

FERNANDA ALVAREZ ROJAS

***REGULAÇÃO DO IRS-2 E DA AKT EM MODELOS
ANIMAIS DE RESISTÊNCIA À INSULINA***

CAMPINAS

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

FERNANDA ALVAREZ ROJAS

***REGULAÇÃO DO IRS-2 E DA AKT EM MODELOS
ANIMAIS DE RESISTÊNCIA À INSULINA***

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

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRIO JOSÉ ABDALLA SAAD

CAMPINAS

2001

UNIDADE	BC
Nº CHAT	
T1 UNICAMP	
AL86r	
V	
TOMBO	48306
PROC.	16-837102
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/04/02
Nº CPD	

BIBID. 238344

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

CM00165632-3

Al86r

Alvarez Rojas, Fernanda

Regulação do IRS-2 e da AKT em modelos animais de resistência à insulina / Fernanda Alvarez Rojas. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Mário José Abdalla Saad

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

1. Insulina. I. Mário José Abdalla Saad. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

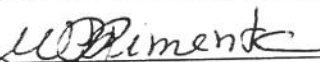
Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

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

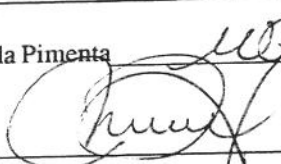


Membros:

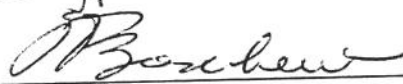
Professora Doutora Walkiria de Paula Pimenta



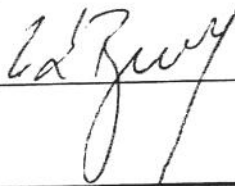
Professor Doutor Fábio Bessa Lima



Professor Doutor Antonio Carlos Boschero



Professor Doutor Sigisfredo Luis Brenelli



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

Data: 11/06/2001

2002-59-17

DEDICATÓRIA

*à Armando pelos momentos compartilhados
e pelos que virão*

Ao Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela bem humorada orientação.

À Emiko, pois sem a sua colaboração este trabalho jamais seria concluído.

À Miriam e Rosângela por compartilhar os bons e maus momentos.

À todos os pós-graduandos do laboratório pela disponibilidade, ajuda e companheirismo.

Aos funcionários do laboratório de biologia molecular, em especial à Renata Pítton e ao Sr. Luiz Janeri, pelo auxílio e disponibilidade constante.

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xvii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. Animais.....	37
3.1.1. Grupos experimentais.....	37
3.2. Material.....	38
3.2.1. Soluções utilizadas.....	39
3.3. Métodos.....	40
3.3.1. Procedimentos com animais para a extração das proteínas teciduais , após estímulo insulínico <i>in vivo</i>	40
3.3.2. “Immunoblotting”.....	41
3.3.3. Immunoprecipitação.....	42
3.3.4. Análise estatística.....	43
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Características gerais dos animais.....	47
4.1.1. Determinação do tempo de fosforilação do IRS-2 em fígado.....	49
4.1.2. Determinação do tempo de fosforilação do IRS-2 em músculo.....	50
4.1.3.a.b.c. Efeito do tratamento agudo com adrenalina na determinação do grau de fosforilação do IRS-2 , associação com a PI 3-quinase e fosforilação da Akt em tecido hepático e muscular de ratos.....	51

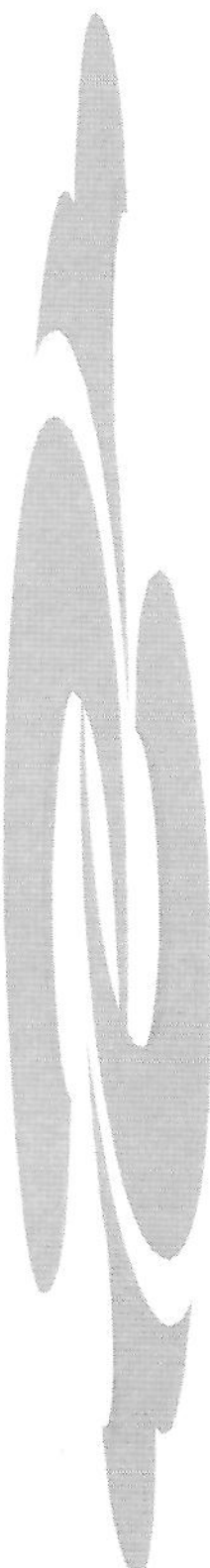
4.1.4.a.b.c. Efeito do tratamento crônico com dexametasona na determinação do grau de fosforilação do IRS-2, associação com a PI 3-quinase e fosforilação da Akt em tecido hepático e muscular de ratos.....	57
4.1.5.a.b.c. Efeito do jejum prolongado com adrenalina na determinação do grau de fosforilação do IRS-2 , associação com a PI 3-quinase e fosforilação da Akt em tecido hepático e muscular de ratos.....	63
4.1.6.a.b.c. Efeito do tratamento com streptozotocina na determinação do grau de fosforilação do IRS-2 , associação com a PI 3-quinase e fosforilação da Akt em tecido hepático e muscular de ratos.....	69
5. DISCUSSÃO	75
6. SUMMARY	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
8. ANEXOS.....	103

