

VIVIAN CRISTINE CALEGARI

**PAPEL DA PROTEÍNA SOCS3 SOBRE A MODULAÇÃO DO
SINAL INTRACELULAR DA ANGIOTENSINA II E SOBRE
O *CROSS-TALK* ENTRE A SINALIZAÇÃO DA
ANGIOTENSINA II E DA INSULINA EM TECIDO
CARDÍACO DE RATOS**

CAMPINAS

2006

VIVIAN CRISTINE CALEGARI

**PAPEL DA PROTEÍNA SOCS3 SOBRE A MODULAÇÃO DO
SINAL INTRACELULAR DA ANGIOTENSINA II E SOBRE
O CROSS-TALK ENTRE A SINALIZAÇÃO DA
ANGIOTENSINA II E DA INSULINA EM TECIDO
CARDÍACO DE RATOS**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica,
área de concentração em Medicina Experimental.*

Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

CAMPINAS

2006

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

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

C128p	<p>Calegari, Vivian Cristine Papel da proteína SOCS3 sobre a modulação do sinal intracelular da Angiotensina II e sobre o cross-talk entre a sinalização da Angiotensina II e da insulina em tecido cardíaco de ratos / Vivian Cristine Calegari. Campinas, SP : [s.n.], 2006.</p> <p>Orientador : Lício Augusto Velloso Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Hipertensão. 2. Resistência à insulina. 3. Janus Kinase. I. Velloso, Lício Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.</p>
-------	---

Título em inglês : Role of SOCS3 protein on the angiotensin II intracellular and the molecular cross-talk between angiotensin II and insulin signaling in cardiac tissue of rats

Keywords: • Hypertension
• Insulin resistance
• Janus Kinase

Área de concentração : Medicina Experimental

Titulação :Doutorado em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora: Prof Dr Lício Augusto Velloso

Prof Dr Francisco Rafael Martins Laurindo

Prof Dr Marcio Alberto Torsoni

Prof Dr Wilson Nadruz Júnior

Prof Dr Everardo Carneiro Magalhães

Data da defesa: 02-06-2006

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Membros:

1. Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

2. Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni

3. Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

4. Prof. Dr. Everardo Carneiro Magalhães

5. Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

02/06/2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meu irmão Willian (*in memoriam*),
e a meu esposo Leonardo, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado forças e por sempre ter iluminado meu caminho e minhas decisões.

Aos meus pais, Mauro e Silvana, pela paciência e amizade, e também pelo carinho e compreensão em todos os momentos.

Ao meu querido irmão, Willian (*in memorian*), que tantas saudades deixou e que me ensinou a viver cada dia como se fosse o último e a dar mais valor às pessoas, à vida e ao presente.

A Leonardo, meu amigo e esposo, pela dedicação e paciência, companheirismo, amor e carinho em todos os momentos.

Aos meus avós, Floripe e Sérgio (*in memorian*), Malvina e Alcides (*in memorian*) que sempre se sentiram orgulhosos de mim e que, com sua experiência de vida, me deram ânimo e esperança para continuar, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha amiga e comadre Paty Karoll, pela amizade, disposição, ajuda e dedicação.

À minha grande amiga Waléria, pela ajuda, amizade, companheirismo e incentivo.

Aos amigos Flávio, Antônio, Rodrigo e Henrique, e às amigas Luciana, Melissinha, Fernanda e Chris, pela amizade, incentivo e apoio em todos os momentos difíceis.

Ao Sr. Luis, meu amigo, pela ajuda e extrema dedicação.

Ao Sr. Jósimo, pela sua presteza, amizade e ajuda e também pelos longos bate-papos.

Aos colegas e companheiros de trabalho de meu laboratório.

Ao Prof. Mário, por me possibilitar o uso de seu laboratório e por sua amizade e otimismo.

Ao Prof. Kleber, pelo empréstimo de seu laboratório e de seu conhecimento.

Ao meu orientador, Prof. Lício, agradeço o apoio e o extremo otimismo, a compreensão, a paciência, e as palavras de incentivo quando tudo parecia não ter mais jeito.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras.”

(Albert Einstein)

	<i>PÁG.</i>
RESUMO.....	<i>xxiii</i>
ABSTRACT.....	<i>xxvii</i>
INTRODUÇÃO.....	31
Angiotensina II - Vias de sinalização.....	33
Insulina – Vias de sinalização.....	35
Proteínas SOCS.....	39
<i>Cross-talk</i> molecular entre a sinalização da ANGII e da Insulina.....	42
Hipertensão arterial X Resistência à insulina.....	43
OBJETIVOS.....	47
CAPÍTULOS.....	51
CAPÍTULO 1- <i>Supressor of cytokine signaling 3 is induced by angiotensin II in heart and isolated cardiomyocytes and participates in desensitization.....</i>	53
CAPÍTULO 2- <i>Supressor of cytokine signaling -3 provides a novel interface in the cross-talk between angiotensin II and insulin signaling systems.....</i>	65
DISCUSSÃO GERAL.....	75
CONCLUSÃO GERAL.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
APÊNDICES.....	127
a) Materiais.....	129
b) Métodos.....	136
OUTROS TRABALHOS PRODUZIDOS DURANTE O DOUTORADO.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS

ANGII – angiotensina II	angiotensina II
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
AT1, AT2	receptores da ANGII 1 e 2
Ca ²⁺	cálcio iônico
Células CHO	células de ovário de Hamster
Células C2C12	células musculares
CIS	proteínas SH2 induzidas pelas citocinas
CVIN	cardiomiócitos ventriculares isolados de neonatos
ECA	enzima conversora de angiotensina
EGF	fator de crescimento epidérmico
ERK	quinase regulada pelo sinal extracelular
GH	hormônio de crescimento
MCF7	linhagem de células de câncer de mama humano
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenoso
IFN- γ	interferon- γ
IL1 β , IL-3, IL-6	interleucinas 1 β , 3 e 6
IP ₃	inositol trifosfato
IR – receptor de insulina	inositol trifosfato
IRS-1, IRS-2	substratos 1 e 2 do receptor de insulina
JAK1, 2, 3 e Tyk2	proteínas da família <i>Janus quinase</i>

JH1 – 7	domínios de homologia JAK conservados 1 a 7
KDa	quilo Dalton
MAPK	proteína quinase ativadora de mitogênese
NIDDM	diabetes mellitus não dependente de insulina (diabetes mellitus tipo II)
NO	óxido nítrico
Células 3T3-L1	células de adipócitos
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PI 3-K	fosfatidil inositol 3 quinase
PIAS	proteínas inibidoras ativadas pelas STATs
PLD	fosfolipase D
Proteína Gq	proteína G estimulatória
Proteína Gi	proteína G inibitória
GLUT(4)	transportador de glicose (4)
IGF1	(fator de crescimento da insulina 1)
PTP α , PTP1b e LAR	proteínas tirosina fosfatase
pY960	fosfotirosina 960
RASMC	células musculares lisas da aorta de ratos
RNAm	RNA mensageiro
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase – transcrição reversa
RWA	ratos <i>Wistar</i> adultos
SH2	<i>Src homology 2</i>
SH2, SH3, PTB, PH	domínios SH2, SH3, PTB, PH

SHP1, SHP2	proteínas tirosina-fosfatases 1 e 2
SIRP α 1	proteína reguladora do sinal
SOCS1 a 7	proteína supressora da sinalização das citocinas 1 a 7
SOS	proteína trocadora de GDP por GTP
STAT1, 3, 5a e 5b	proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição gênica 1, 3, 5a e 5b
TA	temperatura ambiente
TNF- α	fator de necrose tumoral- α
VSMC	células musculares lisas vasculares



RESUMO

O hormônio angiotensina II (ANGII) através de seu receptor AT1 é capaz de ativar a via de sinalização JAK/STAT. Estudos demonstram que esta via encontra-se hiper-ativada durante o desenvolvimento da hipertensão. Os mecanismos pelos quais esta via é regulada pela ANGII ainda não foram totalmente elucidados. Relatos demonstram que hormônios, citocinas e fatores de crescimento que transduzem seus sinais através da via JAK/STAT, acabam por induzir a expressão de proteínas da família SOCS e que estas, por sua vez, promovem a regulação do sinal de seus indutores.

Estudos epidemiológicos demonstram que a hipertensão é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento da resistência à insulina (RI). Embora seja conhecido que a ANGII apresenta importante papel no desenvolvimento da hipertensão e da RI, uma vez que a inibição de sua ação, não somente reduz a pressão sanguínea como também melhora a sensibilidade à insulina em indivíduos hipertensos e resistentes à insulina, muito pouco é conhecido sobre os mecanismos moleculares pelos quais este hormônio pode causar RI.

No presente estudo, examinamos o papel da ANGII sobre os mecanismos de ativação e regulação da via JAK/STAT em coração de ratos *Wistar* adultos (RWA) e em cardiomiócitos ventriculares isolados de ratos neonatos (CVIN). Nossos resultados revelaram que, após a ligação da ANGII ao receptor AT1, ocorre ativação de JAK2 e STAT1 e, subsequentemente, a expressão de SOCS3 é induzida. Verificamos ainda que a ativação da via JAK/STAT e a expressão de SOCS3 são dependentes da ativação de AT1 pela ANGII e que a expressão de c-jun pode ser induzida também pelo receptor AT2. Além disso, observamos que SOCS3 pode participar do mecanismo de desensibilização ou refratariedade do sinal da ANGII através da via JAK/STAT como demonstrado pelo seu bloqueio com oligonucleotídeo antisense contra SOCS3 (AS SOCS3).

Também investigamos se a proteína SOCS3, induzida por ANGII, pode participar do *cross-talk* molecular entre o sinal da ANGII e da insulina. Observamos que o tratamento com ANGII causa queda significativa na atividade de proteínas da via PI 3-K/AKT da insulina e que SOCS3, induzida por ANGII, associa-se a IR, IRS1 e IRS2. O uso de AS SOCS3 restaura os níveis de fosforilação em tirosina de IRS1 e IRS2 induzidos pela insulina, aumenta a associação entre IRS1 e IRS2 com PI 3-K, e a subsequente atividade

desta enzima e da proteína AKT e leva a um aumento na translocação de GLUT4 para a membrana celular.

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, que o hormônio ANGII é capaz de induzir a expressão de uma proteína supressora da sinalização das citocinas, SOCS3, e que esta proteína, além de participar do controle das ações fisiológicas de seu indutor, também participa do *cross-talk* negativo entre o sinal de dois hormônios, ANGII e insulina, podendo se constituir, desta forma, em mais um mecanismo de interconexão entre hipertensão arterial e RI e/ou diabetes mellitus tipo II.



ABSTRACT

Intracellular interactions between different signaling systems may function as mechanisms for enhancing or counter-regulating hormone action. The hormone angiotensin II (ANGII) is involved in the development of both, hypertension and insulin resistance. Several studies demonstrate that in signaling systems that use the JAK/STAT pathway, proteins of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) family participate in signal regulation. In the present study we demonstrate that ANGII is able to activate the JAK/STAT pathway and, subsequently, the expression of SOCS3. SOCS3 is constitutively expressed at a low level in the heart of rats and neonatal rat ventricular myocytes. ANGII, at a physiological concentration, enhances the expression of SOCS3 mRNA and protein, mainly via AT1 receptors. After induction, SOCS3 associates with JAK2 and impairs further activation of the JAK2/STAT1 pathway. Pretreatment of rats with a specific phosphorthioate antisense oligonucleotide against SOCS3, reverses the desensitization to angiotensin signaling, as detected by a fall in c-jun expression after repetitive infusions of the hormone. We also demonstrate the interaction of ANGII-induced SOCS3 with the insulin signaling pathway in cardiac tissue *in vivo* and in isolated cell system. ANGII-induced SOCS3 interacts with the IR, JAK2, IRS1 and IRS2. The inhibition of SOCS-3 expression by antisense oligonucleotide partially restores the ANGII-induced inhibition of insulin-induced IR, IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation, IRS1 and IRS2 association with p85-phosphatidylinositol 3-quinase and AKT [Ser⁴⁷³] serine phosphorylation. Moreover, the inhibition of SOCS3 expression partially reverses ANGII- induced inhibition of insulin-stimulated GLUT-4 translocation to the cell membrane. Thus, ANGII-induced SOCS3 in rat heart and neonatal rat ventricular myocytes may actively participate in the control of the ANGII signaling, and also, as a late event, in the negative cross-talk between ANGII and insulin signaling pathways.



INTRODUÇÃO

Angiotensina II - Vias de Sinalização

O hormônio angiotensina II (ANGII) é um peptídeo biologicamente ativo que apresenta efeitos pleiotrópicos sobre os sistemas nervoso, cardiovascular e endócrino, os quais são iniciados pela ativação de receptores específicos acoplados à proteína G, pertencentes à família dos receptores de sete segmentos transmembrana, chamados AT1 e AT2 (BAKER & ACETO, 1990; TIMMERMANS *et al.*, 1991). Embora AT1 e AT2 sejam igualmente distribuídos em cardiomiócitos (SECHI *et al.*, 1992; MATSUBARA *et al.*, 1994; REGITZ-ZAGROSEK *et al.*, 1995a), vários estudos têm revelado que a maioria das respostas da ANGII é mediada pelo subtipo AT1 (DOSTAL e BAKER, 1992; REGITZ-ZAGROSEK *et al.*, 1994; HANATANI *et al.*, 1995; ITO *et al.*, 1995; REGITZ-ZAGROSEK *et al.*, 1995b; SADOSHIMA e IZUMO, 1996).

Enquanto através de AT1, a ANGII induz vasoconstrição, crescimento e migração celular, produção de componentes da matriz extracelular e inflamação, através de AT2, promove apoptose, e inibe a proliferação e hipertrofia celulares (ALLEN *et al.*, 2000; SIRAGY, 2000). Como a ANGII liga-se a ambos os receptores com similar afinidade, a resposta celular é dependente do nível de expressão e/ou responsividade de ambos os seus receptores independentemente.

No mínimo quatro vias de sinalização intracelular participam da transdução do sinal da ANGII em células alvo. A primeira via envolve a ativação da proteína G_q (proteína G estimulatória) levando a geração de inositol trifosfato (IP₃) e a um subsequente aumento na concentração do cálcio (Ca⁺²) citosólico, o qual modula a contratilidade celular, o tráfego de vesículas, a transcrição de genes e a mitogênese (SADOSHIMA *et al.*, 1995; WALSH *et al.*, 1995); de outro lado, a segunda via envolve a ativação da proteína G_i (proteína G inibitória), a qual causa inibição do AMP cíclico (AMPc) (PEACH, 1981). A terceira via envolve a ativação da cascata da Ras/Raf/MAPK (THOMAS *et al.*, 1996), enquanto a quarta via leva a ativação da quinase intracelular JAK2 (*Janus quinase 2*), que rapidamente direciona o sinal para o núcleo através das proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição (STAT). (DARNELL *et al.*, 1994; SCHINDLER e DARNELL, 1995). É interessante verificar que, embora os receptores da ANGII não apresentem atividade tirosina quinase intrínseca, eles são capazes de ativar inúmeras

proteínas tirosina quinase receptoras e não-receptoras (ISHIDA *et al.*, 1995; SADOSHIMA e IZUMO, 1996; EGUCHI *et al.*, 1998; HEENEMAN *et al.*, 2000). Muitas das proteínas ativadas pela ANGII agem como pontos de convergência para as cascatas de sinalização de um grande número de hormônios, fatores de crescimento e citocinas, apresentando importante papel em distintos *cross-talk* moleculares.

A ativação da via JAK/STAT pela ANGII foi observada em células musculares lisas vasculares (VSMC) (MARRERO *et al.*, 1995b), fibroblastos cardíacos (BHAT *et al.*, 1994, 1995), células musculares cardíacas (MASCARENO *et al.*, 1998) e tecido cardíaco *in vivo* (VELLOSO *et al.*, 1996).

A família *Janus quinase* (JAK) é composta por 4 membros, até então conhecidos: JAK1, JAK2, JAK3 e Tyk2 (IHLE, 2001), com pesos moleculares que variam entre 120 a 130 kDa e, com exceção de JAK3, todos são ubliquamente expressos (LEONARD e O'SHEA, 1998). São proteínas que apresentam 7 domínios de homologia JAK conservados (JH1-7). A porção carboxi-terminal destas moléculas inclui um domínio catalítico funcional (JH1) imediatamente precedido por um domínio pseudo-quinase (JH2). Os domínios JH amino-terminal constituem o domínio FERM (*four-point-one, ezrin, radixin, moesin*) e medeiam a associação com os receptores (KISSELEVA *et al.*, 2002). Ainda, as JAKs não possuem domínios transmembrana nem domínios SH2, SH3, PTB ou PH. Por não possuírem o domínio SH2, estas proteínas não conseguem ligar-se diretamente ao receptor AT1 da ANGII.

A associação entre JAK2 e AT1 é dependente do ligante (MARRERO *et al.*, 1995b; McWHINNEY *et al.*, 1997). A quinase JAK2 precisa estar cataliticamente ativa (fosforilada) para se associar a AT1, uma vez que a inibição de JAK2 por meios farmacológicos ou por uma proteína JAK2 dominante-negativa significativamente reduz esta associação (ALI *et al.*, 1997a).

Após a ativação das quinases JAK, ocorre a fosforilação das proteínas STAT (DARNELL *et al.*, 1994). Estas são fatores de transcrição citoplasmáticos ativados por uma grande variedade de ligantes e estão envolvidas em várias funções biológicas de transformação celular, desenvolvimento, diferenciação, imunidade e apoptose

(LEONARD e O'SHEA, 1998). Estruturalmente, as STATs possuem um sítio de fosforilação em tirosina altamente conservado, um domínio SH2, um domínio de ligação ao DNA (*DNA-binding*) e um domínio de transativação. Através de seu domínio SH2, as STATs ligam-se as JAKs fosforiladas e são, por elas, ativadas. Em seguida, dissociam-se das JAKs e formam homo ou heterodímeros que se translocam para o núcleo onde interagem com elementos específicos do DNA nas regiões promotoras de genes alvos regulando a transcrição gênica (DARNELL, 1997). A duração e o tempo de ativação das proteínas STAT promovido pelas quinases JAK, dependem do tempo em que estas quinases permanecerem ativas. Supõe-se que a super-ativação destas proteínas ocorra por algum defeito no mecanismo de internalização do receptor AT1 após a ligação do ligante, como se observa em células neoplásicas (BROMBERG, 2002). Estudos em cultura de células cardiovasculares, tecido cardíaco e hipotálamo *in vivo* demonstraram que a ANGII é capaz de induzir a fosforilação em tirosina de STAT1 e de STAT3 (CALEGARI *et al.*, 2003; TORSONI *et al.*, 2004).

Além das STATs, as quinases JAK, ativadas pela ANGII, também podem interagir com outras proteínas, como por exemplo, IRS-1 e IRS-2, (JOHNSTON *et al.*, 1995; SAAD *et al.*, 1996), SHP2 (SENGUPTA *et al.*, 1996; YIN *et al.*, 1997), Grb2, Sos (CHAUHAN *et al.*, 1995) e Vav (MATSUGUCHI *et al.*, 1995).

Insulina - Vias de Sinalização

Em mamíferos, a insulina é o principal hormônio envolvido no controle da glicemia. Além de seu papel vital na homeostasia da glicose, o hormônio polipeptídico insulina, exerce um amplo espectro de efeitos fisiológicos em muitos tipos celulares, tais como, estimulação da captação de glicose, íons e aminoácidos, modificação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo intermediário, redistribuição de proteínas de membrana como os transportadores de glicose, regulação da expressão gênica, promoção de crescimento e diferenciação celulares, apoptose e síntese de NO (DRAZNIN *et al.*, 1989; SHULMAN, 1999; PESSIN e SALTIEL, 2000; SALTIEL e KAHN, 2001). As ações da insulina a nível celular iniciam-se pela ligação do hormônio a seu receptor na membrana

plasmática (FREYCHET *et al.*, 1971; CUATRECASAS, 1972). Este receptor está virtualmente presente em todos os tecidos de mamíferos, embora as concentrações variem de menos de cem receptores por célula em eritrócitos circulantes a mais de duzentos mil em adipócitos e hepatócitos (KAHN, 1985).

O receptor de insulina (IR) é uma glicoproteína heterotetramérica, com atividade tirosina quinase intrínseca (CHOU *et al.*, 1987; EBINA *et al.*, 1987), composta de duas subunidades α unidas a duas subunidades β através de pontes dissulfeto (MASSAGUE *et al.*, 1981; KASUGA *et al.*, 1982). As subunidades α estão localizadas na porção extracelular da membrana e possuem o sítio de ligação para a insulina, enquanto as subunidades β são transmembrana e detêm a atividade tirosina quinase do receptor. A ligação da insulina às subunidades α induz a fosforilação de uma complexa cascata de resíduos de tirosina nas subunidades β . Quando estes resíduos de tirosina são trocados através de mutação por resíduos de fenilalanina isoladamente ou em combinação, a atividade quinase e a autofosforilação do IR ficam significativamente reduzidas (CUNNINGHAM *et al.*, 1991; OUWENS *et al.*, 1994), demonstrando dessa forma, que a atividade tirosina quinase do receptor é crucial para a ação insulínica.

No estado basal, o IR está fosforilado em serina e treonina. Após estímulo com insulina, além do aumento das fosfotirosinas, ocorre também aumento do conteúdo de fosfoserina e fosfotreonina do IR. Além da insulina, AMPc e ésteres de forbol (TAKAYAMA *et al.*, 1988) podem induzir a fosforilação em serina e treonina do IR, fato relacionado a uma diminuição da atividade tirosina quinase e perda da sensibilidade à insulina. Desse modo, a resposta após estímulo insulínico do IR é controlada por uma complexa cascata de autofosforilação em resíduos de tirosina (regulação positiva) e, aparentemente, em resíduos de serina e treonina (regulação negativa).

Uma vez ativado, o IR fosforila vários substratos protéicos em tirosina, entre os quais, os substratos do IR (IRS), Shc, Gab1, p60^{dok}, Cbl, JAK2 e APS (SAAD *et al.*, 1996; WHITE, 1998; PESSIN e SALTIEL, 2000; CARVALHEIRA *et al.*, 2001). A fosforilação em tirosina destas proteínas cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia Src 2 (SH2), as quais são capazes de ativar diferentes vias de

sinalização (SALTIEL e KAHN, 2001), tais como PI 3-K/AKT, Ras/Raf/MAPK e JAK/STAT.

A via PI 3-K/AKT, além de ser a responsável pela regulação das ações metabólicas da insulina, como captação de glicose, glicólise, síntese de glicogênio e síntese protéica (MARTE *et al.*, 1997), é também responsável pela regulação da mitogênese e diferenciação celulares (FOLLI *et al.*, 1992; SAAD *et al.*, 1992, 1993; SHEPHERD *et al.*, 1995). A enzima PI -3k é um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A ligação dos IRS fosforilados em tirosina aos domínios SH2 da subunidade p85 ativa o domínio catalítico associado (BACKER *et al.*, 1992). A enzima catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol produzindo, entre outros, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (LIETZKE *et al.*, 2000), o qual serve como um sítio adaptador para o domínio PH das proteínas PKB/AKT e quinases dependentes de fosfolípidos (PDK1 e PDK2) (ALESSI *et al.*, 1997).

A ativação da proteína PKB/AKT é dependente da fosforilação em resíduos de serina (473) e treonina (306). Esta proteína, induzida pela insulina, age estimulando a migração das vesículas dos transportadores de glicose (GLUT) para a membrana plasmática (CALERA *et al.*, 1998), onde, então, promovem a captação de glicose pelos tecidos-alvo. Pouco ainda é encontrado na literatura a respeito da translocação dos GLUTs. Outros sinais, além da ativação da via PI 3-K/AKT, também são necessários para que a insulina estimule o transporte de glicose (PESSIN e SALTIEL, 2000), como a ativação da via CAP/Cbl (RIBON e SALTIEL, 1997; RIBON *et al.*, 1998; BAUMANN *et al.*, 2000; CHIANG *et al.*, 2001).

Várias proteínas tirosina fosfatasas estão envolvidas na transdução do sinal da insulina, como SHP1, SHP2, PTP α , PTP1B e LAR (HASHIMOTO *et al.*, 1992; UCHIDA *et al.*, 1994; KHARITONENKOV *et al.*, 1995, 1997; LAMMERS *et al.*, 1997), sendo SHP2 a mais estudada. Esta fosfatase contém dois domínios SH2 (VOGEL *et al.*, 1993) e se associa ao IR sendo, subseqüentemente, fosforilada por ele (KHARITONENKOV *et al.*, 1995). Sua fosforilação não causa a desfosforilação do IR (KHARITONENKOV *et al.*, 1995), mas SHP2 pode se ligar a IRS-1 e então causar a

desfosforilação desta proteína (KUHNE *et al.*, 1994; NOGUCHI *et al.*, 1994). Estudos em diferentes linhagens celulares demonstraram que SHP2 tem função adaptadora entre o IR e IRS-1 e que a formação deste complexo trimérico pode aumentar o transporte de glicose (KHARITONENKOV *et al.*, 1995). A fosfatase PTP1B é considerada um regulador negativo altamente específico da sinalização da insulina *in vivo* por promover a rápida desfosforilação do IR e de seus substratos. Camundongos *knockout* para PTP1B apresentam aumento da sensibilidade à insulina (ELCHEBLY *et al.*, 1999).

A via Ras/Raf/MAPK inicia-se com a fosforilação em tirosina das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a proteína Grb2 (PAEZ-ESPINOSA *et al.*, 1999), a qual está constitutivamente associada à SOS, uma proteína que troca GDP por GTP da Ras, ativando-a. A ativação da Ras requer a participação da fosfatase SHP2. A Ras ativada estimula a fosforilação em serina de proteínas da cascata da MAPK levando à proliferação e diferenciação celulares (BOULTON *et al.*, 1991). O bloqueio farmacológico desta via inibe a ação da insulina sobre o crescimento celular, mas não exibe efeito algum sobre as ações metabólicas do hormônio (LAZAR *et al.*, 1995).

A via JAK/STAT constitui-se em mais uma via que pode ser ativada pela insulina e está envolvida na regulação da expressão gênica induzida por este hormônio independentemente da via Ras/Raf/MAPK. Após estímulo com insulina, JAK2 associa-se ao IR e é fosforilado em tirosina no fígado, coração, tecido adiposo, e músculo esquelético, de forma tempo e dose-resposta dependentes (SAAD *et al.*, 1996). A fosforilação de JAK2 induzida pela insulina leva à formação do complexo JAK2-STAT e direciona o sinal insulínico para o núcleo (VELLOSO *et al.*, 1998).

Experimentos de Chen *et al.* (CHEN *et al.*, 1997) e Sawka-Verhelle *et al.* (SAWKA-VERHELLE *et al.*, 1997), usando duplo-híbrido, demonstraram que STAT5b pode se constituir num novo substrato direto do IR e que as proteínas STAT1, 3, 5a e 5b, podem ser rapidamente ativadas pela insulina em duas diferentes linhagens celulares que super-expressam o IR e que a perfusão de fígados de camundongo com insulina ativa seletivamente as proteínas STAT5. Sawka-Verhelle *et al.* (SAWKA-VERHELLE *et al.*, 1997), também verificaram que a insulina estimula a fosforilação em tirosina de STAT5b

quando co-expresa com o IR humano em células 293. O achado da interação e da ativação de STAT5b pela insulina adiciona à lista dos substratos do IR um efetor nuclear.

A importância da via JAK/STAT na sinalização da insulina pode ser melhor compreendida através de achados recentes que sugerem que a proteína STAT5, induzida pela insulina, possa ter papel importante na ativação e transcrição de genes da glucoquinase e da proteína SOCS3 (EMANUELLI *et al.*, 2000; SAWKA-VERHELLE *et al.*, 2000).

A ativação das vias PI 3-K/AKT, Ras/Raf/MAPK e JAK/STAT pela insulina podem levar a ativação diferencial de genes necessários ao crescimento celular *versus* aqueles envolvidos na atividade metabólica e diferenciação celular.

Proteínas SOCS

A família de proteínas SOCS é composta por 8 membros, chamados de proteínas supressoras da sinalização das citocinas (SOCS) 1-7 e proteínas SH2 induzidas pela citocina (CIS) (MASUHARA *et al.*, 1997; MINAMOTO *et al.*, 1997; HILTON *et al.*, 1998; YASUKAWA *et al.*, 2000). Estas proteínas compartilham duas regiões de homologia. A primeira, chamada SH2, encontra-se na porção amino-terminal e é responsável pela interação das SOCS com proteínas fosforiladas em tirosina (ENDO *et al.*, 1997). A segunda, chamada SOCS-box, encontra-se na porção carboxi-terminal e é responsável por conferir estabilidade às SOCS e por participar no direcionamento das proteínas em complexo com SOCS para degradação proteosômica (RUI *et al.*, 2002).

As proteínas SOCS, embora tenham sido, originalmente, descritas na sinalização das citocinas, podem ser induzidas através da ativação da via JAK/STAT por vários hormônios, como leptina (BJORBAEK *et al.*, 1998; EMILSSON *et al.*, 1999), insulina (SADOWSKI *et al.*, 2001), hormônio de crescimento (GH) (FAVRE *et al.*, 1999; TOLLET-EGNELL *et al.*, 1999), prolactina (HELMAN *et al.*, 1998; PEZET *et al.*, 1999) e ANGII (CALEGARI *et al.*, 2003; TORSONI *et al.*, 2004) e, quando expressas, inibem a sinalização e a atividade biológica de seus indutores. Elas podem inibir a sinalização de

seus indutores através de vários mecanismos, como por exemplo, podem se ligar ao *loop* de ativação das proteínas JAK e inibir sua atividade catalítica (ENDO *et al.*, 1997; MASUHARA *et al.*, 1997; NAKA *et al.*, 1997; SUZUKI *et al.*, 1998; PEZET *et al.*, 1999; YASUKAWA *et al.*, 1999). Também podem se associar aos receptores de seus indutores fosforilados em tirosina, como o receptor de GH (hormônio de crescimento) (HANSEN *et al.*, 1999), e também ao receptor de insulina (IR) fosforilado (DEY *et al.*, 1998, 2000; EMANUELLI *et al.*, 2000).

Por sua habilidade em serem rapidamente induzidas e por eficientemente inibirem a via JAK/STAT, as proteínas SOCS são potentes moduladores da sinalização fisiológica e patológica de várias citocinas, hormônios e fatores de crescimento *in vivo*. Isto pode ser demonstrado por fenótipos de camundongos *knockout*. Camundongos *knockout* para SOCS3 apresentam letalidade embriônica associada com marcada eritrociteose (MARINE *et al.*, 1999a); camundongos *knockout* para SOCS1 apresentam letalidade perinatal ligada a excessiva resposta ao interferon- γ (IFN- γ) (STARR *et al.*, 1998; ALEXANDER *et al.*, 1999; MARINE *et al.*, 1999b); e camundongos *knockout* para SOCS2 apresentam um aumento no tamanho corporal (METCALF *et al.*, 2000).

A transcrição dos genes *socs* parece ser mediada, pelo menos parcialmente, pelos fatores de transcrição STAT (STARR e HILTON, 1999). Esta hipótese é apoiada por várias evidências. Camundongos deficientes em STAT3 têm bloqueada a transcrição de SOCS1 (AUERNHAMMER *et al.*, 1999). Trabalhos de Emanuelli *et al.* (2000), demonstraram que a indução de SOCS3 pela insulina é mediada, em parte, pela proteína STAT5 porque há nesta proteína sítios de ligação presentes no promotor de SOCS3.

Torsoni *et al.* (2004), recentemente demonstraram que, em hipotálamo de ratos infundidos com ANGII, SOCS3 é rapidamente expressa, associa-se a JAK2 e inibe a ativação da via JAK/STAT induzida pela ANGII. Como consequência desta inibição, a ingestão de água induzida pela ANGII em hipotálamo de ratos é suprimida (TORSONI *et al.*, 2004). Pouco ainda é encontrado na literatura a respeito da ativação das proteínas SOCS pelo hormônio ANGII.

Mascarenho e Siddiqui (2000) demonstraram que vários componentes da via JAK/STAT são encontrados ativos durante a isquemia miocárdica. Desde que a ativação contínua das moléculas de sinalização possa ter efeitos deletérios sobre a função cardíaca, a atividade destas moléculas deve ser rigorosamente controlada. Se a ANGII for capaz de induzir a expressão de SOCS3 em tecido cardíaco, talvez esta proteína possa levar ao término ou ao controle do sinal gerado por este hormônio neste tecido.

Dependendo do tecido ou da linhagem celular estudada, a insulina é capaz de induzir a expressão de SOCS2 (SADOWSKI *et al.*, 2001) e/ou SOCS3 (EMANUELLI *et al.*, 2000; CALEGARI *et al.*, 2005). Peraldi e colaboradores (2001) demonstraram que a insulina induz a expressão do RNAm de SOCS3 em adipócitos 3T3-L1 e a translocação desta proteína para a membrana plasmática onde, através de seu domínio SH2 interage com a fosfotirosina 960 (pY960) do IR podendo, desta forma, participar da desensibilização do sinal da insulina já que compete com STAT5b por este sítio. De forma interessante, este sítio também faz parte do único domínio de ligação para a maioria dos substratos do IR. SOCS3 reduz a fosforilação em tirosina de IRS-1 e sua subsequente associação à subunidade p85 da enzima PI 3-K, demonstrando que a ligação de SOCS3 à pY960 do IR inibe o acoplamento entre IRS-1 e IR (EMANUELLI *et al.*, 2001; PERALDI *et al.*, 2001). Além do mais, SOCS3 é capaz de se ligar diretamente às proteínas IRS e direcioná-las para a degradação proteosómica (RUI *et al.*, 2002). Desta forma, sugere-se que as proteínas SOCS3 sejam potentes inibidores da sinalização da insulina. Este fato é de grande interesse, uma vez que a expressão de SOCS3 está aumentada em várias situações associadas com resistência à insulina (SUN *et al.*, 1999; MOONEY *et al.*, 2001; UEKI *et al.*, 2005).

Como a insulina regula finamente sua sinalização através de vários *loops* de *feedback* negativo (RICORT *et al.*, 1995; VIRKAMAKI *et al.*, 1999), vários circuitos de controle são necessários para manter a ordem adequada nas múltiplas vias de sinalização ativadas pelo hormônio e, portanto, permitir uma resposta celular final coordenada. Acredita-se que a indução de SOCS3 pela insulina constitua-se em um dos meios utilizados por este hormônio para controlar sua própria sinalização e de estabelecer um *cross-talk* com outros hormônios.

Alguns trabalhos demonstram que as proteínas SOCS3 participam do *cross-talk* negativo entre a sinalização de duas citocinas (MAGRANGEAS *et al.*, 2001), e de um hormônio e uma citocina (BOISCLAIR *et al.*, 2000).

Cross-talk molecular entre a sinalização da ANGII e da Insulina

Em vista da importante associação entre resistência à insulina, hipertensão e doença cardiovascular, numerosos estudos vêm explorando a interação entre os sistemas de sinalização da insulina e da ANGII. Vários grupos, inclusive o nosso, têm demonstrado que o *cross-talk* molecular entre estes hormônios ocorre em múltiplos níveis e envolve várias moléculas de sinalização.

Estudos de Saad *et al.* (1995) e Velloso *et al.* (1996), realizados em tecido cardíaco de ratos demonstraram que a ANGII é capaz de estimular a fosforilação em tirosina de IRS-1 e IRS-2, e a associação destes com a enzima PI 3-K, embora iniba a atividade enzimática desta última. Folli *et al.* (1997), demonstraram que a ANGII estimula a fosforilação em serina do IR, IRS-1 e da enzima PI 3-K. Carvalho *et al.* (1997), demonstraram que os antagonistas de AT1 podem bloquear o efeito da ANGII sobre o sinal da insulina. Carvalheira *et al.* (2003), demonstraram que a ANGII induz a co-imunoprecipitação de JAK2 com IRS-1 e IRS-2 e reduz a fosforilação em serina da AKT. Por outro lado, aumenta a associação entre IRS-1 e IRS-2 com Grb2 e a atividade da ERK (CARVALHEIRA *et al.*, 2003).

Em 2000, Elbaz e colaboradores (2000), demonstraram que, em células de ovários de *Hamster* (células CHO), o receptor AT2 inibe a atividade quinase do IR causando, portanto, inativação do IR e inibição da fosforilação de IRS-1- e SIRP α 1 (proteína regulatória do sinal) e a subsequente associação destas proteínas com a fosfatase SHP2 (WELHAM *et al.*, 1994; TAUCHI *et al.*, 1995). Os resultados deste estudo sugerem que a insulina promova um *loop* regulatório envolvendo a ativação de AT2 a fim de obter uma melhor modulação de seus efeitos sobre o crescimento e/ou metabolismo e também uma possível participação de AT2 em tecidos sensíveis à insulina e/ou em situações

patológicas caracterizadas por liberação massiva ou local de insulina, assim como aquelas encontradas em insulinomas. Desta forma, a transativação funcional do IR pelo receptor acoplado a proteína G, AT2, ilustra um novo modo de comunicação negativa entre duas famílias de receptores de membrana e isto pode contribuir para a farmacoterapia de importantes doenças, assim como a hipertensão e o diabetes mellitus.

Hipertensão arterial x Resistência à Insulina

Estudos epidemiológicos revelam que a hipertensão é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes mellitus não dependente de insulina (NIDDM) (DEFRONZO e FERRANNINI, 1991; REAVEN, 1993), independentemente da obesidade.

Ainda são pouco conhecidos os mecanismos responsáveis pela resistência à insulina em hipertensos. Há dúvidas se existe uma relação de causalidade entre hipertensão arterial e resistência à insulina ou se estas condições são apenas simultâneas no mesmo indivíduo, representando um desarranjo de múltiplos sistemas ou mesmo o desarranjo de um único sistema de controle dos sistemas cardiovascular e metabólico, tendo como manifestações hipertensão arterial e resistência à insulina (NATALI *et al.*, 1996).

