforilação da IkB no grupo tratado e controle, porém o grau de fosforilação da JNK apresentou-se inalterado nos dois grupos estudados. Esses dados sugerem que a PD153035 não estimulou a fosforilação de proteínas de resposta inflamatória no figado de animais tratados com a droga, o que provavelmente contribuiu para a melhora do sinal insulínico neste tecido.

Não houve alteração no grau de fosforilação das ERKs (1e2), quando comparado os dois grupos, após estímulo insulínico agudo, sugerindo que a via mitogênica de transmissão do sinal da insulina é preservada em tecido hepático de animais PD.

A redução na ativação da AKT, parece ser um efeito do PD 153035, independente dos IRSs e da PI 3-quinase.

Como a AKT é importante para as ações metabólicas da insulina no figado, e esta serina-quinase estava reduzida em animais tratados com PD 153035, é provável que a melhora da sensibilidade à insulina nestes animais seja independente da via IRS/PI3K/AKT, e provalvelmente dependente de outras vias como, p.ex., a AMPK.

Animais tratados com PD 153035 apresentaram um aumento significativo da fosforilação em tirosina do IRS-1 no músculo após estímulo insulínico agudo. O aumento da fosforilação do IRS-1 foi acompanhada pelo pelo aumento da associação IRS-1/PI3-quinase neste tecido. Observou-se também um aumento significativo da fosforilação da AKT. Esses achados podem ter significância biológica, sabendo-se que a diminuição na fosforilação do receptor de insulina, observada nos animais tratados, é correlacionada com a resistência à insulina. A insulina aumenta a captação de glicose no músculo, em parte devido a translocação do GLUT4 do compartimento intracelular para a membrana plasmática.. A PI 3-quinase é necessária para a translocação do GLUT 4 após o estímulo insulínico (CHEATHAM et al., 1994;OKADA et al., 1994). A AKT tem sido relacionada com a regulação da translocação de GLUT 4, 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). Deste modo, a via IRS-1/PI3-K/Akt parece ser a responsável pela a ativação do transporte de glicose no músculo, bem como síntese de glicogênio . E este aumento na ativação desta via,

no músculo dos animais tratados com PD153035, pode ter um papel fundamental na melhora da sensibilidade a insulina nesses animais.

Semelhante ao fígado, foi observado que a via mitogênica permaneceu preservada, pois não houve alteração na fosforilação das ERKs (1/2), inclusive no estado basal.

A fosforilação em serina das proteínas IRSs por serinas quinases como a c-jun N terminal quinase (JNK) and  $I\kappa K\beta$  podem modular negativamente o sinal da insulina. A inibição destas quinases pode melhorar a ação da insulina. Recentemente JNK tem sido associada a regulação do sinal insulínico por vários estudos (BENETT et al, 2003, PRADA et al, 2005). Esses estudos sugeriram que a JNK pode bloquear o sinal insulínico pela fosforilação do IRS-1 em serina 307, e essa fosforilação leva a inibição das função do IRS-1. O ΙκBα é uma proteína da via do NFκB. O NFκB é um fator de transcrição estimulado por citocinas inflamatórias. Quando ativado, sua resposta modula fosforilando-o em serina e bloquenado sua negativamente o IRS-1, ação (HOTAMISLIGIL, 2003). A proteína IκBα atua nesta via, formando um complexo com o NFκB no citoplasma.. Quando fosforilada pela proteína IKKβ após a ativação da via inflamatória, a I $\kappa$ B $\alpha$  é degradada e se separa do NF $\kappa$ B, permitindo que ele entre no núcleo e atue na expressão de genes de resposta inflamatória (TAK & FIRESTEIN, 2001). Nossos resultados mostraram uma redução significativa na fosforilação IkBa nos animais tratados com PD 153035, sugerindo uma redução na atividade do IKKβ. Assim, no tecido muscular, os resultados mostraram que a droga PD 153035 inibiu duas serinas quinases IKKβ e JNK, envolvidas na regulação da sinalização da insulina., sugerindo ser este um dos mecanismos que melhoram o sinal insulínico neste tecido.

Recentemente observações clínicas sugeriram que inibidores da atividade tirosina quinase podem melhorar o controle do diabetes, provavelmente pelo aumento da sensibilidade à insulina (VENERI et al, 2005). Esses estudos estão de acordo com os nossos resultados. Nesses estudos prévios, o mecanismo sugerido para o efeito de melhora da sensibilidade à insulina e/ou redução da aterosclerose, promovido pelos inibidores tirosina quinase, é atraves do receptor PDGF, provavelmente pela redução da atividade da mTOR.

A mTOR é também uma serina quinase apta a fosforilar o IRS em serina, induzindo resistência à insulina., e a sinalização da mTOR pode induzir a fosforilação da p70s6k como já foi descrito (JACINTO & HALL,2003). Em animais tratados com PD 153035 havia uma redução na fosforilação basal da p70s6k em figado e músculo sugerindo que esta droga inibe a atividade da mTOR, no estado basal . Contudo, depois do estímulo insulínico, a atividade da mTOR era aumentada em animais tratados com PD 153035,sugerindo que a droga não tem efeito direto sobre a atividade da mTOR, mas provavelmente possui um efeito indireto sobre ela através de outros receptores como o PDGF ou EGF.

O papel global do tecido adiposo branco na homeostase da glicose não é claro. Estudos com clamp euglicêmico hiperinsulinêmico indicam que o tecido adiposo é responsável po somente 3%-5% da captação de glicose (JAMES et al, 1985). Este tecido depende da atividade do GLUT4 para captação de glicose e, estudos já demonstraram que a inativação do gene do GLUT4 causa intolerância à glicose, hiperinsulinemia, e induz alterações secundárias na ação da insulina em músculo e figado (ABEL et al,2001)

O tecido adiposo mostrou uma regulação distinta e bastante interessante em relação aos demais tecidos estudados. A administração oral por sete dias de PD 153035 reduziu significativamente a fosforilação do IR e IRS-1 após estímulo agudo com insulina, entretando induziu aumento na fosforilação do IRS-2. Houve redução não significativa na associação destes substratos com a PI 3-quinase, tanto no estado basal como após estímulo insulínico agudo. Foi observado também uma redução significativa da fosforilação da AKT.

