

ROSA CRISTINA TAMBASCIA

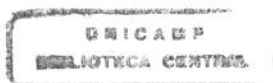
**“ANGIOTENSINA II INDUZ RESISTÊNCIA À INSULINA
ASSOCIADA COM ALTERAÇÃO DO SINAL INSULÍNICO EM
FÍGADO E MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS”.**

Orientador: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de mestre em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas.

Campinas

2001



**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNIDADE	30
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	T151a
V.	Ex.
TOMBO BC	46396
PROC.	16.392/01
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	15/09/01
N.º CPD	

CM00159826-9

~~T152a~~
T151a

Tambascia, Rosa Cristina

“Angiotensina II induz resistência à insulina associada com alteração do sinal insulínico em fígado e músculo esquelético de ratos”. São Paulo / Rosa Cristina tambascia. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Kleber Gomes Franchini

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

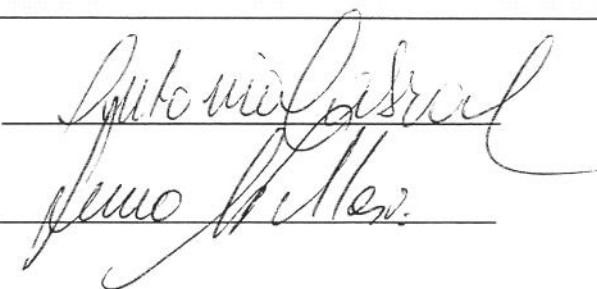
1. Angiotensina. 2. Insulina. 3. Hipertensão. I. Kleber Gomes Franchini. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

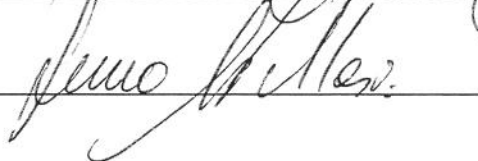
Orientador(a): Prof.Dr. Kleber Gomes Franchini

Membros:

1. Professor Doutor Antônio de Melo Cabral



2. Professor Doutor Lício Augusto Veloso



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

Data:28/06/01

20019236

**Dedico esse trabalho com muito amor aos meus pais
Donato e Lourdes (*in memorian*), ao meu marido
Valentim e aos meus filhos Cristiane e Eduardo.**

Obrigada por tudo.

Agradecimentos

A Deus, por iluminar sempre o meu caminho e minhas decisões.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pelo apoio e incentivo durante a realização desse trabalho, e pela oportunidade de participar da sua equipe de pesquisa.

À direção do Colégio Renovatus, Antônia Furio Cardelli e Alessandra Cardelli de Campos, pelo apoio e incentivo na realização desse curso.

À Mirian Ueno e Maria Esméria C. do Amaral pela imensa ajuda e colaboração nos experimentos.

À Priscila M. Fonseca e Patricia D. C. Corat pela colaboração nos estudos de imunohistoquímica realizados no primeiro artigo publicado.

À todos os funcionários e amigos que colaboraram com os experimentos, em especial, Jêniifer, Luciano, Thaís, Graciela Renata, Sr. Luís e Inara, pela ajuda e atenção dispensadas nesses anos.

Aos amigos Águeda Zaratín, Cláudia Costa, Elen Suedekum, Emiko Hirata, Leda Bento, Maria Helena Lima, Paula Belline, Priscila Perez, Renata Romanezi, Rosana Yuri, Rosângela Bezerra e Wilson Nadruz Jr. pelo carinho e apoio durante esses anos de convivência.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
1 – INTRODUÇÃO.....	01
2 – OBJETIVOS.....	10
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4 – RESULTADOS.....	28
5 – DISCUSSÃO.....	39
6- CONCLUSÃO	44
7 – SUMMARY.....	46
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
9 - ANEXO 1.....	59
10 - ANEXO 2.....	88

ABREVIATURAS

AII	angiotensina II
AII-10ng	angiotensina II 10 ng/kg/min
AII-40ng	angiotensina II 40 ng/kg/min
Bpm	batimento por minuto (unidade de frequência cardíaca)
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FC	frequência cardíaca
IP ₃	inositol trifosfato
IR	receptor de insulina
IRS-1	substrato 1 do receptor de insulina
IRS-2	substrato 2 do receptor de insulina
ITT	teste de tolerância à insulina
kDa	quilo Dalton
Kitt	taxa de decaimento de glicose
mmHg	milímetros de mercúrio
NO	óxido nítrico
NOS1	óxido nítrico sintetase 1.
NOS3	óxido nítrico sintetase 3
PAM	pressão arterial média
PKC	proteína quinase dependente de cálcio
PI 3-K	fosfatidilinositol 3 quinase

PMSF	fenilmetilsulfonilfluoreto
RAS	sistema renina-angiotensina
SDS-PAGE	dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida
TRIS	metano hidroximetilamina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	16
Figura 2 -	17
Figura 3 -	18
Figura 4 -	19
Figura 5 -	21
Figura 6 -	29
Figura 7 -	34
Figura 8 -	35
Figura 9 -	36
Figura 10 -	37

LISTA DE TABELA

Tabela 1 –	31
------------------	----

Resumo

A angiotensina II é um importante hormônio regulador das funções renal, cardíaca e vascular, exercendo seus efeitos através de seus receptores transmembrana. Tem importância central no controle da pressão arterial e da volemia e pode estar envolvida na fisiopatogênese da hipertensão arterial. Por outro lado, evidências clínicas e epidemiológicas indicam que a resistência à insulina coexiste com a hipertensão em mais de 50% dos pacientes hipertensos. Esta associação tem sido interpretada como uma indicação de relação causal entre resistência à insulina e a hipertensão arterial.

No presente estudo, examinamos o efeito da angiotensina II na sensibilidade à insulina e alguns dos possíveis mecanismos moleculares envolvidos. Ratos Wistar, machos, receberam infusões de angiotensina II (doses de 10 e 40 ng/kg/min) e salina (controles) por 6 dias consecutivos. A pressão arterial foi monitorada batimento-batimento em registros diários de uma hora de duração e a sensibilidade à insulina avaliada pelo ITT (teste de Tolerância à Insulina) no quinto dia de infusão. Ao final do sexto dia de infusão de angiotensina II, a insulina plasmática foi dosada. Os animais receberam uma injeção aguda de insulina (6µg) e os tecidos (fígado e músculo esquelético) foram retirados e homogeneizados após 90 segundos da injeção de insulina. Os extratos teciduais foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpos específicos para receptor de insulina (IR) e substrato 1 e 2 do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2). O produto desta imunoprecipitação foi separado através de eletroforese em SDS-PAGE e transferido para membrana de nitrocelulose. As proteínas foram então marcadas com anticorpos específicos e ¹²⁵I associado à proteína A.

A pressão arterial aumentou significativamente apenas na dose de 40ng/kg/min. Apesar de ter ocorrido aumento de cerca de 8 mmHg na pressão arterial de ratos infundidos com angiotensina II 10ng/kg/min, esta elevação não foi estatisticamente significante ao longo de seis dias de infusão. O decaimento da glicemia foi atenuado em 35% nos ratos tratados com dose de 10 ng/kg/min e em 37% naqueles que receberam infusão 40ng/kg/min. A insulina plasmática aumentou 180% na dose de 10ng/kg/min e 140% na dose de 40ng/kg/min. A fosforilação em tirosina do IR foi atenuada em 70% no fígado de ratos com infusão de angiotensina II nas doses de 10 e 40ng/kg/min. No músculo esquelético, a atenuação foi de 80% em ambas as doses. A fosforilação em tirosina do IRS-1 no fígado, foi atenuada em 60 e 73% nos ratos infundidos com angiotensina II nas doses

de 10 e 40ng/kg/min, respectivamente. Efeitos similares ocorreram no músculo esquelético de ratos infundidos com angiotensina II nas doses de 10 e 40ng/kg/min, onde observou-se atenuação na fosforilação em tirosina do IRS-1 de cerca de 70% em ambas as doses de angiotensina II. No fígado de ratos infundidos com angiotensina II nas doses de 10 e 40ng/kg/min houve uma atenuação na fosforilação em tirosina de IRS-2 em 75 e 85%, respectivamente, enquanto no músculo esquelético esta atenuação foi de cerca de 65%.

Estes resultados indicam que a angiotensina II induz a resistência à insulina por um efeito independente de sua influência pressora. Alteração nas etapas iniciais de transmissão do sinal insulínico pode ser a principal causa para a resistência à insulina observada em ratos com infusão crônica de angiotensina II.

1. Introdução

O sistema renina-angiotensina participa na regulação do sistema cardiovascular em diversos níveis, incluindo-se o sistêmico (i.e. circulante) e local, em vasos, coração e cérebro. Este sistema é constituído por uma cascata que tem início na proteólise do angiotensinogênio pela renina e tem como produtos ativos a angiotensina I e angiotensina II, bem como outros peptídeos derivados da proteólise subsequente da angiotensina I e da angiotensina II, como a angiotensina III e a angiotensina 1-7 (JOHNSTON, 1992). A proteólise da angiotensina I se dá predominantemente através da ação da enzima de conversão da angiotensina I em angiotensina II. No entanto, vias alternativas da conversão da angiotensina I em angiotensina II foram identificadas em diversos tecidos (DOSTAL & BAKER, 1999). Apesar de todos os produtos do angiotensinogênio poderem ter efeitos biológicos, a quase totalidade dos efeitos conhecidos deste sistema se deve à ação do octapeptídeo angiotensina II em células do sistema cardiovascular, e.g. células musculares lisas, miócitos cardíacos e fibroblastos (SADOSHIMA & IZUMO, 1993), sistema nervoso central e periférico (KAUFMAN & VOLLMER, 1985), células parenquimatosas renais e córtex adrenal (BIANCHI *et al.*, 1986).

Os efeitos da angiotensina II no sistema cardiovascular se fazem através de ação direta deste hormônio nas células de vasos e coração e, indiretamente, através de ações no sistema nervoso autônomo, produção de vasopressina, produção de aldosterona, produção local de substâncias parácrinas e autócrinas e através do efeito de retenção de volume de líquidos pelos rins (GOODFRIEND *et al.*, 1996). Tantos níveis de ação, justificam a extrema importância deste hormônio na regulação, bem como seu envolvimento na gênese e evolução de processos patológicos do sistema cardiovascular, como hipertensão arterial, doença aterosclerótica e insuficiência cardíaca (DONNELLY, 1992).

Os múltiplos níveis de ação da angiotensina II concorrem para seu efeito pressor. Assim, além de potente vasoconstrictor direto, sua ação renal direta e indireta, através da aldosterona e vasopressina, resulta em retenção de água e sal pelo rins e consequentemente expansão volêmica. A angiotensina II modula a ação do simpático tanto no nível do sistema nervoso central como no nível periférico e assim contribui para maior eficiência na secreção e ação das catecolaminas no sistema cardiovascular, que resulta também em efeito pressor (OSBORN *et al.*, 1991). O efeito da angiotensina II na secreção de vasopressina

através de ação direta em neurônios reguladores da produção deste hormônio pelos núcleos paraventricular e supra-óptico do hipotálamo, resulta em vasoconstrição, retenção de volume e aumento da sede provocados pela vasopressina (FITZSIMONS, 1998). Mais recentemente, diversos estudos indicaram que além destes efeitos funcionais, a angiotensina II exerce efeito trófico diretamente nas células do sistema cardiovascular e rim, determinando crescimento hipertrófico e proliferação celular em vasos e coração. Estes múltiplos efeitos, bem como a demonstração de que a hiperatividade do sistema renina-angiotensina e aumento dos níveis circulantes de angiotensina II elevam a pressão arterial, fundamentam a importância deste hormônio na gênese da hipertensão arterial (SEALEY & LARAGH, 1995).

Mecanismo molecular de ação da Angiotensina II

A angiotensina II exerce seus efeitos através de seus receptores transmembrana. Há quatro subtipos de receptores de angiotensina II (AT), descritos por números de 1 a 4. Os subtipos AT₁ e AT₂ são os mais conhecidos até o momento. Estes subtipos de receptores são polipeptídeos que contêm aproximadamente 360 aminoácidos que atravessam a membrana celular sete vezes (GOODFRIEND *et al.*, 1996). Apesar de suas semelhanças de afinidade pela angiotensina II, o AT₁ e o AT₂ são funcional e estruturalmente distintos, com homologia na sequência de aminoácidos de apenas 30%. O efeito pressor da angiotensina II é mediado quase que totalmente pelo receptor AT₁, sendo que este receptor é o responsável por mediar a maior parte dos efeitos tróficos da angiotensina II. O subtipo AT₁ é altamente específico para angiotensina II, sendo um membro da família de receptores acoplados a proteína Gq. A ligação da angiotensina II ao AT₁ leva à dissociação de subunidades de proteína Gq que, por sua vez, ativam a fosfolipase C. A ativação da fosfolipase C resulta na produção de inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol. O IP₃ libera cálcio de estoques intracelulares. A angiotensina II também aumenta a entrada de cálcio nas células através de canais transmembrana. Cálcio e diacilglicerol ativam enzimas, incluindo a proteína quinase C (PKC) que cataliza a fosforilação de outras enzimas em resíduos serina e treonina dispostas em cascata, regulando assim as funções celulares controladas pela angiotensina II (revisado em GOODFRIEND *et al.*, 1996).

Os efeitos da ativação das demais classes de receptores AT são ainda pouco conhecidos. No entanto, evidências recentes dão conta de que a ativação do receptor do tipo AT₂ está envolvida nas funções tróficas da angiotensina II. Os estudos indicam que, surpreendentemente, a ativação do receptor AT₂ pode antagonizar ou modular os efeitos tróficos da angiotensina II (revisado em GOODFRIEND *et al.*, 1996).

Angiotensina II e Hipertensão Arterial

Diversas evidências indicam que a angiotensina II induz hipertensão arterial secundária (PICKERING & MANN, 1995). Atividade da renina plasmática e a concentração plasmática de angiotensina II estão aumentadas na hipertensão renovascular e em cerca de 16% dos pacientes com hipertensão essencial (BRUNNER *et al.*, 1972). Os mecanismos responsáveis pela produção de hipertensão pela angiotensina II são complexos e não completamente entendidos. A angiotensina II difere de outros agentes vasoconstritores no seu efeito pressor, por ser o mesmo potencialmente cumulativo (ROBERTSON *et al.* 1986). A infusão de doses inicialmente subpressoras de angiotensina II levam, com o tempo, à hipertensão (DICKINSON & YU, 1967). Além disso, a angiotensina II estimula o crescimento vascular e isto pode indicar que seu efeito trófico e agonista têm um importante papel na indução de hipertensão. Por outro lado, a redução na função renal tem sido suficiente para causar hipertensão sem mudanças concomitantes no restante da circulação. O modelo pressor e subpressor da angiotensina II de induzir hipertensão chama a atenção pela possibilidade de mecanismos renal e extrarenal, estarem envolvidos na patogênese da hipertensão causada pela angiotensina II. O modelo de hipertensão usando doses pressoras de angiotensina II ilustra a importância do mecanismo renal. Enquanto que o modelo com doses subpressoras de angiotensina II, mostra a importância das mudanças relacionadas à circulação sistêmica (SIMON & ABRAHAM, 1995). Estes fatos colocam em perspectiva a possibilidade de a angiotensina II contribuir para o desenvolvimento da hipertensão arterial essencial. Por exemplo, estes fatos fundamentam a possibilidade da participação da angiotensina II na gênese da hipertensão essencial em humanos, mesmo na ausência de grandes alterações nos níveis circulantes da mesma. Ainda de acordo com estes fatos, cerca de 50% dos pacientes com hipertensão essencial têm uma condição conhecida como ‘não-modulação’, caracterizada pela

incapacidade de modular a secreção de renina e aldosterona quando submetidos a infusão de angiotensina II. Em geral, nestes pacientes, os níveis circulantes de angiotensina II são normais ou discretamente elevados (CONLIN *et al.*, 1992). A incapacidade de modular a secreção de angiotensina II parece justificar a contribuição deste hormônio para a hipertensão nestes pacientes.

Hipertensão Arterial e Resistência à Insulina

Níveis elevados de pressão arterial estão associados com níveis elevados de insulina circulante, de forma independente do peso e índice de massa corporal. Mais de 50% dos hipertensos têm resistência à insulina (GINSBERG, 2000). A resistência à insulina também foi observada em modelos de animais com hipertensão arterial (KOTCHEN, 1996).

Os mecanismos responsáveis pela resistência à insulina em hipertensos são ainda pouco conhecidos. Há dúvidas se existe uma relação de causalidade entre hipertensão arterial essencial 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 do sistema cardiovascular e metabólico, tendo como manifestações hipertensão e a resistência à insulina (NATALI *et al.*, 1996).

A insulina exerce efeitos cardiovasculares que poderiam, em alguns casos, contribuir para a gênese da hipertensão arterial. Insulina administrada por via intravenosa, causa vasodilatação em indivíduos normais e sua resposta é prejudicada nos obesos, nos indivíduos com resistência à insulina e em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. Essa alteração na resposta à insulina, pode depender da redução na capacidade deste hormônio de estimular a secreção de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais (LAAKSO *et al.*, 1990). Esta idéia encontra suporte na disfunção endotelial detectada em indivíduos portadores de hipertensão arterial e resistência à insulina (GINSBERG, 2000).

Por outro lado, a hiperinsulinemia pode resultar em aumento da reabsorção de sódio e água pelas células tubulares do rim, resultando em retenção de salina e expansão volêmica, aos quais se atribui envolvimento na gênese da hipertensão arterial.

(DEFRONZO *et al.*, 1975; MODAN *et al.*, 1985). No entanto, este efeito é considerado como transitório e o estabelecimento da hipertensão dependeria de modificação da curva de função renal em direção a níveis mais elevados de pressão arterial (ANDERSON & MARK, 1993).

A insulina pode também estimular a atividade do sistema nervoso simpático. Assim, em indivíduos com resistência à insulina, os níveis circulantes elevados desse hormônio poderiam causar hiperatividade do simpático, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de hipertensão arterial (LANSBERG, 1999). Em ratos espontaneamente hipertensos a resposta do sistema nervoso simpático e a insulina estão aumentada comparada com linhagem de ratos normotensos (ANDERSON & MARK, 1993).

Variações na atividade do sistema renina-angiotensina podem também contribuir para a associação entre resistência à insulina e hipertensão. Há indicações de que a angiotensina II pode alterar a ação da insulina "*in vivo*" por pelo menos dois motivos principais. A angiotensina II através de seu efeito vasoconstrictor pode reduzir o clearance de insulina nos tecidos periféricos e assim levar a um excesso de insulina tecidual, que, por sua vez levaria a uma hipo-sensibilização do receptor à ação da insulina (FLISER *et al.*, 1997). No entanto, os estudos que exploraram a influência da angiotensina II, o principal efector do sistema renina-angiotensina, revelaram resultados conflitantes na sensibilidade à insulina. Infusão de angiotensina II local ou sistêmica em voluntários humanos indicaram um aumento na sensibilidade à insulina, sendo esse efeito atribuído ao efeito pressor da angiotensina II (POLLARE *et al.*, 1989; BUCHANAN *et al.*, 1993; TOWNSEND *et al.*, 1993; JAMERSON *et al.*, 1996). Por outro lado, estudos em ratos e cães proporcionam evidências de que a angiotensina II pode reduzir a sensibilidade à insulina (RAO, 1994; RICKEY *et al.*, 1999). Estudos em cultura de células e corações isolados demonstraram que o excesso de angiotensina II pode levar a uma redução na sensibilidade de células musculares lisas e miocárdio à ação da insulina, por efeito antagônico direto da angiotensina II nos mecanismos de sinalização celular da insulina (SAAD *et al.*, 1995; VELLOSO *et al.*, 1996; ALI *et al.*, 1997; FOLLI *et al.*, 1997). No entanto, não existem evidências da presença deste mecanismo em outros tecidos-alvo da ação insulínica, muito mais importantes para os efeitos metabólicos deste hormônio, como por exemplo fígado e músculo esquelético.

Evidências indiretas também apontam para um efeito de resistência à insulina induzido pela angiotensina II. Sabe-se há tempos, que a administração de inibidores da enzima de conversão de angiotensina I em angiotensina II melhora a resistência à insulina em pacientes hipertensos e em animais com hipertensão experimental (TOWNSEND *et al.*, 1993; JAMERSON *et al.*, 1996; RICKEY *et al.*, 1999). No entanto, o efeito dos inibidores da enzima de conversão na sensibilidade à insulina pode estar mais relacionado a ação da bradicinina (CARVALHO *et al.*, 1997) que ao bloqueio da ação da angiotensina II “per se”. Resta ainda a possibilidade de que os efeitos dos inibidores da enzima de conversão se façam através de seu efeito hemodinâmico que resulta em aumento de fluxo nos tecidos periféricos (BUCHANAN *et al.*, 1993).

Mecanismo Molecular e Ação da Insulina

Para promover seus efeitos metabólicos e no crescimento celular a insulina necessita ligar-se a seu receptor, uma glicoproteína presente na membrana celular de todos os tecidos de animais vertebrados (KAHN, 1985). É uma estrutura tetrâmera composta de duas subunidades α , cada uma ligada a uma subunidade β . Pontes dissulfeto fazem as ligações inter e intra-subunidades, resultando a estrutura final β - α - α - β (MASSAGUE *et al.*, 1981; KASUGA, *et al.*, 1982). Cada subunidade α tem peso molecular de 135.000, é exclusivamente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina, enquanto que a subunidade β é uma proteína transmembrana, cada uma com peso molecular de 95.000 e responsável pela transmissão do sinal insulínico (KASUGA *et al.*, 1982a, 1982b). A subunidade α (extracelular) confere alta afinidade à ligação da insulina ao receptor. Aminoácidos cistina na subunidade α e na parte extracelular da subunidade β participam da ligação de pontes de dissulfeto entre as subunidades α e β . O componente transmembrana da subunidade β é responsável pela transmissão do sinal insulínico para sua região citoplasmática (SAAD, 1994).

A subunidade β do receptor de insulina é uma proteína com atividade quinase, estimulada pela insulina, capaz de se autofosforilar e fosforilar outros substratos em aminoácido tirosina (KASUGA, *et al.*, 1982b). Quando a insulina se liga à subunidade α

ocorre uma alteração na conformação do receptor e a atividade quinase, na subunidade β , é estimulada (HERRERA & ROSEN, 1986; PERLMAN *et al.*, 1989 ; WHITE *et al.*, 1988). Este fato determina a transferência de grupos fosfato do ATP para vários aminoácidos tirosina do receptor e promove a fosforilação de substratos protéicos intracelulares.

O primeiro substrato do receptor de insulina a ser identificado foi uma proteína de aproximadamente 185 kDa e denominada substrato 1 do receptor de insulina ou IRS-1. O DNA complementar obtido fígado de rato codifica para uma proteína de 1235 aminoácidos com diversas características interessantes. Não há um domínio transmembrana, isto é, IRS-1 é uma proteína de localização citoplasmática (SUN *et al.*, 1991).

Mais recentemente, a análise da pp185/ IRS-1 em célula de hepatoma (FAO) revelou que a banda 185 contém uma outra fosfoproteína tirosina de alto peso molecular em adição ao IRS-1. A porção mais baixa 185 é composta pelo IRS-1, mas parte de alto peso molecular da pp185 é um substrato do receptor da insulina denominado IRS-2. Essas proteínas (IRS-1 e IRS-2) compõem uma família de proteínas sinalizadoras, que em resposta a estimulação da insulina, fosforilam os resíduos tirosina, localizados nos motivos YMXM ou YXXM, sendo que Y é tirosina, M é metionina e X é qualquer outro aminoácido, servindo essas proteínas de ancoradouro para proteínas intracelulares contendo domínios chamados SH2, homologia com Src 2 (SAAD, 1994; WHITE & KAHN, 1994).