Sabe-se que a insulina exerce efeitos cardiovasculares que podem, em alguns casos, contribuir para a gênese da hipertensão arterial. A hiperinsulinemia promove aumento da reabsorção de sódio e água pelas células tubulares dos rins, resultando em retenção salina e expansão volêmica, aos quais se atribui seu envolvimento na gênese da hipertensão arterial (DEFRONZO *et al.*, 1975). A insulina ainda abaixa os níveis plasmáticos de ácidos graxos livres estimulando diretamente a bomba sódio-potássio-ATPase (Na^+/K^+ ATPase) (CLAUSEN, 1986), demonstrando que talvez o *link* entre resistência à insulina e hipertensão possa ser à nível do transporte de cátion celular. Além disso, altos níveis circulantes de insulina podem causar hiperatividade do sistema nervoso simpático, o que poderia contribuir para o desenvolvimento da hipertensão arterial (LANDSBERG, 1999). O aumento do tônus adrenérgico pode causar ambos,

resistência à insulina e elevação da pressão sanguínea, através das ações das catecolaminas sobre o metabolismo dos carboidratos de um lado (SILVERBERG *et al.*, 1978), e resistência vascular de outro (BUHLER *et al.*, 1980). Também a hiperinsulinemia pode estar associada ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca (CARVALHEIRA *et al.*, 2003).

Variações na atividade do sistema renina-angiotensina (SRA) podem também contribuir para a associação entre resistência à insulina e hipertensão (PEACH, 1977). Há indicações de que a ANGII pode alterar a ação da insulina *in vivo* por pelo menos dois motivos principais. A ANGII através de seu efeito vasoconstritor pode reduzir o *clearance* de insulina nos tecidos periféricos e assim levar a um excesso de insulina tecidual, o que por sua vez, levaria a hipo-sensibilização do receptor à ação da insulina (FLISER *et al.*, 1997). Estudos em cultura de células e corações isolados demonstraram que o excesso de ANGII pode levar a uma redução na sensibilidade de células musculares lisas e do miocárdio à ação da insulina por efeito antagônico direto da ANGII nos mecanismos de sinalização celular da insulina (SAAD *et al.*, 1995; VELLOSO *et al.*, 1996; ALI *et al.*, 1997a; FOLLI *et al.*, 1997). Vários estudos têm demonstrado que o uso de agentes que inibem a ação da ANGII, como os inibidores da enzima conversora de ANGII (ECA) e os antagonistas do receptor AT1, não somente reduzem a pressão sanguínea como também melhoram a sensibilidade à insulina em indivíduos hipertensos e resistentes à insulina (FELDMAN, 2000; SCHEEN, 2004). Dessa forma, torna-se claro que o sistema renina-angiotensina exerce papel regulatório importante sobre a ação da insulina.

Como a resistência à insulina é tecido e via-específica, é possível que, em paralelo à reduzida ação da insulina em vias metabólicas, a hiperinsulinemia possa agir super-estimulando outros alvos da insulina em diferentes células e tecidos. E ainda, o *cross-talk* entre insulina e outros hormônios, como ANGII, epinefrina, GH e leptina, entre outros, pode acabar por modular os efeitos da ação da insulina (MULLER, 2002; MALBON, 2004).

No nível celular, a resistência à insulina está associada com a diminuição da atividade tirosina quinase do IR (VIRKAMAKI *et al.*, 1999) e com a diminuição da fosforilação de proteínas alvo, como o IRS-1, resultando em menor ativação da sinalização distal e atenuação das respostas biológicas deste hormônio. Várias citocinas, como

interleucina-1 β (IL1 β) (LING *et al.*, 1994), interleucina-6 (IL6) (PICKUP *et al.*, 2000) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993; UYSAL *et al.*, 1997; De SOUZA *et al.*, 2005), e hormônios, como o GH (FAVRE *et al.*, 1999) e a ANGII (CARVALHEIRA *et al.*, 2003; CALEGARI *et al.*, 2005) causam resistência à insulina, mas o(s) mecanismo(s) pelos quais eles inibem a sinalização da insulina ainda não foram totalmente elucidados. Um mecanismo pelo qual estes agentes podem causar resistência à insulina é induzindo a expressão de proteínas celulares que inibem a sinalização do IR. De maneira interessante, a expressão das proteínas SOCS encontra-se aumentada por agentes que causam resistência à insulina, incluindo IL1 β , IL6, TNF α , GH e ANGII (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993; LING *et al.*, 1994; UYSAL *et al.*, 1997; FAVRE *et al.*, 1999; PICKUP *et al.*, 2000; CARVALHEIRA *et al.*, 2003; CALEGARI *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos apontam a participação das proteínas SOCS na resistência à insulina. Usando células transfetadas com IR, SOCS1 e SOCS6, Mooney *et al.* (2001) mostraram que SOCS1 e SOCS6 inibem a ativação da quinase ativadora da mitogênese (MAPK) e da PKB induzida pela insulina por causarem inibição da atividade tirosina quinase do IR. Kawazoe *et al.* (2001) observaram que camundongos deficientes em SOCS1 apresentam aumento da sensibilidade à insulina.

De forma inversa a estes achados, Li e colaboradores (2004) demonstraram que a insulina induz a expressão de SOCS6 e que esta se associa ao monômero p85 da enzima PI 3-K, o que resulta em melhora na captação de glicose e tolerância à insulina, sugerindo que SOCS6 possa, positivamente, regular a ação da insulina. SOCS7 também pode ser induzida pela insulina (LI *et al.*, 2004) e interagir com p85 (KREBS *et al.*, 2002). Os autores acima propõem que a modulação de SOCS6 e/ou SOCS7 possam ser potenciais alvos terapêuticos para o tratamento do diabetes tipo II (NIDDM) e de outras doenças associadas com resistência à insulina, como hipertensão arterial.

Acreditamos que uma caracterização mais completa da comunicação entre as vias de sinalização da insulina e da ANGII forneça substrato para uma melhor compreensão dos mecanismos que levam à alta associação clínica entre hipertensão arterial e resistência à insulina e/ou diabetes mellitus tipo II, além de permitir avanços no conhecimento de uma área com potencial terapêutico para ambas as doenças.



OBJETIVOS

Objetivos do Capítulo 1

Investigar se a proteína SOCS3 pode ser induzida pela ANGII em tecido cardíaco de ratos *in vivo* e *in vitro* e se SOCS3 está envolvida no controle da transdução do sinal deste hormônio.

Objetivos do Capítulo 2

Investigar se SOCS3, induzida por ANGII, interage com elementos da via de sinalização da insulina e se constitui em mais um mecanismo de interconexão entre os sistemas de sinalização da ANGII e da insulina.



CAPÍTULOS

Suppressor of Cytokine Signaling 3 Is Induced by Angiotensin II in Heart and Isolated Cardiomyocytes, and Participates in Desensitization

VIVIAN C. CALEGARI, ROSANGELA M. N. BEZERRA, MÁRCIO A. TORSONI, ADRIANA S. TORSONI, KLEBER G. FRANCHINI, MÁRIO J. A. SAAD, AND LÍCIO A. VELLOSO

Department of Internal Medicine, State University of Campinas, 13084 970 Campinas SP, Brazil

Angiotensin II (Ang II) exerts a potent growth stimulus on the heart and vascular wall. Activation of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) intracellular signaling pathway by Ang II mediates at least some of the mitogenic responses to this hormone. In other signaling systems that use the JAK/STAT pathway, proteins of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) family participate in signal regulation. In the present study it is demonstrated that SOCS3 is constitutively expressed at a low level in rat heart and neonatal rat ventricular myocytes. Ang II at a physiological concentration enhances the expression of SOCS3 mRNA

and protein, mainly via AT1 receptors. After induction, SOCS3 associates with JAK2 and impairs further activation of the JAK2/STAT1 pathway. Pretreatment of rats with a specific phosphorothioate antisense oligonucleotide to SOCS3, reverses the desensitization to angiotensin signaling, as detected by a fall in c-Jun expression after repetitive infusions of the hormone. Thus, SOCS3 is induced by Ang II in rat heart and neonatal rat ventricular myocytes and participates in the modulation of the signal generated by this hormone. (*Endocrinology* 144: 4586–4596, 2003)

ANGIOTENSIN II (Ang II) participates in the control of blood pressure, cardiac contractility, regulation of regional blood flow, and cellular growth and repair (1, 2). This hormone specifically activates at least two well characterized transmembrane G protein-coupled receptors belonging to the seven-transmembrane-spanning receptor family, namely, angiotensin receptor 1 (AT1) and angiotensin receptor 2 (AT2) (3, 4). At least four intracellular pathways participate in transduction of the Ang II signal in target cells. Activation of G protein G_q leads to inositol 1,4,5-triphosphate generation and a subsequent rise in cytosolic free calcium, which modulates cell contractility, vesicular trafficking, gene transcription, and mitogenesis (5, 6); on the other hand, induction of G protein G_i inhibits cAMP (7). The third mechanism involves the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade (8), and the fourth mechanism leads to activation of Janus kinase 2 (JAK2), an intracellular kinase commonly engaged by receptors belonging to class I and class II cytokine families, which rapidly directs the signal toward the nucleus through the signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins (9, 10).

Several intracellular signaling systems that use the JAK/STAT pathway to transduce their message are controlled by members of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) family (11, 12). SOCS proteins are under the transcriptional control of STATs (13, 14), and once induced, target receptor/JAK complexes through a central Src homology 2 domain

and a C-terminal SOCS box domain (15, 16). In IL-6 signaling, SOCS3 transcripts are detected as early as 30 min after IL-6 treatment of cultured cells (17). The translated SOCS3 then migrates and interacts with Tyr⁷⁵⁹ in the IL-6 receptor subunit gp130, thereby inhibiting further activation of the IL-6/JAK2/STAT signaling pathway (17). Thus, in addition to the already known intracellular systems that participate in the control of hormone, growth factor, and cytokine signaling, including tyrosine phosphatases, serine-threonine kinases, and protein inhibitor of activated STATs, the SOCS family causes a medium- to long-term inhibition and refractoriness of signaling pathways that engage JAKs and STATs (18, 19).

As Ang II activates JAK2 and STAT-1, -2, -3, and -5, we have investigated the possible involvement of SOCS3 in Ang II-mediated physiological events in rat heart and neonatal rat ventricular myocytes (NRVM). RT-PCR, immunoprecipitation, Western blotting, and immunohistochemistry studies reveal that rat heart and NRVM constitutively express low level of SOCS3, which is rapidly induced by Ang II infusion. The blockade of SOCS3 expression leads to a loss of desensitization of Ang II signaling. Thus, SOCS3 modulates Ang II signaling in heart and NRVM.

Materials and Methods

Antibodies and chemicals

Reagents for SDS-PAGE and immunoblotting were obtained from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). HEPES, phenylmethylsulfonylfluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, pancreatin, Ang II, and BSA (fraction V) were obtained from Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO). Neomycin was purchased from Life Technologies, Inc. (Geneticin G418, Grand Island, NY). Losartan was purchased from Merck & Co. (Wilmington, DE). Protein A-Sepharose 6MB and Percoll (density, 1.131 g/ml) were obtained from Amersham

Abbreviations: Ang II, Angiotensin II; AT, angiotensin receptor; ERK, extracellular signal-regulated kinase; IP, immunoprecipitation; JAK, Janus kinase; NRVM, neonatal rat ventricular myocytes; pY, phosphorytrosine; SHP, Src homology protein tyrosine phosphatase; SOCS, suppressor of cytokine signaling; STAT, signal transducer and activator of transcription.

Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden), [¹²⁵I]protein A, and nitrocellulose membranes were obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, UK). Antibodies against AT1 (rabbit polyclonal, sc-579), JAK2 (rabbit polyclonal, sc-278 and sc-7229), phosphotyrosine (pY; mouse monoclonal, sc-508), c-Jun (rabbit polyclonal, sc-1694), phospho-STAT1 (Tyr⁷⁰¹, goat polyclonal, sc-7988), phospho-ERK (pERK, Tyr²⁰⁴ mouse monoclonal, sc-7383, recognizes ERK, 44 and 42 kDa) and SOCS3 (rabbit polyclonal, sc-9023 and goat polyclonal, sc-7009) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). The secondary antibodies and conjugates used in immunohistochemistry were obtained from Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA). Chemicals, culture media, Lipofectamine Plus, and sera used in myocyte preparation and culture were purchased from Life Technologies, Inc. Chemicals employed in RT-PCR experiments, primers for SOCS3 (sense, 5'-ACC TCT CTC CAA CG-3'; antisense, 5'-TGC TGG GCT AAC TGG-3'), β -actin (sense, 5'-TTT GGG AGG GTG AGG GAC TTC-3'; antisense, 5'-TGA GCG CAA GTA CTC TGT GTG G-3'), and phosphothioate-modified oligodeoxynucleotides for SOCS3 (sense, 5'-CAT GGT CAC CCA CAG-3'; antisense, 5'-CTG TGG GTG ACC ATG-3'; scrambled, 5'-GCT AGC GAT GTC TGG-3'), were synthesized by Life Technologies, Inc. Sodium amobarbital was obtained from Eli Lilly & Co. (Indianapolis, IN).

Animals

Male Wistar rats (1–3 d old for cardiomyocyte preparation or 48 d old/150–200 g for the remaining experiments) from the University's Central Animal Breeding Center were used in the experiments. The adult rats were allowed access to standard rodent chow and water *ad libitum*. Food was withdrawn 12 h before the experiments. Rats were anesthetized by an ip injection of sodium amobarbital (15 mg/kg body weight), and the experiments were initiated after the loss of corneal and pedal reflexes. All experiments were conducted in accord with the principles and procedures described by NIH Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and were approved by the State University of Campinas ethical committee.

Preparation of NRVM

Ventricular cardiac myocytes were prepared by enzymatic disaggregation as described previously (20). Hearts from neonatal (1–3 d old) Wistar rats were excised, and the ventricles were minced and suspended in sterile ADS buffer [4.36 g HEPES, free acid (pH 7.35), 6.8 g NaCl, 1.0 g D-glucose, 0.4 g KCl, 0.14 g NaH₂PO₄·H₂O, 0.1 g MgSO₄ anhydrous, and 0.02 g phenol red]. Tissue was then subjected to multiple enzymatic digestions at 37 °C using a mixture of collagenase and pancreatin. Four or five successive digestions were performed, each lasting 20 min. The solution obtained during each digestion was transferred to a sterile tube containing 1.0 ml newborn calf serum and centrifuged. The pellets obtained were resuspended in newborn calf serum. To separate myocytes from other cells, the suspension was layered onto a discontinuous Percoll density gradient consisting of two phases. After washing to remove traces of Percoll, the myocytes were cultured in DMEM containing 5% fetal calf serum, 10% horse serum, and 100 U penicillin-streptomycin/ml. The cells were plated at the concentration of 6.0 × 10⁴/cm² on plates previously coated with 0.1% gelatin. The purity of the preparation was ascertained by immunofluorescence using TRITC-phalloidin and evaluation by confocal microscopy.

Ang II treatment and tissue extraction

The abdominal cavity was opened, the vena cava was exposed, and 0.02 ml saline (0.9% NaCl), with or without 10⁻⁶ M Ang II (or concentrations ranging from 10⁻¹²–10⁻⁶ M in dose-response experiments), was injected. Some rats received losartan (10 mg/kg, ip) 30 min before the experiments. In some cases rats received 6.0 nmol (diluted in 200 μ l TE buffer) sense, antisense, or scrambled SOCS3 oligonucleotide 3 h before the experiments. Based on the *Rattus norvegicus* SOCS3 mRNA sequence (accession no. AF075383 at NCBI Entrez Nucleotide), three different sequences were designed and tested by ip injection of 6.0 nmol antisense or respective sense oligonucleotide, and they were evaluated for their ability to block SOCS3 synthesis by measuring SOCS3 in immunoprecipitation experiments of heart protein extracts. The sequence 5'-CTG

TGG GTG ACC ATG-3' was capable of reducing 80% ($P < 0.05$) Ang II-stimulated SOCS3 expression and was used in all experiments in parallel with its respective sense sequence as control. At various time intervals (as shown in *Results*), the tips of the ventricles were excised and immediately homogenized in approximately 5 vol 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 vanadate, 2.0 mM phenylmethylsulfonylfluoride, and 0.1 mg aprotinin/ml] with a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operated at maximum speed for 30 sec.

Cardiomyocytes plated at a density of 6.0 × 10⁴/cm² were exposed to Ang II (doses and time as stated in *Results* and figures) and losartan (10⁻⁵ M, loaded 30 min before the experiment). In some experiments cells were treated with neomycin (800 μ g/ml) during the same period of treatment with Ang II. For treatment with sense, antisense, or scrambled SOCS3 oligonucleotides, NRVM were plated (6.0 × 10⁴/cm²), washed in serum- and antibiotic-free DMEM, and maintained in this medium for 3 h. Sense, antisense, or scrambled oligonucleotides were added to the culture medium (1.0 μ M) in parallel with the transfection reagent Lipofectamine Plus (10 μ g/ml). After 8 h, the medium was replaced with 20% fetal calf serum/DMEM and incubated overnight. The next day, the cells were exposed to Ang II and losartan. After stimulation, the cells were washed twice in ice-cold PBS and scraped into ice-cold solubilization buffer (as for heart extraction).

Protein analyses by immunoblotting

Insoluble material was removed by centrifugation for 25 min at 11,000 rpm in a 70.Ti rotor (Beckman, Fullerton, CA) at 4 °C. The protein concentration of the supernatants was determined with the Bradford dye-binding method (21). Aliquots of the resulting supernatants containing 5.0 mg total protein were used for immunoprecipitation with anti-AT1, anti-JAK2, anti-pY, or anti-SOCS3 antibodies at 4 °C overnight, followed by the addition of protein A-Sepharose 6MB for 2 h. The pellets were washed three times in ice-cold buffer [0.5% Triton X-100, 100 mM Tris (pH 7.4), 10 mM EDTA, and 2.0 mM sodium vanadate]. After washing, the pellet was resuspended in Laemmli's sample buffer (22) containing 100 mM dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 5 min. The samples were subjected to SDS-PAGE (10%, 12%, or 15% bis-acrylamide) in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus (Bio-Rad Laboratories). Electrotransfer of proteins from the gel to the nitrocellulose membrane was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean) as described by Towbin *et al.* (23). The nitrocellulose membranes were preincubated in blocking buffer (5% BSA, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20) for 2 h. The nitrocellulose blot was then incubated with the appropriate antibody diluted in blocking buffer (3% BSA instead of nonfat dry milk) overnight at 4 °C and washed for 15 min with the blocking buffer without BSA. The blots were subsequently incubated with 2.0 mCi [¹²⁵I]protein A in 10 ml blocking buffer for 2 h at room temperature and washed again as described above for 15 min. [¹²⁵I]Protein A bound to the antibodies was detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film with Cronex Lightning Plus intensifying screens (Eastman Kodak, Rochester, NY) at -70 °C for 24–72 h. Band intensities were quantified by digital densitometry (Scion Image software, Scion Corp., Frederick, MD) of the developed autoradiographs. For simple immunoblot experiments (not preceded by immunoprecipitation), 0.2 mg total protein from heart or cardiomyocyte extracts was separated by SDS-PAGE (10%, 12%, or 15% bis-acrylamide), transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with the appropriate antibodies (anti-pY, anti-phospho-STAT1, anti-phospho-ERK, anti-SOCS3, anti-JAK2, or anti-c-Jun) (24, 25).

Immunohistochemistry

Rat hearts were fixed in buffered 4% paraformaldehyde in 0.2 M PBS (pH 7.4) for 24 h and embedded in paraffin, and 3.0- μ m sections were obtained. The glass-mounted sections were cleared of paraffin with xylene and rehydrated by sequential washings with graded ethanol solutions (70–100%). After permeabilization with 0.1% Triton X-100 in PBS (pH 7.4) for 10 min at room temperature, the sections were incubated in 1% H₂O₂ in PBS for 30 min to quench the endogenous peroxidase activity. The sections were pretreated in a microwave oven in

sodium citrate buffer (pH 7.4) for 10 min. After washing in PBS, the sections were blocked with 3% nonfat dry milk in PBS for 1 h at 37°C, followed by overnight incubation with the primary antibody (anti-SOCS3 rabbit polyclonal, 1:20 dilution; anti-AT1 rabbit polyclonal, 1:20) in 1% BSA in PBS at 4°C in a moist chamber. The sections were subsequently washed and incubated with a specific biotinylated antirabbit secondary antibody (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA; 1:150 dilution) for 2 h at room temperature, followed by incubation with streptavidin reagent containing avidin-conjugated peroxidase. The color reaction was developed using a diaminobenzidine substrate kit (Vector Laboratories) according to the manufacturer's recommendations. After the color reaction, the sections were counterstained with Harris hematoxylin, dehydrated through an ethanol series into xylene, and mounted using Entelan mounting media (Microscopy, Karlsruhe, Germany). Secondary antibody specificity was tested in a series of positive and negative controls. In the absence of primary antibodies, incubation with secondary antibodies (negative controls) failed to produce any significant staining. The images were obtained using an optical microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and were acquired with a Focus Imagecorder Plus System (26).

RNA isolation

Rat heart ventricles were excised and rapidly frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted from whole ventricles using TRIzol reagent (Life Technologies, Inc.), according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was quantified by spectrophotometry at A₂₆₀ nm, and its integrity was determined from the A₂₆₀/A₂₈₀ nm ratio. After 24 h, isolated total RNA was rendered genomic DNA-free by digestion with ribonuclease-free deoxyribonuclease (RNase; Promega Corp., Madison, WI).

Semiquantitative RT-PCR

RT-PCR was used to determine the mRNA expression of SOCS3, measuring β-actin as an internal standard. Seven micrograms of total RNA from each heart were reverse transcribed with SuperScript reverse transcriptase (200 U/μl) using oligo(deoxythymidine) (50 mM) in a 30-μl reaction volume (5× RT buffer, 10 mM deoxy-NTP, and 40 U/μl ribonuclease-free inhibitor). The RTs involved a 50-min incubation at 42°C and a 15-min incubation at 70°C. After RT, 0.75 μl of the RT product was used in each PCR to a final volume of 50 μl (10× PCR buffer, 1.0 mM deoxy-NTP, 50 mM MgCl₂, Taq polymerase, and sense and antisense primers for SOCS3 and β-actin). The expression of mRNA was determined by PCR using the primers described in *Antibodies and chemicals*, and amplified a 251-bp DNA fragment of SOCS3 and a 489-bp DNA fragment of β-actin. Triplicate reactions were performed using an initial incubation at 94°C for 5 min, denaturation at 94°C for 1 min, followed by annealing at 52°C for 50 sec, extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 7 min. A cycle titration between 20–40 cycles of RT-PCR products revealed that 23 cycles for β-actin and 30 cycles for SOCS3 were within the logarithmic phase of amplification. Therefore, those PCR conditions were used in subsequent experiments. All PCR experiments included a control tube with no RT step. PCR-amplified products were run on 2% Tris/acetic acid/EDTA agarose gels, and the DNA was visualized by ethidium bromide staining. The molecular size of the products was determined using a 1-kb Plus DNA ladder (Life Technologies, Inc.) as standard size marker. Images of the bands were obtained using a TFX 35M UV transiluminator (Life Technologies, Inc.), and band intensity was quantified by digital densitometry (Scion Image software).

Data presentation and statistical analysis

The results are expressed as the mean ± SD of the indicated number of experiments, as appropriate. The blots are presented as direct comparisons of bands in autoradiographs and quantified by densitometry using Scion Image software. The *t* test for unpaired samples was used for statistical analysis. The level of significance was set at *P* < 0.05.

Results

Ang II induces SOCS3 protein expression in rat heart and isolated cardiomyocytes

To investigate Ang II-induced SOCS3 expression, rats received an intracava injection of 0.02 ml of a solution containing 10⁻⁶ M Ang II and after 0–360 min, the hearts were surgically removed and homogenized for protein expression analyses. As shown in Fig. 1A, SOCS3 (30 kDa), which was already present in heart at protein levels that approximated the detection limit of the method, was induced 10 min after treatment with Ang II and reached maximum expression at 120 min. Thereafter, the level of SOCS3 decreased and had returned to basal expression levels at 360 min. Evaluation of SOCS3 expression in nitrocellulose transfers of total protein extracts resolved by SDS-PAGE yielded no detectable bands. In the latter experiments, up to 0.25 mg total protein was loaded into each cell of the electrophoretic apparatus. Thus, even after stimulation with Ang II, the amount of SOCS3 in heart is below the detection limit of the method, and only after partial purification by immunoprecipitation can the protein be detected.

To investigate the dose-dependency of the SOCS3 response to Ang II, experiments were performed after the infusion of 0.02 ml saline or the same volume of saline containing 10⁻¹², 10⁻¹⁰, 10⁻⁸, and 10⁻⁶ M Ang II. Tissue specimens were obtained at 120 min, and heart homogenates were submitted to immunoprecipitation, separation by SDS-PAGE, transfer to nitrocellulose membranes, and evaluation of protein amounts by Western blot with specific antibodies. Enhanced SOCS3 expression was detected after treatment with 10⁻⁸ M Ang II, which provides a serum concentration of Ang II within the physiological range (Fig. 1B).

To examine whether Ang II exerted an effect on SOCS3 expression at the transcriptional level, total RNA extracted from hearts was reverse transcribed and amplified using specific primers for SOCS3 and β-actin. Before stimulation with Ang II, SOCS3 transcripts were already present at low levels in the heart. After stimulation with 10⁻⁶ M Ang II, no early increase was detected (at 1.5 min), but at 60 min a 1.5-fold rise in SOCS3 mRNA was evident and differed significantly from basal levels (Fig. 1C). At 360 min, SOCS3 transcripts had fallen to below basal levels. Thus, it seems that Ang II initially regulates SOCS3 expression at the translation level and only later affects the rate of transcription.

To exclude the possibility of an indirect *in vivo* effect of blood pressure fluctuations or participation of other hormonal systems on SOCS3 induction, isolated neonatal cardiomyocytes were treated with Ang II (10⁻¹¹, 10⁻⁹, 10⁻⁷, and 10⁻⁵ M) for 120 min. Protein extracts from these samples were evaluated by immunoprecipitation, SDS-PAGE, and immunoblotting with anti-SOCS3 antibodies. As depicted in Fig. 1D, Ang II was capable of inducing SOCS3 expression in NRVM beginning at 10⁻⁷ M Ang II. The difference in sensitivity to Ang II between hearts of living rats and NRVM may occur because of age differences (living animals were adults, and NRVM were obtained from neonatal rats), as Ang II receptors are regulated during ontogeny (27), or due to culture conditions that may affect AT1 expression and turnover (28).

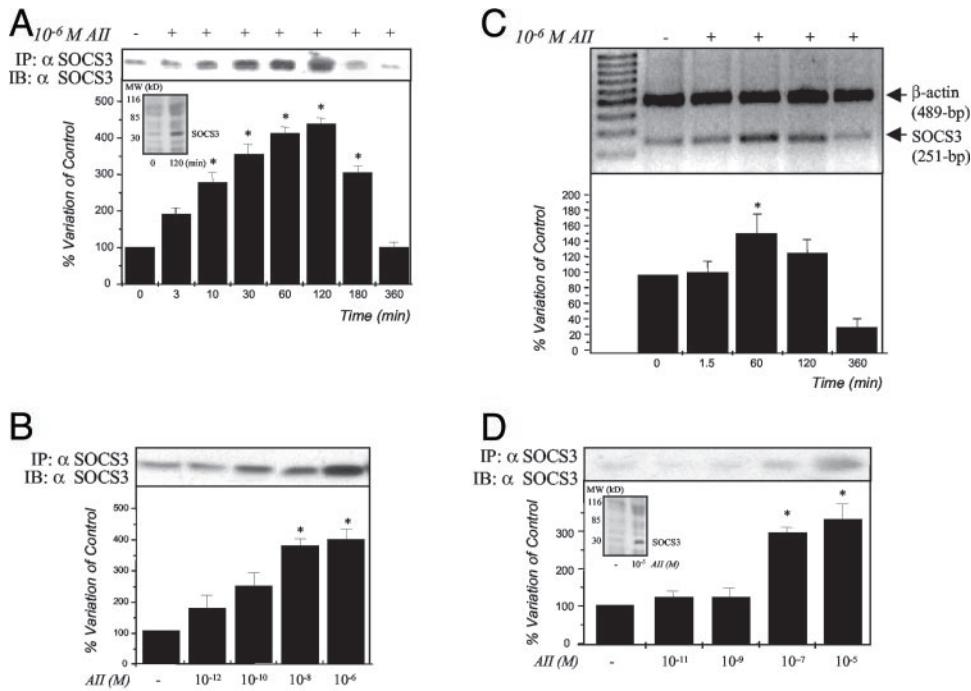


FIG. 1. Time course (A and C) and dose response (B) of Ang II-stimulated SOCS3 expression in rat hearts and dose response of Ang II-stimulated SOCS3 expression in NRVM. A, Rats were anesthetized, the abdominal wall was incised, and 0.02 ml 10⁻⁶ M Ang II was administered into the vena cava as a bolus injection. After the elapsed time indicated in the figure, the tips of left ventricles were excised and homogenized in solubilization buffer at 4°C, immunoprecipitated with rabbit anti-SOCS3 antibody (α SOCS3), and immunoblotted (IB) with goat anti-SOCS3 antibody. The inset depicts a whole blot of a typical run containing a sample from a control (0 min) and a sample from a 10⁻⁶ M Ang II-treated rat (120 min; $n = 3$; $*P < 0.05$). B, Rats were anesthetized, the abdominal wall was incised, and 0.02 ml saline or Ang II at the concentrations indicated in the figure was injected. After 120 min, the tips of the left ventricles were excised and homogenized in solubilization buffer at 4°C, immunoprecipitated with rabbit anti-SOCS3 antibody, and immunoblotted with goat anti-SOCS3 antibody ($n = 3$; $*P < 0.05$). C, Rats were anesthetized, the abdominal wall was incised, and 0.02 ml 10⁻⁶ M Ang II was administered into the vena cava as a bolus injection. After the elapsed time indicated in the figure, the tips of the left ventricles were excised and homogenized in TRIzol; RNA was reverse transcribed and PCR-amplified using SOCS3-specific primers. Products were separated in 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. Upper part, The 489-bp β -actin as internal standard and the 251-bp SOCS3 PCR product. Lower part, Histogram of the quantification of SOCS3 mRNA ($n = 3$; $*P < 0.05$). D, NRVM were prepared following a technique described in the text and were plated in DMEM at a concentration of 6.0 \times 10⁴/cm² on plates previously coated with 0.1% gelatin. Ang II was applied to culture medium at concentrations depicted in the figure. After 120 min, cells were harvested, homogenized, and used for immunoprecipitation with rabbit anti-SOCS3 antibody. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with goat anti-SOCS3 antibody. The inset depicts a whole blot of a typical run containing a sample from control (no Ang II) and a sample from cells treated with 10⁻⁵ M Ang II ($n = 3$; $*P < 0.05$). AII, Ang II; MW, molecular mass standards in kilodaltons.

Tissue distribution of Ang II-induced SOCS3 expression in rat heart

To determine the histological distribution of SOCS3 in cardiac tissue of rats, sections were obtained from several subareas of Ang II-treated (10⁻⁶ M, 120 min) and control hearts. Figure 2, A–D, shows the pattern of basal (non-Ang II-stimulated) SOCS3 protein expression predominantly in the endocardium and in the endothelium and smooth muscle of the coronary arteries of left ventricle and atrium. After treatment with Ang II, a marked increase in the intensity of SOCS3 staining was detected in the same areas as those mentioned above (Fig. 2, E–H). Therefore, it seems that Ang II stimulates an increase in SOCS3 expression in the same areas where it is present before hormone stimulation and does not promote its expression (at least at detectable amounts by this method) in muscle or other cell types present in the heart. Interestingly, the expression of SOCS3 coincides with regions that possess higher concentrations of AT1 receptors (Fig. 2, I–J).

Ang II induces the association of JAK2 and SOCS3 in rat heart and cardiomyocytes

To investigate the association of SOCS3 with JAK2 after Ang II treatment, heart protein homogenates from rats treated or not with 10⁻⁶ M Ang II for different periods of time were immunoprecipitated with a polyclonal anti-SOCS3 antibody. The immunoprecipitates were then immunoblotted with a polyclonal antibody against JAK2. As shown in Fig. 3A, the anti-SOCS3 antibody coimmunoprecipitated small amounts of JAK2 (130 kDa) at time zero. However, 10 min after Ang II treatment, the amount of coprecipitating JAK2 increased significantly. The formation of complexes increased significantly and was maximal 120 min after Ang II treatment, remaining steady for at least 180 min and returning to near basal levels at 360 min. In additional experiments, anti-JAK2 immunoprecipitates were immunoblotted with anti-SOCS3 antibody, and a 30-kDa band (SOCS3) was detected (Fig. 3B). In dose-response experiments, NRVM were exposed to Ang II for 120 min, and the SOCS3/JAK2 asso-

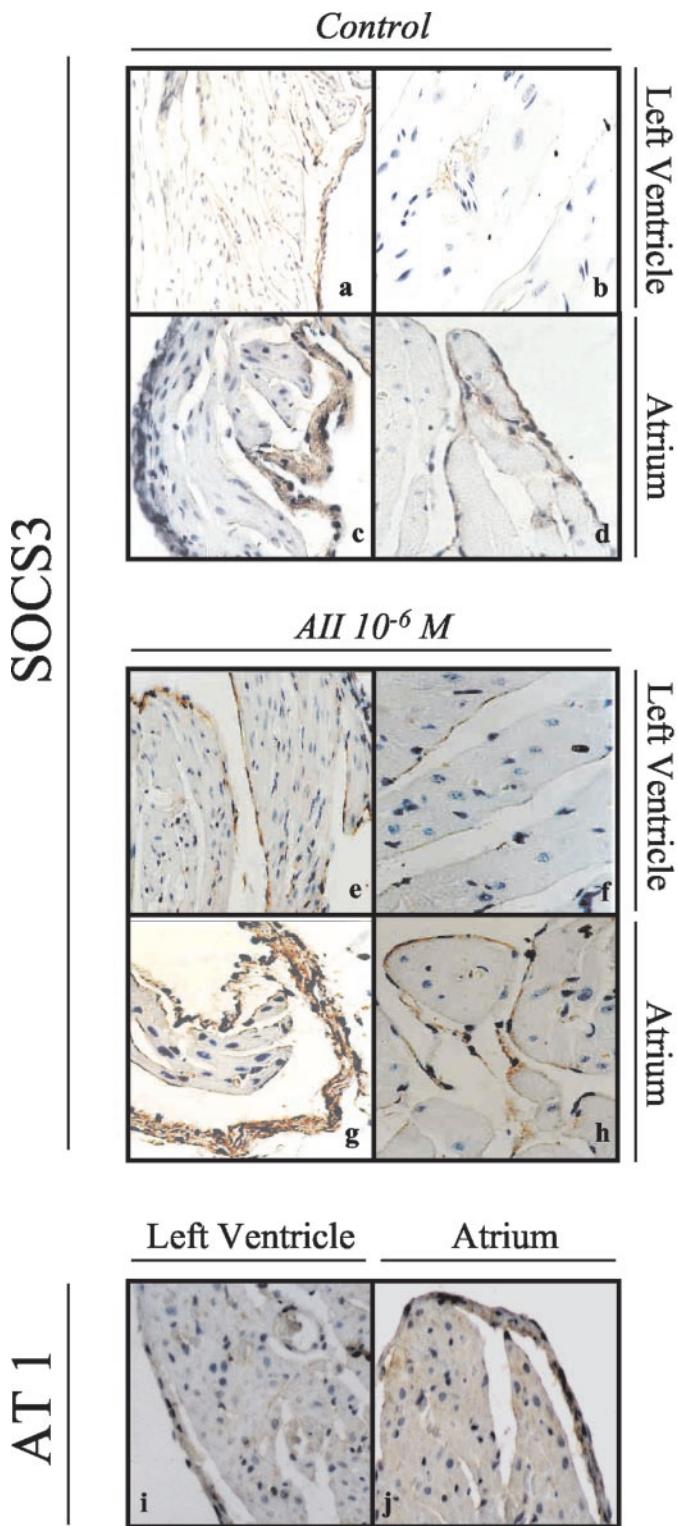


FIG. 2. Histological localization of SOCS3 and AT1 in rat heart. Rats were treated (E–H) or not (A–D and I–J) with $0.02 \text{ ml } 10^{-6} \text{ M}$ Ang II; after 2 h, the hearts were excised, fixed in 4% paraformaldehyde, and submitted to histological characterization of protein distribution by traditional immunoperoxidase staining using anti-SOCS3- (A–H) or anti-AT1 (I–J)-specific antibodies. Depicted are representative examples of three different experiments with specimens obtained from left ventricle (A, B, E, F, and I) and atrium (C, D, G, H, and J) as stated in the figure. AII, Ang II.

ciation was then assessed by immunoprecipitation (anti-SOCS3) and immunoblotting (anti-JAK2). As in heart tissue, NVRM responded to Ang II by exhibiting a dose-dependent association between SOCS3 and JAK2 (Fig. 3C).