De acordo com os nossos resultados, a droga PD 153035 induziu uma resistência à insulina seletiva no tecido adiposo, mas isto não afetou o metabolismo da glicose, como um todo. Sabe-se que além da regulação do transporte de glicose no tecido adiposo, a insulina exerce outros importantes papéis neste tecido, tais como lipogênese, inibição da lipólise, e regulação da secreção de ACRP 30 (adiponectina). Os animais tratados com PD 153035 apresentaram significativa perda de peso corporal e apresentaram redução importante da gordura corporal (mesentérica e epididimal). Este fenótipo incomum encontrado e as característica metabólicas observadas nos animais tratados com PD 153035, estão em concordância com o estudo prévio, feito por BLÜHER et al (2002), que

mostraram que animais knockout para o receptor de insulina tecido adiposo-específico (*FIRKO*), apresentaram redução da massa adiposa, sensibilidade normal à insulina e homeostase glicídica normal. Nos animais FIRKO, foi observado que a perda do receptor de insulina no tecido adiposo, produziu uma proteção quase completa contra a piora da tolerância à glicose nesses animais.

Os nossos resultados demonstraram que o tecido adiposo dos animais tratados com PD153035 apresentaram aumento de secreção de ACRP 30 (adiponectina). ACRP 30 é a proteína mais abundantemente secretada pelos adipócitos e tem sido apontada como uma substância que melhora a sensibilidade à insulina em animais normais e resistentes à insulina (YAMAUCHI et al, 2001; BERG et al, 2001). Estudos sugerem que a insulina é o regulador negativo da expressão da ACRP 30 em adipócitos (FASSHAUER et al, 2002). Secreção aumentada de ACRP 30 pode ter ajudado a compensar a resistância à insulina específica no tecido adiposo dos animais tratados com PD 153035, e em parte, explicar o fenótipo observado nesses animais com sensibilidade à insulina e tolerância à glicose normais

A via mitogênica (ERK 1/2) permaneceu com suas funções preservadas, em concordância com os resultados dos demais tecidos estudados.

No tecido adiposo dos animais tratados com PD 153035 observou-se uma redução significativa da fosforilação das serinas-quinases JNK e I $\kappa$ k $\beta$ . A atividade anti-inflamatória , modulada pela droga PD 153035, especialmente neste tecido, é de suma importância, visto que já se conhece o papel que essas proteínas exercem na indução da resistência à insulina (BENETT et al, 2003; PRADA et al, 2005;HOSTAMISLIGIL, 2003).

Foi observado também um aumento na fosforilação da proteína AMPK após estímulo insulínico, semelhante ao observado anteriormente no fígado dos animais PD. A AMPK é uma proteína que regula o metabolismo energético do organismo. Quando ativada, aumenta a captação de glicose, estimula a oxidação de ácidos graxos, inibe a produção de glicose e regula a secreção de insulina. Deste modo, a AMPK exerce um efeito significante no perfil metabólico global. É um sensor metabólico ativado por fatores (p.ex., stress, hipóxia) que aumentam a relação AMP:ATP. A ACRP 30 (adiponectina)

atua também na regulação da homeostase energética. A adiponectina ativa a AMPK nos tecidos periféricos (RUTTER et al, 2003), e provavelmente o aumento expressivo da fosforilação da AMPK nos tecidos estudados seja produzido pela secreção aumentada de adiponectina.

A regulação tecido-específica das vias de transmissão do sinal da insulina em ratos tratados por 7 dias com a droga PD 153035, contribui para explicar mecanismos que podem ser alvos de estudos para a prevenção e/ou tratamento da resistência à insulina., e finalmente, que a droga PD 153035 é uma nova opção de fármaco a ser estudado e usado no tratamento do diabetes mellitus do tipo 2 e outras situações de resistência à insulina.

Sumariamente, o tratamento com PD 153035 por 7 dias aumentou a fosforilação em tirosina do IR, IRS-1 e IRS-2 no figado, apesar da fosforilação da AKT apresentar-se reduzida neste tecido. No músculo dos animais tratados com PD 153035 observamos que a droga melhora a sinalização da insulina, provavelmente pela redução da atividade das serinas quinases JNK, IKKβ e mTOR. No tecido adiposo a droga induziu resistência à insulina, acompanhada de redução no ganho de peso e redução da adiposidade visceral, possivelmente pelo aumento da secreção de adiponectina pelos adipócitos.

Em conclusão, os resultados do nosso estudo demonstram que o tratamento com PD 153035 aumentou a sensibilidade à insulina, por aumento da adiponectina, aumento da AMPK em figado, músculo e adiposo, e aumentada via IRS/PI3K/AKT em músculo.

# 6- CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram que:

- O tratamento com PD 153035 por 7 dias induziu uma melhora na sensibilidade à insulina nos animais tratados em comparação aos controles.
- O PD 153035 tem efeito heterogêneo sobre o IRS-1 e IRS-2, apresentando regulação tecido específica.
- O tecido hepático modulado pela PD153035 apresentou redução da fosforilação da Akt.
- PD 153035 melhora a sensibilidade à insulina e sinalização da insulina no músculo, provavelmente pela redução da atividade de serinas quinases como JNK, IkKβ e mTOR.,
- A PD153035 induziu resistência à insulina no tecido adiposo, acompanhado por redução da massa adiposa e do fenômeno inflamatório associado.
- O tecido adiposo modulado pela PD 153035 aumentou a secreção de adiponectina, o que justificaria o fenótipo dos animais tratados com a droga e a sinalização apresentada nos experimentos, com aumento em todos os tecidos da AMPK.
- A via mitogênica, através das ERKS (1/2) não sofreu alteração em nenhum tecido estudado dos animais PD 153035.

Conclusão

# 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel ED, peroni OD, Kim JK, Kim Y-B, Boss O, Hadro E, et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. Nature 2001; 409: 729-733.

Benett BL, Satoh Y, Lewis AJ. JNK: a new target for diabetes. Curr Op Pharm 2003; 3: 420-425

Bevan P. Insulin Signalling. J Cell Sci 2001; 114 (8): 1429-1430.

Birnanbaum M. The insulin-sensitive glucose transporter. Int Rev Cytol 1993; 137:239-297.