Foi demonstrado uma associação da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) com o IRS-1 após a estimulação com insulina e isto suporta a hipótese que o IRS-1 se liga a transdução do sinal durante a fosforilação em tirosina estimulada pela insulina (FOLLI *et al.* 1992., SAAD *et al.*, 1993). A PI 3-quinase possui duas subunidades, uma catalítica de 110 kDa e outra reguladora de 85 kDa que contém duas porções SH2 e uma SH3. A associação entre PI 3-quinase e IRS-1 provavelmente ocorre através da sequência YMXM fosforilada no IRS-1 e à porção SH2 da subunidade de 85 kDa (CARPENTER & CANTLEY, 1990). A insulina induz o aumento da concentração celular de fosfatidilinositol 3-fosfato, sugerindo que a PI 3-quinase seja ativada durante a estimulação com insulina. Embora ocorra a fosforilação em tirosina, da subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase após estímulos com outros fatores de crescimento, não há evidência dessa fosforilação após estímulo com insulina. Em vez disso, a ativação parece ocorrer como consequência da

associação do IRS-1 à PI 3-quinase. Então a insulina estimula a fosforilação do IRS-1 e este fosforilado transmite o sinal de transmissão, propagando a ação da insulina (FOLLI, 1992).

Portanto, a insulina após ligar-se ao seu receptor tirosina-quinase, desencadeia uma cascata de reações de fosforilação, inicialmente envolvendo a fosforilação do IRS-1 e IRS-2. Estes servem como proteínas ancoradoras para várias enzimas intracelulares. Como resultado, o IRS-1 e IRS-2 são pontos importantes nas vias de ação insulínica, que contribuirão para determinar a multiplicidade dos efeitos biológicos finais.

2. Objetivos

1- Avaliar a sensibilidade à insulina em ratos submetidos à infusão crônica de angiotensina II em doses subpressoras e pressoras.

2- Avaliar a sinalização celular da insulina em tecidos-alvo de ratos mantidos sob infusão contínua de angiotensina II em doses subpressoras e pressoras.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais Utilizados

Foram utilizados ratos machos adultos Wistar provenientes do CEMIB (Centro de Bioterismo da Universidade de Campinas), com pesos entre 280 a 320 gramas. Os animais receberam como dieta regular ração para ratos (Nuvital ®) e água “*ad libitum*”. Estes animais foram submetidos à cateterização crônica da artéria e veia femorais direitas.

3.2. Materiais Utilizados

Os reagentes e aparelhos para eletroforese de gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE) e eletrotransferência foram da Bio-Rad (Richmond, Calif.,USA). Metano hidroximetilamina (Tris-base), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina e ditioneitol (DTT), Triton X-100, Tween 20 e glicerol foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA). A angiotensina II foi fornecida pela Calbiochem – Novabiochem AG e solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% da Viaflex® Baxter Hospitalar Ltda., Brasil. Proteína A-Sepharose 6MB foi da Pharmacia (Uppsala,Sweden), Proteína A marcada com ^{125}I e ^{125}I insulina humana foram da Amersham – (Aylesbury, UK) e membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, 0,45 μm) foi da Amersham – (Aylesbury, UK). Insulina regular humana (Humulin R) foi da Biobrás (Belo Horizonte, MG, Brasil). Insulina padrão de rato – 100 mg/ml de Novo Biolabs (Novo Research Institute Bagsvaerd - Denmark) e anticorpo anti-insulina foi doado pelo Dr. Leclerck Meyer (Universidade de Bruxelas, Bélgica). Os anticorpos monoclonal antifosfotirosina e policlonal anti-receptor de insulina (IR) e anti-IRS-1 e anti-IRS-2 (substrato 1 e 2 do receptor de insulina) foram da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

3.3. Soluções Utilizadas nos Experimentos

As soluções empregadas nos diversos experimentos estão descritas a seguir:

3.3.1. Solução tampão de extração:

Para a extração de proteínas, para imunoprecipitação dos tecidos estudados. Contém: Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100 mM, EDTA (ácido etileno-diamino tetracético) 10 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoreto) 2 mM (diluído em álcool etílico), Triton X 100 1% e aprotinina 0,1mg/ml. Esta solução deve ser mantida a 4° C. O ortovanadato, PMSF e a aprotinina devem ser acrescidos no momento do uso.

3.3.2. Tampão de Laemmli (5X):

Para aplicação no gel de poliacrilamida. Contém: Azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50%, SDS 10%.

3.3.3. Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado:

Contém: Trisma base 100mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 2 mM, Triton X-100 0,5%. Esta solução deve ser mantida a 4° C.

3.3.4. Solução tampão para SDS-PAGE, gel de resolução -“resolving”:

Utilizada para a elaboração do SDS-PAGE, gel de resolução, um tampão composto de: EDTA 4mM, SDS 2%, Trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

3.3.5. Solução tampão para SDS-PAGE, gel de empilhamento-“stacking”:

Utilizada na confecção do SDS-PAGE, fase de empilhamento das proteínas. Contém: EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 50 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

3.3.6. Solução tampão para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

Empregada para a realização da eletroforese no SDS-PAGE. Para uso, a solução deve ser diluída a 1:4. Contém: Trisma Base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM, SDS 0,4%.

3.3.7. Solução tampão para transferência:

Usada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE, para a membrana de nitrocelulose. Contém: Trisma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Deve ser mantido a 4° C.

3.3.8. Solução basal:

Solução básica para o manuseio da membrana de nitrocelulose, após transferência. Contém: cloreto de sódio 150 mM, Trisma base 10 mM, 0,02% de Tween 20.

3.3.9. Solução bloqueadora:

Utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose, após a transferência. Contém: 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02% dissolvidos em solução basal.

3.3.10. Solução para anticorpos:

A solução contendo os anticorpos específicos que reagirão com as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém: 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal. Os anticorpos utilizados foram: anti-fosfotirosina, anti- IR, anti-IRS-1 e anti-IRS-2.

3.3.11. Tampão fosfato para dosagem de insulina plasmática

Solução I concentrada: Na_2HPO_4 (200 mM) 28,4 g/l

Solução II concentrada: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (260 mM).....35,8 g/l

Preparo: 161 ml da solução I + 39 ml da solução II em 800 ml de água desionizada e acrescentar 0,1% de azida sódica.

3.4. Métodos

3.4.1. Catéteres para monitorização crônica da pressão arterial

Os catéteres para a monitorização da pressão arterial foram construídos com tubo Tygon® (Norton Performance Plastics CO, EUA.) de 20 x 60 polegadas (50 cm de comprimento conectados, em uma das extremidades, a um tubo de polivinil (Silverwater B.C, Australia) 0,5 x 0,8 polegadas (5cm de comprimento). Para a conexão entre os dois tubos utilizaram-se tubos de aço de 1 cm de comprimento e diâmetro 22 gauge, inseridos no tubo de polivinil, após este ser tratado em acetona (Chemco Indústria e Comércio LTDA., Brasil) para facilitar a inserção. Após a inserção da extremidade reforçada do tubo de polivinil no Tygon, aplicou-se cola de contato Brascoplast® Standard – (Brascola Ltda., Brasil) para fixar as superfícies justapostas dos dois tubos, FIGURA 1 (INOUE *et al* -2000 e TAMBASCIA *et al* – 2001).

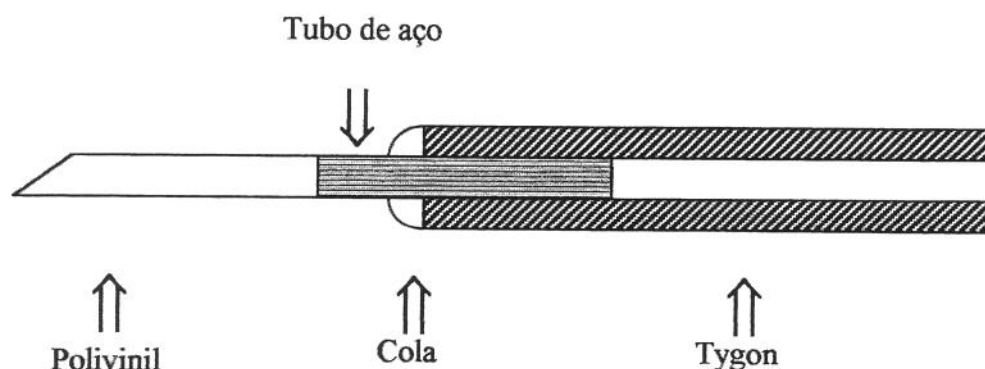


Figura 1 - Esquema representativo de catéter arterial confeccionado.

3.4.2. Catéteres para o sistema de infusão crônica

Os catéteres para a infusão intravenosa crônica de soluções foram construídos com polietileno (PE 50 – Clay Adams, Parsipany, USA); 50 cm de comprimento. Como indicado na FIGURA 2, uma curvatura de $\sim 150^\circ$ foi induzida na extremidade venosa do tubo através de aquecimento e moldagem manual.

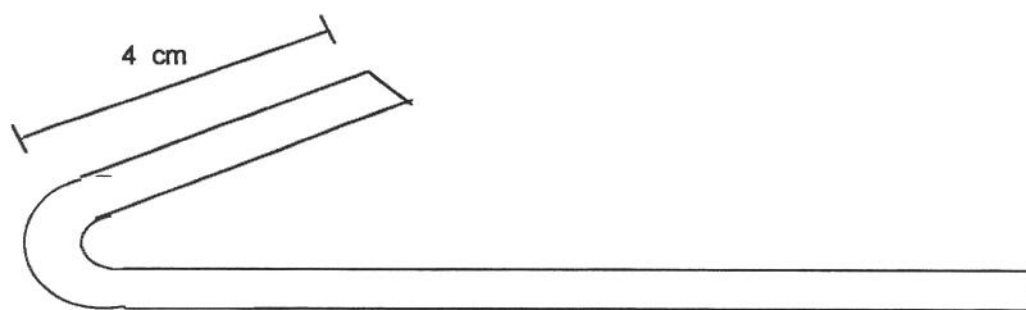


Figura 2 - Esquema representativo de catéter venoso.

3.4.3. Implantação de catéteres

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Cetamina (Ketalar®, Parke-Davis, Brasil) e Diazepam (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil). Esta mistura foi administrada na proporção de 10 mg de cloridrato de cetamina para 0,07 mg de diazepam em volume de 0,22 ml para cada 100 g de peso de rato, por via intraperitoneal.

Os animais foram submetidos à cateterização da artéria e veia femorais direitas e os catéteres foram exteriorizadas subcutaneamente com auxílio de um trocáter. Em seguida a extremidade externa dos cáteres foi passada através de uma espiral de aço de 30 cm de comprimento fixada na região posterior do pescoço através de prótese metálica

revestida com dacron (Bard®DeBakey® Elastic Knit Fabric (C.R.Bard. Inc. USA)

FIGURA 3.

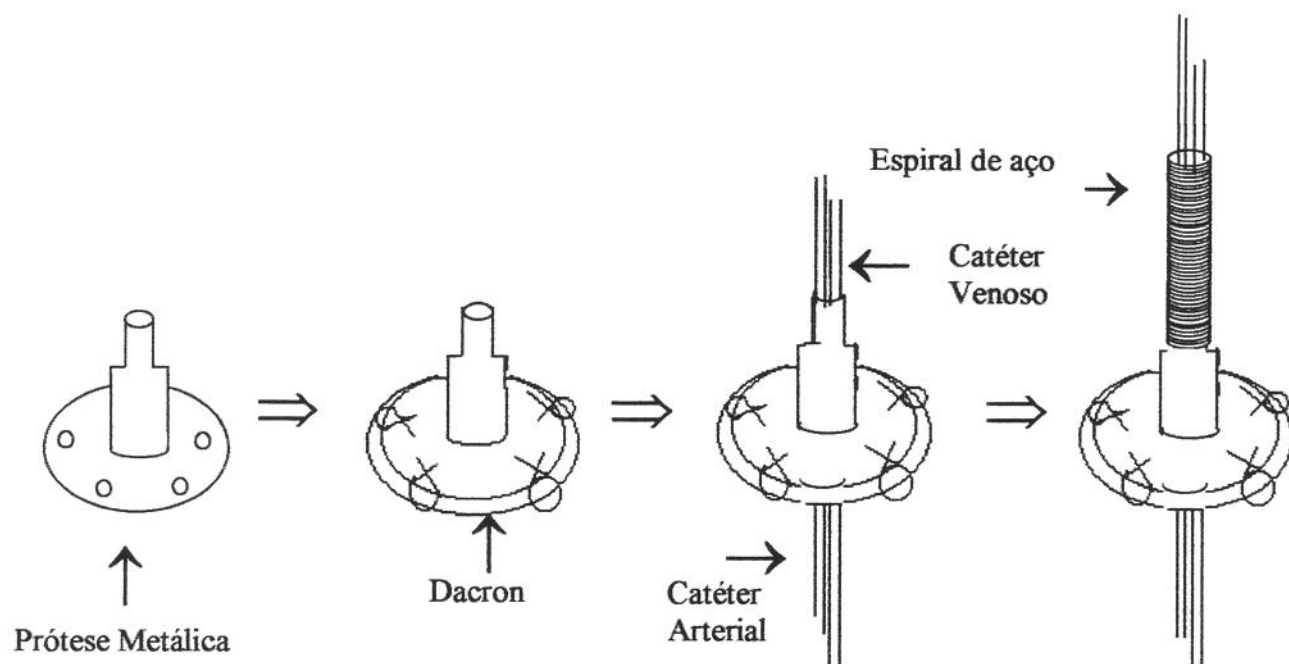


Figura 3 - Prótese de ancoragem do sistema de infusão contínua

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados com assepsia, e após a cirurgia os animais foram tratados com antibiótico profilático (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte – Fort Dodge®, Brasil) sendo 68 mg em 0,2 ml por rato, i.m. Após um período de recuperação pós-operatória de 2 dias, os animais foram submetidos ao experimento.

3.4.4. Sistema de Infusão Crônica

Para a infusão crônica de soluções em ratos não anestesiados, a extremidade livre da espiral de aço foi conectada a um pivô giratório (Instech, USA). O catéter venoso conduzido pela espiral foi conectado a um condutor de metal da estrutura do pivô que, por sua vez, eram conectados a tubos de silicone (Manosil™ Brand Silicone Rubber Tubing –

Manostat – Division of Barnant Company) ligados a seringas de 20 ml (Plastipak – Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda – Curitiba - Brasil) montadas em bomba de infusão (KD Scientific Inc, model 200 series), FIGURA 4 (INOUE *et al* – 2000; TAMBASCIA *et al* - 2001).

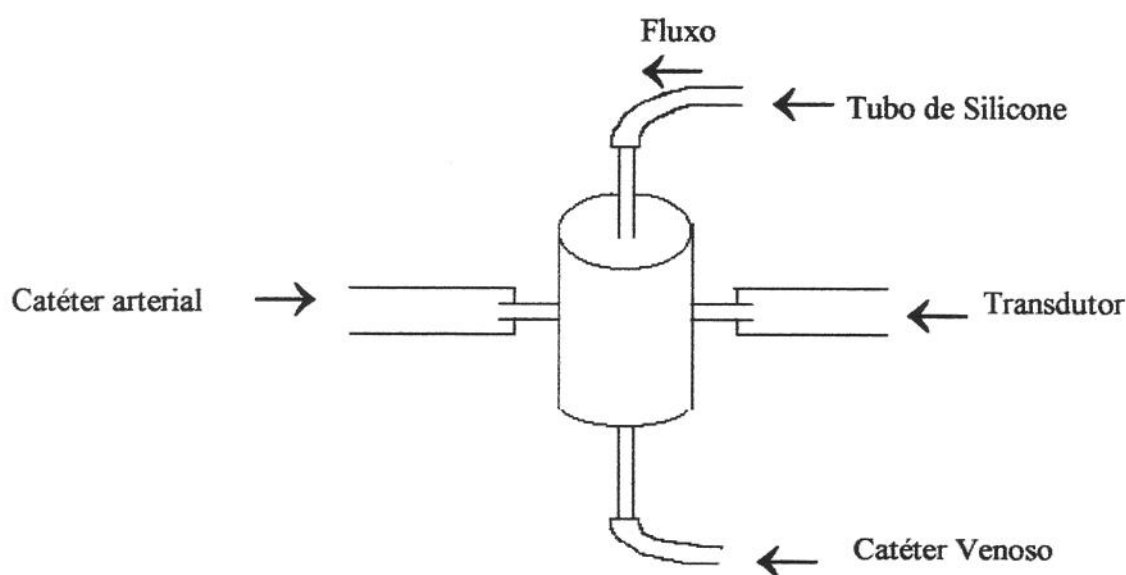


Figura 4 - Pivô usado no sistema de infusão crônica

Este sistema permitia a movimentação livre do animal simultaneamente à infusão contínua e registro da pressão arterial.

Os animais foram divididos em grupos que recebiam infusão contínua de salina, solução de angiotensina II (10ng/kg/min) e solução de angiotensina II (40ng/kg/min). Estas soluções foram infundidas em velocidade 0,5 ml por hora, perfazendo um total diário de 12 ml infundidos.

3.4.5. Registro e análise da pressão arterial e frequência cardíaca

No período que se seguiu à cirurgia de implantação, bem como, nos períodos entre os registros, os catéteres arteriais foram mantidos patentes através de lavagem e

preenchimento com solução de heparina sódica (Cristália, Brasil; 500 U.I./ml). A lavagem e o preenchimento eram realizados com cerca de 0,5 ml da solução de heparina infundida em bolo.

Para o registro da pressão arterial, a extremidade livre do catéter arterial foi conectada a uma das conexões metálica do pivô que, por sua vez, estava ligada a um tubo de Tygon conectado a um transdutor de pressão tipo strain-gauge BLPR (Blood Pressure Transducer- World Precision Instruments, Inc.), previamente calibrado. O sinal da pressão arterial pulsátil foi amplificado (General Purpose Amplifier - ©Stoelting Co.) e processado por uma placa analógico-digital conectada a um computador tipo PC carregado com o sistema Windaq (DATAQ Instruments Inc., Akron, OH, EUA) por 6 dias consecutivos durante 1 hora entre 15:00 – 16:00 horas. O sistema permitiu o registro simultâneo de 4 animais. (FIGURA 5).

Os registros foram analisados pelo programa Windaq (DATAQ Instruments Windaq, Version 1.78, Akron, Oh, EUA) e Advanced Cudas (DATAQ Instruments, Calc Package, Version 3.19, EUA). A análise foi realizada com a detecção dos picos sistólicos e diastólicos das ondas de pressão e para obtenção das médias aritméticas, batimento a batimento das pressões sistólica, diastólica e média e durante o período de registro. Cada canal de registro adquiriu o sinal a uma frequência de amostragem de 100Hz. A frequência cardíaca foi obtida da análise dos intervalos entre os picos máximos normalizados para 1 minuto. Os valores do pico máximo, pico mínimo, pressão arterial média (obtida da integral da área de cada pulso) e frequência cardíaca de cada batimento analisados de planilha de Excel geradas com valores do pós-processamento com o programa Advanced Cudas.

Computador com Sistema Windaq

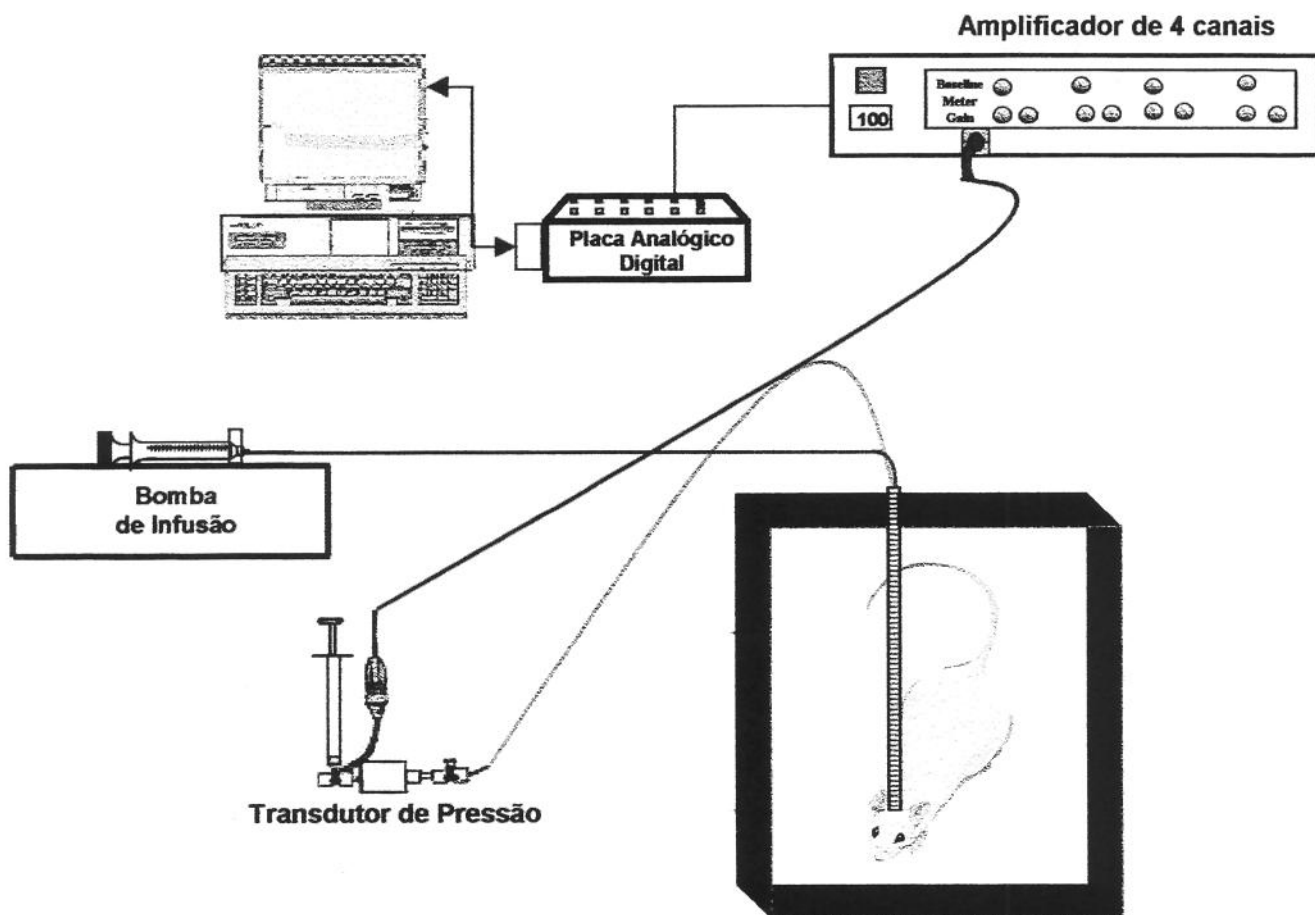


Figura 5 – Esquema representativo dos sistemas de registro e de infusão

3.4.6. Teste de Tolerância à insulina – ITT

Este teste, realizado no quinto dia do protocolo experimental, estima a ação metabólica “*in vivo*” da insulina (BONORA *et al.*, 1989; SAAD *et al.*, 1997). Para a realização deste teste, os ratos ficaram em jejum por seis horas. Inicialmente foi coletado uma amostra de sangue (200 µl) obtido do catéter arterial para análise da glicemia de controle (avaliada no primeiro, terceiro e quinto dia do protocolo experimental). Em seguida, foi injetado insulina (6µg) em bolo por via endovenosa. As amostras de sangue foram então colhidas, nos tempos de 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção. No final de todas as coletas de sangue, os ratos receberam 1 ml de dextrose 10% pelo catéter venoso. As amostras foram colhidas em ácido tricloro acético 5%, para sua desproteinização. Após centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi utilizado para determinação da glicose plasmática, por método enzimático, utilizando kit da Labtest (Campinas, SP- Brasil). Para a análise da sensibilidade à insulina, o logaritmo dos valores individuais de glicemia foram dispostos em gráfico em relação ao tempo. A taxa de desaparecimento da glicose (Kitt) foi calculada utilizando-se a fórmula $\ln_2/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose plasmática foi calculado à partir da inclinação da curva de regressão mínima, durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose.

3.4.7. Dosagem da insulina plasmática

Ao final do sexto dia de infusão foram coletadas amostras de sangue (150µl) para a dosagem da concentração de insulina plasmática. A dosagem foi feita através de técnica de radioimunoensaio com anticorpo anti-insulina de rato como descrito por SCOTT *et al.* (1981). Os ratos ficaram em jejum de seis horas. Foram feitas as diluições necessárias nas diferentes amostras para possibilitar a extrapolação de valores desconhecidos, a partir de uma curva padrão.