SOCS3 is induced by Ang II through AT1-dependent signaling in heart and cardiomyocytes

Heart and cardiomyocytes express both forms of Ang II receptors, AT1 and AT2. As AT1 is expressed at a higher concentration than AT2 in both tissues, and its preferential histological distribution in heart coincides with the sites of greater Ang II-induced SOCS3 expression, we performed a series of experiments using the specific AT1 blocker losartan to assess the Ang II receptor type involved in the induction of SOCS3 expression in both tissues. For that purpose, living rats or NVRM were treated with saline, losartan (10 mg/kg for rats or 10^{-5} M in culture medium for cells), Ang II ($0.02 \text{ ml of } 10^{-6} \text{ M}$ for rats or 10^{-7} M in culture medium for cells), or losartan (doses and concentrations as described above, given 30 min before Ang II), followed by Ang II (same doses and concentrations as described above). At the established times, protein extracts were obtained to assess AT1, JAK2, and STAT1 tyrosine phosphorylation (Fig. 3, D and E), SOCS3 expression (Fig. 3, D and E), and JAK2/SOCS3 association (Fig. 3, F and G). As depicted in the figures, losartan abolished Ang II-induced tyrosine phosphorylation of AT1, JAK2, and STAT1. Moreover, losartan inhibited the expression of SOCS3 (Fig. 3, D and E) and its association with JAK2 (Fig. 3, F and G) in heart and NVRM. Thus, the action of Ang II on the expression and engagement of SOCS3 occurs via a losartan-sensitive mechanism and shows the same pattern of activation of the JAK/STAT pathway induced by Ang II.

Fractional involvement of JAK2 in Ang II-induced JAK tyrosine phosphorylation and Ang II-induced SOCS3/JAK2 association

Members of the SOCS family participate in the physiological control of cytokine signal transduction by binding to JAKs and temporarily inhibiting further stimulation of the JAK/STAT pathway. Significant blockade presumably occurs when most of the JAK2 involved in an initial stimulating event is engaged by SOCS3 and therefore unavailable for further action. To investigate the relative participation of JAK2 in Ang II signaling and its engagement by SOCS3, immunodepletion experiments were performed using a surplus of antibody (5.0 μg) against pY or SOCS3 and running SDS-PAGEs of the starting protein extracts in parallel with immunoprecipitates and the supernatant remains of the immunoprecipitates. Measurement of the total JAK2 present in the starting samples and tyrosine-phosphorylated JAK2 or SOCS3-associated JAK2 were obtained from the densitometric analyses of samples. There was no variation in JAK2 expression after Ang II treatment; however, tyrosine-phosphorylated JAK2 peaked at 10 min and corresponded to 10% of the total JAK2. SOCS3-associated JAK2 was higher at 60 min and corresponded to 15% of the total JAK2 (Fig. 4, A and B).

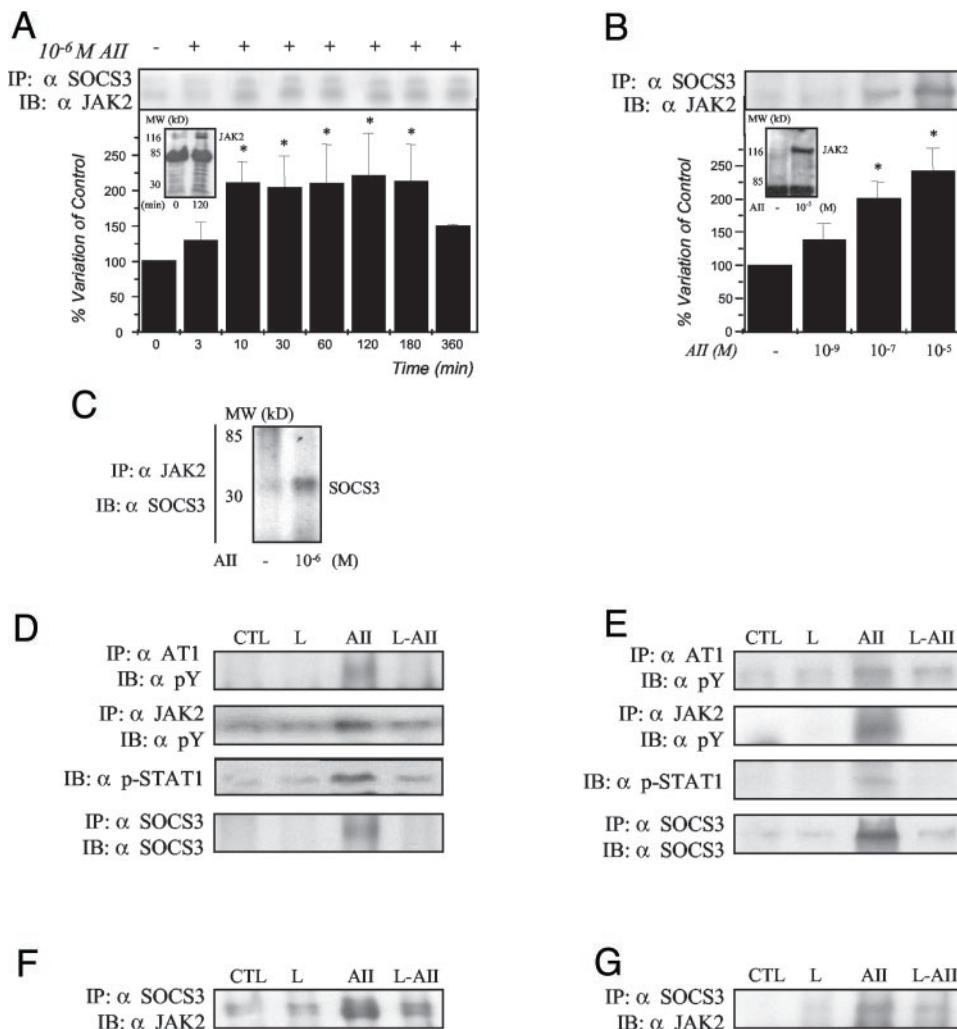


FIG. 3. Evaluation of SOCS3/JAK2 association and Ang II receptor type involved in Ang II-induced SOCS3 expression in heart and NRVM. **A**, The animals were anesthetized, the abdominal cavity was incised, and 0.02 ml 10^{-6} M Ang II (AII) was infused through the vena cava. After the elapsed time indicated in the figure, the tips of the left ventricles were excised and homogenized in solubilization buffer, 5 mg protein were submitted to immunoprecipitation (IP) with anti-SOCS3 (α -SOCS3) antibody, the immunoprecipitates were separated in 12% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes, and the membranes were immunoblotted (IB) with anti-JAK2 (α -JAK2) antibody. The inset depicts a whole blot of a typical run containing a sample from a control (0 min) and a sample from a 10^{-6} M Ang II-treated rat ($n = 3$; *, $P < 0.05$). **B**, Rats were anesthetized, the abdominal cavity was incised, and 0.02 ml 10^{-6} M Ang II was infused through the vena cava. After 120 min, the tips of the left ventricles were excised and homogenized in solubilization buffer, 5.0 mg of protein was submitted to immunoprecipitation with anti-JAK2 antibody, the immunoprecipitates were separated in 12% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes, and the membranes were immunoblotted with anti-SOCS3 antibody ($n = 3$). **C**, NRVM were prepared following a technique described in the text and were plated in DMEM at a concentration of $6.0 \times 10^4/\text{cm}^2$. Ang II was added to culture medium at the concentrations depicted in the figure, and after 120 min, cells were harvested, homogenized, and used for immunoprecipitation with anti-SOCS3 antibody. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with anti-JAK2 antibody ($n = 3$; *, $P < 0.05$). **D–G**, Living rats (D and F) or NRVM (E and G) were treated with losartan (L), Ang II (AII), or losartan followed by Ang II (L-AII); after 10 min (for IP: AT1, JAK2; IB with phospho-STAT1) or after 120 min (for IP, SOCS3), the tips of the left ventricles were excised and homogenized in solubilization buffer as described in the text (D and F), or cells were harvested and homogenized (E and G). Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with antiphosphotyrosine antibodies (α pY) or anti-SOCS3 antibodies (α SOCS3). Total extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with antiphospho-STAT1 antibody (α p-STAT1). Depicted are representative examples of three different experiments. CTL, Control; MW, molecular mass standards in kilodaltons.

Abrogation of Ang II desensitization by the blockade of SOCS3 expression with antisense oligonucleotide

Ang II induces the expression of early inducible genes such as *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, and *egr-1* in cultured cells and animals (2, 29). Repeated exposure to Ang II leads to a reduced induction of the expression of these genes and to refractoriness in several physiological phenomena modulated by

Ang II (30, 31). To test the hypothesis that the induction of SOCS3 by Ang II might be involved in mechanisms of refractoriness to Ang II signaling, we blocked the expression of SOCS3 with a sequence-specific phosphorothioate antisense oligonucleotide and evaluated the ability of repetitive doses of Ang II to induce the expression of c-Jun in heart and isolated cardiomyocytes. Initially, the ability of the antisense

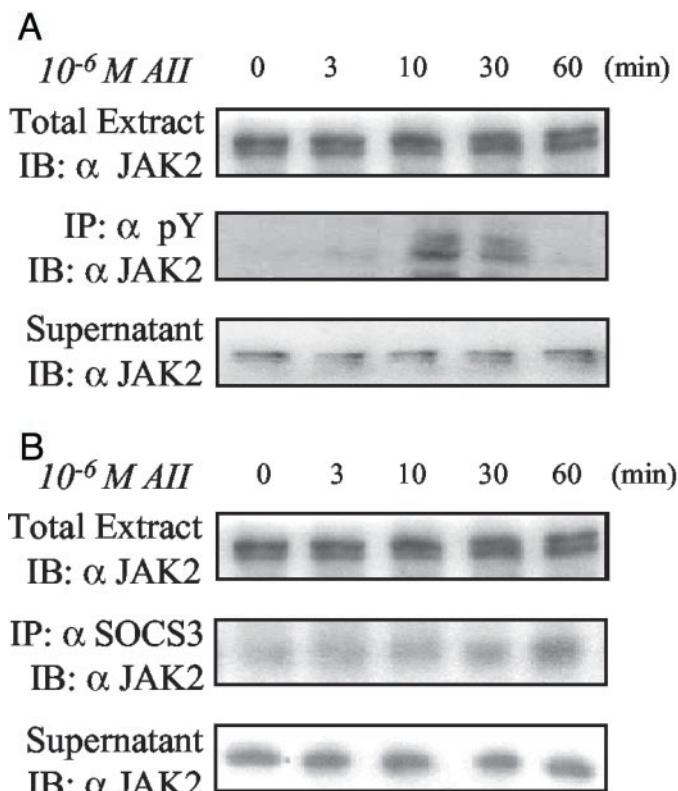


Fig. 4. Relative participation of JAK2 in events induced by Ang II. **A** and **B**, The rats were anesthetized, the abdominal cavity was incised, and 0.02 ml 10^{-6} M Ang II was infused through the vena cava. After the elapsed time indicated in the figure, the tips of the left ventricles were excised and homogenized in solubilization buffer, 0.25 mg protein was submitted to immunoprecipitation (IP) with 5.0 μ g antiphosphotyrosine antibody (α pY; **A**) or 5.0 μ g anti-SOCS3 antibody (α SOCS3; **B**). SDS-PAGEs were used to separate total products obtained from immunoprecipitations and the supernatants of the immunoprecipitation reactions; 0.25 mg total protein extracts from the same samples that were used for immunoprecipitations were separated by SDS-PAGE as well. All membranes were blotted in parallel using anti-JAK2 antibody (α JAK2) and incubated with 2.0 mCi [125 I]protein A, and bands were detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film with Cronex Lightning Plus intensifying screens at -70° C for 72 h. Band intensities were quantified by digital densitometry of the developed autoradiographs, and individual arbitrary densitometric units obtained for each band were used for calculating the relative amount of JAK2 in each sample. Depicted are representative examples of three different experiments. For this, rats were treated with saline or Ang II (10^{-6} M) for 3, 10, 30, or 60 min. Hearts were excised and homogenized, and protein extracts were obtained. From each condition, two samples of 0.25 mg were obtained. One sample was used to run the total extract and was blotted with anti-JAK2 antibody; the second sample was used in IP experiments with the above antibodies. Both the protein obtained in the pellet of the immunoprecipitation and the protein remaining in the supernatant were integrally loaded onto SDS-PAGEs, separated, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with anti-JAK2 antibodies.

oligonucleotide to block Ang II-induced SOCS3 protein synthesis was evaluated by immunoblots of total protein extracts (Fig. 5, A and B). Rats or cells were treated with sense, antisense, or scrambled SOCS3 oligonucleotides and, after the incubation time stated in the figure, were chased with Ang II (0.02 ml 10^{-6} M for rats or 10^{-7} M for cells). The optimal time for pretreatment with oligonucleotide was established

as 3 h for rats and 8 h for cells. These preincubation times were employed in all experiments thereafter. One group of cardiomyocytes was exposed to Ang II plus neomycin to block protein synthesis. As depicted in Fig. 5, C and D (lanes AII), treatment with Ang II without prior infusion of antisense oligonucleotides promoted a 4- to 5-fold increase in SOCS3 expression in heart and cardiomyocytes, respectively (after 120 min of Ang II treatment). Prior infusion of SOCS3 antisense oligonucleotide completely abolished Ang II-induced SOCS3 expression. This expression was detected when only one dose of Ang II was injected (Fig. 5, C and D, lanes AII) or when two subsequent doses, separated by 120 min, were used (Fig. 5, C and D, lanes AS-AII-AII). Pretreating rats with SOCS3 sense and scrambled oligonucleotides did not block Ang II-induced SOCS3 expression (Fig. 5A, lanes S 3 h/AII 120 min, SC 3 h/AII 120 min; Fig. 5B, lanes S 8 h/AII 120 min, SC 8 h/AII 120 min; Fig. 5, C and D, lanes S-AII-AII), whereas treatment of cardiomyocytes with neomycin inhibited SOCS3 induction by Ang II (Fig. 5B, lane Neo+AII 120 min).

A single dose of Ang II (0.02 ml 10^{-6} M in rats or 10^{-7} M in NRVM) caused 4.5- and 3.5-fold increases in c-Jun protein expression in heart and NRVM, respectively, as detected by immunoblots of total protein extracts (Fig. 5, E and F, lanes AII 120 min). If a second dose of Ang II was injected 120 min after the first dose, the rise in c-Jun expression was only 2.5- and 1.5-fold in heart and NRVM, respectively (Fig. 5, E and F, lanes AII-AII), which differed significantly from the amount of c-Jun before any Ang II stimulus or after a single dose of Ang II. The levels of c-Jun 240 min after a single dose of Ang II were almost undetectable (Fig. 5, E and F, lanes AII 240 min). Thus, there was refractoriness to consecutive doses of Ang II, as shown by the ability of Ang II to stimulate an early inducible gene that participates in control of the expression of other genes induced by Ang II. Pretreating the rats with SOCS3 sense or antisense oligonucleotides did not induce c-Jun expression. However, the blockade of SOCS3 partially overcame the phenomenon of Ang II-induced refractoriness to the expression of c-Jun (Fig. 5, E and F, lanes AS-AII-AII). The level of c-Jun when animals were exposed to SOCS3 sense oligonucleotide and then to two consecutive doses of Ang II (interval of 120 min between doses) was similar to that observed when the two doses of Ang II were not preceded by oligonucleotide treatment (Fig. 5E, lane S-AII-AII). The blockade of AT1 with losartan reduced, but did not completely abolish, the property of Ang II to induce the expression of the protooncogene *c-fos* (Fig. 5E, lane L-AII), which is in agreement with previous findings (32, 33).

JAK/STAT pathway-specific events are controlled by SOCS3

Different intracellular signaling pathways are activated in response to Ang II. To investigate the specificity of the signal transduction-blocking effect exerted by SOCS3 on signaling events induced by Ang II, rats were treated with one or two subsequent doses of Ang II, and the tyrosine phosphorylation of JAK2, STAT1, and ERK (which is activated by Ang II through a different pathway) was assessed. A single dose of

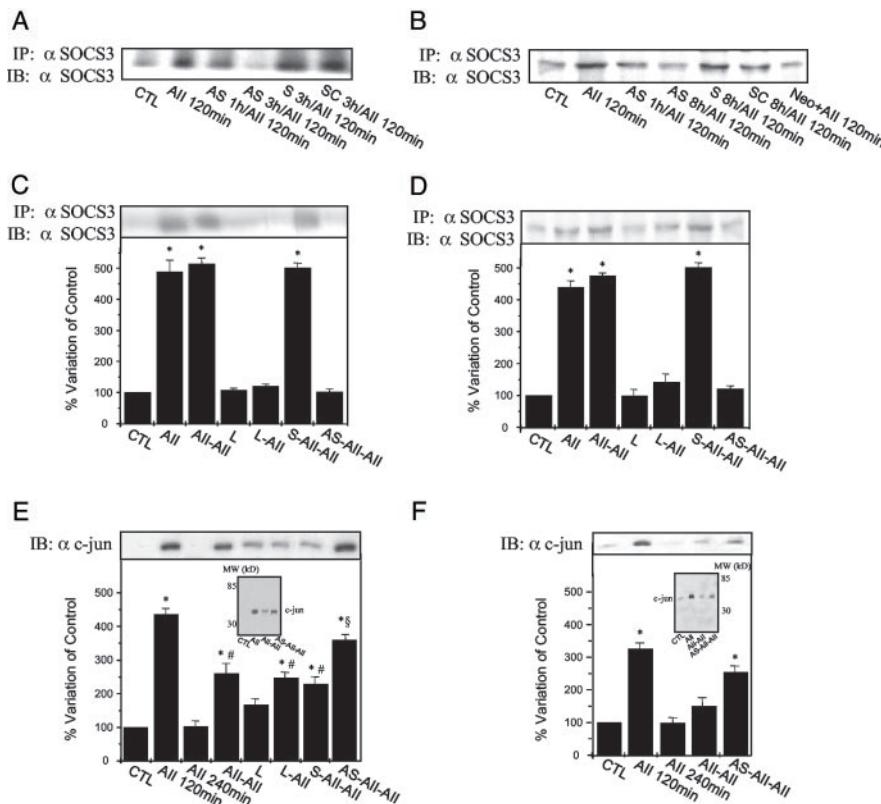


FIG. 5. Effects of losartan and SOCS3 antisense oligonucleotide treatment on the expression of SOCS3 (C and D) and c-Jun (E and F) in heart (A, C, and E) and NRVM (B, D, and F). A, Rats were treated, or not, with 6.0 nmol SOCS3 antisense phosphorothioate oligonucleotide (AS), and after the times depicted in the figure (AS 1 h and AS 3 h), they received an intracava injection of Ang II ($0.02 \text{ ml } 10^{-6} \text{ M}$ AII). Hearts were excised 120 min after Ang II infusion and submitted to procedures for immunoprecipitation and immunoblotting for detection of SOCS3 expression as described in *Materials and Methods* and below. Control groups were treated with sense (S) and scrambled (SC) oligonucleotides. B, NRVM plated in DMEM at a concentration of $6.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ were treated, or not, with SOCS3 antisense phosphorothioate oligonucleotide (AS; $1.0 \mu\text{M}$) and, after the times depicted in the figure (AS 1 h and AS 8 h), were chased with Ang II (AII; 10^{-7} M). After 120 min, cells were harvested, homogenized, and submitted to procedures for detection of SOCS3 expression as described in *Materials and Methods* and below. Control groups were treated with sense (S) and scrambled (SC) oligonucleotides and with neomycin (Neo). Rats (C and E) were treated, or not, with 6.0 nmol (ip) phosphorothioate sense (S-AII-AII) or antisense (AS-AII-AII) oligonucleotide to SOCS3 3 h before beginning the experiments or received 1.0 ml losartan (ip, 10 mg/kg weight body; L and L-AII) 30 min before the beginning of experiments. Then they were anesthetized, the abdominal cavity was opened, and one (AII and L-AII) or two (AII-AII, S-AII-AII, and AS-AII-AII) consecutive doses of Ang II ($0.02 \text{ ml } 10^{-6} \text{ M}$) were infused into the vena cava as a bolus injection. After 120 or 240 min (as depicted in figure), the tip of the left ventricle was excised and homogenized in solubilization buffer at 4°C, and protein extracts were prepared and used as described below. NRVM (D and F) plated in DMEM at a concentration of $6.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ were treated with losartan (L; 10^{-5} M), Ang II (10^{-7} M), and sense (S) or antisense (AS) SOCS3 oligonucleotides ($1.0 \mu\text{M}$) as stated in the text. Cells were exposed to one of the following treatments: a single dose of Ang II (AII), two consecutive doses of Ang II (AII-AII), a single dose of losartan (L), losartan followed by Ang II (L-AII), SOCS3 sense oligonucleotide followed by two consecutive doses of Ang II (S-AII-AII), or SOCS3 antisense oligonucleotide followed by two doses of Ang II (AS-AII-AII). For c-Jun detection (E and F), 200 μg protein were subjected to SDS-PAGE gels, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted (IB) with anti c-Jun (α -c-Jun) antibody. For SOCS3 detection (A-D), 5.0 mg protein were subjected to IP with rabbit anti-SOCS3 (α SOCS3) antibody, and immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted (IB) with goat anti-SOCS3 antibody [$n = 3$; *, $P < 0.05$ vs. control (CTL); #, $P < 0.05$ vs. CTL and AII; §, $P < 0.05$ vs. CTL and S-AII-AII]. E and F, Insets depict a whole blot of a typical run for heart (E) and NRVM (F) c-Jun detection. MW, Molecular mass standards in kilodaltons.

Ang II induced significant tyrosine phosphorylation of JAK2, STAT1, and ERK (Fig. 6, lane AII). Two subsequent doses of Ang II led to a loss of effect, such that the tyrosine phosphorylation levels of JAK2, STAT1, and ERK did not differ significantly from basal (Fig. 6, lane AII-AII). AT1 participation in these events was assessed by using losartan (10 mg/kg; Fig. 6, lanes L and L-AII). The blockade of SOCS3 expression by the antisense oligonucleotide reversed the desensitizing action of Ang II on the tyrosine phosphorylation of JAK2 and STAT1, but not on the tyrosine phosphorylation of ERK (Fig. 6, AS-AII-AII).

Discussion

Desensitization of Ang II signaling may be defined as attenuation of the response after repetitive injections of the hormone (30) and may provide a mechanism of protection against possible harmful effects imposed by overstimulation. Some of the pathways involved in Ang II signal regulation, mostly via AT1, have been characterized. Receptor internalization after ligand binding involves specific clustering of the receptors in clathrin-coated pits and depends on a signal sequence present in the proximal part of the cytoplasmic C-terminal tail of the receptor (34). Serine/threonine phos-

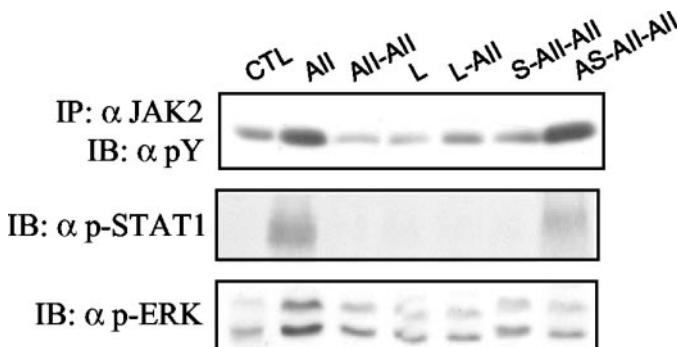


FIG. 6. Effects of losartan and SOCS3 antisense oligonucleotide treatment on activation of the JAK2/STAT1 and ERK signaling pathways. Rats were treated, or not, with 6.0 nmol (ip) phosphorothioate sense (S-AII-AII) or antisense (AS-AII-AII) oligonucleotide to SOCS3 3 h before beginning the experiments or received 1.0 ml losartan (ip, 10 mg/kg weight body; L and L-AII) 30 min before beginning the experiments. Then they were anesthetized, the abdominal cavity was opened, and one (AII and L-AII) or two (AII-AII, S-AII-AII, and AS-AII-AII) consecutive doses (interval of 120 min between doses) of Ang II (0.02 ml 10^{-6} M) were infused into the vena cava as a bolus injection. After 5 min, the tip of the left ventricle was excised and homogenized in solubilization buffer at 4°C, and protein extracts were prepared; 5.0 mg protein were submitted to immunoprecipitation (IP) with anti-JAK2 (α JAK2) antibody, the immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes, the membranes were immunoblotted (IB) with antiphosphotyrosine (α pY) antibody, or 0.2 mg protein was separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and IB with antiphospho-STAT1 (α p-STAT1) or antiphospho-ERK (α p-ERK) antibodies. Depicted are representative examples of three different experiments.

phorylation also participates in the control of signal transduction and leads to signal shutdown by promoting receptor-G protein uncoupling (35). Another mechanism demonstrated in isolated cardiac fibroblasts involves a rapid (30-sec) and transient (30-min) desensitization through protein kinase C activation and leads to up to 50% reduction of Ca^{2+} accumulation after subsequent exposure to Ang II (36). Finally, the participation of the JAK/STAT signaling pathway in the transduction of Ang II signals appears to be controlled by the phosphatase Src homology protein tyrosine phosphatase 1 (SHP1), which binds to a complex formed by JAK2, SHP2, and AT1 and participates in receptor and kinase tyrosine dephosphorylation (37).

Recently, members of the cytokine I and cytokine II receptor families were shown to induce, on a ligand receptor activation basis, the expression and functional activation of SOCS proteins. This new class of proteins, which currently includes eight members (11, 12), is characterized by the possession of a highly conserved C-terminal domain, the SOCS box, a core Src homology 2 domain, and a variable N-terminal head (38). SOCS proteins are induced through activation of the JAK/STAT pathway by several cytokines, leptin (39, 40), insulin (41), GH (42, 43), and PRL (44, 45). When expressed, SOCSs inhibit the signaling and biological activities of the inducers (39, 45). These findings suggest that SOCS proteins can function as inducible intracellular negative regulators of signal transduction.

As JAK2 and several STAT proteins are activated and participate in Ang II signal transduction, we examined whether SOCSs proteins are induced by Ang II in heart, and

whether they participate in the control of Ang II signal transduction or ligand-induced desensitization. The choice to evaluate SOCS3 was based on the fact that other hormones, such as leptin, insulin, and GH, are already known to induce SOCS3 expression. As shown in Figs. 1 and 2, SOCS3 is already expressed at low levels in heart and isolated cardiomyocytes, even before Ang II treatment. Based on the histological evaluation, most immunoreactive SOCS3 occurs in the endocardium and in vascular muscle wall and endothelial cells of the coronary arteries, whereas very faint staining is observed in cardiac muscle. SOCS3 mRNA is also present in nonstimulated heart. After the injection of a supraphysiological dose (10^{-6} M) of Ang II, there is a rapid *in vivo* rise in the protein levels of SOCS3 (as early as 10 min), whereas a significant increase in mRNA levels occurs after 60 min. These facts suggest that both translational and transcriptional regulation of SOCS3 may be under Ang II control. Modulation of the rate of SOCS3 degradation may also favor protein accumulation. Treatment with Ang II increases SOCS3 expression, as shown by a higher intensity of staining (all figures were obtained using exactly the same protocol, and experiments were run in parallel), but causes no shift in the pattern of staining, *i.e.* higher expression is maintained in the endocardium and endothelium. As a high level of SOCS3 expression is observed in NRVM after treatment with Ang II, we suspect that due to differences in age (1- to 3-d-old rats for NRVM preparation and 48-d-old rats for the heart experiments), higher levels of AT1 in isolated cardiomyocytes might be responsible for the enhanced effect observed.

The intracava injection of at least 0.02 ml 10^{-8} M Ang II significantly elevates the level of SOCS3 protein in heart homogenates. This quantity of Ang II provides a circulating concentration that approximates the stimulus-induced range of approximately 100 ng/liter (46) and suggests that stimulation of SOCS3 expression is a physiological phenomenon that may modulate Ang II function. This conclusion is further supported by the ability to induce SOCS3 with 10^{-7} M Ang II in isolated cardiomyocytes. To test the hypothesis of a physiological role for Ang II-induced SOCS3 expression, we used SOCS3-specific phosphorothioate-modified antisense oligonucleotide to block SOCS3 expression and evaluated the ability of repeated doses of Ang II to induce the expression of the early inducible gene *c-jun*. After a single dose of Ang II, the expression of *c-Jun* rapidly increases by up to 5-fold above basal levels after 120 min. After a second dose of Ang II, injected 120 min after the first dose, the increase is only 2.5- and 1.5-fold above basal in heart and NRVM, respectively. These results indicate that desensitization to stimulation by Ang II occurs in both systems tested. In rats pretreated with SOCS3 antisense oligonucleotide, a second dose of Ang II produces an increase of about 3.8-fold above basal, which is significantly different from the responses to single and double doses of Ang II in nonpretreated rats. These results indicate that SOCS3 participates in the control of Ang II-induced *c-Jun* expression, although this is not the only mechanism involved in the control of signal transduction by this path. The experiments with losartan indicate that Ang II induces SOCS3 only through AT1 receptors, whereas *c-Jun* may be induced by the activation of both AT1 and AT2 receptors. This fact may explain why in the absence of

SOCS3, the expression of c-Jun after the second dose of Ang II did not reach the same levels as those observed with a single dose of Ang II, as other mechanisms controlling AT2-induced c-Jun expression would still be operating in the presence of SOCS3 blockade.

In a parallel series of experiments not described here, Ang II-induced expression of SOCS3 was examined in the hypothalamus, another important site of Ang II action. In this tissue, SOCS3 was induced in the anterodorsal preoptic nucleus and median preoptic lateral nucleus by the intracerebroventricular injection of Ang II and was found to participate in the control of water balance (Torsoni, M. A., and L. A. Velloso, unpublished data).

As a final objective of the present study, we evaluated the specificity of the blocking effect of SOCS3 toward the JAK/STAT signaling pathway. Immunodepletion experiments showed that 10–15% of the JAK2 pool expressed in the target tissue is involved in Ang II signaling, as evaluated by the tyrosine phosphorylation of JAK2 and the association of JAK2 with SOCS3. In other signaling systems that use JAK2 as an intermediary signaling molecule, the extent of this involvement is also about 10–20% of all JAK2 available (47, 48). In rats treated with antisense oligonucleotide, two doses of Ang II caused desensitization of the signaling response involving ERK, but not JAK2 and STAT1. As SOCS3 is believed to hamper specific signaling occurring through JAK family members (49), and as Ang II activates ERK through a JAK2-independent mechanism (8), the maintenance of molecular desensitization of Ang II-induced ERK activation after partial abrogation of SOCS3 expression would be predictable.

In conclusion, this is the first evidence for the participation of a protein belonging to the SOCS family in the control of physiological actions of Ang II. This is also the first demonstration of the induction of a SOCS protein through a G protein-coupled receptor. These findings provide a new field of investigation into the mechanisms controlling Ang II signal transduction and reinforce the concept that in several ways Ang II acts as a cytokine.

Acknowledgments

Received January 9, 2003. Accepted June 13, 2003.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Lício A. Velloso, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, State University of Campinas, 13084 970 Campinas SP, Brazil. E-mail: lavelloso@fcm.unicamp.br.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

References

- Touyz RM, Schiffrin EL 2000 Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52:639–672.
- Sadoshima J, Izumo S 1993 Signal transduction pathways of angiotensin II-induced *c-fos* gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers. *Circ Res* 73:424–438.
- Baker KM, Aceto JF 1990 Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol* 259:H610–H618.
- Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF 1991 Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 12:55–62.
- Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S 1995 Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca^{2+} -dependent signaling. *Circ Res* 76:1–15.
- Walsh MP, Kargacin GJ, Kendrick-Jones J, Lincoln TM 1995 Intracellular mechanisms involved in the regulation of vascular smooth muscle tone. *Can J Physiol Pharmacol* 73:565–573.
- Peach MJ 1981 Molecular actions of angiotensin. *Biochem Pharmacol* 30:2745–2751.
- Thomas WG, Thekkumkara TJ, Baker KM 1996 Cardiac effects of AII. AT1A receptor signaling, desensitization, and internalization. *Adv Exp Med Biol* 396:59–69.
- Schindler C, Darnell Jr JE 1995 Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64:621–651.
- Darnell Jr JE, Kerr IM, Stark GR 1994 Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415–1421.
- Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A 2000 Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol* 18:143–164.
- Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Spragg NS, Starr R, Nicholson SE, Metcalf D, Nicola NA 1998 Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:114–119.
- Auernhammer CJ, Bousquet C, Melmed S 1999 Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6964–6969.
- Krebs DL, Hilton DJ 2001 SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19:378–387.
- Suzuki R, Sakamoto H, Yasukawa H, Masuhara M, Wakioka T, Sasaki A, Yuge K, Komiya S, Inoue A, Yoshimura A 1998 CIS3 and JAB have different regulatory roles in interleukin-6 mediated differentiation and STAT3 activation in M1 leukemia cells. *Oncogene* 17:2271–2278.
- Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiya S, Yoshimura A 1997 A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387:921–924.
- Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F 2000 SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* 275:12848–12856.
- Hilton DJ 1999 Negative regulators of cytokine signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 55:1568–1577.
- Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K 1998 Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10626–10631.
- Kim NN, Villarreal FJ, Printz MP, Lee AA, Dillmann WH 1995 Trophic effects of angiotensin II on neonatal rat cardiac myocytes are mediated by cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 269:E426–E437.
- Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Laemmli UK 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J 1979 Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350–4354.
- Saad MJ, Velloso LA, Carvalho CR 1995 Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. *Biochem J* 310:741–744.
- Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR 1996 Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12490–12495.
- Araujo EP, Amaral ME, Souza CT, Bordin S, Ferreira F, Saad MJ, Boschero AC, Magalhaes EC, Velloso LA 2002 Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. *FEBS Lett* 531:437–442.
- Shannugam S, Sandberg K 1996 Ontogeny of angiotensin II receptors. *Cell Biol Int* 20:169–176.
- Ullian ME, Linas SL 1989 Role of receptor cycling in the regulation of angiotensin II surface receptor number and angiotensin II uptake in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 84:840–846.
- Kang PM, Nakouzi A, Simpson T, Scheuer J, Buttrick PM 1996 Role of endogenous renin-angiotensin system in c-fos activation and PKC-ε translocation in adult rat hearts. *Am J Physiol* 270:H2177–H2183.
- Moellenhoff E, Blume A, Culman J, Chatterjee B, Herdegen T, Lebrun CJ, Unger T 2001 Effect of repetitive icv injections of ANG II on c-Fos and AT₁-receptor expression in the rat brain. *Am J Physiol* 280:R1095–R1104.
- Reagan LP, Ye X, Maretzki CH, Fluharty SJ 1993 Down-regulation of angiotensin II receptor subtypes and desensitization of cyclic GMP production in neuroblastoma NIE-115 cells. *J Neurochem* 60:24–31.
- Kim S, Kawamura M, Wanibuchi H, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Iwao H 1995 Angiotensin II type 1 receptor blockade

- inhibits the expression of immediate-early genes and fibronectin in rat injured artery. *Circulation* 92:88–95
33. Naftilan AJ, Gilliland GK, Eldridge CS, Kraft AS 1990 Induction of the proto-oncogene *c-jun* by angiotensin II. *Mol Cell Biol* 10:5536–5540
 34. Conchon S, Peltier N, Corvol P, Clauser E 1998 A noninternalized nondesensitized truncated AT1A receptor transduces an amplified ANG II signal. *Am J Physiol* 274:E336–E345
 35. Balmforth AJ, Shepherd FH, Warburton P, Ball SG 1997 Evidence of an important and direct role for protein kinase C in agonist-induced phosphorylation leading to desensitization of the angiotensin AT1A receptor. *Br J Pharmacol* 122:1469–1477
 36. Iglesias AG, Suarez C, Feierstein C, Diaz-Torga G, Becu-Villalobos D 2001 Desensitization of angiotensin II effect on. *Am J Physiol* 280:E462–E470
 37. Marrero MB, Venema VJ, Ju H, Eaton DC, Venema RC 1998 Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 and SHP-2. *Am J Physiol* 275:C1216–C1223
 38. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ 1997 A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387:917–921
 39. Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS 1998 Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1:619–625
 40. Emilsson V, Arch JR, de Groot RP, Lister CA, Cawthorne MA 1999 Leptin treatment increases suppressors of cytokine signaling in central and peripheral tissues. *FEBS Lett* 455:170–174
 41. Sadowski CL, Choi TS, Le M, Wheeler TT, Wang LH, Sadowski HB 2001 Insulin induction of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA expression in C2C12 skeletal muscle cells is mediated by Stat5*. *J Biol Chem* 276:20703–20710
 42. Tollef-Egnell P, Flores-Morales A, Stavreus-Evers A, Sahlin L, Norstedt G 1999 Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology* 140:3693–3704
 43. Favre H, Benhamou A, Finidori J, Kelly PA, Edery M 1999 Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction. *FEBS Lett* 453:63–66
 44. Helman D, Sadowski Y, Cohen Y, Matsumoto A, Yoshimura A, Merchav S, Gertler A 1998 Cytokine-inducible SH2 protein (CIS3) and JAK2 binding protein (JAB) abolish prolactin receptor-mediated STAT5 signaling. *FEBS Lett* 441:287–291
 45. Pezet A, Favre H, Kelly PA, Edery M 1999 Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. *J Biol Chem* 274:24497–24502
 46. Dzau VJ 1988 Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77:I4–I13
 47. Frasor J, Barkai U, Zhong L, Fazolebas AT, Gibori G 2001 PRL-induced ERα gene expression is mediated by Janus kinase 2 (Jak2) while signal transducer and activator of transcription 5b (Stat5b) phosphorylation involves Jak2 and a second tyrosine kinase. *Mol Endocrinol* 15:1941–1952
 48. Jiao H, Berrada K, Yang W, Tabrizi M, Platanias LC, Yi T 1996 Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol* 16:6985–6992
 49. Krebs DL, Hilton DJ 2000 SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 113:2813–2819

Suppressor of Cytokine Signaling-3 Provides a Novel Interface in the Cross-Talk between Angiotensin II and Insulin Signaling Systems

Vivian C. Calegari, Mônica Alves, Paty Karoll Picardi, Rosana Y. Inoue, Kleber G. Franchini, Mário J. A. Saad, and Lício A. Velloso

Department of Internal Medicine, State University of Campinas, 13081-970 Campinas São Paulo, Brazil

Angiotensin II inhibits insulin-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase through a mechanism, at least in part, dependent on serine phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrates (IRS)-1/2. Recent evidence shows that suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) is induced by insulin and angiotensin II and participates in the negative control of further stimulation of each of these signaling systems independently. In the present study, we evaluated the interaction of angiotensin II-induced SOCS-3 with the insulin signaling pathway in the heart of living rats. A single iv dose of angiotensin II promotes a significant increase of SOCS-3 in heart, an effect that lasts up to 180 min. Once induced, SOCS-3 interacts with the insulin receptor, JAK-2, IRS-1, and IRS-2. The

inhibition of SOCS-3 expression by a phosphothioate-modified antisense oligonucleotide partially restores angiotensin II-induced inhibition of insulin-induced insulin receptor, IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation, and IRS-1 and IRS-2 association with p85-phosphatidylinositol 3-kinase and [Ser⁴⁷³] phosphorylation of Akt. Moreover, the inhibition of SOCS-3 expression partially reverses angiotensin II-induced inhibition of insulin-stimulated glucose transporter-4 translocation to the cell membrane. These results are reproduced in isolated cardiomyocytes. Thus, SOCS-3 participates, as a late event, in the negative cross-talk between angiotensin II and insulin, producing an inhibitory effect on insulin-induced glucose transporter-4 translocation. (*Endocrinology* 146: 579–588, 2005)

THE RECIPROCAL SIGNAL transduction modulation that occurs between the insulin and angiotensin II (Ang II) signaling pathways is thought to play an important role in the common clinical association between diabetes mellitus and hypertension (1–6). The cross-talk between these two systems occurs at distinct levels, beginning at the prereceptor level, as modulation of angiotensin-converting enzyme (ACE) activity leads to simultaneous control of Ang II production and insulin action (7). It then acts at an early postreceptor level because janus kinase (JAK)-2 activity may be modulated by insulin and Ang II (2, 8, 9), and finally it reaches an intermediary postreceptor level because serine kinases activated by Ang II inhibit insulin signal transduction (3). This redundancy may have developed during evolution as a need for tight control of two vital and closely related systems, *i.e.* the circulatory and metabolic systems.