Bolognesi M.L., Marucci G, Angeli P, Buccioni M, Minarini A, Rosini M, Tumiatti V, Melchiorre C. Analogues of prazosin that bear a benextramine-related polyamine backbone exhibit different antagonism toward a1-adrenoreceptor subtypes. J Med Chem 2001; 44: 362-371.

Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. Developmental Cell 2002; 3: 25-38.

Bridges AJ, Zhou H, Cody DR, Rewcastle GW, McMichael A, Showalter HDH, Fry D W, Kraker AJ, Denny WA. Tyrosine Kinase Inhibitors. 8. An Unusually Steep Structure-Activity Relationship for Analogues of 4-(3-Bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (PD 153035), a Potent Inhibitor of the Epidermal Growth FactorReceptor. J. Med. Chem 1996; 39(1); 267-276.

Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR.. Phosphatidylinositol 3kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporte translocation. Mol Cel Biol 1994; 14: 4902-4911.

Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and insulin signaling network. Endocr Rev 1995; 16(2): 117-142.

Clarke JF, Young PW, Yonezawa K, Kasuga M, Holman GD. Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. Biochem J 1994; 300: 631-635.
Cowart M., Lee CH., Gfesser GA., Bayburt EK., Bhagwat SS, Stewart AO. Structureactivity studies of 5-substituted pyridopyrimidines as adenosine kinase inhibitors. Bioorg Med Chem Lett 2001; 11(1):83-86.

Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. J Biol Chem 1999; 274: 1865-1868.

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal ergulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Biochem Biophys Res Commun 2002; 25: 1084-1089.

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 1985; 82: 8634-8637.

Ferrannini E, Galvan AQ, Gastaldelli A, Camastra S, Sironi AM, Toschi E, et al. Insulin: new roles for an ancient hormone. Eur J Clin Inv 1999; 29(10): 842-852.

Folli F, Saad MJA, Backer JM, Kahn CR. Insulin stimulation of PI 3-kinase activity and association with IRS-1 in liver and muscle of intact rat. J Biol Chem 1992; 267: 22171-22177.

Fry DW, Kraker AJ, McMichael A, Ambroso LA, Nelson JM, Leopold WR, Connors RW, Bridges AJ. A specific inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Science 1994; 265(5175):1093-1095.

Hotamilisgil GS. Inflammatory pathways and insulin action. International J Obesity 2003; 27: S53-S55

Hunter SJ, Garvey WT. Insulin action and insulin resistance: disease involving defects in insulin receptors, signal transduction, and glucose transport effector system. Am J Méd. 1998; 105: 331-345.

Jacinto E, Hall MN. TOR signalling in bugs, brain and brawn. Mol Cel Biol 2003; 4: 117-126.

James DE, Burleigh KM, Kraegen EW. Time dependence of insulin action in muscle and adipose tissue in rat in vivo.an increasing response in adipose tissue in time. Diabetes 1985; 34: 1049-1054.

Kahn CR. Insulin resistance, insulin sensitivity, and insulin inresponsiveness: a necessary distinction. Metabolism 1978; 27(suppl.2): 1893-1902.

Kahn CR, White MF, Shoelson SE, Backer JM, Araki E, Cheatham B, et al. The insulin receptor and its substrate: molecular determinants of early events in insulin action. Recent Progress in hormone Research 1993; 48: 291-339.

Kohn AD, Summers SA, Birbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucoses uptake and glucose transportes 4 translocation. J Biol Chem 1996; 271: 31372-31378.

Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henrikssoon H. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. Diabetes 1998; 47: 1281-1286.

Kathuria S, Hartman S, Grunfeld C, Ramachandran J, 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 1986; 83: 8570-8574.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685

Lassila M, Allen TJ, Cao Z, Thallas V, Jandelleit-Dahm KA, Candido R,Cooper ME. Imatinib attenuates Diabetes-associated atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 935-942.

Levitzki A.. Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. Pharmacol Ther 1999; 82(2-3):231-239.

Marin RM. Efeitos de compostos quinazolínicos com propriedades inibidoras de tirosina quinases em corações isolados de ratos [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2003.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment, insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. Diabetologia 1985; 28: 412-419

Meyerovitch J, Backer JM, Kahn CR. Hepatic phosphotyrosine phosphatase activity and its alterations in diabetics rats. J Clin Invest 1989; 84: 976-983.

Okada T, Kawano Y, Sashiara T, Hazeki O, Ui M. Essential role of phosphatidylinositol 3kinase in insulin induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with selective inhibitor wortamanin. J Biol Chem 1994; 269: 3568-3573.

Pearson G, Robinson F, Gibson TB, XU BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocrine Reviews 2001 (a.); 22: 153-183.

Pearson LL, Castle BE, Kehry MR. CD40-mediated signaling in monocytic cells: upregulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Int Immunol 2001 (b); 13: 273-283.

Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. J Clin Invest 2000; 106 (2): 165-169.

Prada PO, Zechin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Amaral MEC, Höer NF, Boschero AC, Saad MJA. Western diet modulates insulin signaling, c-jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1<sup>ser307</sup> phosphorylation in a tissue-specific fashion. Endocrinology 2005; 146 (3): 1576-1587

Rewcastle G W, Denny WA., Bridges A J, Zhou H., Cody D R., Fry D W. Tyrosine kinase inhibitors. 5. Synthesis and structure-activity relationships for 4-[(phenylmethyl)amino]- and 4-(phenylamino)quinazolines as potent adenosine 5'-triphosphate binding site inhibitors of the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor. J Med Chem 1995; 38(18):3482-3487.

Rocco AP, Velho JA, Marin RM, Filho LAR, Vercesi AE, Rittner R, Franchini KG. High performance liquid chromatography analysis of a 4-anilinoquinazoline derivative (PD 153035), a specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in rat plasma. J Chromatogr B 2005; 817: 297-302.

Rothenberg PL, White MF, Kahn CR. The insulin recepptor tyrosine kinase. In: Cuatrecasas P, Jacobs S, eds. Handbook of experimental Pharmacology, vol. 92. Berlin: Springer-Velag ;1990. p.209-243.

Rutter GA, Xavier GS, Leclerc I. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homoeostasis. Biochem J 2003; 375: 1-16.