Preparo das amostras para a construção da curva padrão (CP): Os componentes deste ensaio foram preparados em triplicata e utilizado tampão fosfato para o preparo de todas as

soluções como: anticorpo anti-insulina de ratos (1:200), ^{125}I insulina humana (contagem por minuto, cpm, ideal de 1600) e insulina regular humana. Para a construção da curva, foi feita uma série de nove diluições da insulina humana padrão conhecida, S_1 a S_9 (standard 1 a 9) com concentrações fixas de: $S_1 = 0,02 \text{ ng/ml}$; $S_2 = 0,039 \text{ ng/ml}$; $S_3 = 0,078 \text{ ng/ml}$; $S_4 = 0,160 \text{ ng/ml}$; $S_5 = 0,310 \text{ ng/ml}$; $S_6 = 0,630 \text{ ng/ml}$; $S_7 = 1,250 \text{ ng/ml}$; $S_8 = 2,500 \text{ ng/ml}$; $S_9 = 5,000 \text{ ng/ml}$. De cada solução (S_1 a S_9) foi retirado 100 μl e acrescentado 100 μl de anticorpo anti-insulina de ratos e 100 μl de ^{125}I insulina. Outros componentes utilizados no ensaio foram:

- Total (T) = somente 200 μl de ^{125}I insulina, sem tampão fosfato, para determinação máxima da radioatividade.
- Ligação não-específica (LNE) 200 μl de ^{125}I insulina e 100 μl de tampão fosfato. Para determinação de possíveis interferências por componentes do tampão.
- Referência (Ref.) 100 μl de ^{125}I insulina e 100 μl de anticorpo anti-insulina de ratos.

Todas as amostras (CP, T, LNE, Ref) foram agitadas e incubadas por 48 horas a 4°C .

Preparo das amostras de sangue dos ratos mantidos sob infusão crônica: As amostras de sangue (150 μl) foram centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos e utilizado 100 μl de cada sobrenadante. Estas amostras foram preparadas em duplicatas, utilizando-se o tampão fosfato. Também foi acrescentado a cada sobrenadante, 100 μl de ^{125}I insulina e 100 μl de anticorpo anti-insulina de ratos. Estas amostras foram agitadas e incubadas por 48 horas a 4°C .

Leitura das amostras do ensaio: Após o período de incubação, todas as amostras (CP, LNE, Ref e da infusão crônica), com exceção do total (T), receberam 200 μl de uma solução contendo 2,5% de carvão (Norit A), 0,5% de albumina e 0,25% de dextran T 70. Os tubos foram mantidos durante 20 minutos a 4°C e a seguir foram centrifugados durante 20 minutos a 2800 rpm, a 4°C . O sobrenadante foi descartado e a radioatividade das amostras foi medida em contador γ (Beckman Gamma 5500). O sobrenadante do tubo correspondente ao total (T), não foi descartado e desta maneira, todo o seu volume foi utilizado para leitura da radioatividade. Por intermédio dos valores obtidos nos tubos contendo concentrações fixas de insulina, elaborou-se uma curva padrão que possibilitou o conhecimento dos valores de insulina contida nas amostras. Os resultados foram expressos em ng/ml.

3.4.8. Extração das proteínas teciduais

Para o estudo das etapas iniciais da ação insulínica, após 6 dias de infusão crônica de angiotensina II ou solução fisiológica 0,9% nos ratos controles, os animais foram anestesiados pelo catéter da veia femoral, com tiopental sódico (Cristália, Brasil) na dose de 50 mg/kg peso e submetidos à extração dos tecidos. Para os animais do grupo positivo (com estímulo agudo de insulina), foi injetada insulina regular humana (1,5U ou 6 µg) pelo catéter da veia femoral. Após 30 e 90 segundos, foram retirados fragmentos de fígado e de músculo gastrocnêmico, respectivamente (SAAD *et al.*, 1992). Os animais controle receberam injeções de igual volume de salina.

Os tecidos extraídos foram imediatamente homogeneizados em tampão de extração e mantidos em gelo durante todo o processo. Após centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm a 4° C, o sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração proteica de cada amostra pelo método colorimétrico do biureto. Amostras com igual quantidade de proteína foram então submetidas a imunoprecipitado com o anticorpo para receptor de insulina (IR) e para os substratos 1 e 2 do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2). As amostras foram incubadas por 12 a 14 horas, a 4° C. A seguir, foram acrescentados 50 µl de proteína A-Sepharose 6MB para precipitação do complexo proteína-anticorpo, e a mistura mantida em agitação contínua a 4° C, por mais duas horas. Ao final deste período as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpm, a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o complexo precipitado foi lavado por 3 vezes com tampão específico de lavagem.

3.4.9. Immunoblotting

As proteínas precipitadas foram ressuspensas em tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) contendo 100 mM de DTT e solução aquecida em água fervente por 5 minutos após o que foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 8%. Foram utilizados marcadores de alto peso molecular da Bio Rad (miosina -205kDa, β

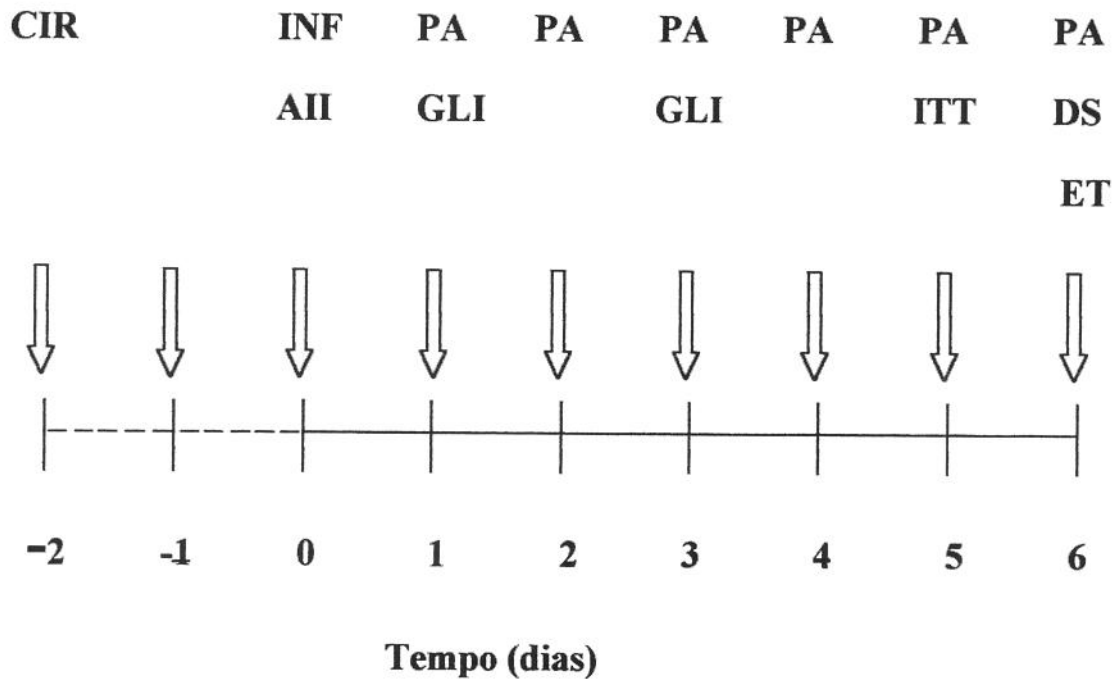
galactosidade – 116 kDa, BSA – 85 kDa e ovalbumina – 47 kDa) para orientação da corrida eletroforética. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da Bio Rad, com solução tampão previamente diluída. Para a eletroforese foram utilizados inicialmente 25 volts até que as proteínas ultrapassem o gel de “stacking”, quando então foi aumentado a voltagem da fonte para 120 volts, mantidos até o final da corrida no gel de resolução. A seguir, as proteínas, separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência do sistema da Bio Rad de eletroforese, mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas (TOWBIN, *et al*, 1979). Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução bloqueadora, por 2 horas, à temperatura ambiente, para reduzir ligação inespecífica e dos anticorpos. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal por três sessões, de dez minutos cada e incubadas com anticorpo específico (para determinar a quantidade de proteína) ou antifosfotirosina (para determinar o grau de fosforilação em tirosina), diluídos em solução tampão por 4 horas, em temperatura ambiente sob agitação constante. As membranas foram então lavadas novamente com solução basal por 3 sessões de 10 minutos cada e incubadas a seguir em solução com proteína A, marcada com ^{125}I durante 2 horas à temperatura ambiente. O excesso de proteína A foi lavado com solução basal e então, as membranas expostas a filme de RX (Kodak XAR – Rochester, NY) com intensificador (Cronex Lightning Plus – DuPont, Wilmington, DE) em cassete mantido a -80°C . Após 72 a 96 horas, os filmes foram revelados e as bandas identificadas na autoradiografia, foram quantificadas nas suas áreas, utilizando-se de densitometria óptica.

3.5. Análise Estatística

Os resultados de pressão arterial, frequência cardíaca, glicemia, Kitt e dosagem de insulina plasmática são apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média. Diferenças entre os valores médios foram analisadas por análise da variância (ANOVA) em duas vias. O teste de Bonferoni foi aplicado para análise “post hoc” e a probabilidade para os testes F serem considerados estatisticamente significantes foi $< 0,05$. Os resultados das leituras densitométricas das membranas foram transformados em porcentagens tendo como o valor

de referência (100%) a intensidade das bandas específicas na situação sem estímulo pela insulina (controle negativo, AII-10 negativa e AII-40 negativa). Estes resultados foram testados através de teste de Kruskal-Wallis-ANOVA para dados não paramétricos. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para análise “post hoc” entre os grupos.

PROTOCOLO



CIR = cirurgia de cateterização

INF. AII = início da infusão crônica de AII e salina nos controle

PA = registro de pressão arterial

GLI = glicemia

ITT = teste de tolerância à insulina

ET = extração dos tecidos

DS = dosagem de insulina

4. Resultados

4.1 Efeito da angiotensina II na pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial foi monitorada e registrada por períodos de uma hora durante seis dias em ratos infundidos com salina (S, n=16) e angiotensina II – 10ng/kg/min (AII-10, n=13) e angiotensina II – 40ng/kg/min (AII-40, n=16).

A FIGURA 6A mostra a média diária da pressão arterial média em ratos não-anestesiados infundidos com salina e angiotensina II. A pressão arterial média dos ratos infundidos com salina permaneceu estável em ~110 mmHg durante o período experimental. Os ratos infundidos com angiotensina II 10ng/kg/min não apresentaram aumento significativo da pressão arterial média comparados com os ratos infundidos com salina. Entretanto, a dose de 40ng/kg/min de angiotensina II produziu um aumento sustentado de pressão arterial de ~25 mmHg.

Durante o período experimental não ocorreu modificação significativa da frequência cardíaca nos vários grupos estudados (FIGURA 6B).

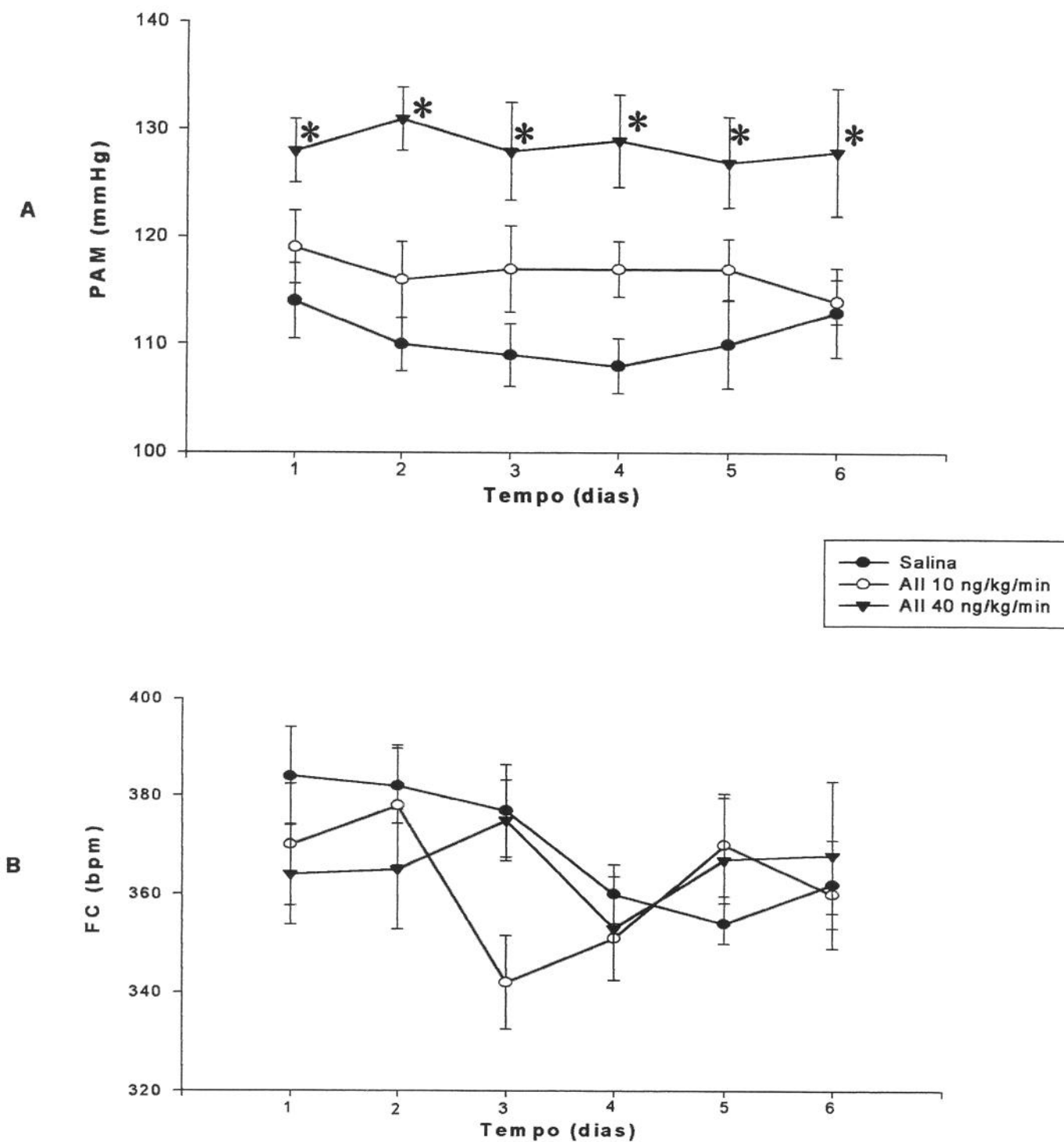


Figura 6- Efeitos da infusão crônica de angiotensina II (AII) na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos não anestesiados (bpm – batimentos por minuto. PAM (A) e FC (B) nos diversos grupos submetidos à infusão crônica. Salina n= 16; AII-10ng n=13; AII-40ng n=16. *p<0,05 comparados com valores de ratos infundidos com salina.

4.2. Efeito da infusão de angiotensina II na sensibilidade à insulina e níveis plasmáticos de insulina

Os níveis plasmáticos de glicose em jejum foram avaliados no primeiro, terceiro e quinto dia do protocolo experimental. Como indicado na TABELA 1, os níveis plasmáticos de glicose foram semelhantes em todos os grupos experimentais: ratos infundidos com salina e angiotensina II (10 e 40 ng/kg/min).

A sensibilidade à insulina foi avaliada pelo teste de tolerância à insulina (ITT) realizado no quinto dia do protocolo experimental. A velocidade de decaimento da glicose (K_{itt}) foi significativamente menor nos ratos infundidos com angiotensina II 10 e 40ng/kg/min comparados com os ratos infundidos com salina (TABELA 1). Ocorreu uma redução de 35 a 37,5% no K_{itt} dos ratos infundidos com angiotensina II 10 e 40 ng/kg/min, respectivamente.

Embora os níveis plasmáticos de glicose em jejum fossem semelhantes entre os três grupos experimentais, os níveis de insulina circulantes foram significativamente maiores nos ratos submetidos à infusão de angiotensina II (TABELA 1). A concentração plasmática de insulina aferida no sexto dia do protocolo experimental aumentou em 180% (4,8ng/ml $\pm$ 0,7) e 140% (4,1ng/ml $\pm$ 0,6) nos ratos com infusão de angiotensina II 10 e 40ng/kg/min, respectivamente, comparados com os ratos infundidos com salina (1,7ng/ml $\pm$ 0,3).

	Glicemia	K_{itt}	Insulina Plasmática
	mg/dl	%/minuto	ng/ml
Salina			
1° dia	87±3		
3° dia	89±4		
5° dia	94±2	4,0±0,2	1,7±0,3
AII- 10ng			
1° dia	91±3		
3° dia	92±4		
5° dia	96±2	2,6±0,2*	4,8±0,7*
AII-40ng			
1° dia	90±2		
3° dia	92±3		
5° dia	101±3	2,5±0,2*	4,1±0,6*

TABELA 1 – Resultados dos testes realizados durante o período de infusão crônica de salina (S) e angiotensina II 10 ng/kg/min (AII-10) e 40 ng/kg/min (AII-40) em ratos. Os níveis plasmáticos de glicose em jejum foram medidos no primeiro, terceiro e quinto dia do protocolo experimental (S n=18, AII-10 n=13, AII-40 n=15). A velocidade de decaimento da glicose foi avaliada pelo teste de tolerância à insulina (ITT) e o K_{itt} foi calculado como descrito em Métodos (S n=18, AII-10 n=13, AII-40 n=15). A dosagem de insulina plasmática foi medida no sexto dia do protocolo experimental através da técnica de radioimunoensaio (S n=8, AII-10 n=9 e AII-40 n=10). * p,0,05.

4.3. Efeito da AII na fosforilação em tirosina do receptor de insulina (IR) e substrato 1 e 2 do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2) induzida por insulina.

Para testar os efeitos da infusão crônica de angiotensina II nos mecanismos de sinalização da insulina, os ratos receberam injeção aguda de insulina ou salina, e a seguir, após, foram retirados fragmento do fígado e do músculo gastrocnêmico para análise por Western blotting e imunoprecipitação com anticorpos anti-IR, -IRS-1, -IRS-2 e fosfotirosina.

Na FIGURA 7 estão representados experimentos típicos realizados com imunoprecipitação e immunoblotting com anticorpos anti-IR, -IRS-1 e -IRS-2, indicando a quantidade destas proteínas presente no fígado e no músculo esquelético dos vários grupos experimentais. Como indicado na figura, não foram observadas diferenças na quantidade de IR, IRS-1 ou IRS-2 em fígado e músculo esquelético entre os grupos.

O estímulo agudo de insulina aumentou o nível de fosforilação em tirosina da banda de peso molecular de 95 kDa do IR em 8,6 vezes no fígado e 7,8 vezes no músculo esquelético de ratos infundidos com salina (FIGURA 8). O nível basal de fosforilação em tirosina do IR não apresentou modificação significativa em fígado e músculo esquelético dos ratos infundidos com angiotensina II. O estímulo agudo de insulina no fígado de ratos infundidos com angiotensina II 10 e 40ng/kg/min aumentou a fosforilação em tirosina do IR em 2,8 vezes e 2 vezes, respectivamente, o qual representa uma atenuação de aproximadamente 70% neste efeito da insulina. No músculo esquelético dos ratos infundidos com angiotensina II 10 e 40ng/kg/min houve um aumento da fosforilação em tirosina do IR em 1,6 vezes e 1,3 vezes respectivamente, o qual representa uma atenuação de aproximadamente 80%.

Na fosforilação em tirosina do IRS-1 (banda 185 kDa), o estímulo agudo de insulina em ratos infundidos com salina, induziu a um aumento de 6 e 12 vezes em fígado e músculo esquelético, respectivamente (FIGURA 9). O tratamento com angiotensina II não levou a modificação significativa nos níveis basais de fosforilação em tirosina do IRS-1 nos tecidos estudados. No fígado de ratos infundidos com angiotensina II 10 e 40ng/kg/min houve um aumento na fosforilação em tirosina do IRS-1 em 2,4 vezes e 1,6 vezes, representando uma atenuação de 60 e 73%, respectivamente. Efeito similar também

ocorreu no músculo esquelético de ratos infundidos com angiotensina II 10 e 40ng/kg/min. Houve um aumento na fosforilação em tirosina do IRS-1 em 3 vezes para angiotensina II 10ng/kg/min e 4 vezes para angiotensina II 40ng/kg/min, representando uma atenuação de 75 e 65% , respectivamente.

O estímulo agudo de insulina aumentou o nível de fosforilação em tirosina do IRS-2 em 10 vezes no fígado e 4 vezes no músculo esquelético de ratos infundidos com salina (FIGURA 10). O nível basal de fosforilação em tirosina do IRS-2 não apresentou modificação significativa em fígado e músculo esquelético dos ratos infundidos com angiotensina II. No fígado de ratos infundidos com angiotensina II 10 e 40ng/kg/min houve um aumento da fosforilação em tirosina do IRS-2 em 2,5 vezes e 1,4 vezes, representando uma atenuação de aproximadamente 75 e 85%, respectivamente. No músculo esquelético dos ratos infundidos com angiotensina II 10 e 40ng/kg/min houve um aumento da fosforilação em tirosina do IRS-2 em 1,3 vezes e 1,4 vezes respectivamente, o qual representa uma atenuação de aproximadamente 65%.

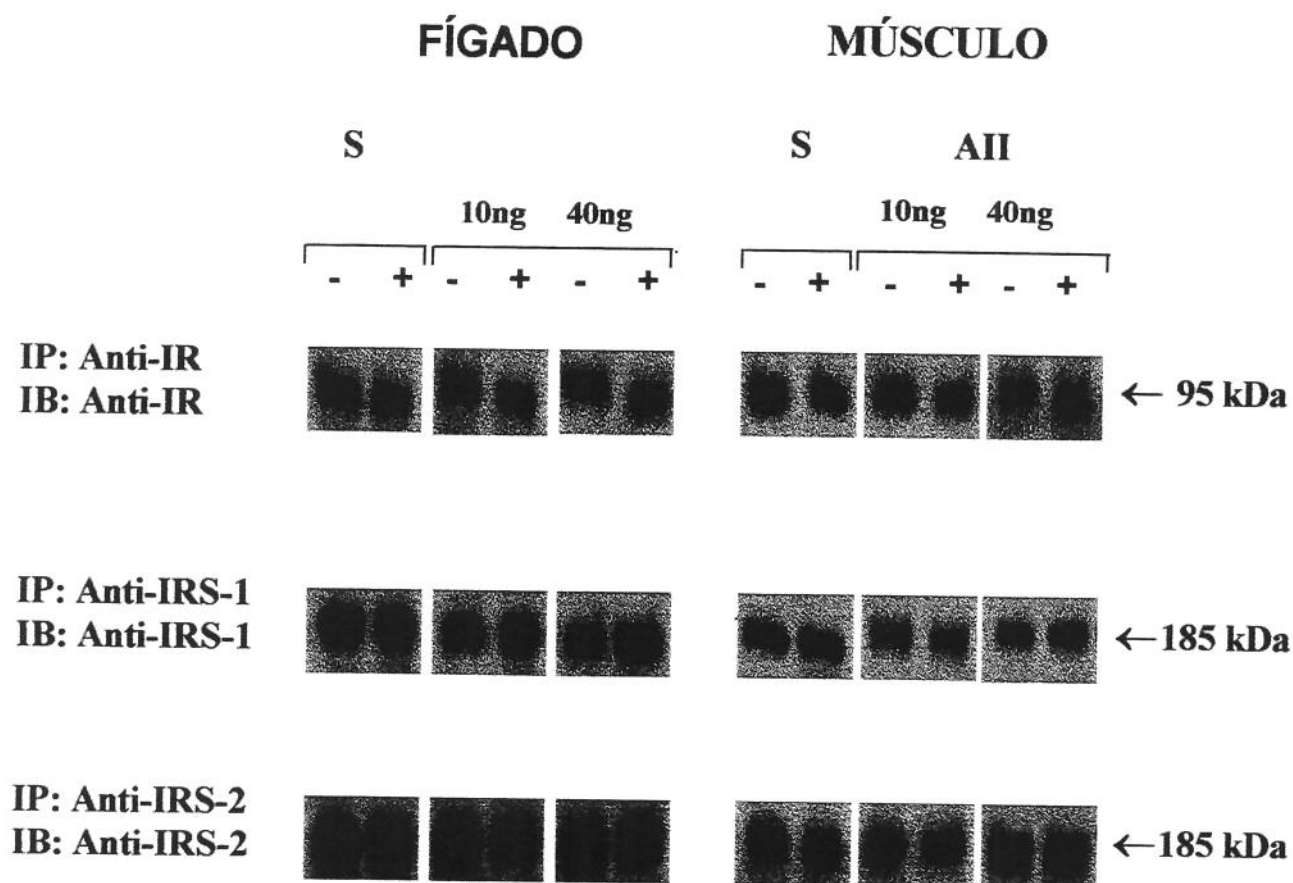


Figura 7 - Avaliação da quantidade de IR, IRS-1 e IRS-2 em fígado e músculo esquelético de ratos infundidos com salina (S) e AII. A figura mostra experimentos individuais típicos realizados com imunoprecipitação (IP) e “immunoblotting” (IB) com os anticorpos anti-IR, -IRS-1 e -IRS-2 em ratos infundidos com salina, angiotensina II 10 e 40ng/kg/min. Foram utilizadas as mesmas quantidades de proteínas totais de homogenatos de fígado e músculo esquelético conforme descrito em Material e Métodos.