In recent years, a series of studies have shown that insulin is capable of inducing the expression of suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 (10–12), a 32-kDa protein that be-

longs to a family of proteins (SOCS family) originally identified as inducible inhibitors of signal transduction by gp130 cytokines (13, 14). When cotransfected with insulin receptor (IR) and insulin receptor substrate (IRS)-1, SOCS-3 inhibits insulin signal transduction by promoting a reduction of insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation (12). Moreover, SOCS-3 may reduce insulin signal transduction by targeting IRS-1 and IRS-2 to proteasomic degradation (15). Recently we demonstrated that Ang II is also capable of inducing SOCS-3 in heart, isolated cardiomyocytes, and the hypothalamus of rats (16, 17). Ang II-induced SOCS-3 inhibits Ang II-stimulated c-jun expression (16) and participates in the mechanisms that lead to refractoriness to Ang II in hypothalamus (17).

In cytokine signaling, proteins of the SOCS family may provide a negative cross-talk between two distinct systems, such as IL-3 and IL-11 (18) and interferon- γ and IL-4 (19) signaling systems. In addition, SOCS proteins may participate in the cross-talk between a cytokine and hormone signaling pathways, such as IL-1 β and GH (20). In the present study, we evaluated whether SOCS-3, induced by Ang II in the heart, interacts with elements of the insulin signaling pathway and exerts any regulatory effect on this system.

Materials and Methods

Antibodies and chemicals

Reagents for SDS-PAGE and immunoblotting were obtained from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). HEPES, phenylmethylsulfonylfluoride, aprotinin, dithiotreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, Ang II, and BSA (fraction V) were obtained from Sigma-Aldrich Corp.

First Published Online October 28, 2004

Abbreviations: ACE, Angiotensin-converting enzyme; Akt, acute transforming retrovirus thymoma; Ang II, angiotensin II; FITC, fluorescein isothiocyanate; GLUT-4, glucose transporter-4; IR, insulin receptor; IRS, insulin receptor substrate; JAK, janus kinase; NRVM, neonatal rat ventricular myocyte; PI 3-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase; SOCS, suppressor of cytokine signaling; STAT, signal transducer and activator of transcription.

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

(St. Louis, MO). Protein A-Sepharose 6 MB was obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden), [¹²⁵I]-protein A and nitrocellulose membranes were obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, UK). Phosphatidylinositol was from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Chemicals, culture media, Lipofectamine Plus, and sera for isolation and culture of cells were purchased from Life Technologies Inc. (Grand Island, NY). Antibodies against SOCS-3 (sc-9023, rabbit polyclonal and sc-7009, goat polyclonal), SOCS-1 (sc-9021, rabbit polyclonal), JAK-2 (sc-278, rabbit polyclonal), IR β (sc-711, rabbit polyclonal), IRS-1 (sc-559, rabbit polyclonal), IRS-2 (sc-8299, rabbit polyclonal), signal transducer and activator of transcription (STAT)-5b (sc-1656, mouse monoclonal), p85-phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) (sc-423, rabbit polyclonal), glucose transporter (GLUT)-4 (sc-7938, rabbit polyclonal), and phosphotyrosine (sc-508, mouse monoclonal) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Anti-[Ser⁴⁷³]Akt (9271, rabbit polyclonal) was purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Antiphosphoserine antibody (AB1603, rabbit polyclonal) was purchased from Chemicon Inc. (Temecula, CA). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibodies and rhodamine-conjugated phalloidin were purchased from Sigma-Aldrich Corp. Phosphothioate-modified oligodeoxynucleotides for SOCS-3 (sense, 5'-CAT GGT CAC CCA CAG-3'; antisense, 5'-CTG TGG GTG ACC ATG-3') were synthesized by Life Technologies, Inc. and were previously tested and optimized for *in vivo* use (16). Sodium amorbital and insulin were obtained from Eli Lilly & Co. (Indianapolis, IN).

Experimental animals

Eight-week-old male Wistar rats from the university's Central Animal Breeding Center were used in the experiments. The adult rats were allowed access to standard rodent chow and water *ad libitum*. Food was withdrawn 12 h before the experiments. All experiments were conducted in accord with the principles and procedures described by National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and were approved by the State University of Campinas ethical committee. For neonatal rat ventricular myocyte (NRVM) preparation, 1- to 3-d-old Wistar rats were employed.

Preparation of NRVM

Ventricular cardiac myocytes were prepared by enzymatic disaggregation following a method previously described (21). After separation the cells were cultured in DMEM at a concentration of $6.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ on plates coated with gelatin. The purity of the cell preparations was ascertained by immunofluorescence using tetramethylrhodamine isothiocyanate-phalloidin and evaluation by confocal microscopy.

Hormone stimulation protocols and tissue preparation

Rats were anesthetized by an ip injection of sodium amorbital (15 mg/kg body weight), and the experiments were initiated after the loss of corneal and pedal reflexes. The abdominal cavity was opened, the cava vein was exposed, and *in vivo* stimulation of the heart was obtained by injection of 0.02 ml saline (0.9% NaCl), 10⁻⁸ M Ang II, and/or 10⁻⁶ M insulin into the cava vein. In some of the time-course experiments the hearts of rats treated with respective hormones were compared with the hearts of rats treated with only saline for similar periods of time. In some cases rats received 6.0 nmol [diluted in 200 μl Tris/EDTA buffer] sense or antisense SOCS-3 oligonucleotide ip 3 h before the experiments. At various time intervals (as shown in *Results*), the tips of the ventricles were excised and immediately homogenized in approximately five volumes of 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 vanadate, 2.0 mM phenylmethylsulfonylfluoride, and 0.1 mg aprotinin/ml] with a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operated at maximum speed for 30 sec.

NRVMs were exposed to oligonucleotides, saline, insulin, and Ang II according to doses and times as stated in *Results* and following a protocol previously described (16).

Protein analyses by immunoprecipitation and immunoblotting

Insoluble material was removed by centrifugation for 25 min at 11,000 rpm in a 70.Ti rotor (Beckman, Fullerton, CA) at 4°C. The protein concentrations in supernatants were determined by the Bradford dye-binding method (22). Aliquots of the resulting supernatants containing 5.0 mg total protein were used for immunoprecipitation with anti-JAK-2, IR β , IRS-1, IRS-2, STAT-5b, SOCS-1, and SOCS-3 antibodies following a method previously described (23). Unspecific binding of proteins to beads were always tested and observed to be insignificant (not shown). Band intensities were quantified by digital densitometry (Scion Image software, Scion Corp., Frederick, MD) of the developed autoradiographs. For simple immunoblot experiments (not preceded by immunoprecipitation), 0.2 mg total protein from heart was separated by SDS-PAGE (10 or 12% bis-acrylamide), transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with the appropriate antibodies (anti-IR, anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-phospho-[Ser⁴⁷³]Akt, and anti-GLUT-4).

PI 3-kinase activity assay

For IRS-1- and IRS-2-associated PI 3-kinase activity assays, 5.0 mg of total protein extracts obtained from the hearts of rats exposed to specific experimental conditions were handled using a method previously described (2, 24). Phosphorylated phosphatidylinositol was separated by thin-layer chromatography, and specific dots were visualized by exposing the thin-layer chromatography plates to RX-films. Dot intensities were quantified by digital densitometry of the developed autoradiographs.

Subcellular fractionation

To characterize the expression and subcellular localization of GLUT-4, a subcellular fractionation protocol was employed as described previously (25). The fractions obtained were treated with Laemmli buffer with 100 mM dithiothreitol, heated in a boiling water bath for 5 min, and aliquots (0.2 mg of protein) subjected to SDS-PAGE and Western blotting with anti-GLUT-4 antibodies as described (23).

Laser confocal microscopy

GLUT-4 localization was determined in frozen sections of Wistar rat hearts and fixed NRVM, following a method described elsewhere (6, 26). Sections (5.0 μm) of heart or microscopy glass-fixed NRVMs were incubated with primary antibody against GLUT-4 (1:20), followed (or not) by incubation with FITC-conjugated secondary antibodies and then rhodamine-conjugated phalloidin (1:500). Images were obtained with a laser confocal microscope (LSM510, Zeiss, New York, NY). Secondary antibody specificity was tested in a series of positive and negative control measurements. All image acquisitions were performed with the same settings of the microscope.

Data presentation and statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm SD of the indicated number of experiments. The blots are presented as direct comparisons of bands in autoradiographs quantified by densitometry using Scion Image software. The *t* test for unpaired samples was used for statistical analysis. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Ang II and insulin induce SOCS-3 expression in heart following different time courses

Ang II induced the expression of SOCS-3 beginning at 10 min (1.8-fold, $P < 0.05$), reaching the maximum expression level at 120 min (4.2-fold, $P < 0.05$) and returning to basal level at 360 min (Fig. 1A, *first blot*), confirming a previous report (16). Ang II treatment induced the expected association of SOCS-3 with not only JAK-2 (begin-

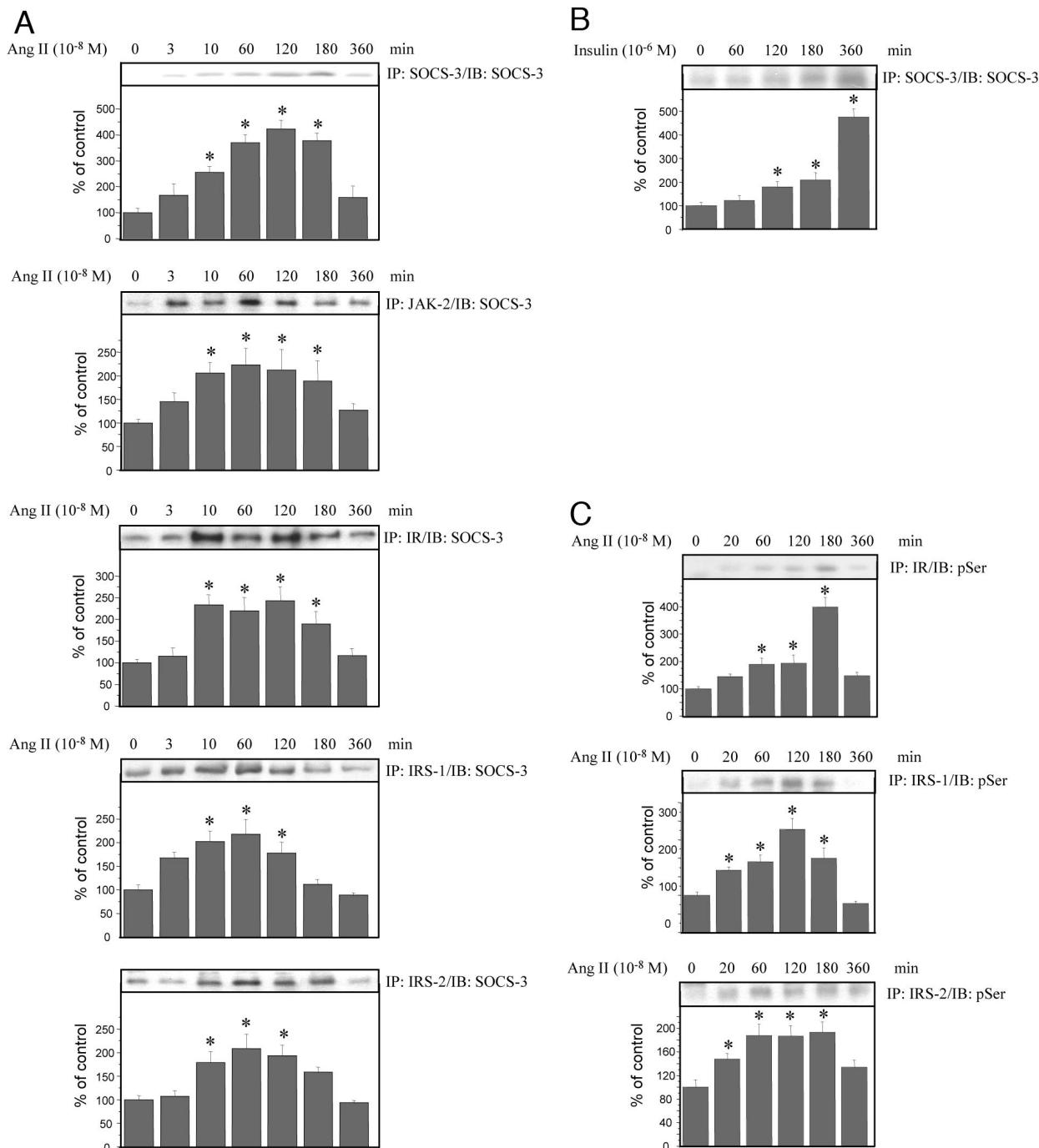


FIG. 1. Time course of Ang II- (A) and insulin-induced (B) expression of SOCS-3, Ang II-induced association of SOCS-3 with JAK-2 and other proteins of the insulin signaling pathway and Ang II-induced serine phosphorylation of proteins of the insulin signaling pathway (C). Rats were anesthetized and acutely treated with a single iv dose of Ang II (0.02 ml, 10⁻⁸ M) (A and C) or insulin (0.02 ml, 10⁻⁶ M) (B). The tips of the hearts were excised at times depicted in the figure and used in immunoprecipitation (IP) assays with anti-SOCS-3 (A, first blot, and B), anti-JAK-2 (A, second blot), anti-IR (A, third blot; C, first blot), anti-IRS-1 (A, fourth blot; C, second blot), and anti-IRS-2 (A, fifth blot; C, third blot) antibodies. Immunocomplexes were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Anti-SOCS-3 (A and B) or antiphosphoserine (C) antibodies were used for blotting (IB). Specific bands were labeled with [¹²⁵I] protein A and visualized by autoradiography. Band intensities were quantified by digital densitometry. In all experiments, n = 5 (*, P < 0.05 vs. time 0). See Materials and Methods for details.

ning at time 10 min, 1.8-fold, P < 0.05, and peaking at time 60 min, 2.3-fold, P < 0.05) (Fig. 1A, second blot) but also IR (highest at 120 min, 2.8-fold, P < 0.05), IRS-1 (highest at 60 min, 2.1-fold, P < 0.05), and IRS-2 (highest at 60 min,

2.0-fold, P < 0.05) (Fig. 1A, blots 3–5). As shown in Fig. 1B, insulin induced the expression of SOCS-3 beginning at 120 min (1.7-fold, P < 0.05) and reaching 4.8-fold increase at 360 min (P < 0.05).

Ang II-induced serine phosphorylation of proteins of the insulin signaling pathway overlaps Ang II-induced SOCS-3 expression and association with proteins of the insulin signaling pathway

Ang II-induced serine phosphorylation of proteins of the insulin signaling pathway is a known mechanism that participates in the negative cross-talk between Ang II and insulin signaling systems (3). To evaluate the temporal relationship between this mechanism and Ang II-induced SOCS-3 association with proteins that belong to the insulin signal transduction pathway, total protein extracts obtained from hearts of rats treated with Ang II ($20 \mu\text{l}$, 10^{-8} M) for the times depicted in Fig. 1C were employed in immunoprecipitation and immunoblot experiments. Ang II-induced serine phosphorylation of IR (Fig. 1C, first blot) started at 60 min and lasted for 180 min; Ang II-induced serine phosphorylation of IRS-1 (Fig. 1C, second blot) started at 20 min and lasted for 180 min; and Ang II-induced serine phosphorylation of IRS-2 (Fig. 1C, third blot) started at 20 min and lasted for 180 min. Thus, the time frames of Ang II-induced SOCS-3 association with proteins of the insulin signaling pathway and Ang II-induced serine phosphorylation of proteins of the insulin signaling pathway ran, to a certain degree, in parallel.

Pretreatment with Ang II interferes with insulin signal transduction

Pretreatment with Ang II did not produce significant changes in IR (Fig. 2A, upper blot), IRS-1 (Fig. 2B, upper blot), and IRS-2 (Fig. 2C, upper blot) protein expression and in insulin-induced IR tyrosine phosphorylation (Fig. 2A, second blot). However, Ang II pretreatment led to significant reduction of insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation (0.5-fold, $P < 0.05$), IRS-1/p85 PI 3-kinase association (0.6-fold, $P < 0.05$), and IRS-1-associated PI 3-kinase activity (Fig. 2B, panels 2–4). Ang II pretreatment also produced a significant fall of insulin-induced IRS-2 tyrosine phosphorylation (0.6-fold, $P < 0.05$), IRS-2/p85 PI 3-kinase association (0.5-fold, $P < 0.05$), and IRS-2-associated PI 3-kinase activity (Fig. 2C, panels 2–4). Finally, Ang II pretreatment led to a significant fall of insulin-induced [Ser^{473}]Akt phosphorylation (0.4-fold, $P < 0.05$) (Fig. 2D).

Inhibition of SOCS-3 expression abolishes Ang II-induced association of SOCS-3 with proteins of the insulin signaling pathway

In a recent study (16), we employed a SOCS-3 antisense oligonucleotide that completely abolished Ang II-induced SOCS-3 expression. In the present study, we observed that SOCS-3 expression was increased by 4.2-fold 120 min after Ang II treatment, preceded by saline or SOCS-3 sense oligonucleotide. However, if Ang II treatment was preceded by SOCS-3 antisense oligonucleotide treatment, a complete abolition of Ang II-induced SOCS-3 expression was observed (Fig. 3A, upper blot). The effect of SOCS-3 antisense oligonucleotide was specific because no inhibition of SOCS-1 expression was observed (Fig. 3A, lower blot). As shown in Fig. 1, the treatment of living rats with Ang II induced not

only SOCS-3 expression but also its association with IR, IRS-1, and IRS-2. When rats pretreated with Ang II (10^{-8} M , 120 min) received an acute dose of insulin (10^{-6} M , 10 min) a significant increase of IR (2.1-fold, $P < 0.05$), IRS-1 (3.8-fold, $P < 0.05$), and IRS-2 (3.2-fold, $P < 0.05$) association with SOCS-3 was observed if compared with rats treated with only Ang II (Fig. 3B, left-hand side blots, WO), meaning that an acute insulin treatment enhances Ang II-induced association of SOCS-3 with proteins of the insulin signaling pathway. The inhibition of SOCS-3 expression with the antisense oligonucleotide completely abolished Ang II-induced and insulin-enhanced association of SOCS-3 with IR, IRS-1, and IRS-2 (Fig. 3B, right-hand side blots, AS). The same effect was observed on Ang II-induced SOCS-3/JAK-2 association (Fig. 3B).

Inhibition of SOCS-3 expression overcomes Ang II inhibition of insulin signal transduction through JAK-2 and STAT-5b

JAK-2 plays a central role in the early intracellular cross-talk between insulin and Ang II signaling systems (2). Both Ang II (9, 27) and insulin (8) rapidly induce tyrosine phosphorylation of JAK-2 in heart muscle. Pretreatment of living rats with Ang II inhibits insulin-induced tyrosine phosphorylation of JAK-2 and STAT-5b (2). To evaluate the participation of SOCS-3 in this phenomenon, rats were pretreated with SOCS-3 antisense oligonucleotide and then treated with a single dose of Ang II. As depicted in Fig. 4, Ang II significantly reduced insulin-induced JAK-2 (0.6-fold, $P < 0.05$) (upper blot) and STAT-5b (0.2-fold, $P < 0.05$) (lower blot) tyrosine phosphorylation. Pretreatment with SOCS-3 antisense oligonucleotide almost completely reverted the Ang II-inhibiting effect.

Inhibition of SOCS-3 expression overcomes Ang II inhibition of insulin signal transduction through IRS-1, -2, and Akt

Pretreatment of rats with Ang II inhibits insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 and serine phosphorylation of Akt. To evaluate the participation of SOCS-3 in this phenomenon, rats were pretreated with SOCS-3 antisense oligonucleotide and then treated with Ang II. As depicted in Fig. 5, the inhibition of SOCS-3 expression completely reverted Ang II-induced inhibition of insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS-1 (Fig. 5B) and IRS-2 (Fig. 5C) and serine phosphorylation of Akt (Fig. 5D).

Inhibition of SOCS-3 expression partially reverts Ang II-induced inhibition of insulin-induced GLUT-4 translocation

To evaluate whether Ang II-induced SOCS-3 interferes with a functional event controlled by insulin, rats were pretreated with Ang II and after 120 min received a single iv dose of insulin to stimulate GLUT-4 migration to cell membrane. In cytosolic fractions, insulin promoted a significant fall in GLUT-4 content, a phenomenon that was partially (not significantly) inhibited by pretreatment with Ang II (Fig. 6A, gray bars). In the membrane fraction, the effect of insulin stimulating the increase of GLUT-4 was remarkable and was

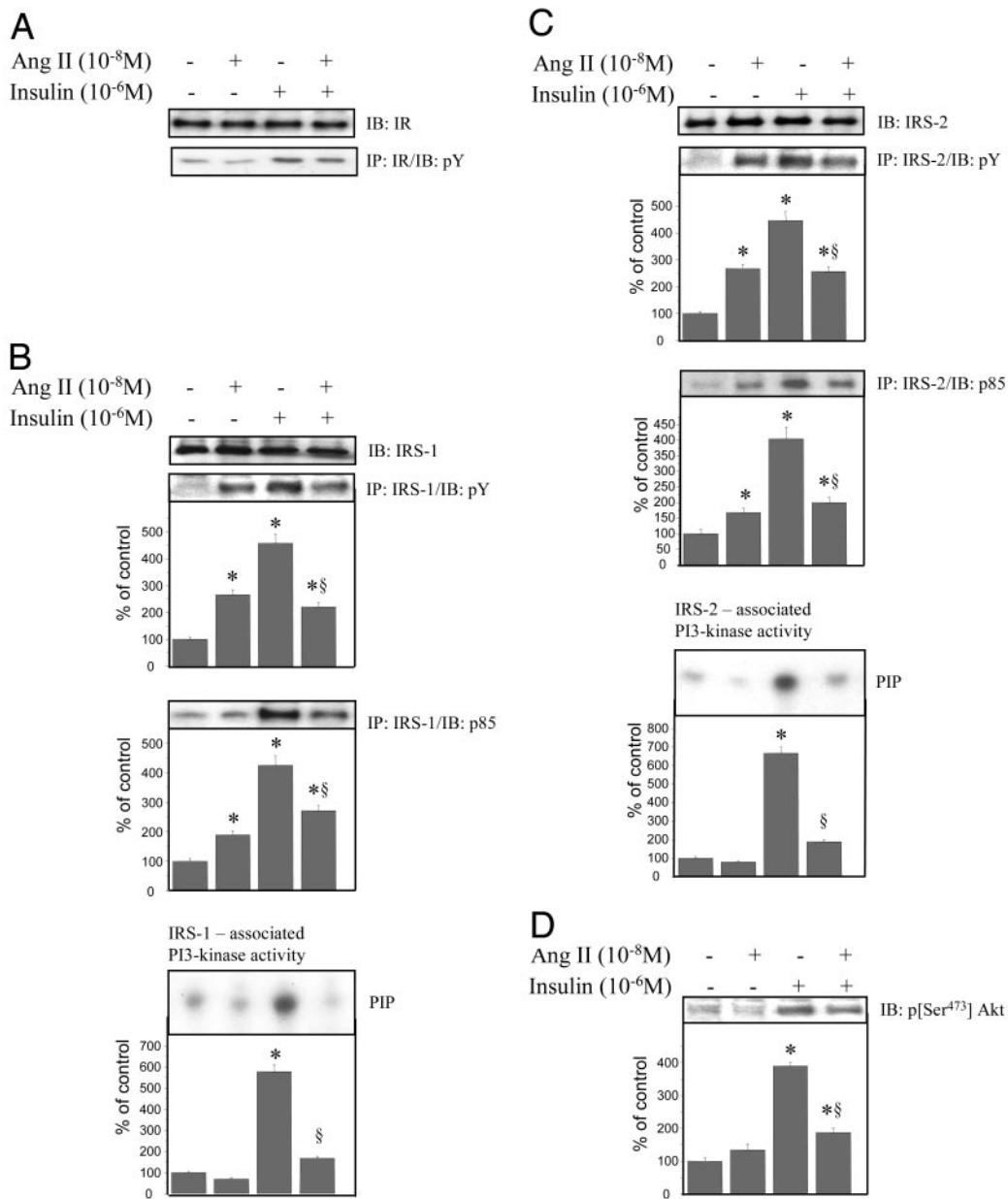


FIG. 2. Effect of Ang II pretreatment on insulin-induced activation of the IR/IRS-1/IRS-2/PI3-kinase/Akt pathway. Rats were anesthetized and acutely treated with a single dose of saline (−) or Ang II (0.02 ml, 10^{-8} M) (+). After 120 min a single dose of saline (−) or insulin (0.02 ml, 10^{-6} M) (+) was injected and, following 2 (IR, IRS-1 and IRS-2) or 5 (PI 3-kinase activity and Akt) min, the tips of the hearts were excised and used in immunoprecipitation (IP) assays with anti-IR (A, second blot), anti-IRS-1 (B, second and third blots and PI 3-kinase activity assay), and anti-IRS-2 (C, second and third blots and PI 3-kinase activity assay) antibodies or in direct immunoblot (IB) assays for determination of IR (A, first blot), IRS-1 (B, first blot), IRS-2 (C, first blot), and p[Ser⁴⁷³] Akt (D). Specific bands were labeled with [¹²⁵I] protein A and visualized by autoradiography. For PI 3-kinase activity assay, IRS-1 (B, last panel) and IRS-2 (C, last panel), immunoprecipitates were employed according to the method described in *Material and Methods*. Band and dot intensities were quantified by digital densitometry. In all experiments n = 5 (*, P < 0.05 vs. saline treated; §, P < 0.05 vs. insulin treated). PIP, 3'Phosphorylated phosphatidylinositol.

significantly inhibited by pretreatment with Ang II (Fig. 6B, gray bars). If rats were pretreated with SOCS-3 antisense oligonucleotide, the effect of Ang II inhibiting insulin-induced GLUT-4 translocation to membrane fraction was partially (significantly) reverted (Fig. 6B, white bars).

To further explore the role of SOCS-3 in Ang II inhibition of insulin-induced GLUT-4 translocation, we employed double-staining confocal microscopy. As depicted in Fig. 6C, in control rats GLUT-4 is sparsely stained in the cells of the

heart ventricle, with only a discrete presence in the cell membrane zone (Fig. 6C, c). Acute treatment with insulin remarkably enhances the staining of GLUT-4 in the periphery of heart cells (Fig. 6C, i), whereas pretreatment with Ang II inhibits the effect of insulin to promote GLUT-4 migration to the peripheral zone of the heart cells (Fig. 6C, ai). Pretreatment with SOCS-3 antisense oligonucleotide partially reverts the negative effect of Ang II on insulin-induced GLUT-4 translocation (Fig. 6C, aiAS).

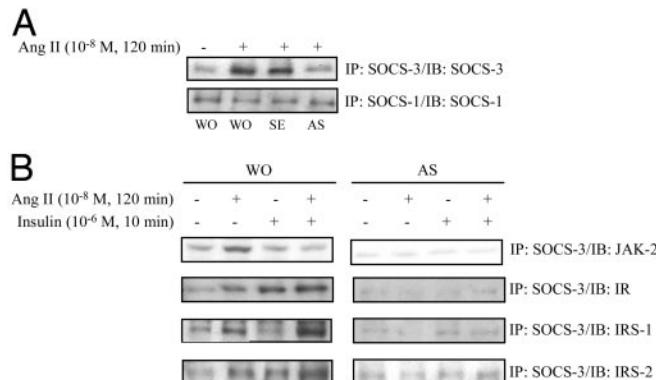


FIG. 3. Effect of SOCS-3 expression inhibition on Ang II-induced association of SOCS-3 with proteins of the insulin signaling pathway. Three hours before the beginning of the experiments, the rats received a single ip dose of vehicle buffer (WO), sense (SE), or antisense (AS) SOCS-3 oligonucleotide ($200 \mu\text{l}$, 6.0 nmol). Rats were then anesthetized and acutely treated with a single dose of saline (−) or Ang II (0.02 ml , 10^{-8} M) (+). After 120 min, the tips of the hearts were excised (A) or a single dose of saline (−) or insulin (0.02 ml , 10^{-6} M) (+) was injected (B), and after 2 (IR, IRS-1 and IRS-2) or 10 (JAK-2) min, the tips of the hearts were excised and used in immunoprecipitation (IP) assays with anti-SOCS-3 or anti-SOCS-1 antibodies. Anti-SOCS-3 (A, *upper blot*), anti-SOCS-1 (A, *lower blot*), anti-JAK-2 (B, *first blots*), anti-IR (B, *second blots*), anti-IRS-1 (B, *third blots*), and anti-IRS-2 (B, *fourth blots*) antibodies were used for blotting. Specific bands were labeled with [^{125}I] protein A and visualized by autoradiography. Band intensities were quantified by digital densitometry. Depicted blots are representative of $n = 5$. See *Materials and Methods* for details.

Ang II-induced SOCS-3 expression interferes with insulin signal transduction in isolated rat cardiomyocytes

Acute injection of Ang II is known to produce systemic effects such as the modulation of heart rate and contractility, increase of blood pressure, and regulation of thirst and renal water balance. To investigate whether the effects of Ang II-induced SOCS-3 expression on insulin signal transduction are independent of the systemic effects of Ang II, we evaluated SOCS-3 expression, activation of insulin signal transduction, and GLUT-4 translocation in NRVMs. The treatment of NRVMs with Ang II led to a significant increase of SOCS-3 expression (4.1-fold, $P < 0.05$) (Fig. 7A). This effect was completely abolished by SOCS-3 antisense but not SOCS-3 sense oligonucleotide pretreatment (Fig. 7A). Pretreatment of NRVMs with Ang II significantly inhibited insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS-1 (Fig. 7B, WO) and IRS-2 (Fig. 7C, WO) and insulin-induced serine 473 phosphorylation of Akt (Fig. 7D, WO). Inhibition of Ang II-induced SOCS-3 expression by the pretreatment of NRVMs with SOCS-3 antisense oligonucleotide partially reverted the inhibitory effect of Ang II on insulin-induced activation of IRS-1 (Fig. 7B, AS), IRS-2 (Fig. 7C, AS), and Akt (Fig. 7D, AS). Finally, the inhibition of Ang II-induced SOCS-3 expression reverted the inhibitory effect of Ang II on insulin-induced GLUT-4 translocation to the cell membrane of NRVM (Fig. 7E).

Discussion

Hypertension is one of the most important risk factors for the development of insulin resistance and diabetes mellitus (28, 29). Clinical and experimental data provide evidence for

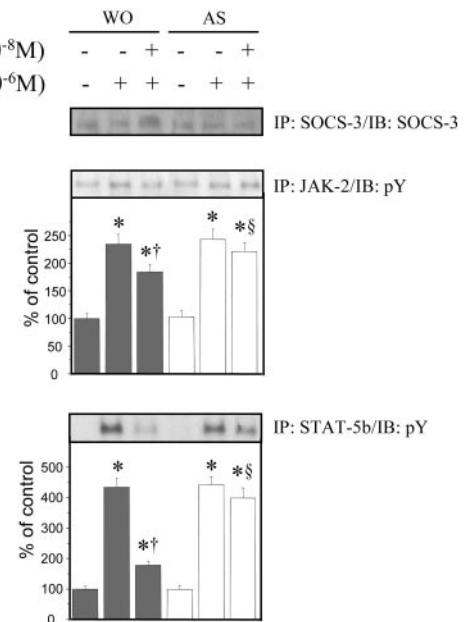


FIG. 4. Effect of SOCS-3 expression inhibition on Ang II-induced inhibition of insulin-induced tyrosine phosphorylation of JAK-2 and STAT-5b. Three hours before the beginning of the experiments, the rats received a single ip dose of vehicle buffer (WO), or antisense (AS) SOCS-3 oligonucleotide ($200 \mu\text{l}$, 6.0 nmol). Rats were then anesthetized and acutely treated with a single dose of saline (0.02 ml) (−) or Ang II (0.02 ml , 10^{-8} M) (+). After 120 min, a single dose of saline (0.02 ml) (−) or insulin (0.02 ml , 10^{-6} M) (+) was injected, and after 10 min the tips of the hearts were excised and used in immunoprecipitation (IP) assays with anti-SOCS-3 (*first blot*), anti-JAK-2 (*second blot*), or anti-STAT-5b (*third blot*) antibodies. Anti-SOCS-3 (*first blot*) or antiphosphotyrosine (pY) (*second and third blots*) antibodies were used for blotting (IB). Specific bands were labeled with [^{125}I]-protein A and visualized by autoradiography. Band intensities were quantified by digital densitometry. In all experiments, $n = 5$. *, $P < 0.05$ vs. saline treated; †, $P < 0.05$ vs. insulin treated; §, $P < 0.05$ vs. Ang II+insulin treated in rats pretreated with no oligonucleotide (WO). See *Materials and Methods* for details.

an impairment of the glucose transport stimulated by insulin-dependent mechanisms in muscle of patients and animals with high blood pressure (30, 31). On clinical grounds the association between diabetes and hypertension has long been recognized and is known to play a central role in some of the common macro- and microvasculopathies that develop in subjects with diabetes (28, 29).

Since the early studies on the clinical effects of inhibitors of ACE for the treatment of hypertension, the substantial benefits for patients with diabetes and the occasional occurrence of hypoglycemia have been evident (32–34). The observation of these effects raised the possibility that Ang II, bradykinin, or both peptides could exert a regulatory role on insulin-dependent and/or -independent mechanisms of glucose mobilization. Exploring the interactions between the Ang II and insulin signaling pathways, we and others have shown that an intracellular molecular cross-talk occurs at an early postreceptor level, which is pivoted by the engagement of JAK-2 and leads to an impairment of the insulin-dependent activation of PI 3-kinase and Akt (2, 9). This phenomenon participates in the inhibition of insulin signal transduction in the heart of animal models of obesity, diabetes,

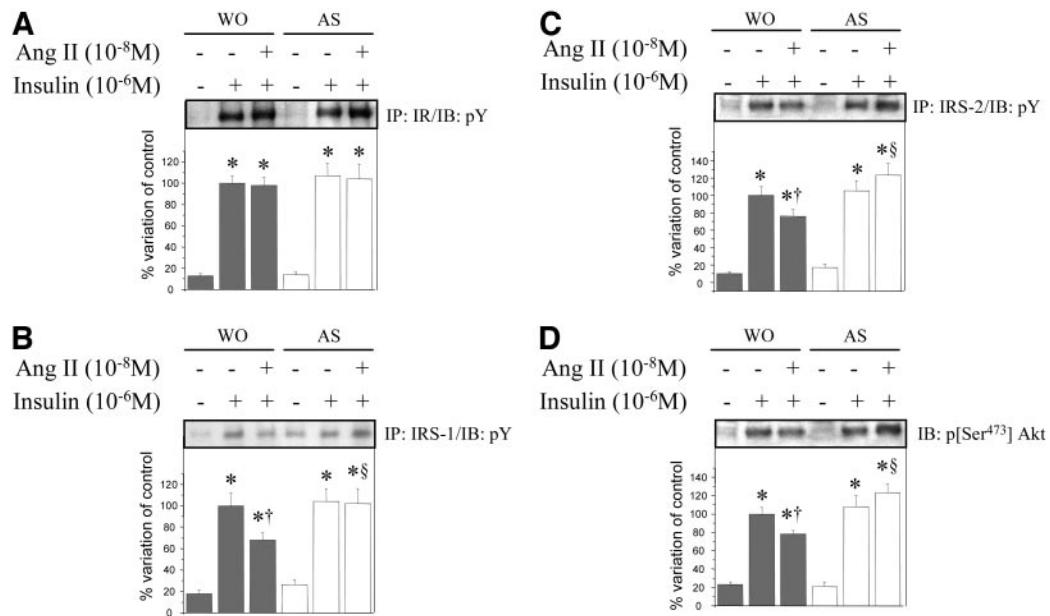


FIG. 5. Effect of SOCS-3 expression inhibition on Ang II-induced inhibition of insulin signal transduction through IR/IRSSs/Akt pathway. Three hours before the beginning of the experiments, the rats received a single ip dose of vehicle buffer (WO) or antisense (AS) SOCS-3 oligonucleotide (200 μ l, 6.0 nmol). Rats were then anesthetized and acutely treated with a single dose of saline (−) or Ang II (0.02 ml, 10^{-8} M) (+). After 120 min, a single dose of saline (−) or insulin (0.02 ml, 10^{-6} M) (+) was injected, and after 2 (IR, IRS-1 and IRS-2) or 5 (Akt) min, the tips of the hearts were excised and used in immunoprecipitation (IP) assays with anti-IR (A), anti-IRS-1 (B), or anti-IRS-2 (C) antibodies. Antiphosphotyrosine (pY) antibodies were used for blotting (IB) (A–C). For direct immunoblot (IB) assays, samples containing 0.2 mg total protein were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-phospho[Ser⁴⁷³] Akt antibodies. Specific bands were labeled with [¹²⁵I]-protein A and visualized by autoradiography. Band intensities were quantified by digital densitometry. In all experiments, $n = 5$. *, $P < 0.05$ vs. saline treated; †, $P < 0.05$ vs. insulin treated; §, $P < 0.05$ vs. Ang II+insulin treated in rats pretreated with no oligonucleotide (WO). See Materials and Methods for details.

and hypertension that hyperexpress Ang II in the cardiac tissue (6). Besides the intracellular cross-talk that depends mostly on the activation of AT1 (2), a prereceptor mechanism of interaction between Ang II and insulin signaling is evidenced when experimental animals are treated with inhibitors of ACE, which leads to an improved insulin action and signal transduction (7). A bulk of evidence suggest that not only the reduction of Ang II but also the increase of bradykinin participates in this extracellular cross-talk (35). Bradykinin induces the tyrosine phosphorylation of IRS-1 and increases PI 3-kinase activity, but, most importantly, it sensitizes this molecular pathway to insulin action (7). Bradykinin also promotes an increase of intracellular nitric oxide, which can up-regulate GLUT-4 translocation and increase glucose uptake by skeletal muscle (36, 37).