Saad MJA, Pimenta WP, Paccola GMGF. Effect of glucose ingestion on peripheral glucose metabolism in normal man. Diabetes & Met 1989; 15: 5-10.

Saad MJA, Folli F, Kahn J, Kahn CR. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. J Clin Invest 1993; 92: 2065-2072.

Saad MJA. Molecular mechanisms of insulin resistance. Braz J Med Biol Res 1994; 27: 941-957.

Scott AM, Atwater I, Rojas E . A method for the simultaneous measurements of insulin release and  $\beta$ -cell membrane potencial in single mouse islets of Langerhans. Diabetologia 1981; 21: 470-475

Sun XJ, Rothenberg PL, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, et al. Structure of insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transducction protein. Nature 1991; 325: 73-77.

Sun XJ, Miralpeix M, Myers MJr, Glasheen E, Backer JM, Kahn CR, White MF. Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. J biol Chem 1992; 267: 22662-22672.

Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Glasheen E, et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. Nature 1995; 337: 173-177.

Sykiotis GP, Papavassiliou AG. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for reversal of insulin resistance. Mol Endocrinol 2001; 15 (11): 1864-1869.

Tak PP, Firestein GS . NFkB: a key role in inflammatory diseases. J Clin Invest 2001; 107: 7-11

Takase Y, Saeki T, Watanabe N, Adachi H., Souda S, Saito I.. Cyclic GMP phosphodiesterase inhibitors. 2. Requirement of 6-substitution of quinazoline derivatives for potent and selective inhibitory activity. J Med Chem 1994; 37, 2106-2122.

Ueno M, Bezerra RMN, Silva MS, Tavares DQ, carvalho CR, Saad MJA. A high-frutose diet induces changes in pp185 phosphorylation in muscle and liver of rats. J Med Biol Res 2000; 33: 1421-1427.

Ukita T, Nakamura Y, Kubo A, Yamamoto Y, Moritani Y, Saruta K, et al. Novel, potent, and selective phosphodiesterase 5 inhibitors: synthesis and biological activities of a series of 4-aryl-1-isoquinolinone derivatives. J Med Chem 2001; 44(13):2204-2218.

Veneri D, Massimo F, Bonora E. Imatinib and regression of type 2 diabetes [correspondence]. N Engl J Med 2005; 352(10) 1049-1050.

Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. J Clin Invest 1999; 103(7): 931-943.

Watanabe N, Adachi H, Takase Y, Ozaki H., Matsukura M.. Miyazaki K,et al. 4-(3-Chloro-4-methoxybenzyl)aminophthalazines: synthesis and inhibitory activity toward phosphodiesterase 5. J Med Chem 2000; 43(13):2523-9.

Watson RT, Pessin JE. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. Recent Prog Horm 2001; 56: 175-193.

White MF, Kahn CR. The insulin signalling system. J Biol Chem 1994; 269: 1-4.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reserves insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. Nat Med 2001; 7: 941-946.

Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. From receptor to effector: insulin signal transduction in skeletal muscle from type II diabetic patients. Ann NY Acad Sci 2002; 967: 120-134.



## ANEXO 1

# PD153035 (BROMOANILINOQUINAZOLINE), A TYROSINE KINASE INHIBITOR, IMPROVES INSULIN SENSITIVITY AND INSULIN SIGNALING IN MUSCLE

Christine Marinho de Lemos<sup>a</sup>, Patykarol Picardi<sup>a</sup>, Sivana Ap. Rocco<sup>a</sup>, Rodrigo Miguel Marin<sup>a</sup>, Patrícia Oliveira Prada<sup>a</sup>, Everardo M. Carneiro<sup>\*</sup>, Kléber Gomes Franchini<sup>a</sup>, Mário J. A. Saad<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Internal Medicine and \*Physiology and Biophysics, State University of Campinas, Brazil.

Correspondence to: Mário J.A. Saad, MD

Departamento de Clínica Médica

FCM-UNICAMP

Campinas, SP, Brasil, 13081-970

Fax: +55 19788 895

## ABSTRACT:

It has been recently demonstrated that long-term treatment with some of tyrosine kinase inhibitor (TKI) drugs might favorably act at steps controlling not only cell growth and replication but also physiological functions responsible for maintaining glucose homeostasis. However, the direct effects of PD 153035, a TKI, on the regulation of the early steps of insulin action are not known. In the present study, we investigated the effect of 7 days PD 153035 administration on insulin sensitivity and insulin signaling in muscle of rats. No differences in fasting plasma glucose levels were observed in animals treated with PD 153035. Plasma glucose disappearance rates were higher in treated animals. Insulin-induced IR tyrosine phosphorylation showed significantly reduced in these animals, however treating rats with PD153035 significantly increased the insulin-induced IRS-1 phosphorylation in the muscle. The increased phosphorylation of IRS-1 was accompanied by increase in IRS-1/PI3-kinase association and Akt and p70s6k phosphorylation were higher in treated animals after insulin stimulation. Reduced phosphorylation of serine-kinases as c-jun N terminal (Jnk) and I $\kappa$ k $\beta$  was observed. These data suggest that PD 153035 improves insulin sensitivity and TKIs are the new drug targets for type 2 diabetes.

### Introduction

Emerging knowledge of potencial anticancer agents that target the intracellular tyrosine kinase region has shown very promising.(1-3). It has been been recently demonstrated that long-term treatment with some of these drugs might favorably act at steps controlling not only cell growth and replication but also physiological functions responsible for maintaining glucose homeostasis. However, the molecular mechanisms that account for this effect on glucose metabolism is unknown.

Quinazoline-derived molecules are among the most active Tirosine Kinase Inhibitors with the highest selectivity for the EGFR disclosed so far. One of the first agents in this class, 4-N-(3'-bromo-phenyl)amino-6,7-dimetoxyquinazoline (PD153035)(fig.1), a reversible ATP competitor with a potent inhibitory effect in vitro but much less activity in vivo (4-7).