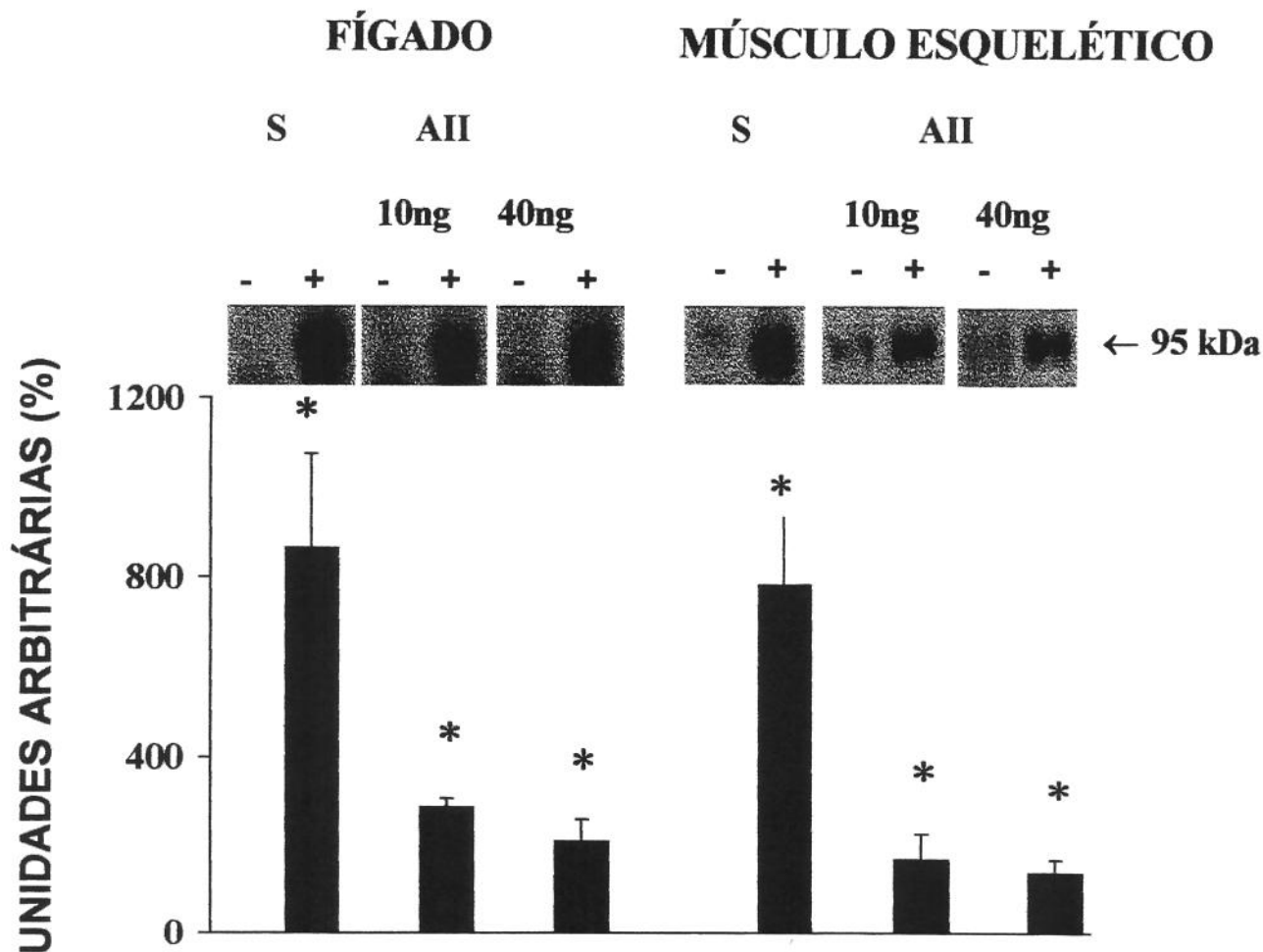


Figura 8 - Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina (IR) em tecido hepático e tecido muscular esquelético, antes (-) e após (+) o estímulo pela insulina, em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo IR em ratos com infusão de angiotensina II (AII) ou salina (S). As proteínas foram extraídas e separadas em gel, conforme descrição em Material e Métodos. Foi realizado “immunoblotting” com antifosfotirosina. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias e os valores expressos em média das %, com relação ao rato controle sem estímulo de insulina (S - e AII -). S, n=15; AII-10, n=9 e AII-40, n=11. *p<0,05

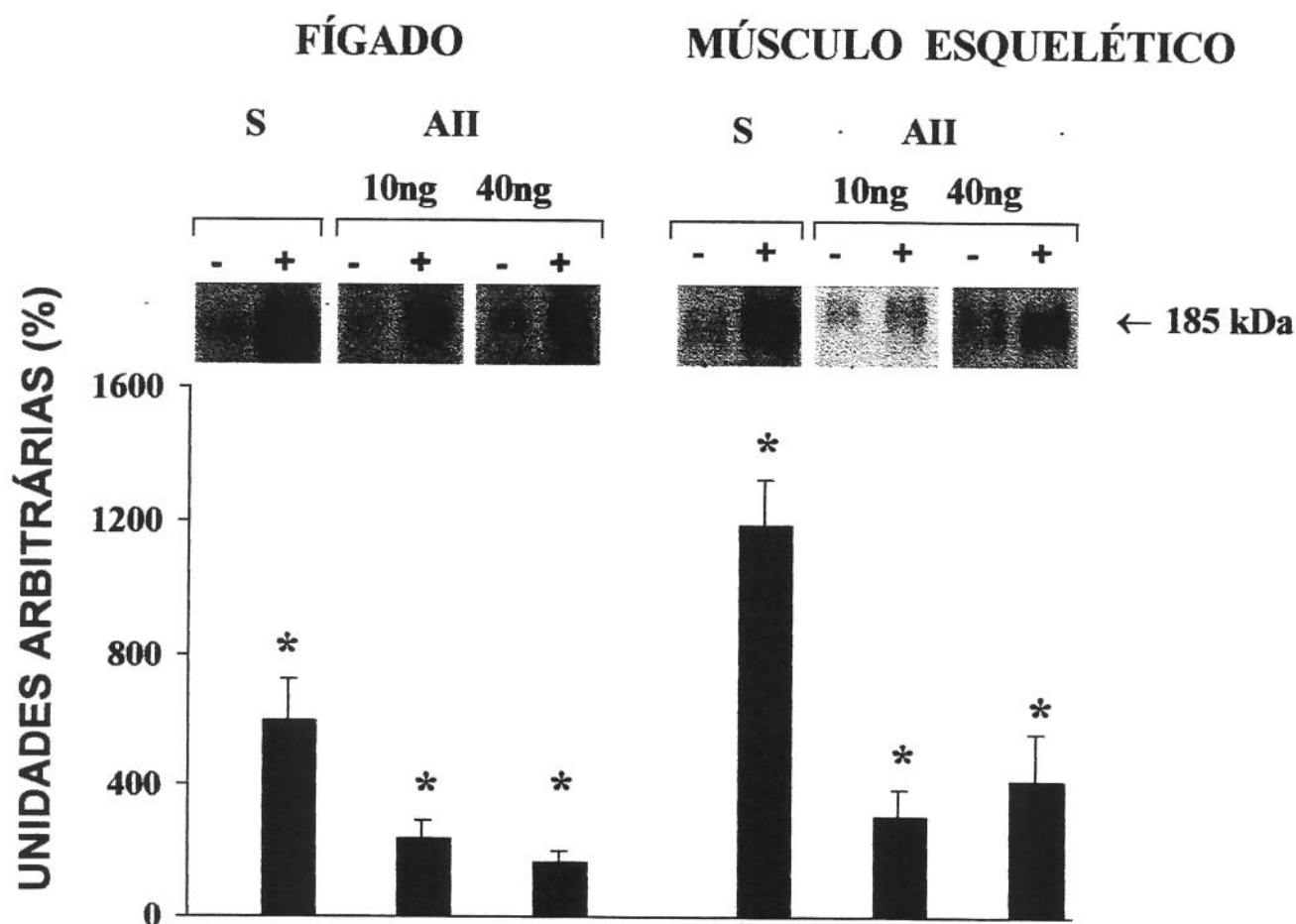


Figura 9 - Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) em tecido hepático e tecido muscular esquelético, antes (-) e após (+) o estímulo pela insulina, em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo IR em ratos com infusão de angiotensina II (AII) ou salina (S). As proteínas foram extraídas e separadas em gel, conforme descrição em Material e Métodos. Foi realizado “immunoblotting” com antifosfotirosina. A densitometria óptica foi realizada nas autoradiografias e os valores expressos em média das %, com relação ao rato controle sem estímulo de insulina (S - e AII-). S, n=15; AII-10, n=9 e AII-40, n=11. *p<0,05

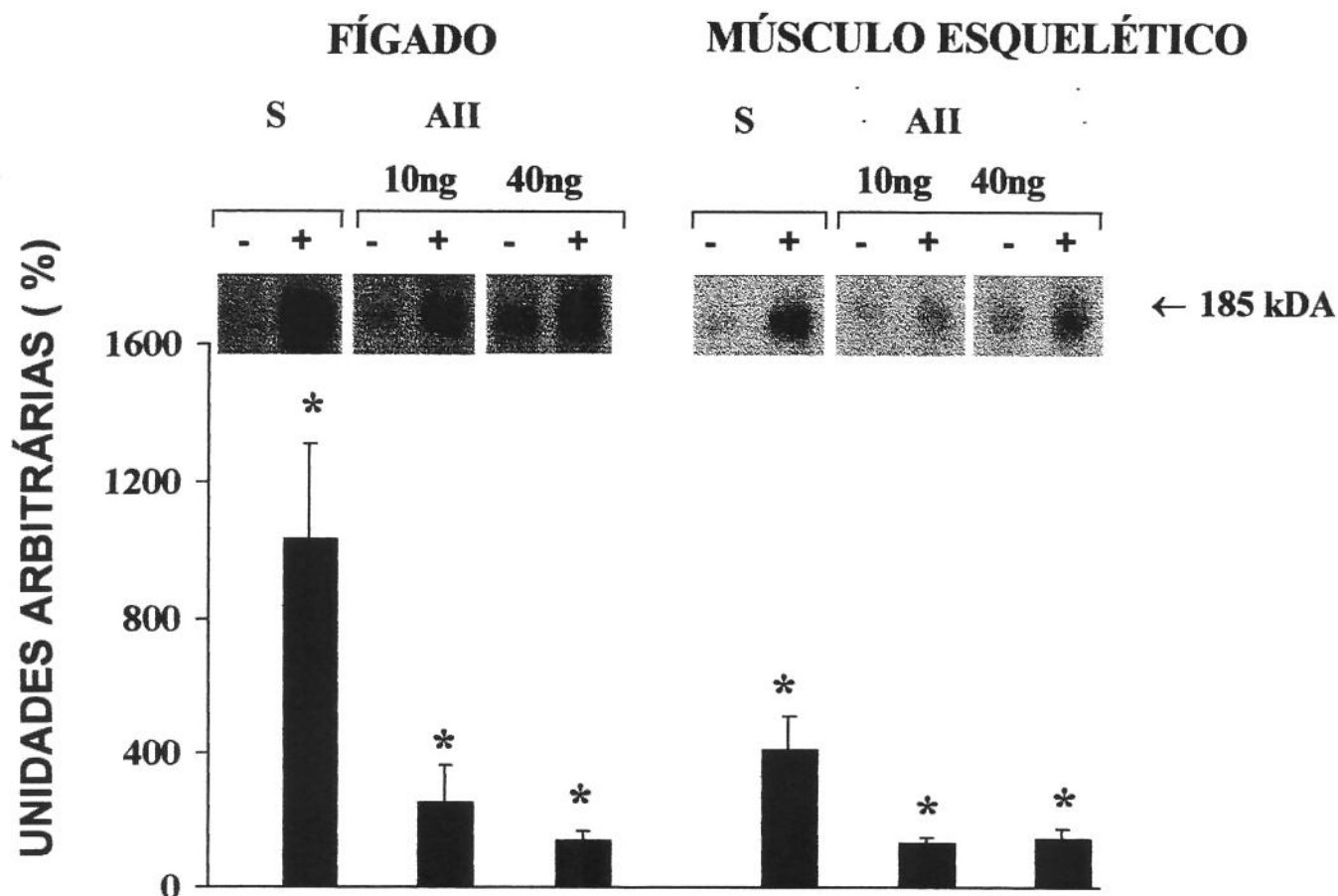


Figura 10 - Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato 2 do receptor de insulina (IRS-2) em tecido hepático e tecido muscular esquelético, antes (-) e após (+) o estímulo pela insulina, em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo IR em ratos com infusão de angiotensina II ou salina (S). As proteínas foram extraídas e separadas em gel, conforme descrição em Material e Métodos. Foi realizado “immunoblotting” com antifosfotirosina. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias e os valores expressos em média das %, com relação ao rato controle sem estímulo de insulina (S - e AII-). S, n=15; AII-10, n=9 e AII-40, n=11. *p<0,05

5. Discussão

Os resultados deste estudo mostraram evidências de que o aumento dos níveis plasmáticos de angiotensina II, através da infusão contínua por 6 dias, provoca redução da sensibilidade à insulina em ratos não-anestesiados, indicada pela atenuação da resposta hipoglicemiante induzida por injeção intravenosa de insulina (teste de ITT), bem como, pelo aumento da insulinemia de jejum em ratos euglicêmicos. O efeito sobre a sensibilidade à insulina foi independente da dose ou do efeito pressor de angiotensina II, como indicado pela redução semelhante na sensibilidade à insulina provocada por doses pressora e subpressora de angiotensina II. Esta redução na sensibilidade à insulina pela angiotensina II foi acompanhada de redução acentuada da fosforilação em tirosina do receptor de insulina (IR), bem como, pela redução da fosforilação em tirosina dos substratos 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) do receptor de insulina induzidos pela insulina. Da mesma forma, o efeito da angiotensina II na fosforilação do IR, IRS-1 e IRS-2 mostrou-se independente da dose de angiotensina II infundida (10 e 40 ng/kg/min) ou de seu efeito pressor. Portanto, esses resultados indicam que aumentos nos níveis circulantes de angiotensina II reduzem a sensibilidade à insulina em ratos, efeito provocado ao menos em parte, pela redução na ação da insulina sobre as etapas iniciais de sua sinalização celular em tecidos-alvo.

A conclusão de que a angiotensina II reduz a sensibilidade à insulina, baseada no teste de tolerância à insulina e nos níveis plasmáticos aumentados de insulina poderia ser criticada já que o teste considerado padrão para se avaliar a sensibilidade à insulina, o clamp de insulina (DEFRONZO *et al.*, 1979) não foi realizado no presente estudo. No entanto, estudos anteriores utilizando a técnica de ITT simultaneamente com a técnica de clamp evidenciaram a propriedade desta técnica para avaliar a sensibilidade à insulina (BONORA *et al.*, 1989).

Estudos anteriores que avaliaram a capacidade da angiotensina II de induzir resistência à insulina, apresentaram resultados conflitantes (BUCHANAN *et al.*, 1993; TOWNSEND & DIPETTE, 1993; FLISNER *et al.*, 1993; BARON *et al.*, 1993). Alguns estudos em seres humanos normais, utilizando infusões sistêmicas de angiotensina II, demonstraram aumento na sensibilidade à insulina, um efeito atribuído aos efeitos hemodinâmicos deste hormônio (BUCHANAN *et al.*, 1993; TOWNSEND & DIPETTE, 1993). O aumento da pressão arterial sistêmica induzido pela angiotensina II poderia aumentar o fluxo em território vascular de músculos esqueléticos, resultando em melhoria

na sensibilidade à insulina. Por outro lado, estudos com infusões locais de angiotensina II em doses constrictoras no antebraço de voluntários humanos, mostraram redução na sensibilidade à insulina (JAMERSON *et al.*, 1996), provavelmente devida à redução do fluxo sanguíneo. Resultados de estudos em ratos e cães, no entanto, indicaram que a angiotensina II infundida sistematicamente, reduz a sensibilidade à insulina (RAO, 1994; RICKEY *et al.*, 1999). A demonstração de que a infusão de angiotensina II reduz a sensibilidade à insulina em ratos no presente estudo também é conflitante com a ausência de resistência à insulina em modelos de hipertensão nos quais a angiotensina II tem um papel patogênico central. Ratos transgênicos (mRen-2)²⁷ e ratos com hipertensão renovascular tem sensibilidade à insulina normal (VETTOR *et al.*, 1994; NATALI *et al.*, 1996). Pode-se especular que ausência de resistência à insulina nestes modelos poderia estar relacionada a um desarranjo simultâneo de outros sistemas de controle, com efeitos opostos àquele da angiotensina II nos mecanismos de sinalização da insulina.

A indicação de que o aumento nos níveis circulantes de angiotensina II provoca resistência à insulina foi ainda fortalecida, em nosso estudo, pelos resultados dos estudos dos mecanismos de sinalização celular induzidos pela insulina em músculo esquelético e fígado. Demonstramos que, a infusão de angiotensina II, independentemente da dose ou do efeito pressor, provoca atenuação marcante da fosforilação em tirosina (ativação) do receptor de insulina, bem como de dois de seus substratos intracelulares imediatos, IRS-1 e IRS-2. Os mecanismos responsáveis por esta alteração não foram explorados no presente estudo, mas poderiam se dever a um efeito hemodinâmico da angiotensina II ou efeito da angiotensina II nos mecanismos de sinalização celular da insulina.

A redução na sensibilidade à insulina induzida pela angiotensina II pode envolver mudanças no fluxo sanguíneo. Reduções do fluxo sanguíneo nos tecidos provocados por agentes vasoconstrictores podem provocar resistência à insulina pela redução do clearance de insulina (JULIUS *et al.*, 1991; LAAKSO *et al.*, 1992; FLISER *et al.*, 1993; BARON *et al.*, 1993; BARON & BRECHTEL, 1993; JAMERSON *et al.*, 1994). Esta redução do clearance de insulina aumenta a concentração local da mesma, que induziu a uma hiposensibilização do receptor à ação da insulina. Esta idéia é corroborada por resultado de estudos realizados com angiotensina II em leito vascular do antebraço de humanos, que demonstraram queda na sensibilidade à insulina após a infusão de angiotensina II

(BUCHANAN *et al.*, 1993; TOWNSEND *et al.*, 1993). Ainda mais, em estudos onde a pressão arterial se elevou simultaneamente à vasoconstricção, provocando aumento de fluxo sanguíneo no antebraço, ocorreu aumento ao invés de queda na sensibilidade à insulina. (JAMERSON, *et al.*, 1996).

No presente estudo, apesar de termos utilizado doses subpressoras e pressoras de angiotensina II e verificado que ambas reduzem a sensibilidade à insulina, não podemos excluir a possibilidade de que a redução do fluxo sanguíneo tecidual tenha sido a causa da queda observada na sensibilidade à insulina. O argumento de que o efeito hemodinâmico seria excluído pelo fato de a dose pressora de angiotensina II ter produzido o mesmo efeito daquele observado pelo tratamento com a dose subpressora, poderia ser rejeitado pelo fato de, já na dose subpressora, termos observado atenuação marcante da sensibilidade à insulina. Isto impediria aparecimento de efeitos adicionais provocados por maior efeito vasoconstrictor da angiotensina II.

Por outro lado, não se pode, apenas através da avaliação de pressão arterial, concluir sobre o estado de vasoconstricção da microcirculação nos diversos territórios vasculares dos animais infundidos com angiotensina II. Apesar de a infusão de angiotensina II poder reduzir o fluxo sanguíneo em tecidos como coração, rim, pele e baço, dependendo da dose utilizada, pode provocar o aumento no fluxo sanguíneo em músculo esquelético (TOWNSEND & DIPETTE, 1993). Portanto, uma avaliação definitiva sobre o papel da vasoconstricção nos efeitos da angiotensina II, sobre a sensibilidade à insulina no modelo que utilizamos neste estudo, dependeria de avaliação apropriada do fluxo sanguíneo regional.

Outra possibilidade para a queda na sensibilidade à insulina em ratos submetidos à infusão de angiotensina II poderia ser uma influência direta da angiotensina II nos mecanismos de sinalização celular da insulina. Esta hipótese encontra apoio em observações anteriores obtidas em células em cultura e órgãos isolados sobre a influência da angiotensina II nas vias de sinalização a insulina (SAAD *et al.*, 1995; VELLOSO *et al.*, 1996; ALI *et al.*, 1997; FOLLI *et al.*, 1997).

Receptores acoplados às proteínas G (dos quais o receptor AT₁ é um representante) podem induzir a autofosforilação e ativação dos receptores do tipo tirosina quinase (dos quais o receptor de insulina é um representante), um fenômeno conhecido

como transativação de receptores tirosina quinase (LINSEMAN *et al.*, 1995; DAUB *et al.*, 1996; DU *et al.*, 1996; DAUB *et al.*, 1997; PRENZEL *et al.*, 1999) Estudos demonstraram que os receptores AT₁, uma vez ativados pela angiotensina II transativam receptores de PDGF (LINSEMAN *et al.*, 1995), EGF (EGUCHI *et al.*, 1998) e IGF (DU *et al.*, 1996). Estudos realizados em corações de ratos demonstraram que a angiotensina II induz a uma rápida fosforilação em tirosina do IRS-1 e IRS-2 (VELLOSO *et al.*, 1996). Esta fosforilação parece ser mediada pela ativação da enzima JAK-2 que é rapidamente fosforilada pela ação da angiotensina II no receptor AT₁ (MARRERO *et al.*, 1995; VELLOSO *et al.*, 1996). No entanto, não existem ainda estudos que demonstraram que receptores AT₁ transativam o receptor de insulina.

Por outro lado, a ativação de receptores AT₂ inibe a autofosforilação da subunidade β do receptor de insulina pela insulina (ELBAZ *et al.*, 2000), à despeito do fato de que este mecanismo não interfere com a ligação da insulina no receptor de insulina. Da mesma forma este efeito acompanha-se, como esperado, de atenuação da fosforilação em tirosina do IRS-1.

Os efeitos da ativação de receptores AT₁ e AT₂ poderiam ser os responsáveis pela atenuação da resposta do IR à insulina, bem como pela resistência observada em ratos infundidos com angiotensina II. No entanto, são necessários estudos adicionais para se confirmar ou não esta possibilidade em nosso modelo experimental.

A resistência à insulina observada em ratos infundidos com angiotensina II poderia também ser causada pela própria hiperinsulinemia devido a um efeito da angiotensina II na secreção de insulina. Apesar de no presente estudo a secreção e clearance de insulina não terem sido avaliados, resultados da literatura indicam que a angiotensina II em doses pressoras não afetam o clearance sistêmico de insulina (O'CALLAGHAN *et al.*, 1998). Além disso, estudos indicam que a angiotensina II reduz, ao invés de aumentar, a secreção basal e pulsátil de insulina (FLISER *et al.*, 1997).

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que infusões de angiotensina II por 6 dias induzem resistência à insulina em ratos que se acompanha de atenuação na transmissão do sinal insulínico pelo receptor de insulina. A confirmação destes resultados no contexto da hipertensão em humanos poderia explicar a associação entre a não-modulação dos efeitos da angiotensina II observada em um subgrupo de pacientes.