Thus, it becomes clear that the renin-angiotensin system exerts a regulatory role on insulin action. This regulation occurs at distinct levels and engages several extra- and intracellular elements. The gross result of this interaction is mostly inhibitory on insulin action. With the recent evidence of the intrinsic negative regulation of insulin (12, 15) and Ang II (16, 17) signaling by SOCS-3, we decided to investigate whether Ang II-induced SOCS-3 could somehow modulate insulin signal transduction and action.

Initially, a time frame was established during which Ang II and insulin induce the expression of SOCS-3 in heart. According to the present data and a previous report (16), the level of SOCS-3 protein in heart is constitutively low. The treatment with Ang II promotes an increase of SOCS-3 ex-

pression that is detectable at 10 min and lasts for approximately 180 min. Conversely, insulin promotes a late stimulation of SOCS-3 expression, beginning at 120 min and lasting for more than 360 min. This finding is similar to that observed by Emanuelli *et al.* (12) when working with skeletal muscle of mice. The decrease of SOCS-3 protein expression that occurs 360 min after Ang II stimulation seems to be a consequence of a fall of Ang II levels because the stimulation with repetitive doses of the hormone is sufficient to prolong SOCS-3 expression as previously demonstrated (16).

Next, it was shown in heart and NRVMs that Ang II-induced SOCS-3 associates with proteins of the insulin signal transduction pathway and that this phenomenon is paralleled by an impairment of the insulin signal transduction machinery. The property of a priming dose of Ang II to hamper insulin signal transduction through IRS-1, IRS-2, PI 3-kinase, and Akt was previously reported (2) and was shown to be, at least in part, dependent on serine phosphorylation of some of those proteins (3). This was herein confirmed and shown to occur in parallel with the expression/association of SOCS-3. However, when Ang II-induced SOCS-3 expression was inhibited by a previous treatment with an antisense oligonucleotide, a partial reversal of the inhibitory effect of Ang II on insulin stimulated IRS-1, IRS-2, and Akt molecular activation was observed, suggesting that each mechanism acts independently to provide a certain degree of regulation on this pathway.

At least two previous reports have shown the participation of SOCS proteins as candidate intermediaries in the cross-

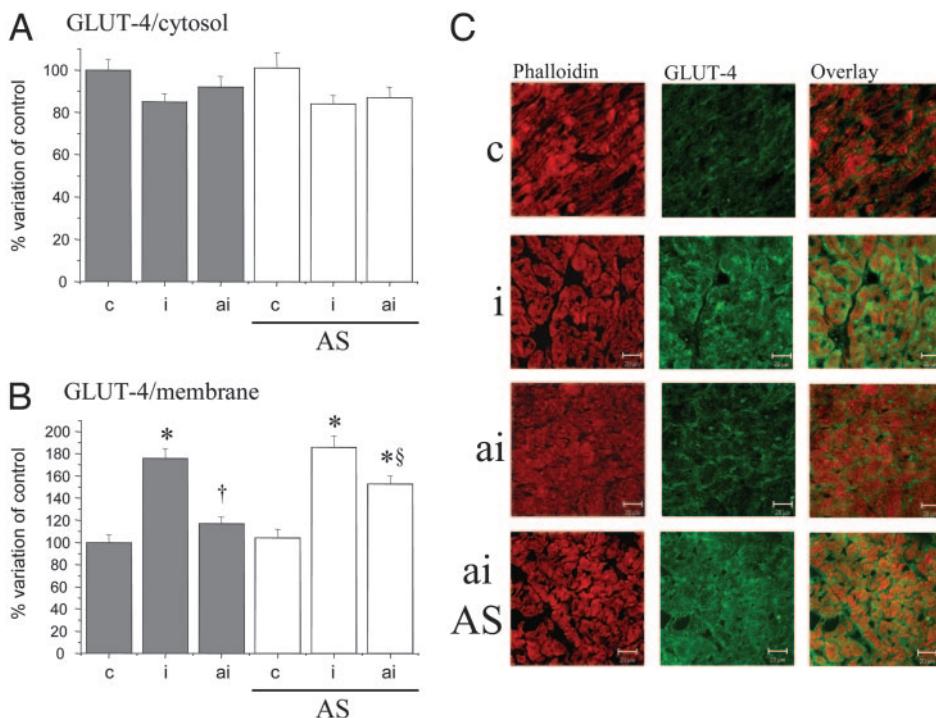


FIG. 6. Effect of SOCS-3 expression inhibition on Ang II-induced inhibition of insulin-induced GLUT-4 translocation. Three hours before the beginning of the experiments, the rats received a single ip dose of vehicle buffer or antisense (AS) SOCS-3 oligonucleotide ($200 \mu\text{l}$, 6.0 nmol). Rats were then anesthetized and acutely treated with a single dose of saline (c or i) or Ang II (0.02 ml , 10^{-8} M) (ai). After 120 min, a single dose of saline (c) or insulin (0.02 ml , 10^{-6} M) (i or ai) was injected. After 10 min the tips of the hearts were obtained, and total protein extracts were submitted to subcellular fractionation providing cytosol (A) and membrane (B) fractions that were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with anti-GLUT-4 antibodies. Specific bands were labeled with [^{125}I]-protein A and visualized by autoradiography. Band intensities were quantified by digital densitometry, and results are presented as bar graphs. In all experiments $n = 5$. *, $P < 0.05$ vs. saline (c) treated; †, $P < 0.05$ vs. insulin (i) treated; ‡, $P < 0.05$ vs. Ang II+insulin (ai) treated in rats pretreated with no oligonucleotide. For confocal laser microscopy (C), the rats were submitted to the same protocols as above. Frozen sections of hearts ($5.0 \mu\text{m}$) were obtained and incubated with primary antibody against GLUT-4, followed by incubation with FITC-conjugated secondary antibodies and then with rhodamine-conjugated phalloidin. Images were obtained with a laser confocal microscope (LSM510, Zeiss), always using the same settings for image acquisition. The images are representative of three independent experiments.

talk between a hormone and a cytokine. Boisclair *et al.* (20) showed that SOCS-3 mediates an inhibitory cross-talk between IL-1 β and GH in hepatoma cells. According to their studies, the pretreatment of the cells with IL-1 β induces an increase of up to 8-fold SOCS-3, which interacts with JAK-2/STAT-5 and hampers GH-induced transcription of the acid-labile subunit gene. In another study, Lagathu *et al.* (38) showed that chronic exposure of 3T3-F442A and 3T3-L1 adipocytes to IL-6 inhibits insulin signal transduction, which is paralleled by an increased expression of SOCS-3. Thus, convincing evidence exists to suggest that proteins of the SOCS family not only modulate signal transduction on an intrapathway basis but also provide a negative feedback for related signaling pathways.

In the last part of the study, we evaluated whether the molecular phenomena controlled by Ang II-induced SOCS-3 would play any regulatory role on a functional event activated by insulin. The activation of GLUT-4 is the rate-limiting step in muscle glucose uptake (39). In the heart, as in skeletal muscle and adipose tissue, insulin stimulates GLUT-4 translocation from an intracellular pool to the cell surface in which it mediates glucose transport (40). Knocking out GLUT-4 expression leads to cardiac dysfunction (41) and progressive heart hypertrophy (42), which illustrates the

functional importance of this protein in cardiac tissue. In the present study, we observed that a pretreatment with Ang II significantly reduced insulin-induced GLUT-4 translocation in the heart and cultured NRVMs. The physiological significance of this phenomenon attests the fact that living rats were treated with 0.02 ml Ang II at the concentration of 10^{-8} M , a dose that provides blood Ang II concentration at the physiological range of 100 ng/liter (43). The inhibition of SOCS-3 expression partially prevented this effect, indicating that SOCS-3 modulates an important function controlled by insulin. In a previous study (15), mice transiently overexpressing SOCS-1 became hyperglycemic and hyperinsulinemic, whereas the levels of the suppressor protein were high. According to this study, both SOCS-1 and SOCS-3 interfere with insulin signal transduction by controlling the ubiquitination and degradation of IRS-1 and IRS-2 (15). Two other recent reports show that insulin-induced SOCS (-1, -3, and -6) expression can modulate further insulin signaling by directly binding to the insulin receptor and early substrates (10, 12, 44). In this context, Krebs and Hilton (45) commented that, besides their classical inhibitory role on cytokine signaling, members of the SOCS family may act as important regulators of signal transduction through members of the family of receptors with intrinsic tyrosine kinase activity.

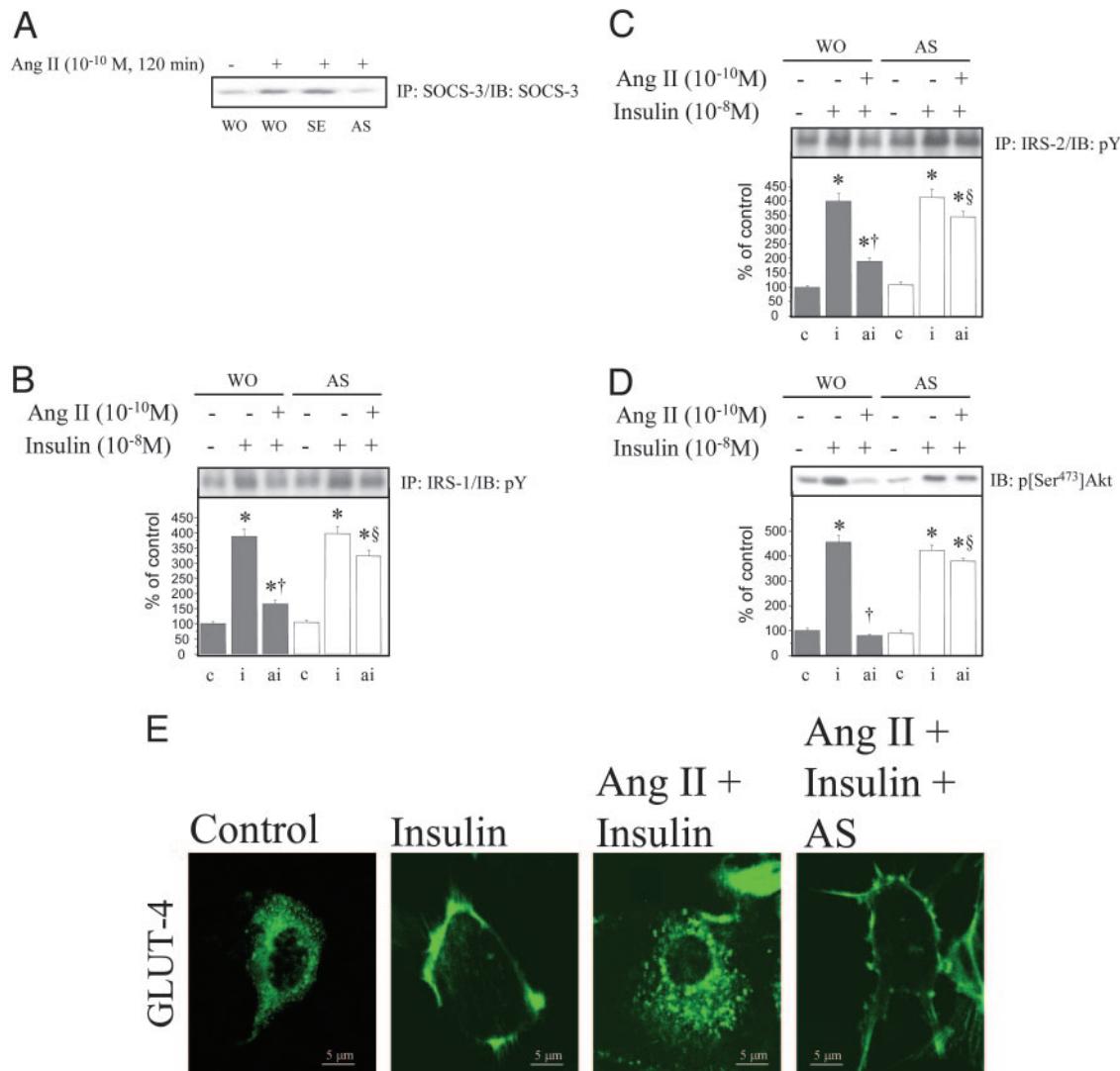


FIG. 7. Effect of SOCS-3 expression inhibition on insulin signal transduction and GLUT-4 translocation in NRVMs. Cells were prepared and plated ($6.0 \times 10^4/\text{cm}^2$) as described in *Materials and Methods*. Sense (SE) or antisense (AS) SOCS-3 oligonucleotides were added to the culture medium ($1.0 \mu\text{M}$) in parallel with the transfection reagent Lipofectamine Plus (10 mg/ml). Some cells were treated with no oligonucleotide (WO) but received the transfection reagent. After 8 h the cells were treated with saline or Ang II (10^{-10} M), and after another 120 min, the cells were treated with saline or insulin (10^{-8} M). For evaluation of signal transduction, 5.0 mg of total protein extracts from NRVMs were used in immunoprecipitation (IP) assays with anti-SOCS-3 (A), anti-IRS-1 (B), or anti-IRS-2 (C) antibodies. Anti-SOCS-3 (A) or anti-phosphotyrosine (pY) (B and C) antibodies were used for blotting (IB). For direct immunoblot (IB) assays, samples containing 0.2 mg total protein were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-phospho[Ser⁴⁷³] Akt (D) antibodies. Specific bands were labeled with [¹²⁵I]-protein A and visualized by autoradiography. Band intensities were quantified by digital densitometry. In all experiments $n = 5$. * $P < 0.05$ vs. saline treated; † $P < 0.05$ vs. insulin treated; § $P < 0.05$ vs. Ang II+insulin treated in rats pretreated with no oligonucleotide (WO). For confocal laser microscopy (E), fixed NRVMs were incubated with primary antibody against GLUT-4, followed by incubation with FITC-conjugated secondary antibodies as described in *Materials and Methods*. Images were obtained with a laser confocal microscope (LSM510, Zeiss), always using the same settings for image acquisition. The images are representative of three independent experiments. In A–D: c, only saline treatment; i, only insulin treatment; ai, Ang II followed by insulin treatment.

In conclusion, our data demonstrate that SOCS-3 can mediate a late cross-talk between Ang II and insulin and that this cross-talk reflects on the control of one of the most important physiological events controlled by insulin, *i.e.* GLUT-4 translocation. It will be interesting to determine whether other hormones and cytokines, known to negatively modulate insulin action, may exert their effect through members of the SOCS family to regulate GLUT-4 function.

Acknowledgments

We thank Dr. N. Conran for English editing.

Received April 13, 2004. Accepted October 19, 2004.

Address all correspondence and requests for reprints to: Lício A. Velloso, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciencias Médicas–Universidade Estadual de Campinas, 13081-970 Campinas São Paulo, Brazil. E-mail: laveloso@fcm.unicamp.br.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Pesquisa.

References

- Saad MJ, Velloso LA, Carvalho CR 1995 Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. *Biochem J* 310 (Pt 3):741–744
- Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR 1996 Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12490–12495
- Folli F, Kahn CR, Hansen H, Bouchie JL, Feener EP 1997 Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J Clin Invest* 100:2158–2169
- Folli F, Saad MJ, Velloso L, Hansen H, Carandente O, Feener EP, Kahn CR 1999 Crosstalk between insulin and angiotensin II signalling systems. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:133–139
- Elbaz N, Bedecs K, Masson M, Sutren M, Strosberg AD, Nahmias C 2000 Functional trans-inactivation of insulin receptor kinase by growth-inhibitory angiotensin II AT2 receptor. *Mol Endocrinol* 14:795–804
- Carvalheira JB, Calegari VC, Zecchin HG, Nadruz Jr W, Guimaraes RB, Ribeiro EB, Franchini KG, Velloso LA, Saad MJ 2003 The cross-talk between angiotensin and insulin differentially affects phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase-mediated signaling in rat heart: implications for insulin resistance. *Endocrinology* 144:5604–5614
- Carvalho CR, Thirone AC, Gontijo JA, Velloso LA, Saad MJ 1997 Effect of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action. *Diabetes* 46:1950–1957
- Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA 1996 Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem* 271:22100–22104
- Velloso LA, Carvalho CR, Rojas FA, Folli F, Saad MJ 1998 Insulin signalling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway. *Cardiovasc Res* 40:96–102
- Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E 2000 SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem* 275:15985–15991
- Sadowski CL, Choi TS, Le M, Wheeler TT, Wang LH, Sadowski HB 2001 Insulin induction of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA expression in C2C12 skeletal muscle cells is mediated by stat5*. *J Biol Chem* 276:20703–20710
- Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavay C, Freidinger K, Hilton DJ, Hotamisligil GS, Van Obberghen E 2001 SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- α in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem* 276:47944–47949
- Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiya S, Yoshimura A 1997 A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387:921–924
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ 1997 A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387:917–921
- Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF 2002 SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 277:42394–42398
- Calegari VC, Bezerra RM, Torsoni MA, Torsoni AS, Franchini KG, Saad MJ, Velloso LA 2003 Suppressor of cytokine signaling 3 is induced by angiotensin II in heart and isolated cardiomyocytes, and participates in desensitization. *Endocrinology* 144:4586–4596
- Torsoni MA, Carvalheira JB, Calegari VC, Bezerra RM, Saad MJ, Gontijo JA, Velloso LA 2004 Angiotensin II (AngII) induces the expression of suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 in rat hypothalamus—a mechanism for desensitization of AngII signaling. *J Endocrinol* 181:117–128
- Magrangeas F, Boistieu O, Denis S, Jacques Y, Minvielle S 2001 Negative cross-talk between interleukin-3 and interleukin-11 is mediated by suppressor of cytokine signalling-3 (SOCS-3). *Biochem J* 353:223–230
- Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kawazoe Y, Kohzaki H, Morita Y, Nakagawa R, Narasaki M, Adachi K, Yoshimoto T, Nakanishi K, Kishimoto T 2001 SOCS-1/SSI-1-deficient NKT cells participate in severe hepatitis through dysregulated cross-talk inhibition of IFN γ and IL-4 signaling *in vivo*. *Immunity* 14:535–545
- Boisclair YR, Wang J, Shi J, Hurst KR, Ooi GT 2000 Role of the suppressor of cytokine signalling-3 in mediating the inhibitory effects of interleukin-1 β on the growth hormone-dependent transcription of the acid-labile subunit gene in liver cells. *J Biol Chem* 275:3841–3847
- Kim NN, Villarreal FJ, Printz MP, Lee AA, Dillmann WH 1995 Trophic effects of angiotensin II on neonatal rat cardiac myocytes are mediated by cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 269:E426–E437
- Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Gasparetti AL, de Souza CT, Pereira-da-Silva M, Oliveira RL, Saad MJ, Carneiro EM, Velloso LA 2003 Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. *J Physiol* 552:149–162
- Folli F, Saad MJ, Backer JM, Kahn CR 1992 Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *J Biol Chem* 267:22171–22177
- Mizukami Y, Yoshida K 1997 Mitogen-activated protein kinase translocates to the nucleus during ischaemia and is activated during reperfusion. *Biochem J* 323 (Pt 3):785–790
- Araujo EP, Amaral ME, Souza CT, Bordin S, Ferreira F, Saad MJ, Boschero AC, Magalhaes EC, Velloso LA 2002 Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. *FEBS Lett* 531:437–442
- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE 1995 Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 375:247–250
- DeFronzo RA, Ferrannini E 1991 Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:173–194
- Reaven GM 1993 Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med* 44:121–131
- Nuutila P, Maki M, Laine H, Knuuti MJ, Ruotsalainen U, Luotoalahti M, Haaparanta M, Solin O, Jula A, Koivisto VA, Voipio-Pulkki L-M, Yki-Jarvinen H 1995 Insulin action on heart and skeletal muscle glucose uptake in essential hypertension. *J Clin Invest* 96:1003–1009
- Kinnick TR, Youngblood EB, O'Keefe MP, Saengsirisuwan V, Teachey MK, Henriksen EJ 2002 Modulation of insulin resistance and hypertension by voluntary exercise training in the TG(mREN2)27 rat. *J Appl Physiol* 93:805–812; discussion 797
- Passa P, Marre M, Leblanc H 1986 Enalapril, captopril, and blood glucose. *Lancet* 1:1447
- Buller GK, Perazella M 1991 ACE inhibitor-induced hypoglycemia. *Am J Med* 91:104–105
- Herings RM, de Boer A, Stricker BH, Leufkens HG, Porsius A 1995 Hypoglycaemia associated with use of inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Lancet* 345:1195–1198
- Henriksen EJ, Jacob S 2003 Modulation of metabolic control by angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. *J Cell Physiol* 196:171–179
- Dietze GJ, Wicklmayr M, Rett K, Jacob S, Henriksen EJ 1996 Potential role of bradykinin in forearm muscle metabolism in humans. *Diabetes* 45(Suppl 1):S110–S114
- Mitchell D, Tyml K 1996 Nitric oxide release in rat skeletal muscle capillary. *Am J Physiol* 270:H1696–H1703
- Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, Maachi M, Capeau J, Caron M 2003 Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun* 311:372–379
- Bryant NJ, Govers R, James DE 2002 Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:267–277
- Fischer Y, Thomas J, Sevilla L, Munoz P, Becker C, Holman G, Kozka IJ, Palacin M, Testar X, Kammermeier H, Zorzano A 1997 Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. *J Biol Chem* 272:7085–7092
- Tian R, Abel ED 2001 Responses of GLUT4-deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis. *Circulation* 103:2961–2966
- Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Virkamaki A, Goodyear LJ, Kahn CR, Kahn BB 2000 Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med* 6:924–928
- Iglesias AG, Suarez C, Feierstein C, Diaz-Torga G, Becu-Villalobos D 2001 Desensitization of angiotensin II: effect on [Ca 2+], inositol triphosphate, and prolactin in pituitary cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E462–E470
- Mooney RA, Senn J, Cameron S, Inamdar N, Boivin LM, Shang Y, Furlanetto RW 2001 Suppressors of cytokine signalling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J Biol Chem* 276:25889–25893
- Krebs DL, Hilton DJ 2003 A new role for SOCS in insulin action. Suppressor of cytokine signaling. *Sci STKE* 2003:PE6

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.



DISCUSSÃO GERAL

Na última década, vários trabalhos demonstraram que a ANGII é capaz de ativar a via JAK/STAT através de seu receptor AT1, em células musculares lisas vasculares (MARRERO *et al.*, 1995b), fibroblastos cardíacos (BHAT *et al.*, 1994), células musculares cardíacas (MASCARENO *et al.*, 1998) e tecido cardíaco *in vivo* (VELLOSO *et al.*, 1996). Esta via é responsável por ativar genes iniciais de resposta ao crescimento e pode constituir-se em um dos mecanismos pelos quais a ANGII induz o crescimento, o remodelamento e o reparo cardíaco e vascular (BERK e CORSON, 1997; HEFTI *et al.*, 1997).

Embora numerosos estudos tenham demonstrado o papel essencial das vias de sinalização intracelular na regulação da hipertrofia (CHIEN, 1999; McKINSEY e OLSON, 1999; SUGDEN, 1999), há poucos estudos sobre a ativação de um *feedback* negativo dessas vias. Como sabemos, a regulação negativa ou a desensibilização de vias de sinalização pode servir como um mecanismo de proteção contra possíveis efeitos deletérios impostos pela super-estimulação.

Assim como é observado em células neoplásicas (BROMBERG, 2002), também em células cardiovasculares, durante o desenvolvimento da hipertensão, ocorre super-ativação da via JAK/STAT (DOSTAL *et al.*, 1997). Alguns trabalhos demonstram que a via JAK/STAT é encontrada ativa quando há sobrecarga aguda de pressão (PAN *et al.*, 1997) e que está associada ao remodelamento cardíaco e vascular induzido pela ANGII na hipertensão, assim como nos processos inflamatórios que antecedem a aterosclerose (DOSTAL *et al.*, 1997). A duração e o tempo de ativação das proteínas STAT promovido pelas quinases JAK, dependem do tempo em que estas quinases permanecerem ativas. A super-ativação das proteínas JAK e *c-Src* talvez seja o mecanismo mais comum para a fosforilação e ativação constitutiva das proteínas STAT. Supõe-se que a super-ativação dessas proteínas ocorra por algum defeito no mecanismo de internalização do receptor após a ligação do ligante, como se observa em células neoplásicas (BROMBERG, 2002). Com isso, as proteínas JAK e *c-Src* passam a se acumular em níveis anormais no interior da célula promovendo a hiper-ativação das STATs. Assim, torna-se claro que a ativação da via JAK/STAT pela ANGII é tão importante quanto sua regulação por mecanismos de *feedback* negativo.

Vários mecanismos estão envolvidos na regulação dos sinais intracelulares transduzidos através da via JAK/STAT, entre eles, a internalização do receptor (STROUS *et al.*, 1996), a degradação pelo sistema ubiquitina/proteosoma (STROUS *et al.*, 1996), a ativação de proteínas PIAS (proteínas inibidoras ativadas pelas STATs) (CHUNG *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 1998) e também a expressão de moléculas reguladoras da sinalização, como as tirosinas fosfatases (JIAO *et al.*, 1996; HAQUE *et al.*, 1998; YOU *et al.*, 1999) e as proteínas da família CIS/SOCS (KREBS e HILTON, 2000).

As proteínas SOCS são induzidas através da ativação da via JAK/STAT pela leptina (BJORBAEK *et al.*, 2000), insulina (SADOWSKI *et al.*, 2001), hormônio de crescimento (FAVRE *et al.*, 1999) e prolactina (AUERNHAMMER *et al.*, 1999), além de várias citocinas, e quando expressas, inibem a sinalização e a atividade biológica de seus indutores (AUERNHAMMER *et al.*, 1999; FAVRE *et al.*, 1999; BJORBAEK *et al.*, 2000; SADOWSKI *et al.*, 2001). Como JAK2 e várias proteínas STAT (VELLOSO *et al.*, 1996; TORSONI *et al.*, 2004) são ativadas pela ANGII e participam da transdução de seu sinal, examinamos se as proteínas SOCS podem ser induzidas pela ANGII em tecido cardíaco de RWA (Ratos *Wistar* adultos) e em CVIN (cardiomiócitos ventriculares isolados de ratos neonatos) e se participam do controle da transdução do sinal desse hormônio ou da desensibilização em resposta a esse ligante. A escolha de SOCS3 foi baseada no fato de que vários hormônios, como os descritos acima, induzem sua expressão e também, devido aos resultados de experimentos preliminares que demonstraram que SOCS3 foi a proteína da família SOCS que mais respondeu ao estímulo com ANGII.

Ao avaliarmos o *time-course* de ativação da expressão de SOCS3 induzida pela ANGII, encontramos que esta proteína, mesmo no estado basal, já se encontra expressa em níveis baixíssimos. Isto nos leva a supor que a expressão basal de SOCS3 seja devido a níveis endógenos circulantes de citocinas e hormônios, inclusive ANGII. Em camundongos adultos, SOCS3 é expressa em níveis relativamente altos nos pulmões, baço e timo, e em níveis relativamente baixos em fígado e coração (STARR *et al.*, 1997). Após a injeção de uma dose supra-fisiológica de ANGII (10^{-6} M), verificamos um rápido aumento no nível protéico de SOCS3, iniciando-se por volta de 10 minutos e alcançando, aos 120 minutos, um pico máximo de expressão.

A expressão de cada um dos genes *socs* é induzida *in vivo* e *in vitro* em resposta às citocinas. Em fígado de roedores, a transcrição dos genes *socs1* e *socs3* é rápida e transitória em resposta à IL-6, iniciando-se dentro de 20 minutos de exposição à IL-6 e declinando dentro de 2 a 4 horas (NAKA *et al.*, 1997). Ao avaliarmos os níveis do RNAm de SOCS3, observamos que estes se encontram elevados após estímulo com ANGII, apresentando um aumento significativo aos 60 minutos após o estímulo com este hormônio. Também em adipócitos 3T3-L1, o RNAm de SOCS3, induzido pela ANGII, alcança pico máximo de expressão 60 minutos após o tratamento com este hormônio (SHI *et al.*, 2004). Nossos resultados sugerem que a regulação da transdução e da transcrição de SOCS3 possa estar sob o controle da ANGII. Além do mais, a modulação da taxa de degradação de SOCS3 pode também favorecer o acúmulo desta proteína.

Experimentos de dose-resposta demonstraram que a expressão de SOCS3 induzida pela ANGII é um fenômeno fisiológico que pode modular a função deste hormônio. A diferença na sensibilidade à ANGII observada entre corações de RWA (6-8 semanas de idade) e CVIN (1-3 dias de vida) pode ocorrer devido à diferença de idade entre estes dois grupos de animais (adultos e neonatos) uma vez que os receptores de ANGII são regulados durante a ontogenia (SHANMUGAM e SANDBERG, 1996), e também devido às condições de cultura as quais podem acabar por afetar a expressão e o turnover de AT1 (ULLIAN e LINAS, 1989).

Dados da literatura demonstram que as proteínas SOCS são capazes de se ligar a membros da família *Janus kinase* e/ou receptores e bloquear a sinalização intracelular (YASUKAWA *et al.*, 1999). As proteínas SOCS1 e SOCS3 possuem dentro de sua região amino-terminal uma seqüência de 12 aminoácidos que se assemelham ao *loop* de ativação de JAK2. Vários autores supõem que estas proteínas inibam a atividade de JAK2 por agirem como pseudo-substratos que evitam o acesso de substratos quinases legítimos, como as STATs, à esta quinase (STARR e HILTON, 1999; YASUKAWA *et al.*, 1999). Uma vez associadas às proteínas fosforiladas em tirosina, as SOCS provavelmente recrutam ubiquitininas ligases, causando a ubiquitinação destas proteínas fosforiladas e sua destruição pelo proteosoma (ZHANG *et al.*, 1999).

Na sinalização da leptina, a associação entre SOCS3 e JAK2 só pode ser observada quando a expressão de SOCS3 encontra-se em níveis altos. Além disso, a super-expressão de SOCS3 pode induzir resistência à leptina (BJORBAEK *et al.*, 1999), já que promove a desfosforilação de JAK2 e do receptor de leptina. Na sinalização da ANGII, verificamos que a associação entre SOCS3 e JAK2 em tecido cardíaco ocorre em paralelo ao aumento da expressão de SOCS3 induzida pela ANGII. As imagens referentes à associação entre SOCS3 e JAK2, confirmam estes nossos achados. É interessante ressaltar que a localização de SOCS3 em coração de RWA coincide com regiões que possuem altas concentrações do receptor AT1 (TAMBASCIA *et al.*, 2001). Embora SOCS3 apresente a mesma distribuição em tecido cardíaco que AT1, não observamos qualquer associação entre SOCS3 e AT1 ou AT2 (dados não mostrados). Logo, em oposição ao que se observa com citocinas (NICHOLSON *et al.*, 2000; SASAKI *et al.*, 2000), SOCS3, induzida por ANGII, associa-se somente a JAK2.

Vários relatos demonstram que a via JAK/STAT é ativada pela ANGII através do receptor AT1 (MARRERO *et al.*, 1995b, 1998 ALI *et al.*, 1997b). Inibidores farmacológicos da atividade deste receptor, como Losartan, podem bloquear a atividade *in vivo* da ANGII (ARDAILLOU, 1999), sugerindo que a sinalização dependente de AT1 seja necessária para a maioria das respostas intracelulares deste hormônio. Em nosso estudo, verificamos que o bloqueio de AT1 causa inibição de sua fosforilação em tirosina e também das proteínas JAK2 e STAT1. Nesta mesma condição experimental, SOCS3 não é expressa e nem se associa a JAK2. Starr e Hilton (1999) demonstraram que a transcrição dos genes *socs* é mediada, pelo menos em parte, pelos fatores de transcrição STAT. Recentes estudos têm revelado que o promotor de SOCS3 contém um elemento de ligação para as STATs funcionalmente ativas (AUERNHAMMER *et al.*, 1999). Logo, nossos achados corroboram os dados da literatura. Estando as proteínas STAT inibidas, a expressão de SOCS3 também estará, já que sua transcrição é dependente destas proteínas. Portanto, com o resultado obtido podemos dizer que é o receptor AT1 da ANGII o responsável por induzir a ativação da via JAK/STAT e, consequentemente, a expressão de SOCS3 induzida por ANGII. Talvez a eficácia do bloqueio de AT1 ou da inibição da ECA, como demonstrado por vários trabalhos (TIMMERMANS *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 1997), em estados

hipertensivos e hipertróficos, seja devida ao bloqueio de mais uma via de efeito mitogênico (JAK/STAT) ativada pela ANGII.

A ANGII ativa a transcrição de proto-oncogenes ou *early inducible genes* como *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* e *egr-1*, os quais codificam proteínas controladoras da expressão de elementos da matriz extracelular (como colágeno e fibronectina), e fatores de crescimento (como o fator de crescimento derivado de plaquetas - PDGF e o fator de transformação de crescimento- β - TGF β) em cultura de miócitos cardíacos e em coração de ratos adultos (DARNELL *et al.*, 1994; KANG *et al.*, 1996). O bloqueio de AT1 por meios farmacológicos inibe a expressão desses genes (KIM *et al.*, 1995a) e acaba tendo grande utilidade clínica no controle da hipertensão arterial (MARRERO *et al.*, 1997). Em células musculares lisas da aorta de ratos (RASMC), o RNAm de *c-jun* é detectado já aos 15 minutos após o estímulo com ANGII, atinge um pico máximo aos 60 minutos e permanece estável por até 180 minutos (NAFTILAN *et al.*, 1990). Em tecido cardíaco, observamos que o bloqueio de AT1 com Losartan reduziu, mas não aboliu completamente a propriedade da ANGII em induzir a expressão do proto-oncogene *c-jun*. Este nosso achado está em concordância com achados prévios que demonstram que, tanto AT1 quanto AT2 podem induzir a expressão de *c-jun* (NAFTILAN *et al.*, 1990; KIM *et al.*, 1995a). O bloqueio de AT1 é acompanhado por um aumento nos níveis circulantes de ANGII e de seus metabólitos, possivelmente resultando na estimulação de AT2, o qual modula os efeitos proliferativos e de crescimento de AT1. Logo, os experimentos com Losartan indicam que a ANGII induz a expressão de SOCS3 somente através de AT1, enquanto a expressão de *c-jun* pode ser induzida pela ativação de ambos os receptores, AT1 e AT2.

Em células musculares lisas vasculares (VSMC), o processo de internalização de AT1 inicia-se por volta de 1,5 minutos (GRIENDLING *et al.*, 1987) após a adição do ligante. Lassegue *et al.* (1993), demonstraram que a sinalização da PLD (fosfolipase D) mediada por AT1 nestas células é ativada 1,5 minutos após a adição de ANGII e continua por mais uma hora, sugerindo que, mesmo estando AT1 internalizado, as vias de sinalização intracelular já induzidas pela ANGII ainda continuam ativas. Anderson *et al.* (1993) e Zhang *et al.* (1996), sugerem que a ANGII promova a translocação de AT1 para dentro de um domínio especializado na membrana de onde sinais prolongados

são gerados. O processo de internalização de AT1 é proposto como um mecanismo de desensibilização.

Muitos investigadores têm observado uma diminuição na responsividade do sinal da ANGII (também chamado taquifilia, desensibilização ou *downregulation*) após repetidas aplicações deste hormônio (PEACH, 1977; MOELLENHOFF *et al.*, 2001). Não há dúvidas de que a exposição prolongada à ANGII altere as vias de sinalização envolvidas na geração do sinal subsequente. Em VSMC, a ANGII além de promover uma redução da expressão global de seu próprio receptor AT1 (LASSEGUE *et al.*, 1995), diminui a quantidade destes receptores na superfície celular, diminui o seu acoplamento à proteína G (KAI *et al.*, 1996) e aumenta os níveis protéicos de fosfatases. O efeito final é uma atenuação da responsividade à ANGII. Logo, há poucos receptores AT1 na superfície celular para serem estimulados e aqueles que estão presentes são incapazes de se acoplar à proteína G e de promover a ativação da PLC ou de tirosinas quinase citosólicas, como JAK2.