Fig. 1. Chemical structures of PD153035

PD153035 have been shown to possess highly potent and selective inhibitory activity against tyrosine-kinase receptors, which might explain most of it's pharmacological properties (4, 8-9). PD153035 inhibited the EGFR tyrosine kinase com 25 pM inhibition constant (10). PD153035 rapidly supressed autophosphorylation of EGFR at low nanomolar concentrations in fibroblasts or human epidermoid carcinoma cells and selectively blocked EGF-mediated cellular processes including mitogenesis, early gene expression, and oncogenesic transformation (4). PD153035 might inhibited other purified tirosine kinases like insulin receptor, and supposily impair insulin signaling. The suggestion contrasts with the observations that some tyrosine kinase inhibitor improve insulin action and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes (1-2).

Insulin signals through a heterotetrameric transmembrane receptor belonging to the family of receptors that bear intrinsic tyrosine kinase activity (11). In skeletal muscle and white adipose tissue (WAT), glucose uptake is mostly dependent on insulin activation of its signalling pathway (12). To date, several intracellular branches of insulin-signalling pathway have been caracterized at molecular level (13). Most studies agree that activation of the pathway IRS-phosphatidylinositol 3(PI3)-kinase-Akt1 is a necessary event in order to achieve full stimulation of glucose transport apparatus in muscle and fat (14). In order to gain insight in this possible contradiction an inhibitor of tyrosine kinase probably including insulin receptor, that improved diabetes control, we investigated the effect of 7 days PD 153035 administration on insulin sensitivity and insulin signaling in muscle of rats.

## Antibodies, chemicals and buffers

Reagents for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Hepes, phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, and bovine serum albumin (fraction V) were from Sigma (St Louis, MO, USA). Protein A-Sepharose 6MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden), 125I-protein A was from ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA, USA), and nitrocellulose paper (BA85, 0.2 mm) was from Amersham (Aylesbury, UK). Sodium thiopental (Amytal) and human recombinant insulin (Humulin R) were from Lilly (Indianapolis, IN, USA). Polyclonal anti-phosphotyrosine antibodies were raised in rabbits and affinity-purified on phosphotyramine columns. Anti-IR, anti-IRS1, anti-IRS2 anti-pERK (a pERK/Tyr 204, detecting pERK42 and pERK44), anti-phospho JNK and anti-phospho I $\kappa$ B- $\alpha$  were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Rabbit anti-p85-PI3-kinase antiserum and anti-phospho [Ser473]Akt1 were from UBI (Lake Placid, NY, USA). Anti-AMPK- $\alpha$  and anti-physpho p70s6k [Thr421/Ser424] were from Cell Signalling Technology Inc., MA, USA) Enzymatic colorimetric .Insulin was determined by RIA (15). The compound PD153035 (16) and its vehicle (propylenoglicol-ppl) were kindly supplied by Doctors Kléber Gomes Franchini, Silvana Aparecida Rocco, Marcelo Mantovani M. de Azevedo e Rodrigo Miguel Marin (Cardiovascular Phisiopathology Lab., Department. of Internal Medicine, School of Medicine, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP)

### Animals and protocols

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) (6-9 weeks old, 200–300 g) obtained from the University of Campinas Animal Breeding Center were used in the experiments. The investigation followed the University guidelines for the use of animals in experimental studies and conforms to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85–23 revised 1996). The animals were maintained on 12 h:12 h artificial light–dark cycles and housed in cages with food (standard rodent chow ) and water provided *ad libitum*. The animals were randomly divided into two groups: animals treated by PD153035 and animals who recieved propylenoglicol (Ecibra, Labcenter) as control. The animals were dosed orally by gavages with 30mg/Kg body weight of PD153035 . This dose corresponded to 1 ml of the drug. The corresponding volume was given of PPL to the animals control. For tissue extraction (at day 7 of the experimental protocol), rats were anaesthetized by intraperitoneal injection of sodium amobarbital (15 mg (kg body weight)1), and the experiments were performed after the loss of corneal and pedal reflexes. Following experimental procedures the rats were killed under anaesthesia following the recommendations of the NIH publication No. 85–23.

#### Plasma insulin Concentration

Insulin was detected on experimental day 3 by RIA, utilizing a guinea-pig anti-rat insulin antibody and rat insulin as standard (15), on samples collected at time 0 and 2 h, and on day 3 of the experimental period.

#### Oral glucose tolerance test (GTT)

An oral GTT was performed on experimental day 3, after an overnight fast; the rats were anaesthetized as described above. After the collection of an unchallenged sample (time 0), a solution of 20 % glucose (2g (kg body weight)-<sup>1</sup>) was administered into the stomach of the rats through a gastric catheter. Blood samples were collected at 15, 30, 60, and 120 min from the tail tip, for determinations of glucose and insulin concentrations.

### Insulin tolerance test (ITT)

An intravenous (I.V.) ITT was performed on experimental day 3. Food was withdrawn 6 h before the test and the rats were anaesthetized as described above. Insulin (6 mg) was injected through the tail vein and blood samples were collected at 5, 10, 15, 20,

25 and 30 min from the tail tip for serum glucose determination. The constant rate for glucose disappearance (*K*itt) was calculated using the formula  $0.693/t\hat{1}$ . The half-time of glucose decay,  $t\hat{1}$ , was calculated from the slope of the least-square analysis of plasma glucose concentrations during the linear decay phase (17).

## Evaluation of insulin action by homeostatic model analysis (HOMA)

Homeostatic model analysis (HOMA) was calculated employing the formula insulin/22.5exp(-ln glucose) (18), using insulin and glucose levels determined at day 8 of the experimental protocol.

# Tissue extraction, immunoblotting and immunoprecipitation

The abdominal cavity of anaesthetized rats was opened and the rats received an infusion of insulin (0.2 ml, 10<sup>-6</sup>M) or saline (0.2 ml) through the porta vein. After different intervals (described under Results), fragments (3.0 mm w 3.0 mm w 3.0 mm) of WAT, liver and skeletal muscle (gastrocnemic) were excised and immediately homogenized in solubilization buffer at 4 °C (1 % Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2.0 mM phenylmethylsulfonic fluoride (PMSF) and 0.1 mg aprotinin  $ml^{-1}$ ) with a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA) operated at maximum speed for 30 s. Insoluble material was removed by centrifugation for 20 min at 9000 g in a 70. Ti rotor (Beckman) at 4°C. The protein concentration of the supernatants was determined by the Bradford dye binding method. Aliquots of the resulting supernatants containing 5.0 mg of total protein were used for immunoprecipitation with antibodies against IR, IRS1and IRS2 at 4 °C overnight, followed nitrocellulose by SDS-PAGE, transfer to membranes and blotting with antiphosphotyrosine, anti-IRS1, anti-IRS2. In direct immunoblot experiments 0.2 mg of protein extracts obtained from each tissue were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-statistical analysis as appropriate.