7. Summary

We have examined the influence of long-term infusion of angiotensin II (AII) on insulin sensitivity and action on liver and skeletal muscle of rats. Rats were continuously infused with saline or AII-10 and 40 ng/kg/min for 6 consecutive days. Arterial pressure (AP) was daily monitored with a computer system (1 hour, beat-to-beat). Insulin sensitivity was evaluated by insulin tolerance test (ITT) performed at the 5th day of AII or saline infusion. Insulin plasma levels were determined at the end of the 6th infusion day. Insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor (IR), insulin receptor substrates 1 and 2 (IRS1, IRS2) were evaluated in liver (L) and skeletal muscle (M) at the 6th experimental day. AP remained stable at ~110 mmHg in saline infused rats along the experimental period. AII-10 did not change the AP significantly, but AII-40 increased mean arterial pressure by ~25 mmHg. The rate constant for plasma glucose decay (K_{it}) induced by an insulin challenge was attenuated by ~38% in rats infused with AII. AII-10 and AII-40 markedly attenuated the insulin-induced activation of IR, IRS-1 and IRS-2, as indicated by the reduction of insulin-induced tyrosine phosphorylation of these proteins to 30-50% in liver and skeletal muscle of AII infused rats. These effects were similar whether subpressor or pressor doses were used, implying that this effect of AII is independent of its pressor influence. Impairment of the initial steps of insulin signal transduction pathway may be the cause for the insulin resistance observed in AII infused rats.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, M.S.; SCHIEFFER, B.; DELAFONTAINE, P.; BERNSTEIN, K.E.; LING, B.N.; MARRERO, M.B. 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.** 272 (19): 12373–12379, 1997.
- ANDERSON, E.A.; MARK, A.L. The Vasodilator action of insulin. Implications for the insulin hypothesis of hypertension. **Hypertension** 21 (2): 136-141, 1993.
- BARON, A.D.; BRECHTEL, G. Insulin differentially regulates systemic and skeletal muscle vascular resistance. **Am. J. Physiol.** 265: E61–E67, 1993.
- BARON, A.D.; BRECHTEL-HOOK, G.; JOHNSON, A.; HARDIN, D. Skeletal muscle flow: a possible link between insulin resistance and blood pressure. **Hypertension** 21: 129–135, 1993.
- BIANCHI, C.; GUTKOWSKA, J.; DE LÉAN, A.; BALLAK, M.; ANAND-SRIVASTAVA, M.B.; GENEST, J.; CANTIN, M. Fate of ¹²⁵I-angiotensin II in adrenal zona glomerulosa cells. **Endocrinology**, 118: 2605-2607, 1986.
- BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIOTORI, V.; CORGNATI, A.; MUGGEO, M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J. Clin. Endocrinol. Metabol.** 68(2): 374–378, 1989.
- BRUNNER, H.R.; LARAGH, J.H.; BAER, L.; NEWTON, M.A.; GOODWIN, F.T.; KRAKOFF, L.R.; BAID, R.H.; BUHLER, F.R. Essential hypertension: renin and aldosterone, heart attack and stroke. **N. Engl. J. Med.** 286: 441-449, 1972.

- BUCHANAN, T.A.; THAWANI, H.; KADES, W.; MODRALL, J.G.; WEAVER, F.A.; LAUREL, C.; POPPITI, R.; XIANG, A.; HSUEH, W. Angiotensin II increases glucose utilization during acute hyperinsulinemia via a hemodynamic mechanism. **J. Clin. Invest.** 92: 720–726, 1993.
- CARPENTER, C.L.; CANTLEY, I.C. -Phosphoinositide kinases. **Biochemistry.** 29: 11147-11156, 1990.
- CARVALHO, C.R.O.; THIRONE, A.C.P.; GONTIJO, J.A.R.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M.J.A. Effect of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action. **Diabetes** 46:1950-1957, 1997.
- CONLIN, P.R.; BRALEY, L.M.; MENACHERY, A.I.; HOLLENBERG, N.K.; WILLIAMS, G.H. Abnormal norepinephrine and aldosterone responses to upright posture in nonmodulating hypertension. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 75 (4): 1017-1021, 1992.
- DAUB, H.; WALLASCH, C.; LANKENAU, A.; HERRLICH, A.; ULLRICH, A. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. **EMBO J.** 16 (23): 7032–7044, 1997.
- DAUB, H.; WEISS, F.U.; WALLASCH, C.; ULLRICH, A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein- coupled receptors. **Nature** 379:557–560, 1996.
- DEFRONZO, R.A.; COOKE, C.R.; ANDRES, R.; FALOONA, G.R.; DAVIS, P.J. The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium and phosphate in man. **J. Clin. Invest.** 55: 845-855, 1975.

- DEFRONZO, R.A.; TOBIN, J.D.; ANDRES, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. **Am J Physiol.** 237 (3): E214-E223, 1979.
- DICKINSON, C.J.; YU, R. Mechanisms involved in the progressive pressor response to very small amounts of angiotensin in conscious rabbits. **Circ. Res.** 20-21 (suppl II): 157-163, 1967.
- DONNELLY, R. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and insulin sensitivity: metabolic effects in hypertension, diabetes, and heart failure. **J. Cardiovasc Pharmacol** 20 (Suppl. 11): S38-S44, 1992.
- DOSTAL, D.E.; BAKER, K.M. The Cardiac Renin-Angiotensin System: Conceptual, or a Regulator of Cardiac Function? **Circ. Res.** 85: 643-650, 1999.
- DU, J.; SPERLING, L.S.; MARRERO, M.B.; PHILLIPS, L.; DELAFONTAINE, P. G-protein and tyrosine kinase receptor cross-talk in rat aortic smooth muscle cells: thrombin and angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and insulin-like growth factor receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 218: 934-939, 1996.
- EGUCHI, S.; NUMAGUCHI, K.; IWASAKI, H.; MATSUMOTO, T.; YAMAKAWA, T.; UTSUNOMIYA, H.; MOTLEY, E.D.; KAWAKATSU, H.; OWADA, K.M.; HIRATA, Y.; MARUMO, F.; INAGAMI, T. 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.** 273 (15): 8890-8896, 1998.
- ELBAZ, N.; BEDECS, K.; MASSON, M.; SUTREN, M.; STROSBURG, A.D.; NAHMIAS, C. Functional transactivation of insulin receptor kinase by growth inhibitory angiotensin II AT2 receptor. **Mol Endocrinology** 14:795-804, 2000.

- FITZSIMONS, J.T. Angiotensin, Thirst, and sodium appetite. **Physiol. Rev.** 78 (3): 583-675, 1998.
- FLISER, D.; ARNOLD U.; KOHL, B.; HARTUNG, R.; RITZ, E. Angiotensin II enhances insulin sensitivity in healthy volunteers under euglycemic conditions. **J. Hypertens.** 11: 983-988, 1993.
- FLISER, D.; SCHAEFER, F.; SCHMID, D.; VELDHUIS, J.D.; RITZ, E. Angiotensin II affects basal, pulsatile, and glucose-stimulated insulin secretion in humans. **Hypertension.** 30: 1156-1161, 1997.
- FOLLI, F.; KAHN, C.R.; HANSEN, H.; BOUCHIE, J.L.; FEENER, E.P. 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 (9): 2158-2169, 1997.
- FOLLI, F., SAAD, M.J.A.; BACKER, J.M.; KAHN, C.R. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of intact rat. **Biol. Chem.** 267 (31): 22171-22177, 1992.
- GINSBERG, H.N. Insulin resistance and cardiovascular disease. **J. Clin. Invest.** 106 (4): 453-458, 2000.
- GOODFRIEND, T.L.; ELLIOTT, M.E.; CATT, K.J. Angiotensin receptors and their antagonists. **The New Engl. J. of Med.** 334 (25): 1649-1654, 1996.
- HERRERA, R.; ROSEN, O.M. Autophosphorylation of the insulin receptor *in vitro*: Designation of phosphorylation sites and correlation with receptor kinase activation. **J. Biol. Chem.** 261: 11980-11985, 1986.

- INOUE, R.Y.; GONTIJO, J.A.R.; FRANCHINI, K.G. Hemodilution mediates hemodynamic changes during acute expansion in unanesthetized rats. **Am. J. Physiol.** 279: R2243 - R2251, 2000.
- JAMERSON, K.A., NESBITT, S.D.; AMERENA, J.V.; GRANT, E.; JULIUS, S. Angiotensin mediates forearm glucose uptake by hemodynamic rather than direct effects. **Hypertension.** 27: 854-858, 1996.
- JAMERSON, K.A.; SMITH, S.D.; AMERENA, J.V.; GRANT, E.; JULIUS, S. Vasoconstriction with norepinephrine causes less forearm insulin resistance than a reflex sympathetic vasoconstriction. **Hypertension.** 23 (part2): 1006-1011, 1994.
- JOHNSTON, C.I. Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. **J. Hypertens Suppl.** 10: S13-S26, 1992
- JULIUS, S.; GUDBRANDSSON, T.; JAMERSON, K.; SHAHAB, S.T.; ANDERSSON, O. Hypothesis: the hemodynamic link between insulin resistance and hypertension. **J. Hypertens.** 9: 983-986, 1991.
- KAHN, C.R. Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. **Annu. Rev. Med.** 36: 429-451, 1985.
- KASUGA, M.; HEDO, J.A.; YAMADA, K.M.; KAHN, C.R. Structure of insulin receptor and its subunits. **J. Biol. Chem.** 257: 10392-10399, 1982.
- KASUGA, M.; KARLSSON, F.A.; KAHN, C.R. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000 dalton subunit of its own receptor. **Science**, 215: 185-187, 1982a.
- KASUGA, M.; ZICK, Y.; BLITHE, D.L.; CRETAAZ, M.; KAHN, C.R. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. **Nature**, 298: 667-669, 1982b.

- KAUFMAN, L.J.; VOLLMER, R.R. Endogenous angiotensin II facilitates sympathetically mediated hemodynamic responses in pithed rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 235:128-134, 1985.
- KOTCHEN, T.A. Attenuation of hypertension by insulin-sensitizing agents. **Hypertension.** 28: 219-223, 1996.
- LAAKSO, M.; EDELMAN, S.V.; BRECHTEL, G.; BARON, A.D. Decreased effect of insulin to stimulate skeletal muscle blood flow in obese man. A novel mechanism for insulin resistance. **J. Clin. Invest.** 85: 1844-1852, 1990.
- LAAKSO, M.; EDELMAN, S.V.; BRECHTEL, G.; BARON, A.D. Effects of epinephrine on insulin-mediated glucose uptake in whole body and leg muscle in humans: role of blood flow. **Am. J. Physiol.** 263: E199-E204, 1992.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.
- LANDSBERG, L. Insulin resistance and hypertension. **Clin. Exp. Hypertens.** 21: 885-894, 1999.
- LINSEMAN, D.A.; BENJAMIN, C.W.; JONES, D.A. Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.** 270 (21): 12563-12568, 1995.
- MARRERO, M.B.; SCIEFFER, B.; PAXTON, W.G.; Heerdt, L., BERK, B.C. DELAFONTAINE, P.; BERNSTEIN, K.E. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT₁ receptor. **Nature** 375: 247-250, 1995.

- MASSAGUE, J.P.; PILCH, P.F.; CZECH, M.P. Eletrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unit stoichiometries. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 77: 7137-7141, 1981.
- MODAN, M.; HALKIN, H.; ALMOG, S.; LUSKY, A.; ESHKROL, A.; SHEFI, M.; SHITRIT, A.; FUCHS, Z. Hyperinsulinemia A link between hypertension obesity and glucose intolerance. **J. Clin. Invest.** 75: 809-817, 1985.
- NATALI, A.; QUINONES GALVAN, A.; ARZILLI, F.; TADDEI, S.; PECORI, N.; FRASCERRA, S.; SALVETTI, A.; FERRANNINI, E. Renovascular hypertension and insulin sensitivity. **Eur. J. Clin. Invest.** 26: 556-563, 1996.
- O'CALLAGHAN, C.J.; KOMERSOVA, K.; LOUIS, W.J. Acute effects of blood pressure elevation on insulin clearance in normotensive healthy subjects. **Hypertension.** 31 (part 1): 104-109, 1998.
- OSBORN, E.C.; FEARN, L.M.; FRANCIS, R.J.; MACKENZIE, J.C.; WILSON, J. Receptors for Angiotensins I and II: their relevance to renal haemodynamics, blood pressure control and hind-limb blood flow. **Med. Hypotheses** 36: 6-16, 1991.
- PERLMAN, R.; BOTTARO, D.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. Conformational changes in the α and β subunits of the insulin receptor identified by anti-peptide antibodies. **J. Biol. Chem.** 264: 8964-8950, 1989.
- PICKERING, T.G.; MANN, S.J. Renovascular hypertension: medical evaluation and nonsurgical treatment. In: **Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management**, 2nd edition, edited J.H. Laragh and B.M. Brenner, Raven Press, Ltd., New York, 1995, pp 2039-2054.

- POLLARE, T.; LITHELL, H.; BERNE, C. A comparison of the effects of hydrochlorothiazide and captopril on glucose and lipid metabolism in patients with hypertension. **N. Engl. J. Med.** 321(13): 868–873, 1989.
- PRENZEL, N.; ZWICK, E.; DAUB, H.; LESERER, M.; ABRAHAM, R.; WALLASCH, C.; ULLRICH, A. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of pro-HB-EGF. **Nature** 402: 884–888, 1999.
- RAO, R.H. Effects of angiotensin II on insulin sensitivity and fasting glucose metabolism in rats. **Am J. Hypertens** 7: 655-660, 1994.
- RICHEY, J.M.; ADER, M.; MOORE, D.; BERGMAN, R.N. Angiotensin II induces insulin resistance independent of changes in interstitial insulin. **Am J. Physiol** 277: E920-E926, 1999.
- ROBERTSON, J.I.S.; MORTON, J.J.; TILLMAN, D.M.; LEVER, A.F. The pathophysiology of renovascular hypertension. **J. Hypertens.** 4(suppl 4): S95-S103, 1986.
- SAAD, M.J.A. Molecular Mechanisms of insulin resistance- **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 27: 941-957, 1994.
- SAAD, M. J. A.; ARAKI, E.; MIRALPEIX, M.; ROTHENBERG, P. L.; WHITE, M. F.; KAHN, C. R. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. **J. Clin. Invest.** 90: 1839-1849, 1992.
- SAAD, M.J.A.; FOLLI, F.; KAHN, J. KAHN, C.R. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. **J. Clin. Invest.** 92: 2065-2072, 1993.

- SAAD, M.J.A.; MAEDA, L.; BRENELLI, S.L.; CARVALHO, C.R.O.; PAIVA, R.S.; VELLOSO, L.A. Defect in insulin signaling transduction in liver and muscle of pregnant rats. **Diabetologia**, 40 : 179–186, 1997
- SAAD, M.J.A.; VELLOSO, L.A.; CARVALHO, C.R.O. 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, 1995.
- SADOSHIMA, J.; IZUMO, S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: critical role of the AT₁ receptor subtype. **Cir. Res.** 73: 413–423, 1993.
- SCOTT, A.M.; ATWATER, I.; ROJAS E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and β -cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. **Diabetologia**, 21 : 470–475, 1981.
- SEALEY, J.E.; LARAGH, J.L. The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. In: **Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management**, 2nd edition, edited J.H. Laragh and B.M. Brenner, Raven Press, Ltd., New York, 1995, pp 1763–1796.
- SIMON, G.; ABRHAM, G. Angiotensin II administration as an experimental model of hypertension. In: **Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management**, 2nd edition, edited J.H. Laragh and B.M. Brenner, Raven Press, Ltd., New York, 1995, pp 1423–1435.
- SUN, X.J.; ROTHENBERG, P.; KAHN, C.R.; BACKER, J.M.; ARAKI, E.; WILDEN, P.A.; CAHELL, D.A.; GOLDSTEIN, B.J.; WHITE, M.F. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction. **Nature**, 352: 73–77, 1991.

- TAMBASCIA, R.C.; FONSECA, P.M.; CORAT, P.D.C.; MORENO, H.; SAAD, M. J. A.; FRANCHINI, K.G. Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II infused rats. **Hypertension** 37 (6): 1423-1428, 2001.
- TOWBIN, H.; STTAEHLIN, J.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 76: 4350-4354, 1979.
- TOWNSEND, R.R.; DIPETTE, D.J. Pressor doses of angiotensin II increase insulin-mediated glucose uptake in normotensive men. **Am. J. Physiol.** 265: E362-E366, 1993.
- VELLOSO, LA.; FOLLI F., SUN, X.J.; WHITE, M.F.; SAAD, M.J.A.; KAHN, C.R.; Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93:12490-12495, 1996.
- VETTOR, R.; CUSIN, I.; GANTEN, D.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; FERRANNINI, E.; JEANRENAUD, B. Insulin resistance and hypertension: studies in transgenic hypertensive TGR(mREN-2)27 rats. **Am. J. Physiol** 267: R1503-1509, 1994.
- WHITE, M.F.; KAHN, R. The insulin signaling system. **J. Biol. Chem.** 269 (1): 1-4, 1994.
- WHITE, M.F.; LIVINGSTON, J.N.; BACKER, J.M.; LAURIS, V.; DULL, T.J.; ULLRICH, A.; KAHN, C.R. Mutation of insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. **Cell**, 54: 641-649, 1988.

9. Anexo 1

Expression and Distribution of NOS1 and NOS3 in the Myocardium of Angiotensin II-Infused Rats

Rosa C. Tambascia, Priscila M. Fonseca, Patricia D.C. Corat, Heitor Moreno, Jr, Mario J.A. Saad, Kleber G. Franchini

Abstract—Studies have indicated a complex functional interaction between angiotensin (Ang) II and NO in the heart. The purpose of the present study was to examine the protein expression and tissue distribution of NO synthases 1 (NOS1) and 3 (NOS3) in the myocardium of rats that underwent continuous infusion of Ang II at 2 different rates (10 and 40 ng · kg⁻¹ · min⁻¹) for 6 days. Mean arterial pressure increased by ≈15 mm Hg in rats infused with Ang II at 40 ng · kg⁻¹ · min⁻¹, but it remained close to the values observed in saline-infused rats (≈110 mm Hg) when Ang II was infused at 10 ng · kg⁻¹ · min⁻¹. The protein expression of a 160-kDa NOS1 and a 135-kDa NOS3 were found to increase (≈200%) in the myocardium of rats infused with both suppressor and pressor doses of Ang II. Immunohistochemistry studies showed that NOS1 and NOS3 are differentially expressed in myocardial cells. NOS1 was detected in cardiac myocytes and in smooth muscle cells of small and large coronary arteries, whereas NOS3 was detected in the endothelium and in perivascular and interstitial tissues, but NOS3 was not detected in cardiac or smooth muscle cells. Ang II infusion enhanced the tissue immunoreactivity of both isoforms in their specific locations but did not change the distribution throughout the myocardium. Myocardium staining with anti-angiotensin type 1 (AT₁) receptor antibody indicated that AT₁ receptor is expressed in cardiac myocytes, coronary smooth muscle cells, and interstitial and perivascular tissues. Ang II infusion did not change the protein expression and distribution of AT₁ receptor in the myocardium. These results indicate that long-term increases in the circulating levels of Ang II modulate the protein expression of NOS1 and NOS3 and, consequently, the function of the local myocardial NO system. (*Hypertension*. 2001;37:●●●-●●●.)

Key Words: angiotensin II ■ nitric oxide ■ nitric oxide synthase ■ heart ■ myocardium

Angiotensin (Ang) II modulates cardiac function and cellular growth in response to physiological and pathological processes.¹ Many of the short- and long-term effects of Ang II on cardiac function and structure are due to its direct action on cardiac myocytes, vascular smooth muscle cells, and cardiac fibroblasts. These effects are mediated through at least 2 different types of receptors, which are broadly distributed in cardiac cells.² However, some of the cardiac effects of Ang II occur through the induction and release of paracrine/autocrine factors, such as transforming growth factor- β , and endothelin-1.^{3,4} In this context, in recent years, experimental evidence has indicated that Ang II and NO influence each other by interacting at various levels of regulation.^{5,6} This may have implications not only for the cardiac functions directly influenced by these factors but also for the pathogenesis of processes such as myocardial ischemia and fibrosis.

In general, Ang II and NO exert antagonistic effects in cellular function and growth.^{6,7} The cellular mechanisms responsible for this antagonism are not clear. In some systems, this interaction seems to be a simple summation of

the effects of Ang II and NO.^{7,8} Ang II is able to activate the NO system by inducing the secretion of NO in small and large coronary arteries. Because NO attenuates the vasoconstrictor effect of Ang II, this can cause a negative feedback system to limit the stimulation by Ang II.⁹ The antagonism of NO on Ang II effects is also seen in the growth effect of Ang II on cardiac fibroblasts.¹⁰

The mutual regulatory influence of Ang II and NO seems to extend to gene regulation. Studies performed in angiotensinogen gene-knockout mice and in rat adrenal medulla suggest that Ang II inhibits the expression of NOS1.^{11,12} In rats, however, long-term infusion of high doses of Ang II increases the expression of NO synthases 1 (NOS1) and 3 (NOS3) in the renal cortex but reduces NOS1 expression in the renal medulla.⁸ The influence of Ang II on the regulation of the constitutively expressed isoforms of NOS in the myocardium remains virtually unexplored.

Thus, the present study was designed to examine the effect of long-term increases in circulating levels of Ang II on the expression, and the cardiac tissue distribution of the constitutive isoforms of NOS (ie, NOS1 and NOS3). Experiments

Received September 7, 2000; first decision October 2, 2000; revision accepted December 4, 2000.

From the Department of Internal Medicine, School of Medicine, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Correspondence to Kleber G. Franchini, MD, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária "Zefferino Vaz," 13081-970 Campinas, SP, Brasil. E-mail franchini@obelix.unicamp.br

© 2001 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://www.hypertensionaha.org>

were also performed to examine the protein expression and the tissue distribution of angiotensin type 1 (AT_1) receptors in the left ventricle of rats treated or not treated with Ang II.

Methods

The experiments were performed on male Wistar rats (270 to 300 g) obtained from animal facilities of the State University of Campinas (Campinas, SP, Brazil). All procedures followed the university's guidelines for the use of animals in experimental studies.

Antibodies and Chemicals

Rabbit polyclonal antibodies raised against NOS1, NOS3, and AT_1 were purchased from Santa Cruz Biotechnology. ^{125}I -labeled protein A was from Amersham. Ang II was from Calbiochem. All other reagent grade chemicals were from Sigma.

Rat Instrumentation and Arterial Pressure Monitoring

All surgical procedures were performed under aseptic conditions. Rats were anesthetized with a mixture of ketamine (70 mg/kg body wt IM) and diazepam (6 mg/kg body wt IM) and maintained at 37°C. Tygon-tipped polyvinyl cannulas were placed in the lower abdominal aorta and inferior vena cava throughout the femoral artery and vein, respectively. The cannulas were exteriorized at the back of the neck in a 25-cm length of stainless steel spring (0.5-cm diameter) attached to a swivel (Instech) at the top of an individual cage that allowed the animal to move freely in its cage while being infused. The animals received single doses of antibiotic (Pentabiotico Veterinário, 100 mg/kg body wt) and were allowed to recover for 5 days before the study. During this period, 0.9% saline was infused continuously through the venous catheter at a rate of 0.5 mL/h. After this period, saline was substituted for Ang II solutions in 2 different concentrations (10 and 40 ng $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ min $^{-1}$) in the experimental animals, while control animals continued to receive only saline.

Arterial pressure was monitored daily for 6 days for a 1-hour period from 3:00 to 4:00 PM. The amplified signal was recorded on a beat-to-beat basis and sampled at 100 Hz with WINDAQ-PRO data acquisition software (DATAQ Instruments).

Tissue Homogenization

At the end of day 6 of Ang II infusion, the animals were anesthetized, hearts were rapidly removed, and the ventricles were minced coarsely and homogenized in $\approx$ 10 volumes of solubilization buffer (1% Triton-X 100; 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4); 100 mmol/L sodium pyrophosphate; 100 mmol/L sodium fluoride; 10 mmol/L EDTA; 10 mmol/L sodium vanadate; 2 mmol/L PMSF; and 0.1 mg aprotinin/mL) at 4°C with the polytron operated at maximum speed for 30 seconds. The extracts were centrifuged at 10 000g at 4°C for 30 minutes, and the supernatant was used for the assay. Protein concentrations were determined with the Bradford dye binding method. The supernatant was treated with Laemmli's sample buffer containing 100 mmol/L dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 4 minutes and then subjected to SDS-PAGE (8% bis-acrylamide) in a Bio-Rad miniature gel apparatus (Mini-Protein, Bio-Rad Laboratories). An equal amount of total protein was used for all samples. Electrophoretic transfer of proteins from the gel to nitrocellulose membrane was performed for 90 minutes at 120 V (constant).