Nossos achados referentes a refratariedade do sinal da ANGII estão em concordância com achados prévios da literatura (REAGAN *et al.*, 1993; MOELLENHOFF *et al.*, 2001). Verificamos que a repetida exposição a ANGII causa redução na expressão do proto-oncogene c-jun e também na fosforilação de JAK2 e STAT1. Já a expressão de SOCS3, após duas doses de ANGII, assemelha-se a somente uma dose.

Pouco é conhecido sobre a meia-vida das proteínas SOCS. Na sinalização da IL-6, a curta meia-vida de SOCS3 sugere que sua atividade seja regulada no nível transcripcional e que interrompa o sinal transduzido por JAK2 apenas transitoriamente. Com o tempo, a expressão dos genes *socs* pode, através de mecanismos intrínsecos, regular negativamente sua própria expressão, permitindo então às células responderem a uma futura estimulação pela citocina (SIEWERT *et al.*, 1999). Baseado nestes achados e em nossos, podemos supor que, 120 minutos após a primeira dose de ANGII, SOCS3 seja expressa e que esta proteína, então presente nas células, acabe por impedir a transdução do sinal da ANGII promovida por uma segunda dose deste hormônio. Ou seja, a presença desta proteína induzida pela primeira dose de ANGII, impede que proteínas participantes da via JAK/STAT, como JAK2 e STAT1 sejam ativadas por uma segunda dose e,

conseqüentemente que, c-jun e SOCS3 sejam novamente expressas. Desta maneira, SOCS3 acaba por regular negativamente a via JAK/STAT e, consequentemente, sua própria expressão induzida pela ANGII. Percebe-se portanto, que a ANGII, além de afetar agudamente a geração de sinais intracelulares, também regula a expressão e a atividade de componentes chaves das vias de sinalização que modulam a responsividade à longo prazo.

Torsoni e colabores (2004), demonstraram que SOCS3 participa de mecanismos que levam a refratariedade do sinal da ANGII no hipotálamo. A participação de SOCS3 no mecanismo de refratariedade do sinal da ANGII em tecido cardíaco pode ser comprovada em nosso estudo através do uso de oligonucleotídeo antisense contra SOCS3 (AS SOCS3). Observamos que o tratamento de RWA e CVIN com AS SOCS3 aboliu completamente a capacidade da ANGII em induzir a expressão desta proteína. O mesmo foi observado após bloqueio de SOCS3 seguido por duas doses consecutivas de ANGII. Verificamos que o bloqueio de SOCS3, mesmo seguido por duas doses consecutivas de ANGII, causa restauração do sinal da ANGII com conseqüente retorno da fosforilação em tirosina de JAK2 e STAT1 e da expressão de c-jun.

Devido ao fato de a expressão de c-jun, após prévio tratamento com AS SOCS3 e duas doses consecutivas de ANGII não retornar a valores bem próximos à quando se administra somente uma dose de ANGII, nos leva a supor que outros mecanismos que controlem a expressão de c-jun e que são ativados por AT2 ainda estejam operando mesmo na ausência de SOCS3, uma vez que, como já vimos nos experimentos com Losartan, c-jun pode ser induzido pela ativação de ambos os receptores.

Portanto, podemos notar que o processo de desensibilização ou refratariedade do sinal da ANGII é resultado de diferentes mecanismos que atuam em conjunto a fim de modular a resposta deste hormônio. Desde que a ANGII exerça efeitos hipertróficos e estimule a síntese protéica em cardiomiócitos (SWYNGHEDA UW, 1999; KAGIYAMA *et al.*, 2002), supomos que a perda do efeito protetor de SOCS3, em condições de estímulo prolongado com ANGII, possa predispor ao crescimento celular descontrolado e à subsequente hipertrofia cardíaca.

Nesta primeira parte de nosso estudo, pudemos demonstrar, pela primeira vez, que um receptor acoplado à proteína G é capaz de induzir a ativação de uma proteína da família SOCS e que esta pode participar do controle das ações fisiológicas do hormônio ANGII. Desde que uma resposta anormal a ANGII possa ter importante papel na patogênese de doenças cardiovasculares e metabólicas, a identificação de novos mecanismos que participem do controle da transdução de seu sinal pode oferecer novos alvos para medidas fármaco-terapêuticas no controle da hipertensão, hipertrofia vascular e cardíaca entre outros.

Na segunda parte do estudo, avaliamos o envolvimento da proteína SOCS3 no *cross-talk* molecular entre ANGII e insulina.

A resistência à insulina caracteriza-se pela reduzida habilidade deste hormônio em regular a homeostasia da glicose em tecidos-alvo e está comumente associada à obesidade, atherosclerose e hipertensão, e freqüentemente precede o diagnóstico clínico de diabetes mellitus tipo II (KRUSZYNSKA e OLEFSKY, 1996; VIRKAMAKI *et al.*, 1999). A resistência à insulina desperta grande interesse clínico e experimental devido à sua comum associação com a doença cardiovascular (REAVEN *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004).

Sabe-se que cerca de 50% dos pacientes portadores de diabetes mellitus tipo II apresentam hipertensão arterial e que, quase a totalidade dos pacientes primariamente hipertensos, são resistentes à ação da insulina (FERRANNINI *et al.*, 1987). A resistência à insulina em pacientes hipertensos e diabéticos tipo II é caracteristicamente acompanhada por hiperinsulinemia (DEFRONZO e FERRANNINI, 1991), aumentando a possibilidade de que elevados níveis de insulina tenham importante papel no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca nessas condições. A taxa de mortalidade em pacientes diabéticos após infarto de miocárdio é três vezes maior que aquela observada em pacientes não-diabéticos (STONE *et al.*, 1989), sugerindo-se que defeitos específicos no miocárdio diabético contribuam para este evento (KANNEL e McGEE, 1979; STONE *et al.*, 1989).

Alterações na disponibilidade de insulina ou nas funções de suas vias de sinalização podem estar envolvidas em um grande número de processos patológicos e fisiológicos do coração no período neonatal (LOPASCHULK e SPAFFORD, 1990), na

resistência à insulina associada com a idade (DEFRONZO, 1981), na obesidade (SIMS *et al.*, 1973), no diabetes tipo II (DEFRONZO e FERRANNINI, 1991), na hipertensão essencial (FERRANNINI *et al.*, 1987), e na hipertrofia cardíaca (PATERNOSTRO *et al.*, 1995) tão bem como na cardiomiopatia observada em pacientes com diabetes tipo I e II (HAMBY *et al.*, 1974; REGAN *et al.*, 1977).

Embora a associação entre resistência à insulina e/ou diabetes mellitus tipo II e hipertensão arterial seja reconhecida há décadas, as bases moleculares que ligam estas duas síndromes ainda não foram claramente definidas. Vários estudos têm demonstrado que os sistemas de transdução do sinal da insulina e da ANGII compartilham um grande número de moléculas efetoras e que, através destas, um hormônio pode acabar por modular a resposta celular do outro. Desde que o coração é um tecido responsável à insulina (CARVALHEIRA *et al.*, 2004), a resistência à insulina induzida pelo hormônio ANGII pode ter um importante papel na etiologia da doença cardiovascular associada com hipertensão e diabetes mellitus tipo II.

Estudos demonstram que o *cross-talk* entre os sistemas de sinalização da insulina e da ANGII ocorre em distintos níveis e envolve vários elementos extra e intracelulares. O resultado desta interação é, na maior parte das vezes, inibitório sobre a ação da insulina. Ao nível pré-receptor, o mecanismo de interação entre o sinal da ANGII e da insulina é evidenciado quando animais experimentais são tratados com inibidores da ECA, os quais, além de reduzirem a pressão sanguínea, levam a uma melhora na ação e na transdução do sinal da insulina (TIMMERMANS *et al.*, 1991). Ao nível pós-receptor, o *cross-talk* entre o sinal da ANGII e da insulina pode ocorrer de três maneiras. A primeira delas envolve a participação da quinase JAK2 a qual promove redução da atividade das enzimas PI 3-K e AKT (ALEXANDER *et al.*, 1985; SCHUNKERT *et al.*, 1995). Este fenômeno participa da inibição da transdução do sinal da insulina no coração de modelos animais de obesidade, diabetes e hipertensão que hiper-expressam ANGII em tecido cardíaco (WEBER e BRILLA, 1991). A segunda maneira envolve a participação de serinas quinases que, ativadas pela ANGII, inibem a transdução do sinal da insulina (FOLLI *et al.*, 1997). Neste trabalho, propomos que a terceira maneira pela qual o *cross-talk* entre o sinal da ANGII e da insulina possa ocorrer, envolva a participação da proteína

inibidora da sinalização SOCS3. Nossa hipótese é apoiada por evidências que demonstram que esta proteína participa da regulação negativa intrínseca do sinal da insulina (SCHINDLER e DARNELL, 1995; MASUHARA *et al.*, 1997) e também da ANGII, como demonstrado por nós na primeira parte deste estudo e também por Torsoni *et al.* (2004).

Ambos, insulina e ANGII são, individualmente, capazes de induzir a expressão de proteínas SOCS em tecidos de animais *in vivo* ou em linhagens celulares *in vitro* (EMANUELLI *et al.*, 2000; EMANUELLI *et al.*, 2001; SADOWSKI *et al.*, 2001; TORSONI *et al.*, 2004). Dependendo do tipo de tecido ou linhagem celular estudada, a insulina é capaz de induzir a expressão de SOCS2 (SADOWSKI *et al.*, 2001) e/ou SOCS3 (EMANUELLI *et al.*, 2000) através da ativação da proteína STAT5b. Em células musculares esqueléticas e em tecido adiposo, a insulina induz a expressão de SOCS3 (EMANUELLI *et al.*, 2000; YASUKAWA *et al.*, 2000; SADOWSKI *et al.*, 2001). SOCS3 é induzida pela insulina em figado de camundongos *db/db* (UEKI *et al.*, 2005) e pode ter importante papel na síndrome metabólica induzida pela obesidade (UEKI *et al.*, 2004a, 2004b). Em tecido cardíaco, a insulina é capaz de induzir a expressão de SOCS3. Ao compararmos o *time-course* de indução de SOCS3 pelos hormônios insulina e ANGII, verificamos que a insulina induz a expressão desta proteína muito mais tarde que a ANGII.

Após a ligação da insulina ao seu receptor, este se autofosforila e associa-se a vários de seus substratos intracelulares, incluindo IRS-1 e IRS-2, ativando-os (WHITE e KAHN, 1994). As proteínas IRS são essenciais para a ação da insulina uma vez que, fosforiladas em tirosina, coordenam múltiplos sinais através das cascadas PI 3-K/AKT e Ras/Raf/MAPK (YENNUSH e WHITE, 1997; WHITE e MYERS, 2001). Camundongos deficientes em IRS-1 ou IRS-2 apresentam resistência à insulina periférica, a maior determinante do diabetes tipo II (WITHERS *et al.*, 1999; BRUNNING *et al.*, 2000; BURKS *et al.*, 2000; GINSBERG, 2000; KAHN e FLIER, 2000; SALTIEL, 2001). Alterações no acoplamento entre o IR e seus substratos ou na fosforilação em tirosina de IRS-1 e IRS-2 reduzem a habilidade da insulina em ativar várias de suas vias de sinalização intracelular (CHERNIAK *et al.*, 1995), tendo, como consequência, graves danos na transdução do sinal da insulina (FOLLI *et al.*, 1997). Desse modo, fica claro que as proteínas IRS são cruciais no processo de transmissão do sinal da insulina.

Segundo trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório (SAAD *et al.*, 1995; VELLOSO *et al.*, 1996), logo após estímulo com ANGII (cerca de um minuto), IRS-1 e IRS-2 são fosforilados em tirosina em tecido cardíaco de ratos de maneira dose-dependente. Sugere-se que este evento seja mediado pela quinase JAK2, já que esta sofre rápida fosforilação após estímulo com ANGII e se associa ao receptor AT1 e a IRS-1 e IRS-2 (MARRERO *et al.*, 1995a ; VELLOSO *et al.*, 1996). Trabalhos de Folli *et al.* (1997), em RASMC, demonstram que o estímulo de 2 minutos com ANGII, não altera a fosforilação em tirosina do IR, mas diminui a fosforilação de IRS-1. Em nosso estudo, verificamos que o tratamento isolado com ANGII de 120 minutos ou aquele seguido por insulina causa queda significativa nos níveis de fosforilação em tirosina do IR, IRS-1 e IRS-2 se comparados ao tratamento com insulina. Comparando-se nossos achados com aqueles acima, podemos supor que, inicialmente, ou seja, minutos após o estímulo, a ANGII exerce um efeito positivo e rápido sobre o sinal da insulina, mas que após isso, ative alguma molécula intracelular regulatória que promova alteração na transdução do sinal insulínico.

Em células intactas, o IR é também fosforilado em resíduos de serina/treonina (KASUGA *et al.*, 1982). Esta fosforilação pode ser estimulada pelo tratamento prolongado com insulina, ésteres de forbol e análogos de AMP cíclico, e presumivelmente é o resultado da fosforilação deste receptor pelas proteínas quinase C ou A (PKC ou PKA) (TAKAYAMA *et al.*, 1984; TAKAYAMA *et al.*, 1988). Ao que tudo indica, a fosforilação em serina/treonina é um mecanismo de contra-regulação da sinalização do IR, tanto no estado fisiológico como no patológico. Várias evidências demonstram que a atividade tirosina quinase do IR é importante para a ação insulínica (ELLIS *et al.*, 1986; EBINA *et al.*, 1987; WILDEN *et al.*, 1992), uma vez que alterações nesta são observadas em estados de resistência à insulina (KAHN e WHITE, 1988).

Os substratos do IR, IRS-1 e IRS-2, apresentam mais de 30 sítios de fosforilação em serina/treonina (SUN *et al.*, 1991). IRS-1, após estímulo com insulina, pode ser fosforilado tanto em resíduos de tirosina, como também em resíduos de serina pela proteína AKT (PAZ *et al.*, 1999). A inibição de IRS-1 pode induzir resistência à insulina, enquanto sua ativação constitutiva pode promover contínuo crescimento celular e respostas

anti-apoptóticas (GUAL *et al.*, 2005). Vários estudos sugerem que agentes como TNF α (KANETY *et al.*, 1995), ácidos graxos livres (SHULMAN, 2000), endotelina-1 (LI *et al.*, 1999), ANGII (FOLLI *et al.*, 1997) e hiperinsulinemia (SCHMITZ-PEIFFER e WHITEHEAD, 2003), os quais induzem resistência à insulina, podem também ativar serina/treonina quinases que fosforilem IRS-1 e inibam sua função.

Paz *et al.*, (1997), demonstraram que a resistência à insulina, no nível molecular, é induzida, ao menos parcialmente, pela aumentada fosforilação em serina/treonina de IRS-1 e IRS-2, o que impede a interação destes substratos com o IR. O hormônio ANGII tem mostrado inibir o sinal da insulina por suprimir a fosforilação em tirosina do IR, IRS-1 e IRS-2 e por elevar a fosforilação em serina destes. Estudos de Folli *et al.* (1997), em RASMC, demonstraram que a ANGII aumenta a fosforilação em serina do IR e IRS-1 e, desta forma, diminui a habilidade do IRS-1 em se ligar ao IR, o que pode contribuir para a geração de resistência à insulina na vasculatura. Nossos dados corroboram com os encontrados na literatura, demonstrando que a ANGII, em tecido cardíaco *in vivo*, é capaz de estimular a fosforilação em serina de três componentes cruciais da cascata de sinalização metabólica da insulina: IR, IRS-1 e IRS-2. Também observamos que estas alterações não ocorreram devido a variações nos níveis de expressão destas proteínas.

Embora o papel específico da PI 3-K induzida pela insulina no coração ainda não esteja bem estabelecido, um estudo recente sugere que esta via seja importante por controlar os eventos de sinalização relacionados à sobrevivência celular do miocárdio durante a reperfusão (JONASSEN *et al.*, 2001). Logo, o *cross-talk* negativo entre ANGII e insulina sobre a via PI 3-K/Akt pode ter um importante papel no desenvolvimento da apoptose cardiomiopática diabética.

Estudos de Folli *et al.* (1997), em RASMC, demonstraram que o estímulo por 2 minutos com ANGII causa a fosforilação em serina da subunidade regulatória p85 da PI 3-K e também a inibição da associação entre IRS-1 e p85 induzida pela insulina. Estudos de Velloso *et al.* (1996), em tecido cardíaco, demonstraram que a ANGII não afeta a associação entre IRS-1 e p85, mas inibe a atividade enzimática da PI 3-K. Deste modo, verifica-se em ambos os estudos, *in vitro* e *in vivo*, que embora a ANGII iniba a sinalização

da insulina através da via PI 3-K, ela exerce efeitos opostos sobre a fosforilação do IRS-1 e sobre a associação entre IRS-1 e p85. Os resultados de nosso estudo coincidem com os encontrados na literatura, uma vez que o tratamento com ANGII (120 minutos) seguido ou não por insulina causa redução significativa no acoplamento entre IRS-1 e IRS-2 com a subunidade p85 da PI 3-K e também diminuição na atividade desta enzima associada a IRS-1 e IRS-2. Além disso, observamos uma severa queda na fosforilação em serina da proteína AKT, uma serina/treonina quinase ativada logo após a PI 3-K, após tratamento com ANGII, embora nenhuma alteração em seus níveis protéicos tenha sido encontrada.

No mínimo três trabalhos demonstram a participação das proteínas SOCS como candidatas intermediárias no *cross-talk* entre um hormônio e uma citocina. Bosclair e colaboradores (2000) mostraram que SOCS3 participa do *cross-talk* inibitório entre IL-1 β e GH em células de hepatoma de ratos. De acordo com seus estudos, o pré-tratamento das células com IL-1 β , causa aumento na expressão de SOCS3, a qual interage com JAK2/STAT5 e interrompe a transcrição de genes induzidos pelo GH. Em outro estudo, Lagathu e colaboradores (2003) mostraram que a exposição crônica de adipócitos 3T3-F442A e 3T3-L1 a IL-6 inibe a transdução do sinal da insulina, o que é acompanhado por um aumento na expressão de SOCS3. A elevada expressão de SOCS1 e SOCS3 induzida pelas citocinas causa atenuação no sinal da insulina, contribuindo para a resistência à insulina associada com o desenvolvimento do diabetes tipo II (EMANUELLI *et al.*, 2001). Como se percebe, existem evidências convincentes para sugerir que as proteínas da família SOCS modulam a transdução do sinal por *feedback* negativo e também participam do *cross-talk* entre várias vias de sinalização.

Em nosso estudo, observamos que SOCS3, induzida por ANGII, interage não somente com proteínas da via de sinalização da ANGII, mas também com proteínas pertencentes à clássica via de sinalização da insulina, como IR, IRS-1 e IRS-2. É interessante notar que o *time-course* encontrado para estas associações é o mesmo que o encontrado na indução da expressão de SOCS3 pela ANGII. Além disso, é durante este mesmo *time-course* que a ANGII induz a fosforilação em serina do IR, IRS-1 e IRS-2. Isto nos leva a crer que a ação inibitória da ANGII sobre o sinal da insulina ocorra também através da proteína SOCS3 e que a elevada associação entre SOCS3 e as proteínas IR,

IRS-1 e IRS-2, em paralelo à elevada fosforilação em serina destas, esteja abolindo a habilidade da insulina em propagar seu sinal. Talvez seja por isso que o bloqueio de AT1, o receptor responsável por induzir a ativação da via JAK/STAT pela ANGII e, consequentemente, a expressão de SOCS3, como vimos na primeira parte deste trabalho, ou então a inibição da ECA, além de reduzirem a pressão sanguínea, aumentam a sensibilidade dos tecidos à insulina em indivíduos hipertensos e resistentes à insulina.

A fim de confirmarmos esta hipótese sobre o envolvimento de SOCS3 no *cross-talk* negativo entre o sinal da ANGII e da insulina, a expressão desta proteína foi inibida com oligonucleotídeo antisense contra SOCS3 (AS SOCS3) e a ativação das proteínas chaves da via PI 3-K/AKT da insulina foi novamente analisada. Após 3 horas do tratamento de RWA com AS SOCS3, verificamos uma marcante e específica queda nos níveis de expressão e fosforilação de SOCS3.

A insulina estimula a fosforilação em tirosina de JAK2 em fígado, músculo e tecido adiposo (KUNISADA *et al.*, 1998). Provavelmente esta fosforilação esteja ligada ao acoplamento de JAK2 ao IR (GUAL *et al.*, 1998). O fator de transcrição STAT5b é considerado um substrato do receptor de insulina capaz de ligar o sinal deste hormônio diretamente da superfície celular ao núcleo (CHEN *et al.*, 1997). STAT5b é ativada em células C2C12 (células musculares) pela insulina (SADOWSKI *et al.*, 2001) e é responsável pela indução dos genes SOCS2 e SOCS3 nessas células (SADOWSKI *et al.*, 2001). SOCS3, através de seu domínio SH2, liga-se ao *loop* de ativação da quinase JAK2 e, desta forma, atenua sua habilidade em fosforilar as proteínas STAT (NAKA *et al.*, 1997; YASUKAWA *et al.*, 1999). Peraldi *et al.* (2001) sugerem que SOCS3 seja fosforilada pela quinase JAK2, uma vez que proteínas SOCS3 defectivas em seu domínio SH2 não fosforilam talvez por não conseguirem se ligar a JAK2 (SUZUKI *et al.*, 1998). CIS e SOCS3 ligam-se aos receptores de citocinas e outros fosforilados e competitivamente interferem com a ligação de outras proteínas contendo domínio SH2 (SASAKI *et al.*, 2000). Recentemente, Emanuelli *et al.*, (2000, 2001) demonstraram que SOCS3 compete com IRS-1 e STAT5b pela fosfotirosina 960 (pY960) do IR induzindo, desta maneira, resistência à insulina. Nossos dados corroboram com estes encontrados na literatura. Em concordância com a redução dos níveis de expressão de

SOCS3 em tecido cardíaco e em CVIN causada pelo uso do AS SOCS3, a associação entre SOCS3 e JAK2 não ocorre o que permite a JAK2 e STAT5b retomarem sua fosforilação normal em tirosina induzida pela insulina.

Estudos recentes demonstram que SOCS1, SOCS3 e SOCS6 podem inibir o IR (EMANUELLI *et al.*, 2000; MOONEY *et al.*, 2001). Emanuelli *et al.* (2000), demonstraram a associação entre SOCS3 e IR em adipócitos 3T3-L1. Vários estudos demonstram que SOCS2 e SOCS3 interagem com receptores de IGF1 (fator de crescimento da insulina 1) e de insulina *in vitro*, *in vivo* e em sistema duplo-híbrido (DEY *et al.*, 1998, 2000). Em tecido cardíaco *in vivo*, também verificamos a associação entre SOCS3 e IR. Também observamos que o bloqueio de SOCS3 com AS SOCS3 promove a não-associação entre estas proteínas.

SOCS1 e SOCS3 associam-se com IRS-1 e IRS-2 em células HEK293 (RUI *et al.*, 2002) e bloqueiam o sinal da insulina por direcionarem IRS-1 e IRS-2 para degradação proteosômica (KAMURA *et al.*, 1998; RUI *et al.*, 2002). Além disso, SOCS1 e SOCS3 diminuem a expressão protéica de IRS-1 e IRS-2 em linhagem de células de câncer de mama humano (MCF7) e também a ativação da PI 3-K, ambas induzidas pela insulina (RUI *et al.*, 2002). Sun *et al.* (1999), em seus estudos, demonstraram que em adição à fosforilação em serina do IRS-1, a reduzida expressão das proteínas IRS está relacionada com estados de resistência à insulina em animais, humanos e em cultura de células e que a causa dessa reduzida expressão não ocorre devido à problemas na transcrição do RNAm de IRS-1, mas sim devido à sua degradação pelo protesoma (SUN *et al.*, 1999). Nossos dados, mais uma vez, encontram suporte na literatura. Verificamos que em tecido cardíaco *in vivo*, SOCS3 associa-se a IRS-1 e IRS-2 e que sua inibição acaba por causar a não-associação entre estas proteínas mesmo após estímulo de 120 minutos com ANGII. Nada podemos afirmar sobre a degradação induzida por SOCS3 de IRS-1 e IRS-2 pelo protesoma, uma vez que não realizamos qualquer investigação a este respeito. Acreditamos que SOCS3 induzida por ANGII, 120 minutos após estímulo inicial, não leve IRS-1 e IRS-2 à degradação, uma vez que, ao avaliarmos a expressão destas proteínas, nenhuma alteração em seus níveis protéicos foi encontrada.

Mooney *et al.* (2001) demonstraram que SOCS1 interfere com a fosforilação em tirosina de IRS-1 *in vitro*. Ueki *et al.* (2005), demonstraram que a super-expressão de SOCS1 causa a inibição da fosforilação em tirosina de IRS-2, enquanto que a super-expressão de SOCS3 suprime a fosforilação tanto de IRS-1 como de IRS-2, sem afetar a fosforilação do IR em fígado de camundongos obesos e diabéticos *db/db*. Além disso, demonstraram que a inibição destas proteínas com oligonucleotídeos antisense contra SOCS1 e SOCS3 praticamente restaura os níveis de fosforilação de IRS-1 e IRS-2. Nossos dados corroboram com os encontrados na literatura. A redução da expressão de SOCS3 em tecido cardíaco e em CVIN, restaurou a fosforilação de IRS-1 e IRS-2 em tecido cardíaco *in vivo* e CVIN. Segundo Emanuelli *et al.* (2000) o retorno da fosforilação de IRS-1 ocorre devido ao desligamento de SOCS3 da pY960 do IR o que permite o acoplamento entre IRS-1 e IR. A fosforilação em tirosina do IR não sofreu qualquer alteração pela redução protéica de SOCS3. Estes achados são consistentes com os mecanismos inibitórios de SOCS3 em bloquear especificamente a fosforilação dos IRS (KAMURA *et al.*, 1998; RUI *et al.*, 2001) e a pré-existência de *down-regulation* do IR (HARRISON *et al.*, 1982; TAYLOR *et al.*, 1982).

Em células COS7 (EMANUELLI *et al.*, 2001), a expressão de SOCS3 reduz a fosforilação em tirosina de IRS-1 e sua subsequente associação à subunidade regulatória p85 da PI 3-K. IL1 β induz a expressão de SOCS3 causando redução da ativação da via IRS/PI 3-K pela insulina (EMANUELLI *et al.*, 2004). Nossos achados em tecido cardíaco de ratos corroboram com os encontrados na literatura. Como resultado da elevada fosforilação em tirosina das proteínas IRS causada pela redução protéica de SOCS3, a atividade da PI 3-K associada a IRS-1 e IRS-2 encontra-se elevada.

A proteína PKB/AKT está envolvida em muitos dos efeitos celulares estimulados pela insulina (MARTE *et al.*, 1997). A expressão de SOCS1 ou SOCS6 inibe a ativação de ERK1/2 e AKT dependentes da insulina (MOONEY *et al.*, 2001), mas não altera o nível de expressão destas proteínas. Em nosso estudo, verificamos que a inibição de SOCS3 reverte o efeito inibitório da ANGII sobre a fosforilação em serina da proteína AKT, tanto em tecido cardíaco como em CVIN.

A atenuação na sinalização da insulina resulta em redução da síntese de glicogênio e transporte de glicose nas células (UEKI *et al.*, 2004a). Em modelos animais de resistência à insulina e em pacientes com diabetes tipo II, a reduzida captação de glicose está associada à menor ativação de IRS-1 e PI 3-K (SESTI *et al.*, 2001). Dados clínicos e experimentais demonstram danos no transporte de glicose estimulado pela insulina em músculo de pacientes e animais com alta pressão sanguínea (PASSA *et al.*, 1986; KINNICK *et al.*, 2002) e também em miocárdio de diabéticos (GARLAND e RANDLE, 1964; NEWSHOLME e RANDLE, 1964; BARRETT *et al.*, 1984). Katz *et al.* (1995), demonstraram que camundongos transgênicos deficientes em GLUT4 são hiperinsulinêmicos e desenvolvem significativa hipertrofia cardíaca.

Em nosso estudo, observamos que o tratamento com ANGII (120 minutos) causa inibição da translocação de GLUT4 estimulado por insulina para a membrana celular em tecido cardíaco de RWA e em CVIN. Também pudemos comprovar que a proteína SOCS3 induzida por ANGII é a responsável pela inibição da translocação de GLUT4 uma vez que, estando SOCS3 bloqueada, GLUT4 transloca-se do citosol em direção à membrana, provavelmente promovendo a captação de glicose. Ueki *et al.* (2004b) ao bloquearem a expressão de SOCS3 em fígado de camundongos *db/db*, observaram que os elevados níveis circulantes de insulina diminuíram, consistentes com a melhora na sensibilidade à insulina confirmada pelo teste de tolerância à insulina.

Quanto à ativação da via Ras/Raf/MAPK, nosso estudo limitou-se a investigar a ativação da proteína ERK (quinase regulada pelo sinal extracelular) pela ANGII (dados não mostrados). Nós encontramos que a ativação da ERK pela ANGII ocorre em níveis muito superiores aos encontrados para com a proteína AKT. Além disso, não observamos qualquer associação entre SOCS3 e proteínas da via Ras/Raf/MAPK. Supomos que esse efeito diferencial da ANGII sobre o sinal da insulina seja mediado por distintas moléculas as quais diferentemente afetam as duas maiores cascatas de sinalização da insulina.

Em outro estudo realizado em nosso laboratório (CARVALHEIRA *et al.*, 2003), observamos que, em tecido cardíaco de ratos, a ANGII age seletivamente sobre as vias de sinalização da insulina causando uma inibição da ativação da via PI 3-K/AKT, em paralelo a uma ativação da via mitogênica Ras/Raf/MAPK pela

insulina. Deste modo, a ativação da via Ras/Raf/MAPK pela ANGII e pela insulina pode estar envolvida em processos patológicos, como o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca em estados hiperinsulinêmicos. Além do mais, este mecanismo encontra-se constitutivamente ativo no coração de modelos animais de síndrome metabólica (CARVALHEIRA *et al.*, 2003). Estudos de Somwar *et al.* (2002), demonstram que a aumentada atividade basal da ERK contribui para o desenvolvimento de resistência à insulina.

Assim, os resultados obtidos em nosso estudo demonstram que a interação de SOCS3, induzida por ANGII, com proteínas da via de sinalização da insulina, apresenta efeitos moleculares e funcionais. No nível molecular, esta interação inibe a fosforilação em tirosina de IRS-1 e IRS-2 e também a fosforilação da proteína AKT. Além disso, SOCS3 inibe a transdução do sinal da insulina através da via JAK/STAT, o que por um lado, é positivo, já que SOCS3 pode proteger órgãos-alvo do estímulo contínuo de crescimento induzido por esta via. No nível funcional, SOCS3, induzida por ANGII, inibe a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, tanto em tecido cardíaco com em CVIN resultando, possivelmente, em redução na captação de glicose por estas células. Logo, SOCS3 apresenta-se como mais um mecanismo pelo qual o *cross-talk* entre o sinal da ANGII e da insulina pode ocorrer. Além disso, nossos resultados nos levam a acreditar que SOCS3 possa estar envolvida no desenvolvimento da resistência à insulina, induzida pela ANGII, em tecido cardíaco. Deste modo, supomos que a proteína SOCS3 possa se constituir em um alvo potencial para a ação de fármacos potencialmente úteis para o tratamento de diabetes mellitus tipo II e hipertensão arterial.



CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, que o hormônio ANGII é capaz de induzir a expressão de uma proteína supressora da sinalização das citocinas, SOCS3, e que esta proteína, além de participar do controle das ações fisiológicas de seu indutor, também participa do *cross-talk* negativo entre o sinal de dois hormônios, ANGII e insulina, podendo se constituir, desta forma, em mais um mecanismo de interconexão entre hipertensão arterial e resistência à insulina e/ou diabetes mellitus tipo II.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PRJ, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Current Biol* 1997; 7: 261-7.

Alexander RW, Brock TA, Gimbrone Jr MA, Rittenhouse SE. Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension* 1985; 7: 447-51.

Alexander WS, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Spring NS, et al. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* 1999; 98: 597-608.

Ali MS, Schieffer B, Delafontaine P, Bernstein KE, Ling BN, Marrero MB. Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation and activation of insulin receptor substrate 1 and protein-tyrosine phosphatase 1D in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997a; 272: 12373-79.

Ali MS, Sayeski PP, Dirksen LB, Hayzer DJ, Marrero MB, Bernstein KE. Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J Biol Chem* 1997b; 272: 23382-88.

Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens* 2000; 13: 31S-8S.

Anderson KM, Murahashi T, Dostal DE, Peach MJ. Morphological and biochemical analysis of angiotensin II internalization in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993; 264: C179-88.

Ardaillou R. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol* 1999; 11:S30-9.

Auernhammer CJ, Bousquet C, Melmed S. Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 6964-9.

Backer JM, Myers Jr MG, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J* 1992; 11: 3469-79.

Baker KM, Aceto JF. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol* 1990; 259: H610-8.

Barrett EJ, Schwartz RG, Francis CK, Zaret BL. Regulation by insulin of myocardial glucose and fatty acid metabolism in the conscious dog. *J Clin Invest* 1984; 74: 1073-9.

Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, Thurmond DC, Mora S, Shigematsu S, et al. CAP defines a second signaling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* 2000; 407: 202-7.

Berk BC, Corson MA. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res* 1997; 80: 607-16.

Bhat GJ, Thekkumkara TJ, Thomas WG, Conrad KM, Baker KM. Angiotensin II stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity. Evidence that the AT1A receptor activates transcription factor-Stat91 and/or a related protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 31443-9.

Bhat GJ, Thekkumkara TJ, Thomas WG, Conrad KM, Baker KM. Activation of the STAT pathway by angiotensin II in T3CHO/AT1A cells. Cross-talk between angiotensin II and interleukin-6 nuclear signaling. *J Biol Chem* 1995; 270: 19059-65.

Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1998; 1: 619-25.

Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 1999; 274: 30059-65.

Bjorbaek C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS, et al. SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J Biol Chem* 2000; 275: 40649-657.

Boisclair YR, Wang J, Shi J, Hurst KR, Ooi GT. Role of the suppressor of cytokine signaling-3 in mediating the inhibitory effects of interleukin-1 β on the growth hormone-dependent transcription of the acid-labile subunit gene in liver cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 3841-7.

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991; 65: 663-75.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.

Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 2002; 109: 1139-42.

Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillete J, Schubert M, Orban PC, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000; 289: 2122-5.

Buhler FR, Kiowski W, van Brummelen P, Amann FW, Bertel O, Landmann R, et al. Plasma catecholamines and cardiac, renal and peripheral vascular adrenoceptor-mediated responses in different age groups of normal and hypertensive subjects. *Clin Exp Hypertens* 1980; 2: 409-26.

Burks DJ, Font de Mora J, Schubert M, Withers DJ, Myeras MG, Towerry HH, et al. IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature* 2000; 407: 377-82.

Calegari VC, Bezerra RM, Torsoni MA, Torsoni AS, Franchini KG, Saad MA, et al. Suppressor of cytokine signaling 3 is induced by Angiotensin II in heart and isolated cardiomyocytes, and participates in desensitization. *Endocrinology* 2003; 144: 4586-96.

Calegari VC, Alves M, Picardi PK, Inoue RY, Franchini KG, Saad MJ, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 provides a novel interface in the cross-talk between angiotensin and insulin signaling systems. *Endocrinology* 2005; 146: 579-88.

Calera MR, Martinez C, Liu H, Jack AK, Birnbaum MJ, Pilch PF. Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem*. 1998; 273: 7201-4.

Carvalheira JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, et al. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 2001; 500: 119-24.

Carvalheira JB, Calegari VC, Zecchin HG, Nadruz Jr W, Guimarães RB, Ribeiro E, et al. The cross-talk between angiotensin II and insulin differentially affects phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase-mediated signaling in rat heart: implications for insulin resistance. *Endocrinology* 2003; 144: 5604-14.

Carvalho CR, Thirone AC, Gontijo JA, Velloso LA, Saad MJ. Effect of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action. *Diabetes* 1997; 46: 1950-57.

Chauhan D, Kharbanda SM, Ogata A, Urashima M, Frank D, Malik N, et al. Oncostatin M induces association of Grb2 with Janus kinase JAK2 in multiple myeloma cells. *J Exp Med* 1995; 182: 1801-6.

Chen J, Sadowski HB, Kohanski RA, Wang LH. Stat5 is a physiological substrate of the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2295-300.

Cherniak AD, Klarlund JK, Conway BR, Czech MP. Disassembly of Son-of-sevenless proteins from Grb2 during p21ras desensitization by insulin. *J Biol Chem* 1995; 270: 1485-8.

Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, et al. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 2001; 410: 944-8.

Chien KR. Stress pathways and heart failure. *Cell* 1999; 98: 555-8.

Chou CK, Dull TJ, Russel DS, Gherzi R, Lebwohl D, Ullrich A, et al. Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. *J Biol Chem* 1987; 262: 1842-7.

Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 1997; 278: 1803-5.

Clausen T. Regulation of active Na⁺-K⁺ transport in skeletal muscle. *Physiol Rev* 1986; 66: 542-80.

Cuatrecasas P. Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69: 1277-81.

Cunningham BC, Ultsch M, de Vos AM, Mulkerrin MO, Clauser KR, Wells JA. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* 1991; 254: 821-5.

Darnell Jr JE, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994; 264:1415–21.

Darnell Jr JE. STATs and gene regulation. *Science* 1997; 277: 1630-5.

DeFronzo RA, Cooke CR, Andres R, Faloona GR, Davis PJ. The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. *J Clin Invest* 1975; 55: 845-55.