#### Data Presentation And Statistical Analysis

All numerical results are expressed as the mean  $\pm$ S.E.M. of the indicated number (n) of experiments. The results of blots are presented as direct comparisons of bands in autoradiographs and quantified by densitometry using the ScionCorp software (Scion Image). Analysis of variance (ANOVA) for multiple compaisons was used for statistical analysis as appropriate. The level of significance was set at p<0,05.

#### Results

### Metabolic characterization

There was a significant difference in body weight between the groups (Fig.1.A). Even producing lower levels of insulin (fig.1D), no differences in glucose levels during GTT was observed (fig 1B) in rats treated with PD153035. Increased insulin sensitivity in treated animals was further confirmed by an ITT, which showed a significant increase of ~50% in i.v.  $K_{itt}$  (fig 1C.), and a reduced HOMA value (fig 1E). Taken together these results suggest that PD 153035 might improve insulin sensitivity.

### Effects of PD153035 upon the insulin signaling pathway:

To investigate the effect of PD 153035 on tyrosine phosphorylation of IR, IRS-1 and IRS-2 following stimulation by insulin in pathophysiological states of insulin resistance, we infused insulin into the portal vein of rats. After that, the muscle was removed and homogeneized and the proteins were immunoprecipitated with a polyclonal anti-IR, anti-IRS-1 and anti-IRS-2 antibody. The IR, IRS-1 and IRS-2 immunoprecipitates were analyzed for tyrosyl phosphorylation by immunoblotting with a monoclonal anti-phosphotyrosine antibody. The nitrocellulose membranes were also stripped and reblotted with anti-PI3-kinase antibodies, in order to assess the association of these proteins with IRS-1 and IRS-2. The protein phosphorylation levels of Akt, p70s6k, AMPK, Jnk and IkB were measured in whole tissue extracts and blotting with specific antibody for each one, was also studied.

#### Insulin signaling in skeletal muscle:

There was a significantly reduced insulin-stimulated IR tyrosine phosphorylation in the muscle of PD153035 animals (C:100 ± 5,30% vs PD:31,93± 5,23%, p < 0,05; n=16, fig 2.A.). The IRS-1 tyrosine phosphorylation showed a significant increase in muscle of treated animals after insulin stimulation (C:100 ± 9,86% vs PD: 150,1765 ± 8,2636%, p<0,05, n=16)( fig 2B.) IRS-1/PI3-K association in PD treated animals showed an increase after insulin stimulation when compared with control animals (C:100 ± 10,19% vs PD:204,13 ± 10,77%, p < 0,05; n=16, fig 2.C.).

Basal and insulin-induced IRS-2 tyrosine phosphorylation showed a significant increase in muscle of PD153035 treated animals (basal:C:27,25  $\pm$  2,475% vs PD:96,66  $\pm$  9,39%, *p*<0,05, *n*=8; insulin-induced:C:100  $\pm$ 8,78% vs PD:163,09  $\pm$  16,22%, *p*<0,05; *n*=16, fig 2.D.). IRS-2/PI3-K association increased in the muscle of these animals in the basal state and when stimulated by insulin (basal: C: 41,78  $\pm$  4,83% vs PD: 83,61  $\pm$  6,41%, p<0,05, n=8; insulin-induced: C:100  $\pm$  13,98% vs PD:213,18  $\pm$  16,55%, *p*<0,05; *n*=16, fig 2.E.).

Was analysed insulin-induced Akt serine phosphorylation in whole tissue extract using an anti-phospho Akt antibody. Based on immunoreactivity, the insulin-induced Akt serine phosphorylation was increased in the muscle of PD treated animals (C:100  $\pm$  33,43% vs PD:284,26  $\pm$  17,20%, *p* <0,05; *n*=11, fig 3A.).

Basal p70s6k serine phosphorylation was decreased in the muscle of PD treated animals, but insulin-induced p70s6k phosphorylation showed a significant increase in the muscle of these animals (basal: C: 22,71 ± 3,76% vs PD: 7,80 ± 0,37%, insulin-induced: C:100 ± 3,35% vs PD:130,15 ± 3,74%, p < 0,05; n=16, fig 3C.). There was no difference in Erk phosphorylation in this tissue (fig 3B). The insulin-induced AMPK threonine phosphorilation showed a increase in the muscle of treated animals (C:100 ± 8,19% vs PD: 178,30 ± 23,77%, p<0,05, n=16) (fig 3D)

Jnk phosphorylation was decreased in the muscle of PD treated animals (C:  $52,51 \pm 3,44\%$  vs PD:  $20,49 \pm 3,58\%$ , p < 0,05; n=16, fig 3E.). I $\kappa$ B phosphorylation showed a significant decrease in the muscle of PD treated animals (C:100  $\pm 9,2\%$  vs PD:72,94  $\pm 5,04\%$ , p < 0,05; n=16, fig 3F.).

#### Discussion

The molecule PD 153035 was synthesized as one of a series of compounds evaluated as tyrosine kinase inhibitors. PD 153035 inhibited the EGF receptor tyrosine kinase by 50% at concentration of  $29 \pm 5,1$  pM. PD153035, shares with 4-anilinoquinazoline derived compounds the required elements for highly potent enzyme inhibition (4, 9). No previous research has investigated insulin sensitivity and signal transduction in insulin target tissues of animals that were treated with tyrosine kinase inhibitor, like PD 153035.

Animals that received PD153035 for 7 days showed metabolic characteristics that support the fact that PD153035 improves insulin sensitivity. PD 153035 action leads to a situation characterized by low insulin levels, without changes in glucose levels during GTT. Our results demonstrated that, after acute oral administration of PD153035, there was an improvement in insulin sensitivity in rats, as shown by an increase in glucose disappearance rate during the ITT. The mechanism underlying the improvement in insulin sensitivity induced by PD153035 is not fully understood. In the present study, we evaluated the in vivo insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor, IRS-1 and IRS-2, and also the association of IRS-1 and IRS-2 with PI 3-Kinase in muscle of rats treated with PD153035 (19-21).