Protein Analysis by Immunoblotting

The nitrocellulose membrane was preincubated in blocking buffer (5% nonfat dry milk, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20) overnight at 4°C. The membrane was then incubated with anti-NOS1, anti-NOS3, or anti- AT_1 receptor antibodies diluted in 10 mL of blocking buffer (3% BSA instead of nonfat dry milk) overnight at 4°C and washed for 60 minutes in blocking buffer without milk or BSA. The blots were subsequently incubated with 2 μ Ci of ^{125}I -labeled protein A (30 μ Ci/ μ g) in 10 mL of blocking buffer for 2 hours at room temperature, and then washed again for 30 minutes as described above. ^{125}I -labeled protein A bound to the

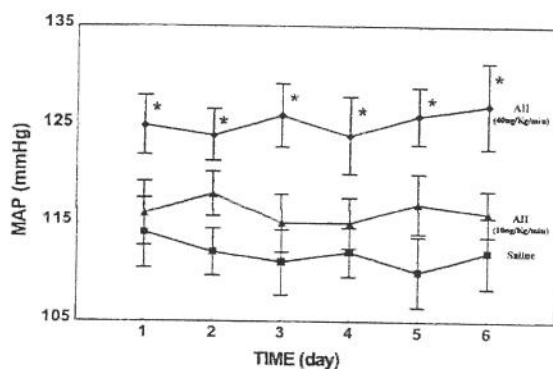


Figure 1. Effects of a 6-day infusion of Ang II and saline ($n=7$) on mean arterial pressure (MAP). Ang II was infused at rates of 10 ($n=8$) and 40 ng ($n=7$) $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ min $^{-1}$. * $P<0.05$ vs values of saline-infused rats.

specific antibodies was detected by autoradiography. Band intensities were quantified by optical densitometry of the developed autoradiographs.

Tissue Preparation for Immunohistochemistry

Rats were heparinized, deeply anesthetized with pentobarbital sodium, and euthanized with a lethal dose of lidocaine. The ventricles were fixed by overnight immersion with 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.4, and processed to inclusion in Histotec (Merck). Sections (5 μ m) were transferred to poly-L-lysine-coated glass slides. The endogenous peroxidase activity was blocked by treatment with 0.03% H_2O_2 in 0.1 mol/L PBS at room temperature for 30 minutes. The sections were preincubated in blocking buffer (5% nonfat dry milk on 0.1 mol/L PBS) for 45 minutes at 37°C, followed by overnight incubation with the primary antibodies anti-NOS1, anti-NOS3, and anti- AT_1 (1:50) at 4°C. The sections were extensively rinsed in 0.05 mol/L PBS and incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:100) for 2 hours at 25°C. After washing as above, sections were subjected for 5 minutes to freshly prepared diaminobenzidine that contained H_2O_2 (0.8%). Secondary antibody specificity was tested in a series of positive and negative control measurements. In the absence of primary antibodies, application of secondary antibodies (negative controls) failed to produce any significant staining.

Statistical Methods

Data are mean $\pm$ SEM of absolute (arterial pressure) or percent (blots) values. Differences among mean values were tested with a 2-way ANOVA for repeated measurements. Bonferroni's multiple-range test was used as a post hoc analysis if the probability from the F test was <0.05 .

Results

Effect of Ang II Infusion on Arterial Pressure

Figure 1 summarizes the effects of saline and Ang II infusion on mean arterial pressure over the course of a 6-day period (saline $n=7$, 10 ng $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ min $^{-1}$ Ang II $n=8$, 40 ng $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ min $^{-1}$ Ang II $n=7$). The mean arterial pressure of saline-infused rats remained stable at $\approx$ 110 mm Hg during the experimental period. No significant change was observed in mean arterial pressure of rats infused with Ang II at 10 ng $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ min $^{-1}$, but rats infused with Ang II at 40 ng $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ min $^{-1}$ showed a sustained increase in mean arterial pressure of $\approx$ 15 mm Hg compared with saline-infused rats.

Effect of Ang II Infusion on Myocardial Expression and of NOS1, NOS3, and AT_1

Representative Western blots and the average values ($n=5$) of densitometric readings of blots obtained with anti-NOS1

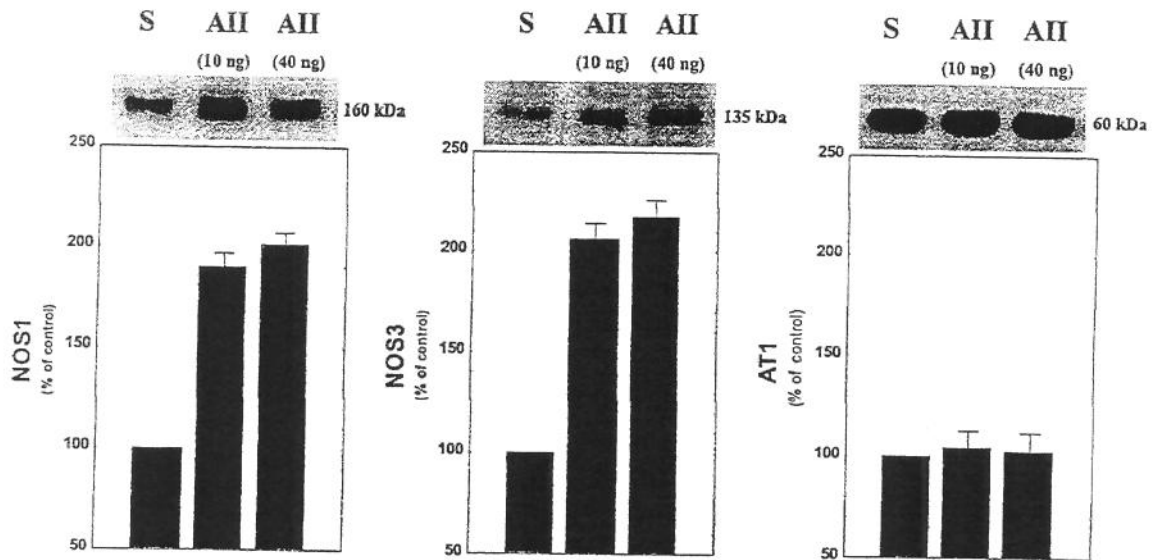


Figure 2. Ang II enhances the protein expression level of NOS1 and NOS3. Representative blots and average values (5 experiments) of myocardial expression of NOS1, NOS3, and AT₁ receptor in saline- (S) and Ang II-infused rats. NOS1 and NOS3 indicate isoforms 1 and 3 of NOS. * $P < 0.05$ vs values of saline-infused rats.

and anti-NOS3 antibodies are shown in Figure 2A and 2B. Single bands of 160 and 135 kDa were observed in blots of myocardial homogenates stained with anti-NOS1 and anti-NOS3 antibodies, respectively. Infusion of Ang II increased the protein expression levels of both NOS1 and NOS3 by $\approx 200\%$. Ang II infused at 10 and 40 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ produced similar increases in the protein expression levels of NOS1 and NOS3.

A single 60-kDa band was observed in Western blots of the myocardium homogenates stained with anti-AT₁ antibody (Figure 2C). Comparable protein expression levels of AT₁ receptor were observed in saline- and Ang II-infused rats.

Effect of Ang II Infusion on Myocardial Distribution of NOS1, NOS3, and AT₁

Figure 3 shows the NOS1 staining in the left ventricle of saline- (Figure 3A and 3C) and 10 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ Ang II-infused rats (Figure 3B and 3C). NOS1 staining was detected in cardiac myocytes (Figure 3A and 3B, arrows) and in the smooth muscle cells of small and large coronary vessels (Figure 3C and 3D, arrows and asterisks). No significant staining for NOS1 was detected in the endothelium or in the perivascular tissues (Figure 3C and 3D). Remarkable increases of NOS1 staining intensity were observed in cardiac myocytes and in the smooth muscle cells of coronary arteries of rats infused with Ang II. This effect was similar for Ang II infused at rates of 10 and 40 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (data not shown).

NOS3 staining was detected (Figure 4A and 4B) in the endothelium (arrowheads) and in perivascular and interstitial tissues (asterisks) of myocardial small and large coronary arteries. Virtually no reaction product was detected within the media of coronary arteries (Figure 4A and 4B) or cardiac myocytes (data not shown). Infusion of Ang II increased the staining intensity of both the perivascular and interstitial tissues and apparently left the endothelium staining un-

changed. Again, this effect was similar for both Ang II infusion rates (data not shown).

Figure 5A and B shows the AT₁ receptor staining in the myocardium of saline- and Ang II-infused rats. AT₁ receptor was detected in cardiac myocytes (arrows), in the smooth muscle cells of small and large coronary arteries (arrowheads), and in the perivascular and interstitial tissues. No remarkable difference in the intensity or the distribution of the signal was detected in saline- or Ang II-infused rats (data not shown).

Discussion

The present study showed that long-term infusion of Ang II enhances the protein expression of NOS1 and NOS3 in the rat myocardium. This effect was not dependent on the pressor effect of Ang II because similar increases in the myocardial NOS1 and NOS3 protein levels were found in rats infused with subpressor and pressor doses of this hormone. Myocardial staining with specific antibodies against NOS1 and NOS3 confirmed and extended the observation of Western blot experiments to show that NOS1 and NOS3 are differentially expressed in myocardial cells. NOS1 was detected in cardiac myocytes and in smooth muscle cells of small and large coronary arteries, but it could not be detected in the endothelium or perivascular and interstitial tissues. However, NOS3 was detected in the endothelium and perivascular and interstitial tissues, but it was not detected in cardiac myocytes or in coronary smooth muscle cells. Ang II infusion enhanced the tissue immunoreactivity for both NOS1 and NOS3 in their specific locations, but it did not change the distribution of these isoforms in myocardial structures. Finally, the myocardium staining with anti-AT₁ antibody indicated that the AT₁ receptor, the major effector of cardiac effects of Ang II, is expressed in cardiac myocytes, smooth muscle cells of coronary vessels, and perivascular and interstitial tissue. These data are compatible with the notion that Ang II

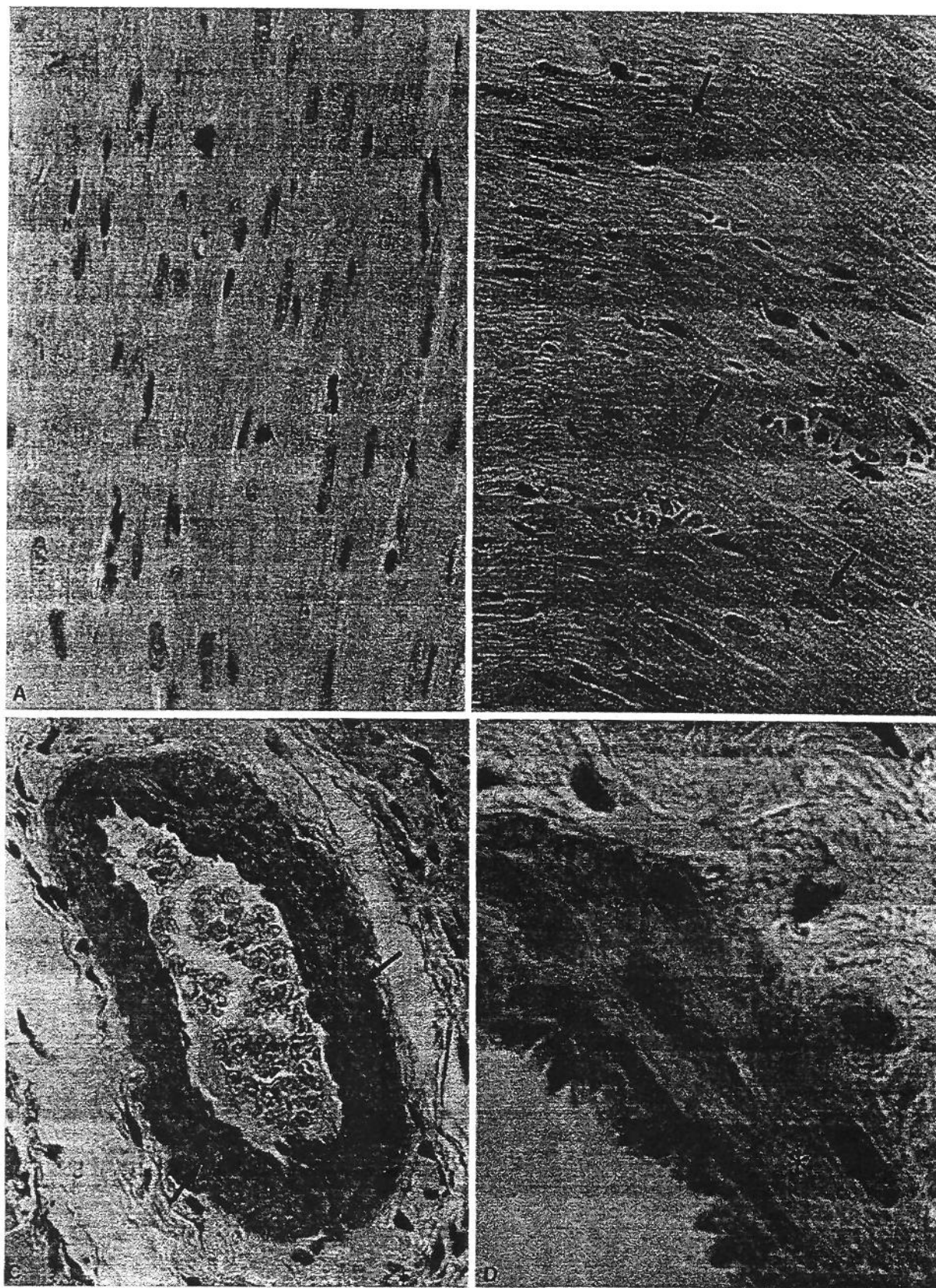


Figure 3. Light photomicrographs of sections of left ventricle from rats infused with saline (A, C) and Ang II ($10 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) stained with anti-NOS1 antibody. These are representative examples of 5 different experiments. A, Cardiac myocytes demonstrating a light positive staining in saline-infused rats. B, Cardiac myocytes of a rat subjected to Ang II infusion, showing a marked staining for NOS1 (arrows). C, A large coronary artery of a rat infused with saline, demonstrating a light staining of smooth muscle cells (arrows). D, High magnification of a large coronary artery of Ang II-infused rat, demonstrating an intense staining of smooth muscle cells (asterisks).

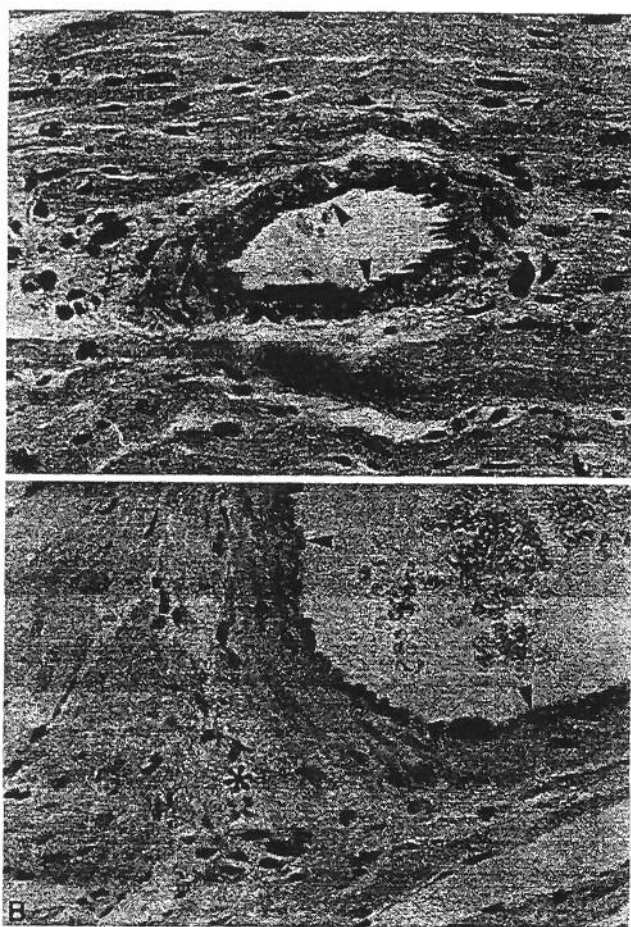


Figure 4. Myocardial distribution of NOS3. A, Representative example of a coronary artery of a saline-infused rat. NOS3 staining is observed in endothelium (arrowheads) and in perivascular tissue (asterisks). B, Representative example of a coronary artery of a rat treated with Ang II ($10 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). NOS3 is also observed in the endothelium and perivascular tissue (arrowheads and asterisk).

modulates the protein expression of NOS1 and NOS3 and, consequently, the function of the NO system in the myocardial cells.

Although the results of the present study indicate that Ang II may regulate the expression of NOS1 and NOS3 in the rat myocardium, the mechanisms responsible for this phenomenon were not explored in the present study. However, because the effects of Ang II on NOS1 and NOS3 protein expression were demonstrated to be independent of the pressor effect of this hormone, it is reasonable to ascribe the enhanced expression of these NOS isoforms to the action of Ang II on myocardial cells, either directly or indirectly through the local release of autocrine/paracrine factors.

The mechanisms for the regulation of NOS1 and NOS3 expression in the myocardium are virtually unknown. However, the NOS1 promoter region has *cis*-acting elements such as AP-2, transcriptional enhancer factor-1, cAMP response binding element, and nuclear factor- κ B, whereas NOS3 promoter region has Sp1, GATA, and cAMP-responsive element.¹³ Accordingly, Ang II regulates the activity of transcription factors such as nuclear factor- κ B and GATA-4 in vascular smooth muscle cells and cardiac myocytes,

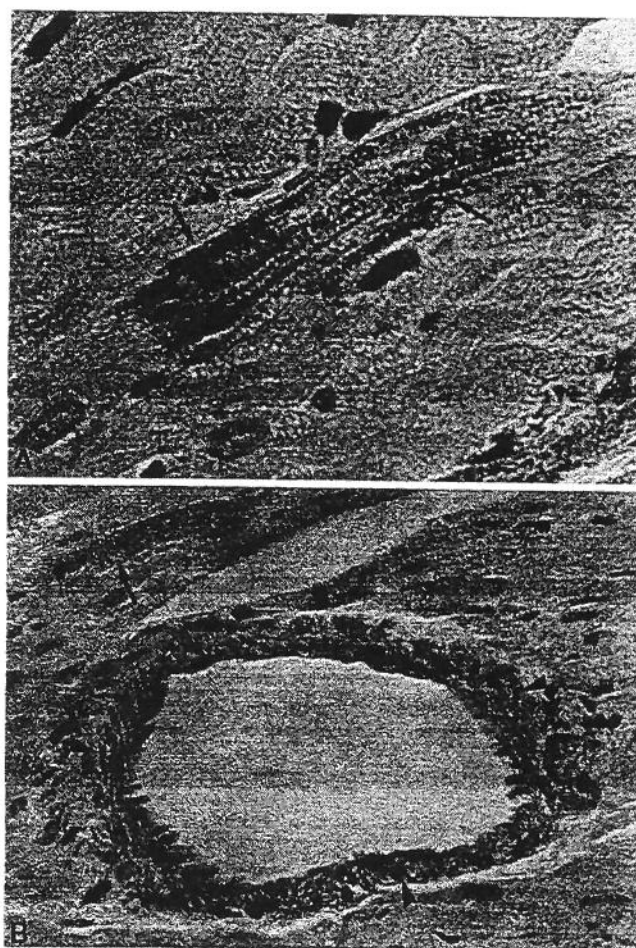


Figure 5. Representative examples of myocardial distribution of AT₁ receptors in saline-infused rats. A, Immunostaining of cardiac myocytes (arrows). B, Immunostaining of vascular smooth muscle of a coronary artery (arrowheads).

respectively.^{14,15} These mechanisms could be implicated in the regulation of NOS1 and NOS3 expression during Ang II infusion. In addition, Ang II upregulates the cardiac expression of various growth factors such as transforming growth factor- β_1 , platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor, which potentially can induce gene expression, including the constitutive isoforms of NOS.¹³

Although NOS1 and NOS3 are known to be expressed in the heart, the cellular distribution of these 2 isoforms is still not clear.¹³ The anatomic distribution and physiological roles of NOS1 in the heart have been the subjects of relatively few reports to date. Early reports indicated that NOS1 is expressed exclusively in the myocardial neurons.¹⁶ More recent studies, however, demonstrated that cardiac myocytes, in addition to the neurons, indeed stain for NOS1.¹⁷ Our present data show that in addition to cardiac myocytes, NOS1 is also expressed in smooth muscle cells of coronary arteries. This localization of NOS1 in cardiac and smooth muscle cells may indicate a tissue-specific regulation. Accordingly, it is now well accepted that cardiac, skeletal, and smooth muscle cells express μ NOS1, an elongated splice variant of NOS1.^{18,19} Whether or not the product detected in the present study is the μ NOS1 isoform needs further study.

The results of the present study show a remarkable difference in the distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardial cells. In addition to the expected endothelial location of NOS3, it was also detected in the interstitial and perivascular tissues. Increases in the staining produced by Ang II infusion were easily detected in the interstitial and perivascular tissues, but no staining could be detected in the endothelium. The reason for the absence of detectable changes in the NOS3 staining in the endothelium could be related to the narrow space occupied by the endothelial cell, which makes conclusions difficult in regard to changes in NOS3 expression by immunohistochemical analysis. The increases of NOS3 protein expression in cardiac interstitial and perivascular tissues induced by Ang II could be due to the well-known effect of angiotensin II on interstitial tissue proliferation and fibrosis.

NOS3 was not detected in significant amounts in cardiac myocytes. Although this result agrees with some of the early studies, it contrasts with more recent studies showing that cardiac myocytes indeed express NOS3.¹⁷ The reason for this discrepancy is not clear but could be related to antibody specificity against certain isoforms of NOS3 in cardiac myocytes.

Finally, we have shown that AT₁ receptor is also expressed in cardiac and vascular smooth muscles, as well as in interstitial and perivascular tissues, the structures in which the increases in protein expression of NOS1 and NOS3 were detected. This suggests that Ang II could enhance NOS1 and NOS3 expression via AT₁ receptor. However, the mediation via the angiotensin type 2 receptors is also possible.

In conclusion, the present study demonstrates that long-term infusion of Ang II is accompanied by an increase in the protein expression of NOS1 and NOS3 in the cells of rat myocardium, independent of changes in arterial pressure. The present data also provide evidence that NOS1 and NOS3 are differentially distributed in cardiac myocytes, coronary vessels, and interstitial tissue and that these NOS isoforms are upregulated by Ang II in these specific locations. The Ang II upregulation of NOS1 and NOS3 in myocardial cells could account for the impairment of the direct contractile and growth effects of this hormone on vascular smooth muscle cells, cardiac myocytes, and fibroblasts when plasma or tissue levels of Ang II are increased. This may favor functions such as local blood flow, modulation of oxygen consumption, and inhibition of fibroblasts, vascular smooth muscle cells, and cardiac myocyte growth effects of Ang II.

Acknowledgments

This study was sponsored by grants from Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. 98/11403-7) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Proc. 521098/97-1).