DeFronzo RA. Intolerance and aging. *Diabetes Care* 1981; 4: 493-501.

DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14: 173-94.

De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005; 146: 4192-9.

Dey BR, Spence SL, Nissley P, Furlanetto RW. Interaction of human suppressor of cytokine signaling (SOCS)-2 with the insulin-like growth factor-I receptor. *J Biol Chem* 1998; 273: 24095-101.

Dey BR, Furlanetto RW, Nissley P. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 protein interacts with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 38-43.

Dostal DE, Baker KM. Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart. Mediation by the AT1 receptor. *Am J Hypertens* 1992; 5: 276-80.

Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, Bhat GJ, Karoor V, McWhinney CD, et al. Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 2893-902.

Draznin B, Melmed S, Leroith D. Insulin action, molecular and cellular biology of diabetes mellitus. 1989 (Liss, New York), Vol II.

Ebina Y, Araki E, Taira M, Shimada F, Mori M, Craik CS, et al. Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 704-8.

Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, et al. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 1998; 273: 8890-6.

Elbaz N, Bedecs K, Masson M, Sutren M, Strosberg AD, Nahmias C. Functional trans-inactivation of insulin receptor kinase by growth-inhibitory angiotensin II AT2 receptor. Mol Endocrinol 2000; 14: 795-804.

Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase - 1B gene. Science 1999; 283: 1544-8.

Ellis L, Clauser E, Morgan DO, Edery M, Roth RA, Rutter WJ. Replacement of insulin receptor tyrosine 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. Cell 1986; 45: 721-32.

Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, van Obberghen E. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. J Biol Chem 2000; 275: 15985-91.

Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidingers K, Hilton DJ, et al. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- α in the adipose tissue of obese mice. J Biol Chem 2001; 276: 47944-9.

Emanuelli B, Goondu M, Filloux C, Peraldi P, van Obberghen E. The potential role of SOCS-3 in the interleukin-1beta desensitization of insulin signaling in pancreatic β -cells. Diabetes 2004; 53: S97-S103.

Emilsson V, Arch JR, de Groot RP, Lister CA, Cawthorne MA. Leptin treatment increases suppressors of cytokine signaling in central and peripheral tissues. FEBS Lett 1999; 455: 170-4.

Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. Nature 1997; 387: 921-4.

Favre H, Benhamou A, Finidori J, Kelly PA, Edery M. Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction. FEBS Lett 1999; 453: 63-6.

Feldman R. ACE inhibitors versus AT1 blockers in the treatment of hypertension and syndrome X. Can J Cardiol 2000; 16: 41E-4E.

Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, et al. Insulin resistance in essential hypertension. N Engl J Med 1987; 317: 350-7.

Fliser D, Schaefer F, Schmid D, Veldhuis JD, Ritz E. Angiotensin II affects basal, pulsatile, and glucose-stimulated insulin secretion in humans. Hypertension 1997; 30: 1156-61.

Folli F, Saad MJ, Backer JM, Kahn CR. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of the intact rat. J Biol Chem 1992; 267: 22171-7.

Folli F, Kahn CR, Hansen H, Bouchie JL, Feener EP. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin-angiotensin II crosstalk. J Clin Invest 1997; 100: 2158-69.

Freychet P, Roth J, Neville Jr DM. Insulin receptor in the liver: specific binding of ¹²⁵I-insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. Proc Natl Acad Sci USA 1971; 68: 1833-7.

Garland PB, Randle PJ. Effects of alloxan-diabetes, starvation, hypophysectomy and adrenalectomy and of fatty acids, ketone bodies and pyruvate on the glycerol output and concentrations of free fatty acids, long-chain fatty acyl coenzyme a, glycerol phosphate and citrate cycle intermediates in rat hearts and diaphragm muscle. Biochem J 1964; 93: 678-87.

Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest* 2000; 108: 453-8.

Griendling KK, Delafontaine P, Rittenhouse SE, Gimbrone Jr MA, Alexander RW. Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 14555-62.

Gual P, Baron V, Lequoy V, van Obberghen E. Interaction of Janus kinases JAK-1 and JAK-2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-1 receptor. *Endocrinology* 1998; 139: 884-93.

Gual P, Marchand-Brustel YL, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 2005; 87: 99-109.

Hamby RI, Zoneraich S, Sherman L. Diabetic cardiomyopathy. *J Am Med Assoc* 1974; 229: 1749-54.

Hanatani A, Yoshiyama M, Kim S, Omura T, Toda I, Akioka K, et al. Inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist of cardiac phenotypic modulation after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1905-14.

Hansen JA, Lindberg K, Hilton DJ, Nielsen JH, Billestrup N. Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signaling by suppressor of cytokine signaling proteins. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 1832-43.

Haque SJ, Harbor P, Tabrizi M, Yi T, Williams BR. Protein-tyrosine phosphatase Shp-1 is a negative regulator of IL-4- and IL-13-dependent signal transduction. *J. Biol Chem* 1998; 273: 33893-96.

Harrison LC, Itin A, Kasuga M, van Obberghen E. The insulin receptor on the human lymphocyte: insulin-induced down-regulation of 126,000 and 90,000 glycosylated subunits. *Diabetologia* 1982; 22: 233-8.

Hashimoto N, Feener EP, Zhang WR, Goldstein BJ. Insulin receptor protein-tyrosine phosphatases. Leukocyte common antigen-related phosphatase rapidly deactivates the insulin receptor kinase by preferential dephosphorylation of the receptor regulatory domain. *J Biol Chem* 1992; 267: 13811-4.

- Heeneman S, Haendeler J, Saito Y, Ishida M, Berk BC. Angiotensin II induces transactivation of two different populations of the platelet-derived growth factor β receptor. Key role for the p66 adaptor protein Shc. *J Biol Chem* 2000; 275: 15926-32.
- Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 2873-92.
- Helman D, Sandowski Y, Cohen Y, Matsumoto A, Yoshimura A, Merchav S, et al. Cytokine-inducible SH2 protein (CIS3) and JAK2 binding protein (JAB) abolish prolactin receptor-mediated STAT5 signaling. *FEBS Lett* 1998; 441: 287-91.
- Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Spring NS, et al. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 114-9.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 289: 87-91.
- Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 211-7.
- Ishida M, Marrero MB, Schieffer B, Ishida T, Bernstein KE, Berk BC. Angiotensin II activates pp60c-src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995; 77: 1053-9.
- Ito M, Oliverio MI., Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 3521-5.
- Jiao H, Berrada K, Yang W, Tabrizi M, Platanias LC, Yi T. Direct association with and dephosphorylation of Jack2 Kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 6985-92.
- Johnston JA, Wang LM, Hanson EP, Sun XJ, White MF, Oakes SA, et al. Interleukins 2, 4, 7, and 15 stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrates 1 and 2 in T cells. Potential role of JAK kinases. *J Biol Chem* 1995; 270: 28527-30.
- Jonassen AK, Sack MN, Mjos OD, Yellon DM. Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circ Res* 2001; 89: 1191-8.

Kagiyama S, Eguchi S, Frank GD, Inagami T, Zhang YC, Phillips MI. Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense. *Circulation* 2002; 106: 909-12.

Kahn CR. Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med* 1985; 36: 429-51.

Kahn CR, White MF. The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *J Clin Invest* 1988; 82: 1151-6.

Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 473-81.

Kai H, Fukui T, Lassegue B, Shah A, Minieri CA, Griendling KK. Prolonged exposure to agonist results in a reduction in the levels of the Gq/G11 alpha subunits in cultured vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 1996; 49: 96-104.

Kamura T, Sato S, Haque D, Liu L, Kaelin WG, Conaway RC, et al. The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev* 1998; 12: 3872-81.

Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 1995; 270: 23780-4.

Kang PM, Nakouzi A, Simpson T, Scheuer J, Buttrick PM. Role of endogenous renin-angiotensin system in c-fos activation and PKC- epsilon translocation in adult rat hearts. *Am J Physiol* 1996; 270: H2177-83.

Kannel WB e McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *J Am Med Assoc* 1979; 241: 2035-8.

Kasuga M, Hedoi JA, Yamada KM, Kahn CR. Structure of insulin receptor and its subunits. *J Biol Chem* 1981; 257: 10392-9.

Kasuga M, Karlson FA, Kahn CR. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* 1982; 215: 185-7.

Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R, Charron MJ. Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* 1995; 377: 151-5.

Kawazoe Y, Naka T, Fujimoto M, Kohzaki H, Morita Y, Narasaki M, et al. Signal transducer and activator of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor 1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) inhibits insulin signal transduction pathway through modulating insulin receptor substrate 1 (IRS-1) phosphorylation. *J Exp Med* 2001; 193: 263-9.

Kharitonov A, Schnekenburger J, Chen Z, Knyazev P, Ali S, Zwick E, et al. Adapter function of protein-tyrosine phosphatase 1D in insulin receptor/insulin receptor substrate-1 interaction. *J Biol Chem* 1995; 270: 29189-93.

Kharitonov A, Chen Z, Sures I, Wang H, Schilling J, Ullrich A. A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. *Nature* 1997; 386: 181-6.

Kim S, Kawamura M, Wanibuchi H, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade inhibits the expression of immediate-early genes and fibronectin in rat injured artery. *Circulation* 1995a; 92: 88-95.

Kim NN, Villarreal FJ, Printz MP, Lee AA, Dillmann WH. Trophic effects of angiotensin II on neonatal rat cardiac myocytes are mediated by cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 1995b; 269: E426-37.

Kinnick TR, Youngblood EB, O'Keefe MP, Saengsirisuwan V, Teachey MK, Henriksen EJ. Modulation of insulin resistance and hypertension by voluntary exercise training in the TG(mREN2)27 rat. *J Appl Physiol* 2002; 93: 805-12; discussion 797.

Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002; 285: 1-24.

Krebs DL e Hilton DJ. SOCS. Physiological suppressors of cytokine signaling. *J. Cell Sci* 2000; 113: 2813-9.

Krebs DL, Uren RT, Metcalf D, Rakar S, Zhang JG, Starr R, et al. SOCS-6 binds to insulin receptor substrate 4, and mice lacking the SOCS-6 gene exhibit mild growth retardation. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 4567-78.

Kruszynska YT e Olefsky JM. Cellular and molecular mechanisms of non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Investig Med* 1996; 44: 413-28.

Kuhne MR, Zhao Z, Rowles J, Lavan BE, Shen SH, Fischer EH, et al.. Dephosphorylation of insulin receptor substrate 1 by the tyrosine phosphatase PTP2C. *J Biol Chem* 1994; 269: 15833-7.

Kunisada K, Tone E, Fujio Y, et al. Activation of gp130 transduces hypertrophic signals via STAT3 in cardiac myocytes. *Circulation* 1998; 98: 346-52.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.

Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, Maachi M, Capeau J, Caron M Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 372-9.

Lammers R, Moller NP, Ullrich A. The transmembrane protein tyrosine phosphatase alpha dephosphorylates the insulin receptor in intact cells. *FEBS Lett* 1997; 404: 37-40.

Landsberg L. Insulin resistance and hypertension. *Clin Exp Hypertens* 1999; 21: 885-94.

Lassegue B, Alexander RW, Clark M, Akers M, Griendling KK. Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin II-stimulated vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* 1993; 292: 509-17.

Lassegue B, Alexander RW, Nickenig G, Clark M, Murphy TJ, Griendling KK. Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 601-9.

Lazar DF, Wiese RJ, Brady MJ, Mastick CC, Waters SB, Yamauchi K, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. *J Biol Chem* 1995; 270: 20801-17.

Leonard WJ e O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 293-322.

Li J, DeFea K, Roth RA. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 9351-6.

Li L, Grenning LM, Anderson PO, Li S, Edvardsen K, Johnston J, et al. Insulin induces SOCS-6 expression and its binding to the p85 monomer of phosphoinositide 3-kinase, resulting in improvement in glucose metabolism. *J Biol Chem* 2004; 279: 34107-14.

Lietzke SE, Bose S, Cronin T, Karlund J, Chawla A, Czech MP, et al. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol Cell* 2000; 6: 385-94.

Ling PR, Bistrian BR, Mendez B, Istfan NW. Effects of systemic infusions of endotoxin, tumor necrosis factor, and interleukin-1 on glucose metabolism in the rat: relationship to endogenous glucose production and peripheral tissue glucose uptake. *Metabolism* 1994; 43: 279-54.

Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, et al. Inhibition of Stat-1-mediated gene activation by PIAS 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10626-31.

Lopaschulk GD e Spafford MA. Energy substrate utilization by isolated working hearts from newborn rabbits. *Am J Physiol* 1990; 258: H1274-80.

Magrangeas F, Boisteau O, Denis S, Jacques Y, Minvielle S. Negative cross-talk between interleukin-3 and interleukin-11 is mediated by suppressor of cytokine signalling-3 (SOCS-3). *Biochem J* 2001; 353: 223-30.

Malbon CC. Insulin signaling: putting the “G-“ in protein-protein interactions. *Biochem J* 2004; 380: e11-e2.

Marine JC, McKay C, Wang D, Topan DJ, Parganas E, Nakajima H, et al. SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell* 1999a; 98: 617-27.

Marine JC, Topan DJ, McKay C, Wang D, Parganas E, Stravopodis D, et al. SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell* 1999b; 98: 609-16.

Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Duff JL, Berk BC, Bernstein KE. The role of tyrosine phosphorylation in angiotensin II-mediated intracellular signalling. *Cardiovasc Res* 1995a; 30: 530-6.

Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, et al. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 1995b; 375: 247-50.

Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Schieffer E, Bernstein KE. Electroporation of pp60c-src antibodies inhibits the angiotensin II activation of phospholipase C- γ 1 in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol Chem* 1995c; 270: 15734-8.

Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun J, Harp JB, Ling BN. Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 1997; 272: 24684-90.

Marrero MB, Venema VJ, Ju H, Eaton DC, Venema RC. Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 and SHP-2. *Am J Physiol* 1998; 275: C1216-23.

Marte BM e Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 355-8.

Mascareno E, Dhar M, Siddiqui MA. Signal transduction and activator of transcription (STAT) protein-dependent activation of angiotensinogen promoter: a cellular signal for hypertrophy in cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5590-4.

Mascareno E e Siddiqui MA. The role of Jak/STAT signaling in heart tissue renin-angiotensin system. *Mol Cell Biochem* 2000; 212: 171-5.

Massague JP, Pilch PF, Czech MP. Electrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unit stoichiometries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 77: 7137-41.

Masuhara M, Sakamoto H, Matsumoto A, Suzuki R, Yasukawa H, Mitsui K, et al. Cloning and characterization of novel CIS family genes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 439-46.

Matsubara H, Kanasaki M, Murasawa S, Tsukaguchi Y, Nio Y, Inada M. Differential gene expression and regulation of angiotensin II receptor subtypes in rat cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in culture. *J Clin Invest* 1994; 93: 1592-601.

Matsuguchi T, Inhorn RC, Carlesso N, Xu G, Druker B, Griffin JD. Tyrosine phosphorylation of p95Vav in myeloid cells is regulated by GM-CSF, IL-3 and steel factor and is constitutively increased by p210BCR/ABL. *Embo J* 1995; 14: 257-65.

McKinsey TA e Olson EN. Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 267-74.

McWhinney CD, Hunt RA, Conrad KM, Dostal DE, Baker KM. The type I angiotensin II receptor couples to Stat1 and Stat3 activation through Jak2 kinase in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 2513-24.

Metcalf D, Greenhalgh C, Viney E, Willson T, Starr R, Nicola N, et al. Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature* 2000; 405: 1069-73.

Minamoto S, Ikegame K, Ueno K, Narasaki M, Naka T, Yamamoto H, et al. Cloning and functional analysis of new members of STAT induced STAT inhibitor (SSI) family: SSI-2 and SSI-3. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 79-83.

Moellenhoff E, Blume A, Culman J, Chatterjee B, Herdegen T, Lebrun CJ, et al. Effect of repetitive icv injections of ANG II on c-Fos and AT(1)-receptor expression in the rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: R1095-104.

Mooney RA, Senn J, Cameron S, Inamdar N, Boivin LM, Shang Y, et al. Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J Biol Chem* 2001; 276: 25889-93.

Muller G. Dynamics of plasma membrane microdomains and cross-talk to the insulin signaling cascade. *FEBS Lett* 2002; 531: 81-7.

Naftilan AJ, Gilliland GK, Eldridge CS, Kraft AS. Induction of the proto-oncogene c-jun by angiotensin II. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 5536-40.

Naka T, Narasaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997; 387: 924-9.

Natali A, Quinones Galvan A, Arzilli F, Taddei S, Pecori N, Frascerra S, et al. Renovascular hypertension and insulin sensitivity. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 556-63.

Newsholme EA e Randle PJ. Regulation of glucose uptake by muscle. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan diabetes, starvation, hypophysectomy and adrenalectomy, on the concentrations of hexose phosphates, nucleotides and inorganic phosphate in perfused rat heart. *Biochem J* 1964; 93: 641-51.

Nicholson SE, De Souza D, Fabri LJ, Corbin J, Willson TA, Zhang JG, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2- binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 6493-8.

Noguchi T, Matozaki T, Horita K, Fujioka Y, Kasuga M. Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin-stimulated Ras activation. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 6674-82.

Ouwens DM, van der Zon GCM, Pronk GJ, Bos JL, Moller W, Cheatham B, et al. A mutant insulin receptor induces formation of a Shc-growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) complex and p21ras-GTP without detectable interaction of insulin receptor substrate 1 (IRS1) with Grb2. Evidence for IRS1-independent p21ras-GTP formation. *J Biol Chem* 1994; 269: 33116-22.

Paez-Espinosa EV, Rocha EM, Velloso LA, Boschero AC, Saad MJ. Insulin-induced tyrosine phosphorylation of Shc in liver, muscle and adipose tissue of insulin resistant rats. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 156: 121-9.

Pan J, Fukuda K, Kodama H, Makino S, Takahashi T, Sano M, et al. Role of angiotensin II in activation of the JAK/STAT pathway induced by acute pressure overload in the rat heart. *Circ Res* 1997; 81: 611-7.

Passa P, Marre M, Leblanc H. Enalapril, captopril, and blood glucose. *Lancet* 1986; 21:1447.

Paternostro G, Clarke K, Heath J, Seymour A-ML, Radda GK. Decreased GLUT4 mRNA content and insulin-sensitive deoxyglucose uptake show insulin resistance in hypertensive rat heart. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 205-11.

Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, et al. A Molecular Basis for Insulin Resistance. Elevated serine/ threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; 272: 29911-8.

Paz K, Liu YF, Shorer H, Hemi R, LeRoith D, Quan M, et al. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. *J Biol Chem* 1999; 274: 28816-22.

Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1977; 57: 313-70.

Peach MJ. Molecular actions of angiotensin. *Biochem Pharmacol* 1981; 30: 2745-51.

Peraldi P, Filloux C, Emanuelli B, Milton DJ, van Obberghen E. Insulin induces suppression of cytokine signaling-3 tyrosine phosphorylation through Janus-activated kinase. *J Biol Chem* 2001; 276: 24614-20.

Pessin JE e Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 165-9.

Pezet A, Favre H, Kelly PA, Edery M. Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. *J Biol Chem* 1999; 274: 24497-502.

Pickup JC, Chusney GD, Thomas ST, Burt D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci* 2000; 67: 291-300.

Reagan LP, Ye X, Maretzki CH, Fluharty SJ. Down-regulation of angiotensin II receptor subtypes and desensitization of cyclic GMP production in neuroblastoma N1E-115 cells. *J Neurochem* 1993; 60: 24-31.

Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med* 1993; 44: 121-31.

Reaven G, Abbasi F, McLaughlin T. Obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. *Recent Prog Horm Res* 2004; 59: 207-223.

Regan TJ, Lyons MM, Ahmad SS, et al. Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1977; 60: 885-99.

Regitz-Zagrosek V, Auch-Schwelk W, Neuss M, Fleck E. Regulation of the angiotensin receptor subtypes in cell cultures, animal models and human diseases. *Eur Heart J* 1994; 15: 92-7.

Regitz-Zagrosek V, Friedel N, Heymann A, Bauer P, Neuss M, Rolfs A, et al. Regulation, chamber localization, and subtype distribution of angiotensin II receptors in human hearts. *Circulation* 1995a; 91: 1461-71.

Regitz-Zagrosek V, Neuss M, Fleck E. Effects of angiotensin receptor antagonists in heart failure: clinical and experimental aspects. *Eur Heart J* 1995b; 16: 86-91.

Ribon V e Saltiel AR. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 1997; 324: 839-45.

Ribon V, Herrera R, Kay BK, Saltiel AR. A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain- containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions. *J Biol Chem* 1998; 273: 4073-80.

Ricort JM, Tanti JF, van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y. Alterations in insulin signalling pathway induced by prolonged insulin treatment of 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* 1995; 38: 1148-56.

Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. SOCS-1 and SOCs-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS-1 and IRS-1. *J Biol Chem* 2002; 277: 42394-8.

Saad MJ, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest* 1992; 90: 1839-49.

Saad MJ, Folli F, Khan 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: 2065-72.

Saad MJ, Velloso LA, Carvalho CR. Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. *Biochem J* 1995; 310: 741-4.

Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso, LA. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem* 1996; 271: 22100-4.

Sadoshima J e Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 1993; 73: 413-23.

Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S. Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G-protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca^{2+} -dependent signaling. *Circ Res* 1995; 76: 1-15.

Sadoshima J e Izumo S. The heterotrimeric G_q protein-coupled angiotensin II receptor activates p21 ras via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes. *Embo J* 1996; 15: 775-87.

Sadowski CL, Choi TS, Le M, Wheeler TT, Wang LH, Sadowski HB. Insulin induction of SOCS-2 and SOCs-3 mRNA expression in C2C12 skeletal muscle cells is mediated by STAT5a. *J Biol Chem* 2001; 276: 20703-10.

Saltiel AR e Kahn CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414: 799-806.

Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 2001; 104: 517-29.

Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura A. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem* 2000; 275: 29338-47.

Sawka-Verhelle D, Filloux C, Tartare-Deckert S, Mothe I, van Obberghen E. Identification of Stat 5B as a substrate of the insulin receptor. *Eur J Biochem* 1997; 250: 411-7.

Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, Decaux JF, Girard J, van Obberghen E. Stat5B, activated by insulin in a Jak-independent fashion, plays a role in glucokinase gene transcription. *Endocrinology* 2000; 141: 1977-88.

Scheen AJ. Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the rennin-angiotensin system. *Drugs* 2004; 64: 2537-65.

Schindler C e Darnell Jr JE. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 621– 51.

Schmitz-Peiffer C e Whitehead JP. IRS-1 regulation in health and disease. *IUBMB Life* 2003; 55: 367-74.

Schunkert H, Sadoshima J, Cornelius T, Kagaya Y, Weinberg EO, Izumo S, et al. Angiotensin II-induced growth responses in isolated adult rat hearts. Evidence for load-independent induction of cardiac protein synthesis by angiotensin II. *Circ Res* 1995; 76: 489-97.

Sechi LA, Griffin CA, Grady EF, Kalinyak JE, Schambelan M. Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. *Circ Res* 1992; 71: 1482-9.

Sengupta TK, Schmitt EM, Ivashkiv LB. Inhibition of cytokines and JAK-STAT activation by distinct signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9499-504.

Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. Deffects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J* 2001; 15: 2099-111.

Shanmugam S e Sandberg K. Ontogeny of angiotensin II receptors. *Cell Biol Int* 1996; 20: 169-76.

Shepherd PR, Nave BT, Siddle K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J* 1995; 305: 25-8.

Shi H, Tzameli I, Bjorbaek C, Flier JS. Suppressor of cytokine signaling 3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signaling. *J Biol Chem* 2004; 279: 34733-40.

Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance in humans. *Am J Cardiol* 1999; 84: 3J-10J.

- Shulman GI. Cellular mechanism of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 171-6.
- Siewert E, Muller-Esterl W, Starr R, Heinrich PC, Schaper F. Different protein turnover of interleukin-6-type cytokine signalling components. *Eur J Biochem* 1999; 265: 251-7.
- Silverberg AB, Shah SD, Haymond MW, Cryer PE. Norepinephrine: hormone and neurotransmitter in man. *Am J Physiol* 1978; 234: E252-E6.
- Sims EAH, Danford E, Horton ES, Bray GA, Glennon JA, Salans LB. Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man. *Recent Hormone Res* 1973; 29: 457-96.
- Siragy HM. The role of the AT₂ receptor in hypertension. *Am J Hypertens* 2000; 13: 62S-7S.
- Somwar R, Koterski S, Sweeney G, Sciotti R, Djuric S, Berg C, et al. A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 2002; 277: 50386-95.
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJL, Rayner JR, Jenkins BJ, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997; 387: 917-21.
- Starr R, Metcalf D, Elefanti AG, Brysha M, Willson TA, Nicola NA, et al. Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14395-9.
- Starr R e Hilton DJ. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays* 1999; 21: 47-52.
- Stone PH, Muller JE, Hartwell T, et al. The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular to the adverse prognosis. *J Am Coll Cardiol* 1989; 14: 49-57.
- Strous GJ, Van Kerkhof P, Govers R, Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor. *EMBO J* 1996; 15: 3806-12.

Sugden PH. Signaling in myocardial hypertrophy: life after calcineurin? *Circ Res* 1999; 84: 633-46.

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991; 352: 73-7.

Sun XJ, Goldberg JL, Qiao LY, Mitchell JJ. Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteosome degradation pathway. *Diabetes* 1999; 48: 1359-64.

Suzuki R, Sakamoto H, Yasukawa H, Masuhara M, Wakioka T, Sasaki A, et al. CIS3 and JAB have different regulatory roles in interleukin-6 mediated differentiation and STAT3 activation in M1 leukemia cells. *Oncogene* 1998; 17: 2271-8.

Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999; 79: 215-62.

Takayama S, White MF, Lauris V, Kahn CR. Phorbol esters modulate insulin receptor phosphorylation and insulin action hepatoma cells *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 7797-801.

Takayama S, White MF, Kahn CR. Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 1988; 263: 3440-77.

Tambascia RC, Fonseca PM, Corat PD, Moreno Jr H, Saad MJ, Franchini KG. Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II-infused rats. *Hypertension* 2001; 37: 1423-8.

Tauchi T, Feng GS, Shen R, Hoatlin M, Bagby Jr GC, Kabat D, et al. Involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp in erythropoietin receptor signal transduction pathways. *J Biol Chem* 1995; 270: 5631-5.

Taylor SI, Samuels B, Roth J, Kasuga M, Hedo JA, Gorden P, et al. Decreased insulin binding in cultured lymphocytes from two patients with extreme insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 919-30.

Thomas WG, Thekkumkara TJ, Baker KM. Cardiac effects of AII. AT1A receptor signaling, desensitization, and internalization. *Adv Exp Med Biol* 1996; 396: 59 –69.

Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 55-62.

Tollet-Egnell P, Flores-Morales A, Stavreus-Evers A, Sahlin L, Norstedt G. Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology* 1999; 140: 3693-704.

Torsoni MA, Carvalheira JB, Calegari VC, Bezerra RM, Saad MJ, Gontijo JA, et al. Angiotensin II (AngII) induces the expression of suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 in rat hypothalamus – a mechanism for desensitization of Ang II signaling. *J Endocrinol* 2004; 181: 117-28.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4.

Uchida T, Matozaki T, Noguchi T, Yamao T, Horita K, Suzuki T, et al. Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains. *J Biol Chem* 1994; 269: 12220-8.

Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 2004a; 24: 5434-46.

Ueki K, Kondo T, Tseng YH, Kahn CR. Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004b; 101: 10422-7.

Ueki K, Kadowaki T, Kahn CR. Role of suppressors of cytokine signaling SOCS-1 and SOCS-3 in hepatic steatosis and the metabolic syndrome. *Hepatology Research* 2005; 33: 185-92.

Ullian ME e Linas SL. Role of receptor cycling in the regulation of angiotensin II surface receptor number and angiotensin II uptake in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 84: 840-6.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 1997; 389: 610-4.

Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 12490-5.

Velloso LA, Carvalho CR, Rojas FA, Folli F, Saad MJ. Insulin signalling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway. *Cardiovasc Res* 1998; 40: 96-102.

Venema RC, Venema VJ, Eaton DC, Marrero MB. Angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of signal transducers and activators of transcriptin 1 is regulated by Janus-activated Kinase 2 and Fyn Kinases and mitogen-activated protein Kinase phosphatase1. *J Biol Chem* 1998; 273: 30785-800.

Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 1999; 103: 931-43.

Vogel W, Lammers R, Huang J, Ullrich A. Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science* 1993; 259:1611-4.

Walsh MP, Kargacin GJ, Kendrick-Jones J, Lincoln TM. Intracellular mechanisms involved in the regulation of vascular smooth muscle tone. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73: 565-73.

Wang CG, Goalstone ML, Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistence that impact cardiovascular Biology. *Diabetes* 2004; 53: 2735-40.

Weber KT e Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 1991; 83: 1849-65.

Welham MJ, Dechert U, Leslie KB, Jirik F, Schrader JW. Interleukin (IL)-3 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, but not IL-4, induce tyrosine phosphorylation, activation, and association of SHPTP2 with Grb2 and phosphatidylinositol 3'-kinase. *J Biol Chem* 1994; 269: 23764-8.

White MF e Kahn CR. The insulin signaling system. *J. Biol. Chem* 1994; 269: 1-4.

White MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 1998; 182: 3-11.

White MF e Myers MG in Endocrinology (DeGroot, L. J., and Jameson J. L., eds) W. B. Saunders Co., Philadelphia; 2001.

Wilden PA, Siddle K, Haring E, Backer JM, White MF, Kahn CR. The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities: analysis with insulin and anti-receptor antibodies. *J Biol Chem* 1992; 267: 13719-27.

Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet* 1999; 23: 32-40.

Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *Embo J* 1999; 18: 1309-20.

Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 143-64.

Yenush L e White MF. The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. *Bioessays* 1997; 19: 491-500.

Yin T, Shen R, Feng GS, Yang YC. Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1997; 272: 1032-7.

You M, Yu DH, Feng GS. Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated JAK/STAT pathway. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2416-24.

Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Menard L, Caron MG. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* 1996; 271: 18302-5.

Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Simpson RJ, et al. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2071-6.



APÊNDICES

a) Materiais

1. Anticorpos e Reagentes

Foram utilizados anticorpos policlonais contra os receptores AT1 e IR e também contra AKT, fosfo-AKT (pAKT), JAK2, IRS-1, IRS-2, SOCS3, SOCS1, fosfo-STAT1 (pSTAT1), fosfo-serina (pSer), GLUT4 e *c-jun* e anticorpos monoclonais contra fosfo-tirosina (pY)(4G10). Além disso, utilizaram-se anticorpos conjugados com fluoresceína (FITC), faloidina e rodamina, os quais foram utilizados para imunofluorescência. Todos os anticorpos foram obtidos da empresa Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA), com exceção dos seguintes anticorpos: anti-pSer que foi obtida da Chemicon Inc. (Temecula, CA, USA), anti-p85 que foi obtido da Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY), anti-Akt-Ser473 e anti-pAkt-Ser473 que foram obtidos da Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Losartan foi obtido da Merck Pharmaceutical Co. (Wilmington, DE, USA). Reagentes para determinação das proteínas totais (Biureto), SDS/PAGE e *immunoblotting* foram obtidos da Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Proteína A-Sepharose 6MB e Percoll (densidade 1.131 g/ml) foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). 125 I-Protein A e membranas de nitrocelulose foram obtidas da Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, UK). Reagente Trizol, bem como produtos utilizados em RT-PCR e PCR, *primers* para SOCS3 e β -actina, oligodeoxinucleotídeos fosfotiolados modificados sense e antisense contra SOCS3, *Scrambled*, Lipofectamina Plus, meio de cultura (DMEM), soro fetal bovino (SFB) e soro de cavalo (HS) foram obtidos da Life Technology (Grand Island, NY, USA). Anestésico tiopental sódico foi obtido da empresa Cristália (Itapira, SP, Brasil). Insulina foi obtida da Eli Lilly & Co. (Indianapolis, IN, USA). Fosfatidilinositol foi obtido da empresa Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Colagenase fração IV foi obtida da empresa Worthington. PMSF, aprotinina, ditiótreitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, glicerol, angiotensina II, soro de albumina bovina (BSA-fração V), pancreatina e demais reagentes utilizados foram obtidos da empresa Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO, USA).

Quadro 1- Primers para β -actina e SOCS3 utilizados em experimentos de PCR semiquantitativo.

Primers	Sequência	Produto (pb)
β -actina	s- 5' - TTT GGG AGG GTG AGG GAC TTC 3'	
	as- 5' - TGA GCG CAA GTA CTC TGT GTG G 3'	489
	(Life Technologies, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)	
SOCS3	s- 5'- ACC TCT CTC CTC CAA CG - 3'	
	as- 5'- TGC TGG GCT AAC TGG - 3'	251
	(Life Technologies, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)	

s – iniciador sense

as – iniciador antisense

Quadro 2- Oligonucleotídeos fosfotiolatos modificados sense e antisense contra SOCS3 e Scramble.

Oligonucleotídeo	Seqüência
SOCS3	s- 5'- CATGGTCACCCACAG - 3'
	as- 5'- CTGTGGGTGACCATG - 3'
SCRAMBLE	5'- GCTAGCGATGTCTGG-3'
	(Life Technologies, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)

s – iniciador sense

as – iniciador antisense

2. Animais

Para o presente estudo foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem *Wistar-Hannover* provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 150 e 200 gramas. Os animais foram acomodados em gaiolas coletivas, em número máximo de 5 animais por unidade, mantidas em ambiente silencioso, com temperatura controlada, em ciclos de 12 horas de período diurno (das 07:00 às 19:00 horas) e 12 horas de período noturno (das 19:00 às 07:00 horas) mantidos artificialmente. Receberam água e ração Purina

(contendo 2,3 mg de sódio por grama de ração) “*ad libitum*”. Todas as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa Animal foram seguidas.

Os animais foram mantidos em jejum por 8 horas antes dos experimentos para extração do coração, recebendo água “*ad libitum*”. Em seguida, vários estudos foram realizados e diversas técnicas de biologia molecular foram empregadas, como *Western blot*, imunohistoquímica (imunofluorescência), ensaio enzimático, RT-PCR e fracionamento subcelular.

No presente estudo também foram utilizados ratos neonatos da linhagem *Wistar* provenientes do CEMIB da UNICAMP, com 1 a 3 dias de vida, para obtenção de cardiomiócitos. Estes permaneceram juntamente com a mãe no CEMIB até o dia do experimento.

3. Soluções utilizadas nos experimentos

❖ Soluções empregadas em *Western blot*:

Tampão de extração: utilizado para homogeneização do tecido cardíaco e extração de proteínas. Composta de: 100 mM Trisma base, pH 7,5, 10 mM EDTA, 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM NaF, 10 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF diluído em álcool etílico, 1% Triton X-100 e 0,1 mg/ml aprotinina. Esta solução foi preparada e mantida no gelo durante todo o experimento. Na₃VO₄ e PMSF foram acrescentados ao tampão somente no momento de uso.

Tampão de Laemmli (5x): utilizado para armazenar, em freezer, as proteínas extraídas e sua posterior aplicação em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para eletroforese. Composto de: 0,1 % azul de bromofenol, 1 M fosfato de sódio, pH 7,0, 50% glicerol e 10% SDS.

Tampão para lavagem do imunoprecipitado: utilizado para lavagem das amostras após incubação com proteína A-sepharose 6 MB. Composto de: 100 mM Trisma base, 10 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄ e 0,5% Triton X-100. Esta solução foi preparada e mantida no gelo durante todo o processo de lavagem das amostras.

Tampão para SDS-PAGE, gel da fase de resolução “Resolving”: utilizado para confecção do gel de resolução. Composto de: 4 mM EDTA, 2% SDS e 750 mM Trisma base, pH 8,9 (ajustado com HCl).

Tampão para SDS-PAGE, gel da fase de empilhamento “Stacking”: utilizado para confecção do gel onde ocorre o empilhamento das proteínas. Composto de: 4 mM EDTA, 2% SDS e 50 mM Trisma base, pH 6,7 (ajustado com ácido fosfórico).

Tampão para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): utilizado na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Composto de: 200 mM Trisma base, 1,52 M glicina, 7,18 M EDTA e 0,4% SDS. Para uso, a solução foi diluída 1:4.

Tampão para transferência: utilizado na transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Composto de: 25 mM Trisma base, 192 mM glicina, 20% Metanol e 0,02% SDS para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Mantido à 4°C.

Solução basal: utilizada no manuseio da membrana de nitrocelulose após a transferência. Composta de: 150 mM NaCl, 10 mM Trisma base e 0,02% Tween 20.

Solução bloqueadora: utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose após a transferência a fim de diminuir ligações inespecíficas. Composta de: 5% BSA dissolvido em solução basal.

Solução de anticorpo: solução contendo anticorpos específicos para marcação de proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Composta de: 3% BSA dissolvido em solução basal mais os anticorpos na diluição estabelecida.

Solução de Iodo (¹²⁵I): solução que permite a visualização das bandas de proteínas em autoradiografia. Composta de: 1% BSA dissolvido em solução basal mais 2 µCi de proteína A marcada com ¹²⁵I.

Tampão de Stripping: utilizado para remover anticorpos secundários da membrana de nitrocelulose. Composto de: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 M β-mercaptoetanol, uréia, 0,1 mg/ml BSA.

❖ Soluções empregadas em Fracionamento subcelular:

Tampão STE para fracionamento subcelular: utilizado para separação das frações celulares (núcleo, membrana e citosol). Composto de: 0,32 M sacarose, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM NaF, 100 mM Pirofosfato de sódio, 100 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF e 0,1 mg/ml aprotinina.

Tampão T para fracionamento subcelular: utilizado na purificação da fração nuclear. Composto de: 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM EDTA, 10 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 100 mM NaF, 100 mM pirofosfato de sódio e 0,1 mg/ml aprotinina.