Treating rats with PD153035 significantly increased the insulin-induced IRS-1 phosphorylation in the muscle. The increased phosphorylation IRS-1 was accompanied by increase in IRS-1/PI3-kinase association in this tissue. These findings may be of biological significance, since the decrease in insulin receptor observed in treated animals when compared with control animals is known to correlate with insulin resistance. Insulin increases glucose uptake into muscle partly through the translocation of GLUT 4 from intracellular compartments to the plasma membrane. Distinct experimental approaches have led to the conclusion that PI 3-kinase is necessary for insulin-stimulated GLUT4 translocation (22-29). Thus it is reasonable to speculate that the IRS-1/PI3-K/Akt pathway may be linked to the activation of glucose transport in muscle as well as as glycogen synthesis in liver and muscle, and that increase in this pathway in animals treated with PD153035 may have a role in the enhanced insulin sensitivity in these animals. An increase

in basal IRS-1 tyrosine phosphophorylation in rats treated with PD153035 was observed in muscle, and may be a direct tissue-specific effect of PD153035 (30).

There are a number of possible mechanisms that lead to an improvement of the insulin signaling pathway in PD153035 treated animals. Since serine phoshorylation of IRSs proteins by serine-kinases as c-jun N terminal kinase (Jnk) and I $\kappa$ B $\beta$  may impair insulin signaling, A inhibition of these kinases may improve insulin action. Recently Jnk has been linked to the regulation of insulin signaling by several studies (31-32). It is suggested that Jnk may impair insulin signaling by phosphorilating IRS-1 in ser 307, and this phosphorylation leads to inhibition of IRS-1 function. IKK $\beta$  activity was monitored using I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation described (33). I $\kappa$ B $\alpha$  undergoes phosphorylation after IKK $\beta$  activation. IKK $\beta$  is a serine-kinase that may impair insulin signaling by phosphorilating IRS-1 in ser 307, there was a reduction in I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, suggesting a reduction in IKK $\beta$  activity. In summary our results show that PD 153035 inhibit two serine kinases IKK $\beta$  and JNK, involved in downregulation of insulin action., suggesting a possible mechanism for the improvement in insulin signaling.

Recently some clinical observations suggest that inhibitors of tyrosine kinase may improve diabetes control, probably by increasing insulin sensitivity (1-2). These studies are in accordance with our results. In these previous studies, the mechanism suggested for effect of tyrosine kinase inhibitors improving insulin sensitivity and/or reducing atherosclerosis, is through PDGF receptor, probably by reducing the activity of mTOr. mTOR is also a serine kinase able to phosphorylate IRS in serine, inducing insulin resistance, and downstream signaling mTOR can induce p70s6kinase phosphorylation as previously described (34-35). In animals treated with PD 153035 there was a decrease in basal p70s6k phosphorylation suggesting that this drug inhibit basal mTOR activity. However, after insulin stimulation, the activity of mTOR was increased in animals treated with PD 153035, suggesting that the drug does not have a direct effect on mTOR activity, but probably an indirect effect through other receptor as PDGF or EGF.

## **Conclusions**

In conclusion, the results of the present study demonstrates that an inhibitor of tyrosine kinase PD 153035 can improve insulin sensitivity and insulin signaling in muscle, probably by reducing the serine kinase activity of JNK, IKK $\beta$  and mTOr, suggesting that it is an attractive drug to be used for the treatment of type 2 diabetes mellitus and other situation of insulin resistance.

# Acknowledgments

We thank Mr. Luis Janeri, Mr. Márcio Alves da Cruz, Mr. Jósimo Pinheiro and Mr. Alexandro Vieira Jacob for their technical assistance.

This work was supported by grants from Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and Cnpq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

## References

- Lassila M, Allen TJ, Thallas V, Jandeleit-Dahm KA, Candido R, Cooper ME (2004). Imatinib attenuates diabetes-associated atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 935-942.
- Veneri D, Massimo F, Bonora E (2005). Imatinib and regression of type 2 diabetes. N Engl J Med 352(10): 1049-1050
- Moller DE (2001). New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. Nature 414: 821-827
- Fry DW, Kraker AJ, McMichael A, Ambroso LA, Nelson JM, Leopold WR, Connors RW, Bridges AJ (1994). A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase.. Science 265: 1093-1095
- 5. Bos M, Mendelsohn J, Kim YM, Albanell J, Fry DW, Baselga J (1997). PD153035, a tyrosine kinase inhibitor, prevents epidermal growth factor receptor activation and inhibits growth of cancer cells in a receptor number-dependent manner. Cl Cancer Research 3: 2099-2106
- 6. Ciardello F (2000). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. Drugs 60 (1): 25-32
- 7. Rae JM, Lippman ME (2004). Evaluation of novel epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. Breast Cancer Res Treat 83: 99-107
- Levitzki A (2003). Protein Kinase inhibitors as a therapeutic modality. Acc Chem res 36:462-469
- Rocco SA, Velho JA, Marin RM, Filho LAR, Vercesi AE, Rittner R, Franchini KG (2005). High performance liquid chromatography analysis of a 4-anilinoquinazoline derivative (PD153035), a specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase in rat plasma. J Chromatrgr B 817: 297-302
- Bridges AJ, Zhou H, Cody DR, Rewcastle GW, McMitchael A, Showalter HDH, Fry DW, Kraker AJ, Denny WA (1996). Tyrosine kinase inhibitors.8. An unusually steep structure-activity relationship for analogues of 4-(-Bromoanilino)-6,7dimetoxyquinazoline (PD153035), a potent inhibitor of epidermal growth factor receptor. J Med Chem 39:267-276