References

- Weber KT, Brilla CG. Pathologic hypertrophy and the cardiac interstitium: fibrosis and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991;83:1849-1865.
- Sadoshima J, 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;73:413-423.
- Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, Karliner JS. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF β and endothelin from fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 1998;40:352-363.
- Kupfahl C, Pink D, Friedrich K, Zurbrugg HR, Neuss M, Wamecke C, Fielitz J, Graf K, Fleck E, Zagrosek VR. Angiotensin II directly increases transforming growth factor β 1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart. *Cardiovasc Res*. 2000;46:463-475.
- Li D, Tomson K, Yang B, Mehta P, Croker BP, Mehta JL. Modulation of constitutive nitric oxide synthase, bcl-2 and Fas expression in cultured human coronary endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation and angiotensin II: role of AT₁ receptor activation. *Cardiovasc Res*. 1999;41:109-115.
- Ritchie RH, Schiebinger RJ, Lapointe MC, Marsh JD. Angiotensin II-induced hypertrophy of adult rat cardiomyocytes is blocked by nitric oxide. *Am J Physiol*. 1998;275:H1370-H1374.
- Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Levy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res*. 1998;83:1271-1278.
- Chin SY, Pandey KN, Shi S-J, Kobori H, Moreno C, Navar LG. Increased activity and expression of Ca²⁺-dependent NOS in renal cortex of Ang II-infused hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1999;277:F797-F804.
- Hennington BS, Zhang H, Miller MT, Granger JP, Reckelhoff JF. Angiotensin II stimulates synthesis of endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension*. 1998;31:283-288.
- Rizvi MA, Myers PR. Nitric oxide modulates basal and endothelin induced coronary artery vascular smooth muscle cell proliferation and collagen levels. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:1779-1789.
- Kihara M, Umemura A, Kadota T, Yabana M, Tamura K, Nyuui N, Ogawa N, Murakami K, Fukamizu A, Ishii M. The neuronal isoform of constitutive nitric oxide synthase is up-regulated in the macula densa of angiotensinogen gene-knockout mice. *Lab Invest*. 1997;76:285-294.
- Iwai N, Hanai K, Tooyama I, Kitamura Y, Kinoshita M. Regulation of neuronal nitric oxide synthase in rat adrenal medulla. *Hypertension*. 1995;25:431-436.
- Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 1999;43:509-520.
- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Konig S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor κ B through AT₁ and AT₂ in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res*. 2000;86:1266-1272.
- Herzig TC, Jobe SM, Aoki H, Molkentin JD, Cowley AW, Izumo S, Markham BE. Angiotensin II type 1a receptor gene expression in the heart: AP-1 and GATA-4 participate in the response to pressure overload. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94:7543-7548.
- Shah AM, McCarthy PA. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Therap*. 2000;86:49-86.
- Feron O, Bellhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae: specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem*. 1996;271:22810-22814.
- Silvagno F, Xia H, Bredt DS. Neuronal nitric oxide synthase m, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1996;271:11204-11208.
- Schwarz PM, Kleinert H, Förstermann U. Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase 1 expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2584-2590.

10. Anexo 2

IMPAIRMENT OF INSULIN SIGNALING INDUCED BY LONG-TERM INCREASES OF ANGIOTENSIN II

Authors: Rosa C. Tambascia, Miriam Ueno, Maria Esméria C Amaral, Everardo M. Carneiro, Mario J. A. Saad, Kleber G. Franchini.

Department of Internal Medicine, School of Medicine

State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Address for correspondence:

Kleber G. Franchini, MD.
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas
Cidade Universitária "Zefferino Vaz"
13081-970 Campinas, SP. Brasil.
Phone/Fax: (55) (19) 3788 8950.
E.Mail: franchin@obelix.unicamp.br

Running Head: Angiotensin II and insulin resistance.

This study was sponsored by grants from FAPESP - Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 98/11403-7) and CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Proc. 521098/97-1).

ABSTRACT

We have examine the influence of long-term infusion of angiotensin II (AII) on insulin sensitivity and action on liver and skeletal muscle of rats. Rats were continuously infused with saline or AII-10 and 40 ng/Kg/min for 6 consecutive days. Arterial pressure (AP) was daily monitored with a computer system (1 hour, beat-to-beat). Insulin sensitivity was evaluated by insulin tolerance test (ITT) performed at the 5th day of AII or saline infusion. Insulin plasma levels were determined at the end of the 6th infusion day. Insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor (IR), insulin receptor substrates 1 and 2 (IRS1, IRS2) were evaluated in liver (L) and skeletal muscle (M) at the 6th experimental day. AP remained stable at ~110 mmHg in saline infused rats along the experimental period. AII-10 did not change the AP significantly, but AII-40 increased mean arterial pressure by ~25 mmHg. The rate constant for plasma glucose decay (K_{ITT}) induced by an insulin challenge was attenuated by ~38% in rats infused with AII. AII-10 and AII-40 markedly attenuated the insulin-induced activation of IR, IRS-1 and IRS-2, as indicated by the reduction of of insulin-induced tyrosine phosphorylation of these proteins to 30-50% in liver and skeletal muscle of AII infused rats. These effects were similar whether subpressor or pressor doses were used, implying that this effect of AII is independent of its pressor influence. Impairment of the initial steps of insulin signal transduction pathway may be the cause for the insulin resistance observed in AII infused rats.

Key Words: Insulin, Insulin resistance, Angiotensin II, Hypertension, Risk Factor.

INTRODUCTION

Angiotensin II (AII) plays a major role in the regulation of the cardiovascular and renal functions (1, 2). Several lines of evidence support the contribution of AII, individually or synergistically, with other factors to the pathogenesis of cardiovascular affections such as hypertension and ischemic heart disease (3, 4). In addition, the state of the renin-angiotensin system (RAS) has been suggested as an isolated factor that might influence the cardiovascular risk (5, 6). Attenuation on salt regulation of RAS, metabolic abnormalities associated with insulin resistance and a familial predisposition to both hypertension and myocardial infarction cluster on subset of individuals known as “non-modulators” of RAS (7, 8). Treatment of these individuals with converting enzyme inhibitors, not only is efficacious to high blood pressure control but may also correct abnormalities associated with insulin resistance (9, 10, 11, 12). Overall, these data are compatible with the notion that primary defects in the regulation of RAS may influence the insulin sensitivity.

The studies exploring the influence of AII, the major effector of RAS, on insulin sensitivity have yielded conflicting results. Systemic and local infusion of AII in human volunteers have been reported to increase the insulin sensitivity, an effect attributed to the hemodynamic effects of this hormone (13, 14, 15). On the other hand, studies in rats and dogs have provided evidence that AII may indeed reduce the insulin sensitivity (16, 17). Accordingly, studies have shown that AII may directly reduce the insulin action in cell culture systems, cardiac tissue and smooth muscle cells (18, 19, 20, 21). This suggests that overactivity of RAS is likely to induce insulin resistance by a direct action of AII on insulin signaling pathway. The reason for such discrepancies on the influence of AII on insulin sensitivity are not clear. However, it might be that variable AII doses and experimental settings (eg acute vs chronic, intact animals vs cell culture), and, obviously, differences in

the species used in the various studies contribute for the discrepancies. Presently, we studied the influence of chronic infusion of subpressor and pressor doses of AII on insulin sensitivity, plasma insulin concentration and on the initial steps of insulin signalling pathway in rats.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and Chemicals. Polyclonal antibodies against insulin receptor (IR), insulin receptor substrates 1 and 2 (IRS-1, IRS-2) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Monoclonal antibody against phosphotyrosine (4G10) was from Upstate Biotechnology. Affinity-purified rabbit anti-mouse IgG was from Dako. [125 I]protein-A was from Amersham and Protein A-Sepharose 6MB was from Pharmacia. AII was from Calbiochem. All other reagent grade chemicals were from Sigma.

Animals. The experiments were performed on adult male Wistar rats (260-330 g) obtained from the university's Central Animal House. The rats were housed with food and water provided *ad libitum*. All procedures and the care of the rats were in accordance with institutional guidelines for animal use in research.

Rat instrumentation. Surgical procedures for femoral artery and venous catheter implantation were performed under aseptic conditions as described before (22). The cannulas were exteriorized at the back of the neck in a 25-cm length of stainless steel spring which was attached to a swivel (Instech, USA) at the top of an individual cage to allow the animal to move freely about its cage while being infused.

Arterial pressure monitoring. Pulsatile arterial pressure was monitored daily for 6 consecutive days in an 1 hour period (from 15:00 to 16:00 h) by a computerized system

(beat-to-beat, sampled at 100 Hz) running a WINDAQ-PRO Data Acquisition software (DATAQ Instruments, Akron, USA).

Insulin tolerance test. This test was performed for the estimation of insulin sensitivity in conscious rats as described before (23, 24). Briefly, after a baseline sample blood collection (100 μ l) for plasma glucose concentration measurement, the rats received an intravenous injections of insulin (6 μ g of insulin in 0.5 ml of saline) and plasma glucose was determined at 4, 8, 12, and 16 min after the injection. Plasma glucose concentration was measured by the glucose oxidase method and the rate constant for plasma glucose decay (Kitt) was calculated from the formula $0.693/t_{1/2}$ (23). Plasma glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least square analysis of the plasma glucose concentration during the linear phase of decline (23, 24).

Plasma insulin. At the end of the 6th day of AII or saline infusion a blood sample (200 μ l) was taken from the rats for insulin plasma concentration determination by radioimmunoassay as previously described (25).

Tissue preparation and protein analysis by immunoblotting. At the end of experimental period the rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/Kg; i.p.) and tissue samples (~50mg) of liver and skeletal muscle (gastrocnemius) were collected after a bolus injection of saline (0.2 ml) or insulin (6 μ g). The samples were then minced coarsely and homogenized immediately in approximately 10 volumes of solubilization buffer as described before (23). Protein concentrations were determined with the Bradford dye binding method and equal amount of total protein was pipeted in each vial used for immunoprecipitation with antibodies against IR, IRS-1 and IRS-2. The immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE protein separation. Aliquots of precipitated proteins

were treated with Laemmli sample buffer and heated in boiling water bath for 4 min, after which they were subjected to SDS-PAGE. The proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane which were blotted with anti-IR, IRS-1, IRS-2 (1 µg/ml) and anti-phosphotyrosine (1.5 µg/ml) antibodies. The blots were subsequently incubated with 2 µCi of [¹²⁵I]protein A (30 µCi/µg) and developed with a preflashed Kodak XAR film with Cronex Lightning Plus intensifying screens at -80°C for 24 h. Band intensities were quantified by optical densitometry of the developed autoradiographs.

Experimental design. The animals were maintained in individual cages and allowed to recover for 3 days before the study. During this period saline 0.9% was infused continuously through the venous catheter at a rate of 0.5 ml/h. At the 3rd post-operative day saline was substituted by saline solutions of AII infused at 10 (AII-10) and 40 (AII-40) ng/Kg/min in two different groups of rats while saline was continued in a third group. After the arterial pressure monitoring sessions blood samples were collected for plasma glucose determination. ITT was performed at the end of the 5th day of the experimental protocol. At the end of 6th day blood sample was collected for the analysis of plasma insulin concentration. Thereafter, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/Kg). A single dose of insulin (6 µg in 200 µl of saline) was infused intravenously and after 90 s samples of tissues were collected for immunoblotting analysis. After the tissue collection the animals were sacrificed with a lethal dose of sodium pentobarbital.

Statistical methods. Data are presented as means ± SE of absolute values (Arterial Pressure, ITT) or percent values in comparison with control period. Differences among mean values

were tested with a two-way ANOVA for repeated measurements. A Bonferroni's multiple-range test was used as a post hoc analysis if the probability from the F-test was <0.05 .

RESULTS

Effect of AII on arterial pressure. Figure 1 summarizes the daily mean arterial pressure of conscious rats infused with saline (S; $n=16$), AII at 10ng/kg/min (AII-10; $n=13$) and AII at 40 ng/kg/min (AII-40; $n=16$) along 6 days. The average mean arterial pressure of saline infused rats remained stable at ~ 110 mmHg during this period. AII-10 did not change mean arterial pressure significantly, compared to saline infusion, while AII-40 produced a sustained increase of ~ 25 mmHg.

Effect of AII infusion on insulin sensitivity and plasma levels. Fasting plasma levels determined after 1, 3 and 5 days of AII infusion were found to be similar to those of saline infused rats (Table 1). The insulin sensitivity was tested by insulin tolerance test (ITT) performed at the 5th experimental day. The plasma glucose disappearance rate (K_{ITT}) was found to be significantly lower in AII-10 and AII-40 compared to saline infused rats (Table 1). Although fasting plasma glucose levels were similar in the three groups of rats, plasma insulin levels were detected to be significantly higher in rats infused with AII. Fasting plasma insulin levels measured at the 6 day of the experimental protocol were found to be significantly increased (Table 1) in AII-10 and AII-40, respectively, compared with the levels of saline infused rats.

Effect of AII on insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IR, IRS-1 and IRS-2 in liver and skeletal muscle.

The IR β -subunit, which contains an intrinsic tyrosine kinase, undergoes a rapid tyrosine autophosphorylation and is activated in response to insulin binding to the

extracellular α -subunit of the receptor. In addition, the increase in tyrosine phosphorylation of IR allows its transient interaction with intracellular protein substrates, including IRS-1 and IRS-2 via their phosphotyrosine binding domains (PTB domains) (26,27,28,29). This is followed by a tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 on YMXM/YXXM motifs that induces their binding to Src homology 2-domain (SH-2) containing molecules, which include phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), Grb2, SHP2, NCK, and Fyn (26, 28, 30, 31). These events and pathways initiate the cellular signaling mechanisms responsible for the major metabolic and growth effects of insulin. To investigate the potential mechanisms responsible for the decrease in insulin sensitivity induced by AII, the effects of insulin infusion on tyrosine phosphorylation content of IR, IRS-1 and IRS-2 were examined in AII-10, AII-40 and saline infused rats. Samples of liver and skeletal muscle were harvested, homogenized and then IR, IRS-1 and IRS-2 were immunoprecipitated with specific antibodies. The immunoprecipitates were then resolved in SDS-PAGE and immunoblotted with the specific antibodies for the determination of protein expression levels and with monoclonal anti-phosphotyrosine antibody for tyrosine phosphorylation analysis.

As indicated in the representative examples of figure 2 the protein expression levels of IR, IRS-1 or IRS-2 in the liver and skeletal muscle were not affected by the 6-day infusion of AII.

Insulin infusion increased the tyrosine phosphorylation level of the 95kDa band of IR by 8.6 and 7.8 fold in liver and skeletal muscle of saline infused rats, respectively (Fig. 3). The baseline tyrosine phosphorylation content of IR was found to be unaffected by AII infusion. AII greatly attenuated the insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR. In the

liver of rats infused with AII-10 and AII-40 insulin increased tyrosine phosphorylation of IR only by 3.8 and 3 fold, respectively, which represented an attenuation to ~40% in this effect of insulin. Similar attenuation in the insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR was observed in the skeletal muscle of rats infused with AII.

AII did not change significantly the baseline tyrosine phosphorylation levels of IRS-1 (Fig. 4). In saline infused rats insulin injections induced a rapid and marked increase in tyrosine phosphorylation of IRS-1, more evident in the skeletal muscle (12-fold) than in the liver (6-fold). AII-10 and AII-40 attenuated the insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS-1 either in the liver and in skeletal muscle to ~35%.

The baseline tyrosine phosphorylation of IRS-2 was found to be increased by 4-5-fold in the liver of rats infused with AII compared to saline. However, AII did not change the baseline tyrosine phosphorylation of IRS-2 in the skeletal muscle compared to saline. In the liver of saline infused rats, insulin injection increase IRS-2 tyrosine phosphorylation by 10-fold, while in skeletal muscle this increase was of 4-fold (Fig. 5). In both tissues, this effect was greatly attenuated in rats infused with AII-10 and AII-40.

DISCUSSION

The results of the present study provide evidence that increased circulating levels of AII reduces the insulin sensitivity in rats. This was indicated by the attenuation of the hypoglycemic response induced by an intravenous challenge of insulin and by the increases in the fasting insulin plasma levels in rats infused with AII, despite the fact that they were euglycemic. Whereas this represents the standard for assessing insulin sensitivity, fasting hyperinsulinemia and, in particular, an attenuation in the hypoglycemia induced by insulin

in ITT are generally recognized as excellent indicators of peripheral tissue resistance to insulin-mediated glucose uptake (23, 24, 32). These effects were independent of the AII doses, as well as, of the pressor effect of this hormone as indicated by the similar reductions in insulin sensitivity seen in rats receiving sub-pressor or pressor doses of AII. The results were extended to explore the influence of AII infusion on the early steps of insulin cell signalling mechanisms. The reduction in the insulin sensitivity induced by the AII infusion was paralleled by a marked attenuation of the insulin-induced activation of IR, accompanied by a similar reduction in the activation of IRS-1 and IRS-2 in the liver and skeletal muscle. This was indicated by the marked reduction of the insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR, IRS-1 and IRS-2. These effects on insulin signal transduction mechanisms were similar for both AII-10 and AII-40 ng/Kg/min. Overall, these results indicate that a long-term infusion of AII reduces the insulin sensitivity in rats explained, at least partially, by the reduction in the ability of insulin to activate the early steps of the insulin signalling pathway in target tissues.

The marked attenuation in the insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR, IRS-1 and IRS-2 in liver and skeletal muscle of AII-infused rats indicate that this hormone causes insulin resistance by influencing the early steps of insulin signalling pathway. Accordingly, a cross-talk between AII and insulin have been shown to occur at multiple levels of insulin signaling pathway in cardiac and vascular smooth muscle and various cell lineages (19, 20, 21, 22). G protein-coupled receptors including AT1 receptor can trigger autophosphorylation of receptor tyrosine kinases (RTK), a phenomenon referred to as RTK transactivation (33, 34, 35, 36, 37, 38). AT1 receptors transactivates the receptors for platelet-derived growth factor (36), epidermal growth factor (37), and insulin-like growth factor (38). One could speculate that this mechanism would be responsible for the increase

in baseline tyrosine phosphorylation of IR in skeletal muscle of AII infused rats, however it remains to be demonstrated that activation of AT1 receptors transactivates IR. On the other hand, activation of AT2 receptors has been shown to inhibit autophosphorylation of IR β -subunit, despite the fact that it does not interfere with the insulin binding properties of IR (39). This effect has been shown to be accompanied by an impairment of the insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS-1. These data indicate that AII activation of AT1 and AT2 receptors may inhibit the normal interactions between the insulin signalling pathway components which would explain the negative modulation of insulin signaling by AII seen in the present study. The expression of both types of AII receptors in the hepatocytes and skeletal muscle fibers(40, 41) further support this hypothesis.

Another possible mechanism for the reduction in insulin sensitivity induced by AII involves changes in regional blood flow. Acute reductions of skeletal muscle blood flow by infusion of vasoconstrictors reduces the glucose uptake and also the insulin clearance (42, 43, 44, 45, 46, 47). Studies that explored the relationship between local hemodynamic effects of AII and insulin sensitivity have yielded conflicting results. In euglycemic human volunteers, systemic infusion of AII at pressor doses were reported to increase, rather than to decrease skeletal muscle blood flow (13, 14, 44). This has been shown to be followed by an increase in insulin sensitivity, indicating that this effect is related to the hemodynamic influence of AII, an assumption confirmed in studies using intra-arterial infusion of AII (15). Other reports demonstrated that acute infusion of subpressor and pressor doses of AII had no effect on glucose disposal by skeletal muscle (48). Our present results showing a marked attenuation of insulin sensitivity in AII-infused rats agree with other studies in rats (16) and dogs (17) which also found evidence of AII-induced insulin resistance. These

differences could be explained by different responses of regional vasculature to the vasoconstrictor effect of AII in different species (49, 50, 51). Differences in the experimental protocols, such as duration and doses of AII infusion, could also explain the different results among the studies. However, in the present study, no difference was observed in the attenuation of ITT after 1 and 5 days or between pressor and sub-pressor doses of AII., indicating that the duration or doses of AII may not be important for the reduction in insulin sensitivity.

The insulin resistance observed in AII infused rats could be caused by the hyperinsulinemia *per se* due to an effect of AII on insulin secretion. Although, in the present study the secretion and clearance rate of endogenous insulin were not measured available data indicate that insulin clearance is not affected by AII at doses that increase arterial pressure (52). Moreover, AII has been shown to reduce rather than increase basal and pulsatile insulin secretion (53).

Finally, the demonstration that AII-infusion reduces the insulin sensitivity in rats also conflicts with the absence of insulin resistance in models of hypertension in which AII is presumed to be the major pathogenetic factor. Transgenic rats (mRen2)²⁷ have normal insulin sensitivity both at the whole body and tissue level (54). Moreover, insulin resistance is not prominent in renovascular hypertension (55). However, one could speculate that the absence of insulin resistance in these models could be related to simultaneous disarrangement of other control systems in these hypertensive models that could counteract the direct effect of AII on insulin signaling mechanisms. In this context, we recently have shown (56) that increases in AII circulating levels may induce the expression of NOSI and NOSIII in the myocardium and coronary blood vessels of rats. Increases in the NO secretion could counteract the effect of AII on insulin signaling mechanisms.

In conclusion, we have provided evidence that long-term infusion of AII induces insulin resistance in rats, an effect that is probably mainly related to a direct influence of AII on insulin action in target tissues. These results suggest that systemic and local tissue overactivity of the RAS impairs insulin signalling and could contribute to insulin resistance in hypertension. The confirmation of these results in the context of hypertension in humans could explain the association of nonmodulation and insulin resistance in subsets of hypertensive subjects.

REFERENCES

1. Dostal DE, KM Baker. The Cardiac Renin-Angiotensin System: Conceptual, or a Regulator of Cardiac Function? *Circ Res.* 1999;85:643-650.
2. Sealey JE and JH Laragh. The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. In: *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*, 2nd edition, edited by J.H. Laragh and B.M. Brenner, Raven Press, Ltd., New York, 1995 pp1763-1796.
3. Waeber B, H.R. Brunner. The renin-angiotensin system: role in experimental and human hypertension. In: *Zanchetti A, Mancia G., eds. Handbook of Hypertension: Pathophysiology of Hypertension.* Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science BV; 1997; 17:847-852.

4. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 1992;327:669–677.

5. Modan M, H. Halkin, S Halmog, A Luski, A Eshkil, M Shefi, A Shitrit, A. Fuchs. Hyperinsulinemia: a link between hypertension, obesity, and glucose intolerance. *J Clin Invest* 75:809-816, 1985.

6. Alderman M, S. Madahavam, WL Ooi, H Cohen, JE Sealey, JE Laragh. Association of renin-sodium profile with the risk of myocardium infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med* 324:1098-1104, 1991.

7. Lifton RP, PN Hopkins, RR Williams, Hollenberg NK, GH Williams, RG Dluhy. Evidence for heritability of nonmodulating essential hypertension. *Hypertension* 13:884-889, 1989.

8. Ferri C, Bellini C, Desideri G, Valenti M, De Mattia G, Santucci A, Hollenberg NK, Williams GH. Relationship between insulin resistance and nonmodulating hypertension: linkage of metabolic abnormalities and cardiovascular risk. *Diabetes* 48:1623-1630, 1999.

9. Williams GH, NK Hollenberg. Nonmodulating hypertension: a subset of sodium-sensitive hypertension. *Hypertension* 17:I81-I85, 1991.

10. Berne C, T Pollare, H. Lithel. Effects of antihypertensive treatment on insulin sensitivity with special reference to ACE inhibitors. *Diabetes Care* 14:39-47, 1991.
11. Donnelly R. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and insulin sensitivity: metabolic effects in hypertension, diabetes, and heart failure. *J. Cardiovasc Pharmacol* 20 (Suppl. 11):S38-S44, 1992.
12. Pollare T, Lithell H, Berne C. 1989 A comparison of the effects of hydro-chlorthiazide and captopril on glucose and lipid metabolism in patients with hypertension. *N Engl J Med.* 321:868 –873.
13. Buchanan, T. A., H. Thawani, W. Kades, J. G. Modrall, F. A. Weaver, C. Laurel, R. Poppiti, A. Xiang, and W. Hsueh. Angiotensin II increases glucose utilization during acute hyperinsulinemia via a hemodynamic mechanism. *J. Clin. Invest.* 92: 720–726, 1993.
14. Townsend, R. R., and D. J. DiPette. Pressor doses of angiotensin II increase insulin-mediated glucose uptake in normotensive men. *Am. J. Physiol.* 265 (Endocrinol. Metab. 28): E362–E366, 1993.
15. Jamerson KA, Nesbitt SD, Amerena JV, Grant E, Julius S Angiotensin mediates forearm glucose uptake by hemodynamic rather than direct effects. *Hypertension* 1996; 27:854-858.

16. Rao RH. Effects of angiotensin II on insulin sensitivity and fasting glucose metabolism in rats. *Am J Hypert* 7:655-660, 1994.

17. Richey JM, M Ader, D Moore, RN Bergman. Angiotensin II induces insulin resistance independent of changes in interstitial insulin. *Am J Physiol* 277 (Endocrinol. Metabol. 40): E920-E926, 1999.