❖ Soluções empregadas em imunohistoquímica:

Paraformaldeído 4 %: empregado na fixação de ventrículos cardíacos. Composto de: 4 % paraformaldeído, 0,2 M tampão fosfato, pH 7,4, água desionizada, pH 7,4 (ajustado com NaOH).

Tampão fosfato salina (PBS) 0,1 M, pH 7,4: utilizado em experimentos de imunohistoquímica. Composto de: 0,2 M fosfato de sódio dibásico acrescido de 0,2 M fosfato de sódio monobásico até atingir pH 7,4. Diluída em 0,3 M NaCl (V:V).

Tampão paraformaldeído 4% mais sacarose 4%: utilizado na fixação de cardiomiócitos em cultura (CVIN). Composto de: 4 % paraformaldeído, 4 % sacarose, 0,2 M tampão fosfato, pH 7,4, água desionizada, pH 7,4 (ajustado com NaOH).

Solução bloqueadora para imunofluorescência A: utilizada no bloqueio de ligações inespecíficas. Composta de: 8% glicina, 2,5 % BSA, 2 % leite em pó desnatado, 4 ml PBS 0,1 M, pH 7,4.

Solução bloqueadora para imunofluorescência B: utilizada no bloqueio de ligações inespecíficas. Composta de: 3% leite em pó desnatado diluído em PBS 0,1 M, pH 7,4.

Solução de anticorpo: solução contendo anticorpos específicos para marcação de proteínas Composta de: 1% BSA diluída em PBS 0,1M, pH 7,4, à qual se adiciona o anticorpo na diluição específica.

❖ Soluções empregadas em RT-PCR e PCR:

Solução para Reação de transcrição reversa (RT-PCR): utilizada para obtenção da fita simples do DNA (cDNA). Composta de: 5x tampão RT (transcriptase reversa), 10 mM dNTP, 50 mM oligo-dT, 40 U/ μ l inibidor RNase Out, 200 U/ μ l enzima SuperScript (transcriptase reversa), 7 μ g RNA total e água DEPC para um volume final de 30 μ l.

Solução para Reação de amplificação: utilizada em PCR. Composta de: tampão 10 x, 1 mM dNTP, 50 mM MgCl₂, iniciador (*primer*) sense e antisense para SOCS3, iniciador (*primer*) sense e anti-sense para β -actina (controle interno), *taq polimerase*, cDNA e água DEPC, para um volume final de 25 μ l.

❖ Soluções empregadas no ensaio da atividade enzimática da PI 3-K:

Tampão PI 3-K: utilizado para homogeneização de tecido cardíaco e extração de proteínas. Composto de: 50 mM HEPES (pH 7,1), 137 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 2 mM Na₃VO₄, 100 mM Pirofosfato de sódio, 100 mM NaF, 2 mM EDTA, 172 mM PMSF, 0,1 mg/ml aprotinina, 10 mM Benzamidina, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40. Esta solução foi preparada e mantida no gelo durante todo o experimento.

Tampão para lavagem do imunoprecipitado: utilizado para lavagem das amostras após incubação com proteína A 6 MB. Composto de: tampão PBS pH 7,4, contendo 1% Triton X-100 e 100 μ M Na₃VO₄. Esta solução foi preparada e mantida no gelo durante todo o processo de lavagem das amostras.

Tampão para ressuspensão: utilizado para ressuspender o imunoprecipitado. Composto de: 10 mM Tris, 100 mM CaCl₂, 1 MM EDTA e 10 μ l fosfatidilinositol. Esta solução foi preparada e mantida no gelo durante todo o processo de lavagem das amostras.

❖ Soluções empregadas em cultura de cardiomiócitos ventriculares isolados de neonatos (CVIN):

Tampão ADS 10X: utilizado na lavagem do tecido cardíaco. Composto de: 6,8 g NaCl, 4,76 g Hepes, 0,138 g NaH₄PO₄, 1,0 g D-glucose, 0,4 g KCl, 0,195 g MgSO₄ * 7 H₂O e água Milliq para um volume final de 100 ml. Após o preparo, foi filtrado em filtros 0,22 µm e mantido em ambiente refrigerado (4°C). Antes do uso, foi aquecido em estufa à 37 °C.

Tampão ADS IX: utilizado no preparo do gradiente de Percoll. Composto de: solução tampão ADS 10X e água Milliq (9:1). Após o preparo, foi filtrado em filtros 0,22 µm e mantido em ambiente refrigerado (4°C). Antes do uso, foi aquecido em estufa à 37 °C.

Tampão ADS IX red: utilizado no preparo do gradiente de Percoll. Composto de: solução tampão ADS 10X e água Milliq (9:1), mais 0,02 g vermelho de fenol. Após o preparo, foi filtrado em filtros 0,22 µm e mantido em ambiente refrigerado (4°C). Antes do uso, foi aquecido em estufa à 37 °C.

Tampão de digestão: utilizado na digestão enzimática do tecido cardíaco. Composto de: tampão ADS 10X, 80 unidades/ml colagenase tipo II e 0,6 mg/ml pancreatina. Este tampão foi preparado no momento do uso, filtrado em filtros 0,22 µm e mantido em estufa à 37°C.

Gradiente de densidade de Percoll: utilizado na separação de cardiomiócitos de não-cardiomiócitos. Composto de: Percoll e solução tampão ADS 10X (9:1) (solução estoque). Este gradiente consiste de duas fases: *TOP* (composta de 4,5 ml solução estoque mais 5,5 ml tampão ADS 1X) e *BOTTOM* (composta de 5,5 ml solução estoque mais 2,9 ml tampão ADS 1X red). Adicionou-se 4 ml da fase *TOP* a um tubo e, no fundo deste, 4 ml da fase *BOTTOM*, vagarosamente, a fim de que este deslocasse o primeiro. Em seguida, adicionou-se a solução contendo as células (CVIN), cuidadosamente, sobre o *TOP*. O tubo foi levado à centrifugação à 3000 rpm, 30 minutos, 37 °C. A banda de cardiomiócitos que se localiza pouco acima da fase *BOTTOM* foi retirada cuidadosamente.

Gelatina 0,1%: utilizada para aderência das células às placas de cultura ou então, às lamínulas. Composta de: 0,1 g gelatina diluída em 100 ml água Milliq. Após o preparo, a gelatina foi submetida à filtração em filtros de 0,22 µm e colocada no interior de placas de cultura a fim de formar uma fina película. O excesso foi retirado com pipeta.

DMEM: utilizado como meio de cultura para diversos fins. Composto de: 1,16 g bicarbonato de sódio, 1 pacote DMEM e 1000 ml água Milliq. Após agitação por 60 minutos, o meio foi filtrado, testado em estufa à 37º C por 24 horas e então, armazenado em ambiente refrigerado (4 ºC). No momento do uso, foi aquecido e mantido em estufa à 37 ºC.

Meio para plaqueamento (Platting Media): utilizado no plaqueamento e aderência dos CVIN. Composto de: DMEM, 5% SFB, 10% HS, 0,01% BrDU e 100 U/ml penicilina-estreptomicina. O meio foi preparado no momento do uso, aquecido em estufa à 37 ºC e então, adicionado às placas de cultura já pré-cobertas com gelatina.

Meio de Manutenção (Maintenance Media): utilizado na manutenção dos CVIN aderidos à placa de cultura. Composto de: DMEM, 0,5% penicilina-estreptomicina e 0,01% BrDU. O meio foi preparado no momento do uso, aquecido em estufa à 37 ºC e então colocado, cuidadosamente, sobre os CVIN.

b) Métodos

1. Procedimentos cirúrgicos (ratos Wistar adultos - RWA)

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (5 mg/100 g de peso, i.p.) e usados após 10-15 minutos, assim que a anestesia foi confirmada pela perda de reflexos corneanos. À seguir, a cavidade abdominal foi aberta para exposição da veia cava inferior, através da qual receberam 0,02 ml de salina 0,9%, ANGII 10^{-6} M ou 10^{-8} M e/ou insulina 10^{-6} M previamente diluídas em salina. Para experimentos de dose-resposta, os animais receberam ANGII em doses que variavam entre 10^{-12} e 10^{-4} M previamente diluídas em salina. Em alguns experimentos, o bloqueio da sinalização da ANGII foi obtido através do pré-tratamento com Losartan (10 mg/kg rato, i.p.) Em alguns experimentos, os animais receberam oligonucleotídeo fosfotiolato modificado sense (S) e antisense (AS) contra

SOCS3 ou *Scrambled* (6 nmol, i.p.), conforme descrito no item 2. Após períodos de tempo pré-determinados, a cavidade torácica foi aberta para retirada dos ventrículos, os quais foram lavados em tampão de extração a fim de se remover todo o excesso de sangue.

2. Tratamento dos animais adultos com Oligonucleotídeos

Os animais receberam, i.p., 3 horas antes do início dos experimentos, 6 nmol de oligonucleotídeo fosfotiolato S SOCS3 ou AS SOCS3, a fim de se avaliar a expressão desta proteína e de elementos participantes da via de sinalização da ANGII (JAK2, STAT1, c-jun e SOCS3) e da insulina (IR, JAK2, IRS-1, IRS-2, PI 3-k, AKT e GLUT4). Em alguns casos, receberam oligonucleotídeo *Scrambled*, da mesma maneira descrito acima, a fim de se testar a eficiência dos oligonucleotídeos S e AS SOCS3. Decorrido o tempo estabelecido, os animais foram anestesiados e tratados conforme descrito no item 1.

3. Isolamento de cardiomiócitos (CVIN)

Cardiomiócitos ventriculares provenientes de ratos *Wistar* neonatos de 1 a 3 dias de vida, foram submetidos a digestão enzimática conforme descrito por Kim e colaboradores (1995b). Os neonatos tiveram seu coração extraído do tórax e os ventrículos foram separados dos átrios, reduzidos a tamanhos pequenos com o auxílio de pinça e tesoura estéreis e transferidos para uma placa contendo solução tampão ADS 10X estéril. O tecido foi então submetido à múltiplas digestões enzimáticas (5 a 6 digestões de 20 minutos cada) à 37 °C usando-se para isso uma mistura de colagenase tipo II (80 Mandl U/ml) e pancreatina (0,6 mg/ml) (tampão de digestão). A solução obtida em cada digestão foi transferida para um tubo contendo 1,0 ml de soro fetal bovino (SFB), centrifugada (3000 rpm, 5 minutos, 37° C) e os *pellets* resultantes foram ressuspensos em 1,0 ml de SFB, colocados sobre uma placa de cultura e mantidos em uma atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂, à 37° C até o final da digestão do restante do tecido. A fim de se separar os cardiomiócitos dos não-cardiomiócitos, a suspensão celular foi submetida ao gradiente de densidade de Percoll. Após retirada da banda de cardiomiócitos, estes foram submetidos à lavagem com solução tampão ADS 10X para remoção do excesso de Percoll (3000 rpm, 5 minutos, 37 °C). O *pellet* resultante foi ressuspensos, delicadamente, em meio de

plaqueamento. Em seguida, após contagem das células viáveis coradas com Azul de Tripan, os cardiomiócitos foram plaqueados em uma densidade de 5×10^4 células/cm² em placas pré-cobertas com gelatina 0,1% e com meio de plaqueamento para um volume final de 5 ml e mantidos em uma atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂. A fim de se investigar a localização *in situ* de proteínas alvo do estudo através de imunofluorescência, lamínulas foram previamente colocadas no interior das placas de cultura e então, pré-cobertas com gelatina 0,1%. Após 48 horas, o meio foi trocado por meio de manutenção e os cardiomiócitos foram então incubados por um período de 24-48 horas antes do início de seu tratamento com ANGII 10^{-7} M ou 10^{-10} e/ou insulina 10^{-8} M, concomitantemente ou não com Losartan 10^{-5} M, ou com oligonucleotídeos S ou AS SOCS3 (1 µm). Decorrido o período pré-estabelecido de tratamento, os cardiomiócitos foram lavados 2 vezes com PBS e removidos da placa com *cell scraper* (“rodo”) em tampão de extração para posterior imunoprecipitação (item 6) ou então, sujeitos à fixação com paraformaldeído mais sacarose para experimentos posteriores de imunofluorescência (item 11.3).

A pureza dos cardiomiócitos foi avaliada através de imunofluorescência, usando-se para isso o marcador TRITC-faloidina. As preparações foram montadas e observadas em um microscópio confocal.

4. Incorporação do Oligonucleotídeo em cardiomiócitos isolados em cultura

As células plaqueadas (CVIN) conforme descrito no item 3, foram lavadas e mantidas em meio de manutenção por 3 horas antes do tratamento com o oligonucleotídeo. Após, foram tratadas com o oligonucleotídeo S ou AS SOCS3 ou *Scrambled* (1 µm). O reagente LipofectAMINE Plus (10 µg/ml) foi usado como veículo de transfecção. Após 8 horas, o meio foi trocado por meio DMEM suplementado com 20% de SFB e incubado *overnight*. Em seguida, as células receberam meio DMEM livre de soro por 4 horas antes de se iniciar o tratamento. As células foram então tratadas conforme descrito no item 3.

5. Homogeneização e Determinação do conteúdo de proteínas totais (Biureto)

O material extraído conforme descrito nos itens 1 e 3 foi submetido a homogeneização em tampão de extração, à 4 °C, utilizando-se para isso um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os fragmentos celulares foram então centrifugados (15.500 x g, 20 minutos, 4 °C) para remoção do material insolúvel e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Parte deste foi utilizado para determinação do conteúdo das proteínas totais através do método fotocolorimétrico de Biureto (BRADFORD, 1976), enquanto que a outra parte foi submetida à imunoprecipitação (item 6) e *immunoblotting* (item 7) com anticorpos específicos.

6. Imunoprecipitação

Após determinação do conteúdo de proteínas totais, o sobrenadante foi utilizado para imunoprecipitação *overnight*, à 4 °C, com anticorpos específicos. O imunoprecipitado foi separado após incubação com proteína A-Sepharose 6 MB por 2 horas à 4 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (15.500 x g, 20 minutos, 4 °C) e submetidas à lavagem com tampão de lavagem por 3 vezes de 5 minutos cada (15.500 x g, 4 °C). As proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) contendo 100 mmol/l de DTT e aquecidas em água fervente por 5-10 minutos. À seguir, quantidades iguais de proteína (5 mg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD *miniature slab gel apparatus* (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 120 V em períodos de tempo variáveis em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD, como descrito (TOWBIN *et al.*, 1979). A ligação dos anticorpos à proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 120 minutos com tampão de bloqueio à temperatura ambiente (TA). A membrana de nitrocelulose foi incubada *overnight* com anticorpos específicos diluídos em solução para anticorpo, e então, lavada por 15 minutos com solução basal. Após, a membrana foi incubada com 5 µCi de [¹²⁵I] Proteína A (30 µCi/µg) em solução de iodo por 120 minutos à TA e lavada novamente por 15 minutos, como descrito anteriormente. A

proteína A [^{125}I] ligada aos anticorpos específicos foi detectada e quantificada por autoradiografia em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Para isso, o cassete contendo a membrana e o filme foi mantido à temperatura de - 80 °C e, após 12 - 120 horas, o filme foi revelado de maneira convencional. As bandas identificadas na autoradiografia foram quantificadas nas suas áreas utilizando-se densitometria óptica. Para tal, foi utilizado um scanner de mesa ColorPage HR6X (Genius) e o programa *Scion Image* (*Scioncorp*).

7. Immunoblotting

Após a determinação do conteúdo de proteínas totais, ao sobrenadante foi acrescentado tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) contendo 100 mM de DTT, e então aquecido por 5-10 minutos. Em seguida, quantidades iguais de proteínas (200 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE conforme descrito anteriormente (item 6).

8. Fracionamento subcelular

O material extraído conforme descrito no ítem 1, foi submetido a homogeneização em tampão STE à 4 °C , utilizando-se para isso um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operado em velocidade máxima por 30 segundos. À seguir, essas amostras foram submetidas à centrifugação (1.000 x g, 25 minutos, 4 °C) a fim de se obter a separação das frações.

O *pellet* resultante, correspondente à fração nuclear, foi ressuspensido em tampão T, mantido em gelo por 30 minutos, centrifugado (15.000 x g, 30 minutos, 4 °C) e o sobrenadante retirado e armazenado em gelo. Com isso, obteve-se a fração nuclear.

O sobrenadante resultante da primeira centrifugação foi retirado e ultracentrifugado (100.000 x g, 60 minutos, 4 °C) a fim de se obter a fração citosólica, a qual foi retirada e armazenada em gelo, enquanto que o *pellet*, foi ressuspensido em tampão STE mais 1% de Nonidet P-40, mantido em gelo por 20 minutos e ultracentrifugado (100.000 x g, 10 minutos, 4 °C), obtendo-se assim, a fração de membrana. Parte do

sobrenadante da fração nuclear, citosólica e de membrana foi submetido à determinação do conteúdo de proteínas totais pelo método fotocolorimétrico de Biureto (BRADFORD, 1976), enquanto que a outra parte foi submetida à imunoprecipitação e *immunoblotting* conforme descrito nos itens 6 e 7, respectivamente.

9. Stripping

Membranas já utilizadas em experimentos anteriores foram incubadas com solução de *stripping* em recipiente plástico fechado, à 60 °C (banho-maria), por 60 minutos. Esta solução foi descartada, sendo, a seguir, adicionada às membranas solução contendo 1 M Tris-HCl, pH 7,5, durante 30 minutos, à TA, sob agitação contínua. As membranas foram então lavadas com solução basal e incubadas com solução bloqueadora, solução para anticorpo e para iodo conforme descrito anteriormente no item 6.

10. PCR - semi quantitativo

10.1. Coleta de amostras

Amostras de tecido cardíaco (ventrículos) provenientes de ratos Wistar adultos, tratados conforme descrito no item 1, foram coletadas após o *time-course* pré-estabelecido em condições livres de RNases, nas quais todo o material cirúrgico e de armazenamento foi cuidadosamente lavado e esterilizado em estufa à 180 °C por 8 horas. Após a extração, as amostras foram lavadas em solução salina estéril para eliminar todo o excesso de sangue e então submersas em N₂ líquido para congelamento. Todo o material foi devidamente identificado e armazenado em freezer – 70 °C para posterior extração de RNA

10.2. Extração de RNA total

Sob condições estéreis e livres de RNases, as amostras foram utilizadas para extração do RNA total com reagente Trizol (GIBCO BRL).

Os ventrículos foram macerados em N₂ líquido e homogeneizados com Trizol (1 ml Trizol/50-100 mg de tecido). Após atingirem a temperatura ambiente, os homogenatos foram transferidos para tubos estéreis onde permaneceram à TA por 5 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado (12.000 x g, 10 minutos, 4 °C) e o sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionado 0,2 ml de clorofórmio/ml de Trizol, homogeneizado vigorosamente por 15 segundos e mantido por 3 minutos à TA, sendo à seguir centrifugado (12.000 x g, 15 minutos, 4 °C). O RNA encontrado na fase aquosa da solução contida no tubo foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 0,5 ml de álcool isopropil/ml de Trizol, homogeneizado e mantido à TA por 10 minutos para, em seguida, ser novamente centrifugado (12.000 x g, 10 minutos, 4 °C), a fim de que ocorresse a precipitação do RNA. O sobrenadante foi removido e, ao *pellet* contendo o RNA, foi adicionado 75 % etanol-DEPC (1 ml/ml de Trizol) e centrifugado (7.500 x g, 5 minutos, 4 °C). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet*, após seco, foi ressuspenso em água estéril, livre de RNase (H₂O DEPC), e armazenado em freezer – 70 °C.

A quantidade de RNA das amostras foi estimada por espectrofotometria a 260 nm (A260) e a 280 nm (A280) e a integridade do RNA isolado foi determinada pela razão A260:A280 e por eletroforese em gel de agarose com visualização em luz ultra violeta, usando brometo de etídeo como corante.

10.3. Obtenção do cDNA e reação de amplificação

Para sintetizar a fita simples do cDNA à partir do RNA total, realizou-se uma reação de transcrição reversa (RT-PCR). As condições para transcrição foram de 50 minutos à 42 °C e 15 minutos à 70 °C utilizando aparelho PTC –100 (MJ Research, Inc, Watertown, Mass). Todo o procedimento foi realizado sob condições estéreis e livres de RNases.

Como controle negativo de contaminação com DNA genômico, uma reação de RT-PCR foi realizada à semelhança das condições descritas acima, com exceção da enzima SuperScript utilizada na solução da reação, que foi substituída por água DEPC.

10.4. PCR semiquantitativo

Para estabelecer o ponto ótimo de amplificação na fase exponencial da curva de amplificação, amostras de cDNA do mesmo animal foram utilizadas para uma reação de amplificação, sendo utilizado tubos em duplicata que foram retirados da reação de amplificação a cada um ou dois ciclos, iniciando no ciclo 20 e terminando no ciclo 38.

As condições de amplificação foram de 94 °C/5 minutos (denaturação inicial), 94 °C/1 minuto (denaturação), 52 °C/50 segundos (anelamento dos primers), 72 °C/1 minuto (extensão) e 72 °C/7 minutos (extensão final).

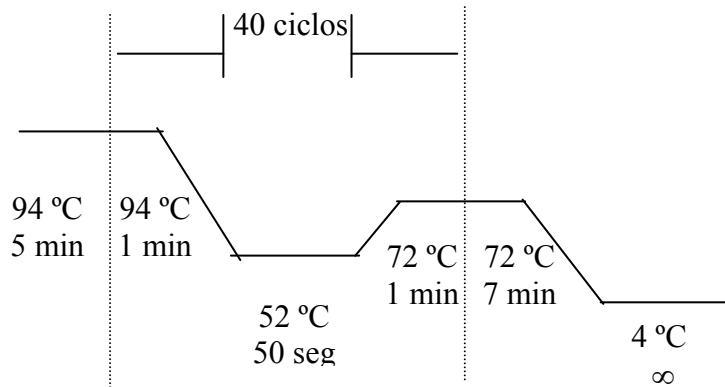


Figura 1- Esquema das condições de amplificação para os genes da β-actina e SOCS3

O produto final da reação de amplificação foi submetido à eletroforese em gel 1,5 % de agarose, corado posteriormente com brometo de etídeo e visualizado em luz ultra-violeta através do aparelho TFX 35M UV Transluminator (Life Technologies, Inc, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD).

Foram também submetidas à estas condições de PCR, amostras controle negativo da reação, onde um volume de água foi adicionado em substituição ao volume de cDNA utilizado na reação de amplificação, para se investigar contaminação dos materiais usados no preparo da reação e amostras controle negativo do RT-PCR.

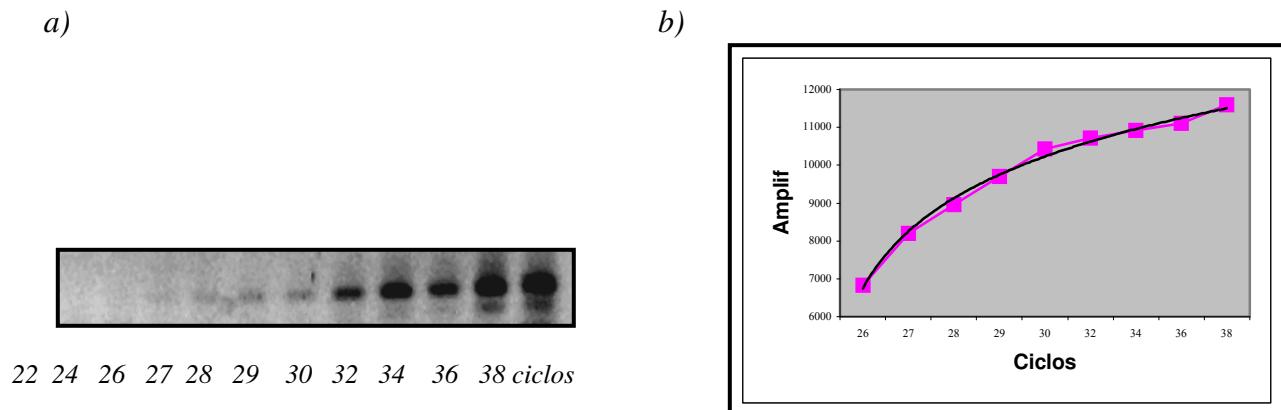


Figura 2- a) Gel de agarose 1,5%. Teste com número crescente de ciclos a fim de se estabelecer o ponto inicial de exponenciação da curva de amplificação dos primers sense e antisense para SOCS3; b) Curva da regressão linear feita pelo programa INSTAT a fim de se verificar o ponto inicial de exponenciação de amplificação do primer para SOCS3, considerado como ótimo para a realização do experimento.

Após analisar-se o gráfico, estabeleceu-se o ciclo 30 como ótimo para a amplificação do primer para SOCS3. Para β -actina, o ciclo usado foi o 23.

11. Imunohistoquímica (RWA)

11.1. Fixação e processamento do material (Parafina)

Após tratamento dos animais conforme descrito nos itens 1 e 2, os ventrículos cardíacos foram extraídos, lavados em salina 0,9 % estéril, a fim de se remover todo o excesso de sangue e mergulhados em solução de paraformaldeído 4 % por 12 horas, à TA.

O material foi então processado e incluído em parafina, conforme procedimento de rotina. As lâminas, previamente silanizadas, receberam cortes de 3 μm e foram armazenadas em estufa à 60 °C até o momento do uso. Estas lâminas foram utilizadas para reações de imunofluorescência.

11.1.1. Reação de Imunoperoxidase

Cortes histológicos de átrios e ventrículos, obtidos conforme descrito no item 11.1, foram diafanizados e hidratados e então submetidos à imunoperoxidase, com a utilização de anticorpo específico, conforme descrito à seguir.

Inicialmente, foram lavados em tampão PBS por 3 vezes (5 minutos cada lavagem) e permeabilizados com 0,1 % de Triton X-100 diluído em PBS 0,1 M, pH 7,4, durante 10 minutos, à TA. Após lavagem em PBS, conforme descrito anteriormente, foram incubados com solução bloqueadora da atividade da peroxidase endógena, permanecendo no escuro por 30 minutos, à TA. Novamente foram lavados em PBS por 3 vezes de 5 minutos cada e submetidos à solução bloqueadora para imunoperoxidase por 1 hora, à TA, a fim de se evitar a ligação de proteínas não-específicas. Os cortes foram então incubados com anticorpo primário (*anti-goat SOCS3*, diluição 1:20) em solução de anticorpo, em câmara umidecida e fechada, *overnight*, à 4 °C. Os cortes chamados de controle negativo receberam somente solução de anticorpo (sem adição de anticorpo). Após lavagem com PBS (3 vezes com intervalos de 5 minutos), os cortes foram incubados novamente com a solução de anticorpo contendo o anticorpo secundário específico biotinilado (*anti-goat biotinilado*, diluição 1:150), por 2 horas, à TA. Após lavagem com PBS, os cortes foram submetidas à incubação por 45 minutos com Estreptoavidina conjugada com peroxidase (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA). Foram novamente lavados e submetidos à solução reveladora (kit Vectashield, Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA) por 8 – 10 minutos, sendo à seguir, lavados com água destilada por 5 minutos. Realizou-se então, a contra-coloração com Hematoxilina de Harris por aproximadamente 30 segundos. Os cortes foram lavados com água destilada por 5 minutos e desidratados. As lâminas foram montadas utilizando-se o meio de montagem Entelan. A reação de peroxidase nas amostras foi detectada em microscópio óptico (Leica, Wetzlar, Alemanha) e as fotografias foram obtidas utilizando-se o sistema Focus Imagecorder Plus.

11.1.2. Reação de Imunofluorescência (Parafina)

Os cortes histológicos de átrios e ventrículos, obtidos conforme descrito no item 11.1, foram diafanizados e hidratados e então submetidos à imunofluorescência, com a utilização de anticorpo específico para SOCS3 e JAK2, conforme descrito à seguir.

Os cortes foram lavados em tampão PBS, por 3 vezes (5 minutos cada lavagem), permeabilizados com 0,1 % de Triton X-100 diluído em PBS 0,1 M, pH 7,4, durante 10 minutos, à TA, e novamente lavados em PBS conforme descrito anteriormente para, em seguida, serem incubados com solução bloqueadora para imunofluorescência A, por 60 minutos, à TA, a fim de se evitar ligações inespecíficas. Os cortes foram então incubados com o primeiro anticorpo primário (*anti-goat* SOCS3, diluição 1:20) em solução de anticorpo, em câmara úmida e fechada, *overnight*, à 4 °C. Os cortes chamados de controle negativo receberam somente solução de anticorpo (sem adição de anticorpo). Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados em solução de anticorpo contendo o segundo anticorpo primário (*anti-rabbit* JAK2, diluição 1:20) por 2 horas, à TA. À seguir, foram lavados e então, incubados com o primeiro anticorpo secundário conjugado com isotiocianato fluoresceína (*donkey anti-goat* FITC, diluição 1:150) em solução de anticorpo, por 2 horas à TA. Os cortes foram bem lavados com PBS, a fim de se remover todo o excesso deste anticorpo. Em seguida, foram incubados com o segundo anticorpo secundário conjugado com rodamina (*donkey anti-rabbit* R, diluição 1:150) em solução de anticorpo, por 2 horas à TA e lavados. As lâminas foram montadas utilizando-se o meio de montagem Vectashield. A especificidade dos anticorpos secundários foi testada através de cortes controle positivo e negativo. Na ausência dos anticorpos primários, a aplicação dos anticorpos secundários (controle negativo) não produziu qualquer marcação significativa. As imagens foram obtidas utilizando-se microscópio de fluorescência (Leica, Wetzlar, Alemanha) e as fotos foram obtidas através do sistema Focus Imagecorder Plus.

11.2. Fixação e processamento do material (Congelação)

Após tratamento dos animais conforme descrito nos itens 1 e 2, ventrículos cardíacos foram extraídos, lavados em salina 0,9 % estéril, a fim de se remover todo o excesso de sangue, mergulhados em Tissue-tec e congelados em nitrogênio líquido à -70 °C.

Lâminas, previamente silanizadas, receberam cortes de 5 µm e foram armazenadas em freezer -80 °C até o momento do uso. Estas lâminas foram utilizadas para reações de imunofluorescência.

11.2.1. Reação de Imunofluorescência (Congelação)

Os cortes histológicos de ventrículos, obtidos conforme descrito no item 11.2, foram fixados com acetona gelada por 10 minutos, lavados em tampão PBS 0,1 M, pH 7,4, por 3 vezes (5 minutos cada lavagem) e incubados com solução bloqueadora para imunofluorescência B, por 60 minutos, à TA, a fim de se evitar ligações inespecíficas. Os cortes foram então incubados com o anticorpo primário (*anti-goat* GLUT4, diluição 1:20) em solução de anticorpo, à 4 °C, overnight. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão PBS 0,1 M, pH 7,4, por 3 vezes (5 minutos cada lavagem) e incubados com anticorpo secundário conjugado com isotiocianato fluoresceína (*donkey anti-goat* FITC, diluição 1:150) em solução de anticorpo, por 2 horas, no escuro, à TA. Os cortes foram bem lavados com PBS 0,1 M, pH 7,4, a fim de se remover todo o excesso deste anticorpo. Em seguida, foram incubados com o segundo anticorpo secundário conjugado com rodamina (*donkey anti-rabbit* R, diluição 1:500) em solução de anticorpo, por 45 minutos, no escuro, à TA e lavados por três vezes com PBS 0,1 M, pH 7,4. As lâminas foram montadas utilizando-se o meio de montagem Vectashield. A especificidade dos anticorpos secundários foi testada através de cortes controle positivo e negativo. Na ausência do anticorpo primário, a aplicação dos anticorpos secundários (controle negativo) não produziu qualquer marcação significativa. As imagens foram obtidas através de microscópio confocal a laser (LSM510, Zeiss, New York, NY).

11.3. Fixação e processamento do material (CVIN)

Para a realização desta técnica foram utilizadas somente as placas em cujo interior havia sido colocada uma lamínula, pré-coberta com gelatina 0,1%, sobre a qual os cardiomiócitos encontravam-se aderidos, conforme descrito no item 3.

Inicialmente, os cardiomiócitos aderidos às lamínulas foram lavados em tampão PBS 0,1 M, pH 7,4, por 3 vezes (5 minutos cada lavagem) e fixados com tampão paraformaldeído 4% mais sacarose 4%, durante 15 minutos, à TA. Em seguida, este material foi submetido à reação de imunofluorescência.

11.3.1. Reação de Imunofluorescência (CVIN)

Após lavagem em PBS 0,1 M, pH 7,4, conforme descrito anteriormente, os cardiomiócitos aderidos às lamínulas foram incubados com solução bloqueadora de imunofluorescência C, por 1 hora, à TA, a fim de se evitar a ligação de proteínas não-específicas. Em seguida, foram incubados com o anticorpo primário (*anti-goat* GLUT4, diluição 1:20) em solução de anticorpo, em câmara úmida e fechada, *overnight*, à 4 °C. Os cortes chamados de controle negativo receberam somente solução de anticorpo (sem adição de anticorpo). À seguir, foram lavados e então, incubados com o primeiro anticorpo secundário conjugado com isotiocianato fluoresceína (*donkey anti-goat* FITC, diluição 1:150) em solução de anticorpo, por 2 horas, no escuro, à TA. Após lavagem dos cortes com PBS 0,1 M, pH 7,4, os cardiomiócitos aderidos foram incubados com o segundo anticorpo secundário conjugado com rodamina (*donkey anti-rabbit* R, diluição 1:150) em solução de anticorpo, por 45 minutos, no escuro, à TA e lavados por três vezes com PBS. Em seguida, fazendo-se uso do meio de montagem Vectashield, as lamínulas contendo os cardiomiócitos foram colocadas sobre lâminas histológicas. A especificidade dos anticorpos secundários foi testada através de cortes controle positivo e negativo. Na ausência dos anticorpos primários, a aplicação dos anticorpos secundários (controle negativo) não produziu qualquer marcação significativa. As imagens foram obtidas utilizando-se microscópio confocal a laser de fluorescência (LSM510, Zeiss, New York, NY).

12. Ensaio da atividade da PI 3-K

Após o tratamento dos animais como descrito nos itens 1 e 2, estes tiveram seus ventrículos cardíacos removidos e submetidos à homogeneização em tampão PI 3-K, à 4° C, utilizando-se para isso um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operado em velocidade máxima por 30 segundos.

Os fragmentos celulares foram então centrifugados ($15.500 \times g$, 20 minutos, 4 °C) para remoção do material insolúvel e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Parte deste foi utilizado para determinação do conteúdo das proteínas totais através do método fotocolorimétrico de Biureto (BRADFORD, 1976), enquanto que a outra parte foi submetida à imunoprecipitação com anticorpos anti-IRS-1- ou anti-IRS-2, *overnight*, à 4° C. As amostras foram incubadas com proteína A-6MB por 2 horas e, em seguida, lavadas 8 vezes em tampão para lavagem do imunoprecipitado. O precipitado foi ressuspensido em 50 µl de tampão para ressuspensão. A reação foi iniciada com a adição de 10 µl de ATP 440 µM contendo [^{32}P] ATP, mantida sob agitação constante à 22° C, por 10 minutos. A reação foi finalizada com a adição de 20 µl de HCl 8N e 160 µl de metanol/clorofórmio (1:1). Após uma rápida centrifugação, a fase inferior foi aplicada em placa de cromatografia fina (TLC). Os resultados foram visualizados por auto-radiografias e quantificados por densitometria óptica.

***OUTROS TRABALHOS PRODUZIDOS
DURANTE O DOUTORADO***

The cross-talk between angiotensin and insulin differentially affect the PI 3-Quinase and MAP quinase-mediated signaling in rat heart: implications for insulin resistance. Carvalheira JB, **Calegari VC**, Zecchin HG, Ribeiro EB, Franchini KG, Velloso LA, Saad MJA. *Endocrinology*. 2003 Dec;144(12):5604-14.

ANGII induces the expression of cytokine signaling-3 in rat hypothalamus – A mechanism for desensitization of ANGII signaling. Torsoni MA, Carvalheira JB, **Calegari VC**, Bezerra RMN, Saad MJA, Velloso LA – *J Endocrinol*. 2004 Apr;181(1):117-28.

Increased expression of advanced glycation end-products and their receptor and activation of NF- κ B in lacrimal glands of diabetic rats. Mônica Alves, Daniel Andrade Cunha, **Vivian Cristine Calegari**, Mário J. A. Saad, Lício Augusto Velloso e Eduardo Melani Rocha. *J Endocrinol* 2005 Oct;187(1):159-66

Nuclear Factor- κ B, advanced glycated end-products and insulin expression in lacrimal glands of aging rats. Mônica Alves, **Vivian Cristine Calegari**, Daniel Cunha de Andrade, Lício Augusto Velloso e Eduardo Melani Rocha. *Diabetologia* 2005 Nov; 48(11):1-7.

The nitric oxide donor S-nitroso-N-acetylcysteine modulates angiotensin II signal transduction in a pathway-specific manner. Fernando Ganzarolli, **Vivian C. Calegari**, Kleber G. Franchini, Mario J. A. Saad, Lício A. Velloso. Trabalho submetido ao *Biochem Biophys Res Commun*, em outubro de 2005.

PRÊMIOS:

Prêmio Geral de melhor trabalho do XXVI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Apresentação do trabalho intitulado: “Papel da proteína reguladora SOCS3 sobre o *cross-talk* molecular entre a sinalização da angiotensina II e da insulina – efeitos sobre a associação entre hipertensão arterial e diabetes mellitus”.

Prêmio Pesquisa Básica no XXXIII Congresso Brasileiro de Oftalmologia, conferido à Mônica Alves, Daniel A. Cunha, Vivian Cristine Calegari, Mario JA Saad e Eduardo M. Rocha. Apresentação do trabalho intitulado: “Olho seco e senilidade: influência do fator nuclear kappa-β e dos produtos de glicosilação em glândulas lacrimais e filme lacrimal de ratos senis”. Prêmio obtido em setembro de 2005.