- 11. Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR (1999).Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanism of insulin resistance. J Clin Invest 103: 931-943
- Pessin JE, Saltiel AR (2000). Signaling Pathways in insulin action, molecular targets of insulin resistance. J Clin Invest 106: 165-169
- Saltiel AR, Kahn CR (2001). Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature 414:799-806
- Summers SA, Yin OP, Whitman EL, Garza LA, Cho H, Tuttle RL, Birbaum MJ (1999). Signaling pathways mediating insulin-stimulated glucose transport. Ann NY Acad Sci 892: 169-186
- Scott AM, Atwater I, Rojas E (1981). A method for the simultaneous measurements of insulin release and β-cell membrane potencial in single mouse islets of Langerhans. Diabetologia 21: 470-475
- 16. Franchini KG, Rocco SA, Marin RM, Saad MJA, Rittner R (2004). Patent required, PI0400869-3.
- Bonora E, Zavaroli I, Salpi O, Pezzarossa A, Dall'Aglio E, Coscelli C, Butturini (1987). Influence of the mestrual cycle on glucose tolerance and insulin secretion. Am J Obstet Gynecol 157: 140-141
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985). Homeostasis model assessment, insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. Diabetologia 28: 412-419
- Lavan BE, Kuhne MR, Garner CW, Anderson D, Rudijk M, Pawson T, Lienhard GE (1992). The association of insulin-elicited phosphotyrosine proteins with Srchomology domains. J Biol Chem 267: 11631-11636.
- 20. Kelly KL, Rudderman NB (1993).Insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-Kinase: association with a 185-kDa tyrosine-phosphorylated protein (IRS-1) and localization in a llow density membrane vesicle. J Biol Chem 268: 4391-4398.

- 21. Giorgetti S, Balloti R, Kowalski-chawel A, Tartare S, VanObberghen E (1993).the insulin and insulin-like growth factor-1 receptor substrate IRS-1 associates with and activates phosphatidylinositol 3-Kinase in vitro. J Biol Chem 268: 7358-7364.
- 22. Hara K, Yonezawa K, Sakame H, Ando A, Koton K, Kitamura T, Kitamura Y, Ueda H, Stephens L, Jackson TR, Hawkins PT, Dhand R, Clark AE, Holman GD, Waterfield MD, Kasuga M, (1994). Phosphoinositide 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not ras activation in CHO cells.Proc Natl Acad Sci USA 91: 7415-7419.
- 23. Cheatham B, Vlahos Cj, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR(1994). Phosphatidyl inositol 3 kinase activation is equires for insulin stimulation of pp70S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. Mol Cell biol 14: 4902-4911.
- 24. Yeh JI, Gulve EA, Rameh L, Birbaum MJ (1995). The effects of wortmannin on rat skeletal muscle: dissociation of signaling pathways for insulin-and contraction-activated hexose transport. J Biol Chem 270: 2107-2111.
- Sanches-Margalet V, Golfine ID, Vlahos CJ, Sung CK(1994). Role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin receptor signaling studies with inhibitor LY294002. Biochem Biophys Res Commun 204: 446-452.
- Stephens JM, Pilch PF (1995). The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT4, The major insulin-responsive glucose transporter. Endocr Rev16: 529-546.
- 27. Quon MJ, Butte AJ, Zarnowski MJ, Sesti G, Cushman SW, Taylor SI (1995). Insulin receptor substrate-1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4 translocation in transfected rat adipose tissue cells. J Biol Chem 169: 27290-27924.
- Haruta T, Morris AJ, Rose DW, Nelson JG, Mueckler M (1995). Insulin stimulated GLUT4 translocation is mediated by divergent intracellular signaling pathway. J Biol Chem 270: 27991-27994.
- 29. Lam K, Carpenter CL, Ruderman NB, Friel JC, Kelly KL (1994). The phosphatidylinositol 3-kinase serina kinase phosphorylates IRS-1: stimulation by insulin and inhibition by wortmannin. J Biol Chem 269: 20648-20652.

- 30. Carvalho CRO, Brenelli SL, Silva AC, Nunes ALB, Velloso LA, Saad MJA (1996). Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. Endocrinology 137: 151-159.
- Benett BL, Satoh Y, Lewis AJ (2003) JNK: a new target for diabetes. Curr Op Pharm
  3: 420-425
- 32. Prada PO, Zechin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Amaral MEC, Höer NF, Boschero AC, Saad MJA (2005). Western diet modulates insulin signaling, c-jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1<sup>ser307</sup> phosphorylation in a tissue-specific fashion. Endocrinology 146 (3): 1576-1587
- Tak PP, Firestein GS (2001). NFkB: a key role in inflammatory diseases. J Clin Invest 107: 7-11
- 34. Tee AR., Blenis J (2005). mTOR, translational control and human disease. Seminars in Cell & Developmental Biology 16: 29–37
- 35. Inoki K, Ouyang H, Li Y, and Guan1 K-L. (2005). Signaling by Target of Rapamycin Proteins in Cell Growth Control. Microbiol Mol Biol Rev 69 (1): 79-100

### LEGENDS

**Figure 1**. (A).Mean of weight gain in rats with and without PD153035 (B). Glucose concentrations during i.p. GTT, (C) glucose disappearance rate. The constant rate for plasma glucose disappearance (Kitt) was calculated as described in **METHODS.** (D) insulin concentrations in control and PD 153035 treated rats.. HOMA values (E) for control and PD153035 groups rats were calculated as previously described (Matthews et al, 1985). Results are representative of the mean  $\pm$  S.E.M, \*p<0,05, controls vs PD 153035.

**Figure 2.** Muscle extracts from rats injected with saline (-) or insulin (+) were prepared (see Materials and Methods ). Tissue extracts were immunoprecipitated (IP) with anti-IR antibody and immunoblotted (IB) with anti-PY antibody (A) .Tissue extracts were also immunoprecipitated (IP) with anti-IRS-1 and IRS-2 antibody and immunoblotted (IB) with anti-PY (figs B, D) and anti-PI(3)K (figs C, E) antibodies. The results of scanning densitometry are expressed as arbitrary units. Collumns and bars represent the mean  $\pm$  SEM. \*p<0,05, controls vs PD 153035.

**Figure 3**. Muscle extracts from rats injected with saline (-) or insulin (+) were prepared (see Materials and Methods ). Whole tissue extracts were immunoblotted (IB) with anti-phospho Akt , anti phospho Erk (figs A,B), anti-phospho p70s6k, anti-phospho AMPK (figs C,D), anti-phospho Jnk and anti-phospho I $\kappa$ B (figs E,F) antibodies. The results of scanning densitometry are expressed as arbitrary units. Collumns and bars represent the mean ± SEM. \*p<0,05, controls vs PD 153035.

FIG. 1.



FIG. 2.





А



