18. Saad MJA, Velloso LA, Carvalho CRO 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

19. Velloso L, Folli F, Sun X, White M, Saad M, Kahn C 1996 Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12490-12495.

20. Ali MS, Schieffer B, Delafontaine P, Bernstein KE, Ling BN, Marrero MB 1997 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* 272:12373-12379.

21. Folli F, C. R. Kahn, H. Hansen, J. L. Bouchie, E. P. Feener. 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. 100:2158-2169.

22. Tambascia RC, Fonseca PM, Corat PDC, Moreno H, Saad MJA, Franchini KG. Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II infused rats. Hypertension (in press).

23. Carvalho CRO, A.C. P. Thirone, J.A. R. Gontijo, L. A. Velloso and M. J. A. Saad. Effect of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action. Diabetes 46:1950-1957, 1997.

24. Bonora E, P. Moghetti, C. Zancanaro, M. Gigolini, M. Querena, V. Cacciatoni, A. Corgnati, M Muggeo. Estimation of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance test with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. J Clin Endocrinol Metab 68:374-378, 1989.

25. Scott AM, Atwater I and Rojas E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and β -cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. Diabetologia 21:470-475, 1981.

26. White, M.F., and C.R. Kahn (1994) The insulin signaling system. J. Biol. Chem. 269: 1-4.

27. Eck, M.J., S. Dhe-Paganon, T. Trub, R.T. Nolte, and S.E. Shoelson (1996) Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. Cell. 85: 695-705.

28. Sun, X.J., L. Wang, Y. Zhang, L. Yenush, M.G. Myers Jr., E. Glasheen, W.S. Lane, J.H. Pierce, and M.F. White (1995) Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature (Lond.)*. 377: 173-177.

29. Sun, X.J., P. Rothenberg, C.R. Kahn, J.M. Backer, E. Araki, P.A. Wilden, D.A. Cahill, B.J. Goldstein, and M.F. White (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature (Lond.)*. 352: 73-77.

30. Folli, F., M.J. Saad, J.M. Backer, and C.R. Kahn (1992) Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3 kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle on the intact rat. *J. Biol. Chem.* 267: 22171-22177.

31. Sun, X.J., S. Pons, T. Asano, M.G. Myers Jr., E. Glasheen, and M.F. White (1996) The Fyn tyrosine kinase binds IRS-1 and forms a distinct signaling complex during insulin stimulation. *J. Biol. Chem.* 271: 10583-10587.

32. DeFronzo RA, JD Tobin, R Andres. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237:E214-E223, 1979.

33. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A 1996 Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein- coupled receptors. *Nature* 379:557-560

34. Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A 1997 Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* 16:7032–7044
35. Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A 1999 EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of pro-HB-EGF. *Nature* 402:884–888.
36. Linseman DA, Benjamin CW, Jones DA 1995 Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270:12563–12568
37. Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F, Inagami T 1998 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* 273:8890–8896
38. Du J, Sperling LS, Marrero MB, Phillips L, Delafontaine P. 1996 G-protein and tyrosine kinase receptor cross-talk in rat aortic smooth muscle cells: thrombin and angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and insulin-like growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 218:934–939.

39. Elbaz N, K Bedecs, M Masson, M Sutren, A.D. Strosberg, C. Nahmias. Functional transactivation of insulin receptor kinase by growth inhibitory angiotensin II AT2 receptor. *Mol Endocrinology* 14:795-804, 2000.
40. Garcia-Sainz JA, Martinez-Alfaro M, Romero-Avila MT, Gonzalez-Espinosa C. Characterization of the AT1 angiotensin II receptor expressed in guinea pig liver. *J Endocrinol* 154:133-138, 1997.
41. van Kats JP, de Lannoy LM, Jan Danser AH, van Meegen JR, Verdouw PD, Schalekamp MA. Angiotensin II type 1 (AT1) receptor-mediated accumulation of angiotensin II in tissues and its intracellular half-life in vivo. *Hypertension* 30:42-49, 1997.
42. Julius S, T Gudbrandsson, K. Jamerson, ST Shahab, O Andersson. Hypothesis: the hemodynamic link between insulin resistance and hypertension. *J. Hypertens* 1991; 9:983-986.
43. Jamerson KA, SO Smith, JV Amerena, E Grant, S Julius. Vasoconstriction with norepinephrine causes less forearm insulin resistance than a reflex sympathetic vasoconstriction. *Hypertension* 1994; 23:1006-1011.
44. Flisner D, Arnold U, Kohn B, Hartung R, Ritz E. Angiotensin II enhances insulin sensitivity in healthy volunteers under euglycemic conditions. *J. Hypertens* 11:983-988, 1993.

45. Baron, A. D., G. Brechtel-Hook, A. Johnson, and D. Hardin. Skeletal muscle flow: a possible link between insulin resistance and blood pressure. *Hypertension* 21: 129–135, 1993.
46. Baron, A. D., and G. Brechtel. Insulin differentially regulates systemic and skeletal muscle vascular resistance. *Am. J. Physiol.* 265 (Endocrinol. Metab. 28): E61–E67, 1993.
47. Laakso, M., S. V. Edelman, G. Brechtel, and A. D. Baron. Effects of epinephrine on insulin-mediated glucose uptake in whole body and leg muscle in humans: role of blood flow. *Am. J. Physiol.* 263 (Endocrinol. Metab. 26): E199–E204, 1992.
48. Morris AD, JR Petrie, JMC Anderson, R Donnelly. Effects of angiotensin II on insulin sensitivity: a placebo-controlled study. *Clin Sci* 82:397–405, 1992.
49. Motwani, J. G., and A. D. Struthers. Dose-response study of the redistribution of intravascular volume by angiotensin II in man. *Clin. Sci. (Colch.)* 82: 397–405, 1992.
50. Osborn, E. C., L. M. Fearn, R. J. Francis, J. C. Mackenzie, and J. Wilson. Receptors for angiotensins I and II: their relevance to renal hemodynamics, blood pressure control and hind-limb blood flow. *Med. Hypotheses* 36: 6–16, 1991.
51. Doursout, M. F., J. E. Chelly, C. J. Hartley, J. Szilagyi, J. L. Montastruc, and J. P. Buckley. Regional blood flows and cardiac function changes induced by angiotensin II in conscious dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 591–596, 1988.

52. O'Callaghan CJ, Komersova K, Louis WJ. Acute effects of blood pressure elevation on insulin clearance in normotensive healthy subjects. *Hypertension*. 31:104-109, 1998.
53. Fliser D, Schaefer F, Schmid D, Veldhuis JD, Ritz E. Angiotensin II affects basal, pulsatile, and glucose-stimulated insulin secretion in humans. *Hypertension* 1997; 30:1156-1161.
54. Vettor R, Cusin I, Ganten D, Rohner-Jeanrenaud F, Ferrannini E, Jeanrenaud B. Insulin resistance and hypertension: studies in transgenic hypertensive TGR(mREN-2)²⁷ rats. *Am J Physiol* 267:R1503-1509, 1994.
55. Natali A, Quinones Galvan A, Arzilli F, Taddei S, Pecori N, Frascerra S, Salvetti A, Ferrannini E. Renovascular hypertension and insulin sensitivity. *Eur J Clin Invest* 26:556-563, 1996.

LEGENDS

Fig 1. Daily mean arterial pressure (MAP; beat-to-beat, 1 hour, sampled at 100 Hz) of rats infused with saline (n=16), AII-10 ng/Kg/min (n=13) and AII-40 ng/Kg/min (n=16). * $p < 0.05$ compared to saline infused rats.

Fig. 2. Representative examples of immunoprecipitation/immunoblotting (IP/IB) experiments performed with specific antibodies against IR (anti-IR), IRS-1 (anti-IRS-1) and IRS-2 (anti-IRS-2) in rats infused with saline, AII-10 and AII-40 ng/Kg/min.

Fig. 3. Effect of AII infusion on insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR. Representative blots of immunoprecipitated IR, stained with anti- α Py antibody of rats infused with saline, AII-10 and AII-40 ng/Kg/min. The average values of saline (n=15), AII-10 (n=9), AII-40 (n=11) are shown as percent values compared to saline infused rats. * $p < 0.05$ compared to the values of saline infused rats without the insulin challenge. # $p < 0.05$ compared to saline infused rats after the insulin challenge.

Fig 4. Effect of AII infusion on insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS-1

Fig 5. Effect of AII infusion on insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS-2.

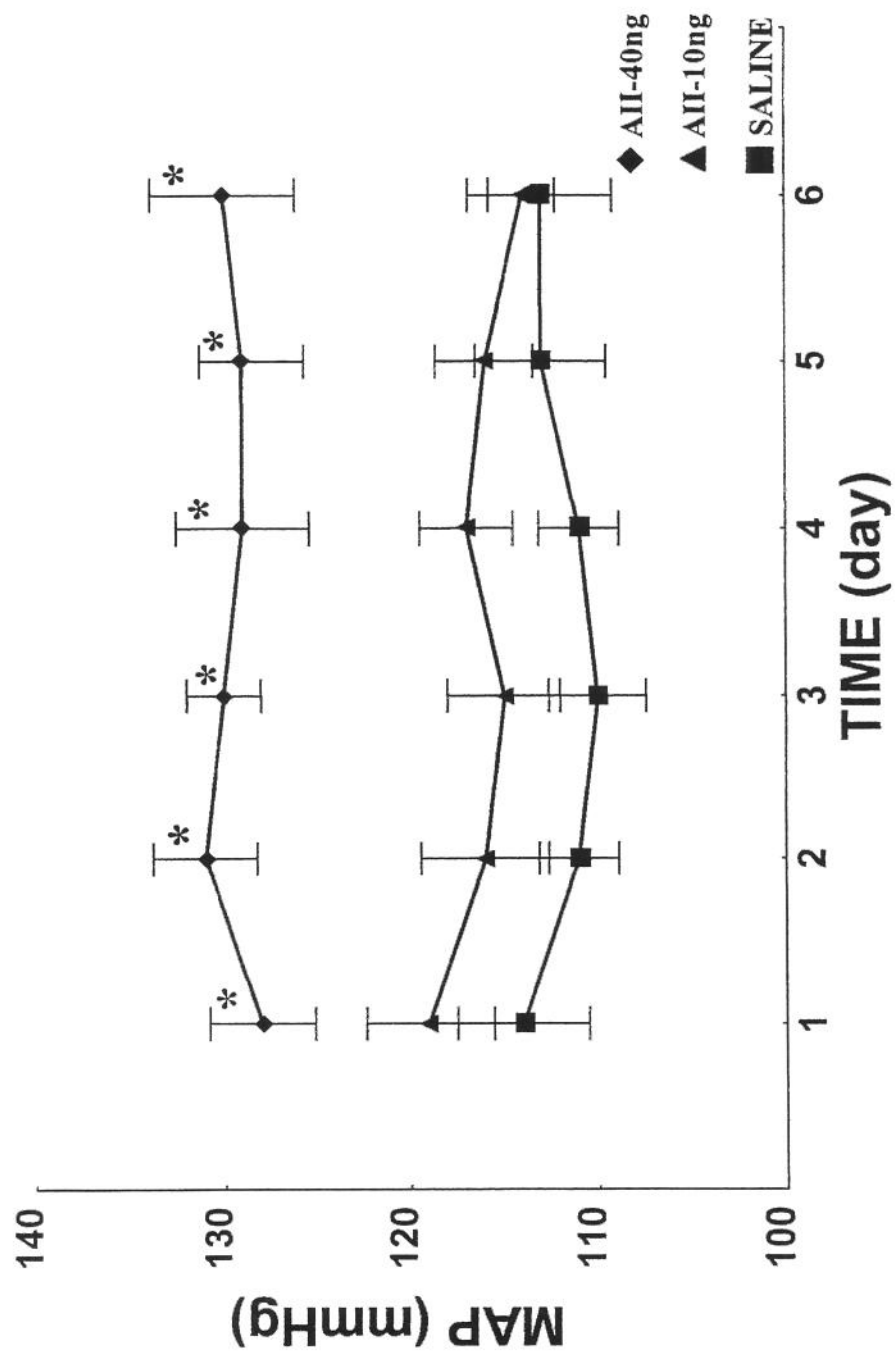


Figure 1

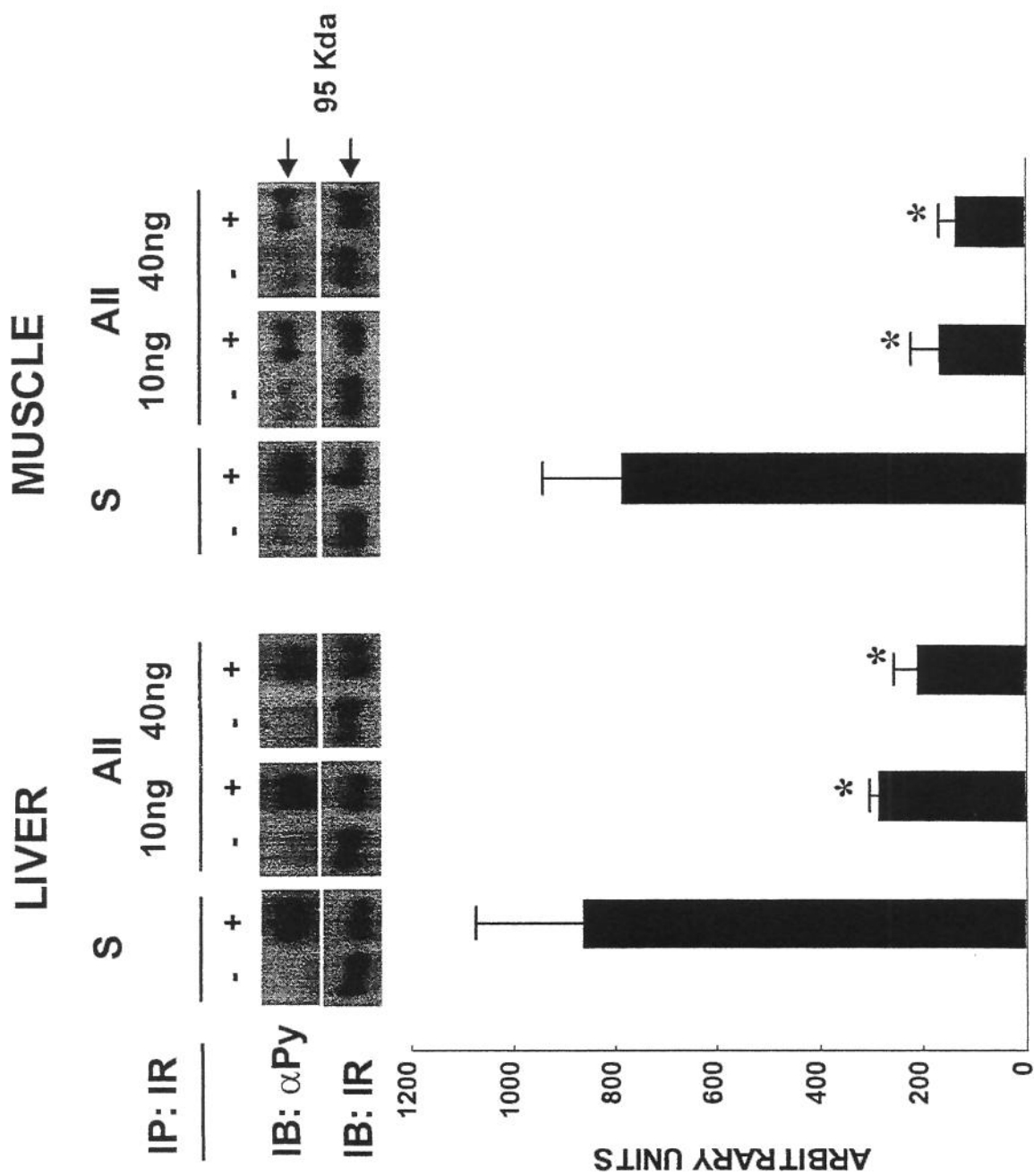


Figure 2

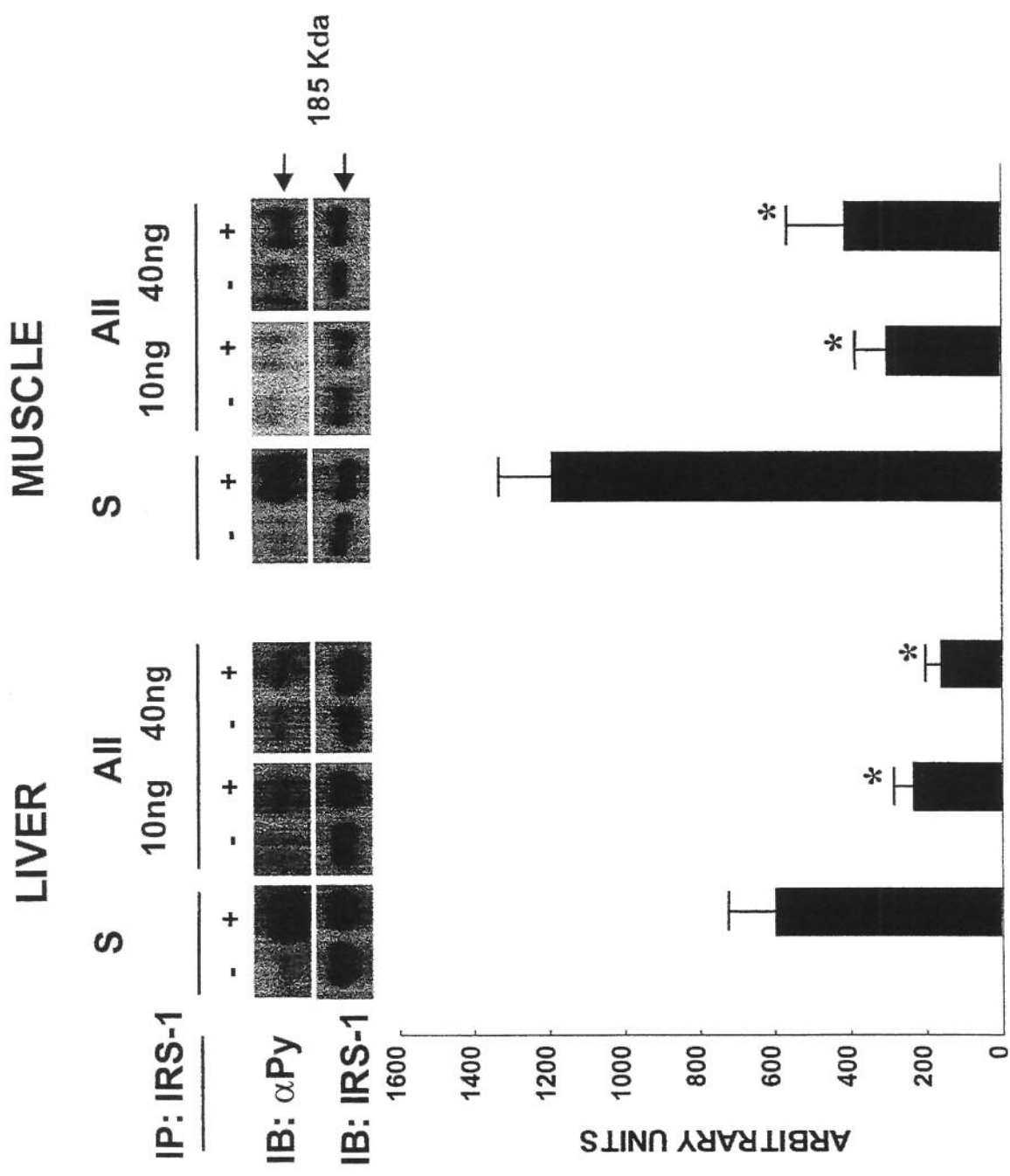


Figure 3

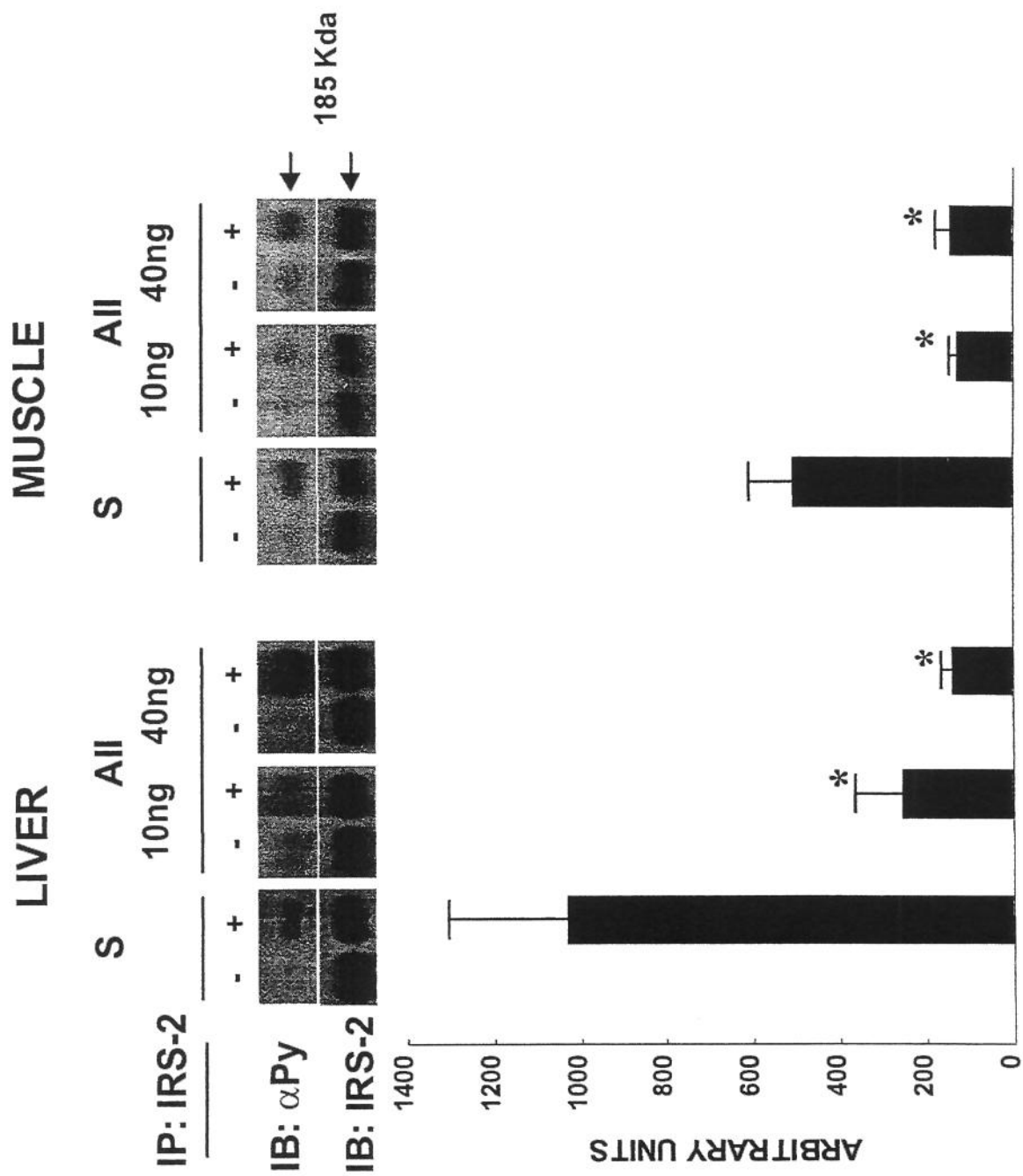


Figure 4

Table 1

	<i>Glicemia</i> (mg/dL)	<i>K_{ITT}</i> (%/min)	<i>Plasma Insulin</i> (μ g/ml)
Saline			
day 1	87 $\pm$ 3		
day 3	89 $\pm$ 4		
day 5	94 $\pm$ 2	4.0 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.3
AII – 10 ng			
day 1	91 $\pm$ 3		
day 3	92 $\pm$ 4		
day 5	96 $\pm$ 2	2.6 $\pm$ 0.2*	4.8 $\pm$ 0.7*
AII – 40 ng			
day 1	90 $\pm$ 2		
day 3	92 $\pm$ 3		
day 5	101 $\pm$ 3	2.5 $\pm$ 0.2*	4.1 $\pm$ 0.6*

K_{ITT} rate constant for plasma glucose decay.

* p<0.05 compared with saline infused rats