μCi	microCuri
cAMP	adenosina monofosfato cíclica
^{125}I	isótopo de iodo 125
ATP	adenosina trifosfato
AKT/PKB	proteína quinase B (intermediário distal à ativação da PI 3-quinase)
DAG	diacilglicerol
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotretol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGF	epidermal growth factor
GLUT	transportador de glicose
GRB2	proteína ligadora do receptor para o fator de crescimento
GTP	guanosina trifosfato
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IR	receptor de insulina
IRS-1	substrato 1 do receptor de insulina
IRS-2	substrato 2 do receptor de insulina
kDa	quilo Daltons
MAPK	proteína quinase ativadora da mitogênese
Nck	proteína adaptadora ligada às vias de crescimento
PDGF	plated-derived growth factor

PEPCK	fosfoenol piruvato carboxiquinase
PKA	proteína quinase A
PI 3-quinase	fosfatidilinositol 3-quinase
PMSF	fluoreto de fenilmetil sulfonila
pp 185	proteína fosforilada de 185 kDa
Ras	proteína originalmente identificada como oncogene, tem participação na regulação do metabolismo e crescimento celular
RNA	ácido ribonucléico
SDS-PAGE	eletroforese em gel de pliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SH2	segunda homologia do src
SH3	terceira homologia do src
Src	oncogene originalmente definido como produto do sarcoma vírus Rous
STZ	estreptozotocina
Syp	fosfatase tirosina-específica
Tris	tri(hidroximetil)-aminometano

	PÁG.
Figura 1: Avaliação do grau de fosforilação do IRS-2 em função do tempo.....	49
Figura 2: Avaliação do grau de fosforilação do IRS-2 em função do tempo.....	50
Figura 3a e b: Efeito do tratamento agudo com adrenalina na fosforilação do IRS-2 e na associação com a PI3-quinase em tecido hepático.....	52
Figura 3c: Efeito do tratamento agudo com adrenalina na fosforilação do Akt em tecido hepático.....	53
Figura 4a e b: Efeito do tratamento agudo com adrenalina na fosforilação do IRS-2 e na associação com a PI3-quinase no tecido muscular...	55
Figura 4c: Efeito do tratamento agudo com adrenalina na fosforilação do Akt no tecido muscular.....	56
Figura 5a e b: Efeito do tratamento crônico com dexametasona na fosforilação do IRS-2 e na associação com a PI3-quinase no tecido hepático.	58
Figura 5c: Efeito do tratamento crônico com dexametasona na fosforilação da Akt no tecido hepático.....	59
Figura 6a e b: Efeito do tratamento crônico com dexametasona na fosforilação do IRS-2 e na associação com a PI3-quinase no tecido muscular.....	61
Figura 6c: Efeito do tratamento crônico com dexametasona na fosforilação da Akt no tecido muscular.....	62
Figura 7a e b: Efeito do jejum prolongado na fosforilação do IRS-2 e na associação com a PI3-quinase no tecido hepático.....	64

Figura 7c:	Efeito do jejum prolongado na fosforilação do Akt no tecido hepático.....	65
Figura 8a e b:	Efeito do jejum prolongado na fosforilação do IRS-2 e na associação com a PI3-quinase no tecido muscular.....	67
Figura 8c:	Efeito do jejum prolongado na fosforilação do Akt no tecido muscular.....	68



RESUMO

A insulina, ao se ligar à subunidade α de seu receptor heterotetramérico, dá início a uma série de ações imediatas e tardias, metabólicas e promotoras de crescimento. Tais eventos ocorrem através da estimulação da subunidade β transmembrana do receptor, que se autofosforila e ativa a fosforilação de substratos endógenos intracelulares. Estas proteínas quando fosforiladas podem se unir a proteínas com porção SH2, como a PI 3-quinase. Uma etapa distal a estas associações é a fosforilação em serina da Akt. Utilizando-se técnicas de “immunoblotting” com anticorpos anti-IRS-2, antifosfotirosina, anti-PI 3-quinase e anti-Akt é possível analisar o grau de fosforilação do IRS-2 e Akt, e a associação do IRS-2 com a proteína PI 3-quinase.

Neste estudo investigamos o grau de fosforilação em tirosina do IRS-2 e sua associação a PI 3-quinase e o grau de fosforilação em serina/treonina da Akt em tecido hepático e muscular de quatro modelos de resistência à insulina: o tratamento agudo com adrenalina, o tratamento crônico com dexametasona, o jejum prolongado e ratos com diabetes induzido por STZ.

Em experimentos com ratos normais para a avaliação do efeito tempo após a infusão de insulina no grau de fosforilação do IRS-2, verificou-se que o pico de fosforilação do IRS-2 foi de 30 segundos para o tecido hepático e de 90 segundos para o tecido muscular, após infusão de insulina na veia porta.

No fígado de ratos tratados agudamente com adrenalina observamos uma diminuição significativa no grau de fosforilação do IRS-2 para $63 \pm 11\%$, $p < 0.05$, quando comparamos com os ratos controle. Também houve uma diminuição na associação do IRS-2/PI 3-quinase para $73 \pm 8\%$, $p < 0.05$ e da fosforilação da Akt para $60 \pm 5\%$, $p < 0.05$. Em tecido muscular destes animais houve uma redução para $74 \pm 8\%$, $p < 0.05$, no grau de fosforilação do IRS-2 dos ratos tratados quando comparados com os ratos controle. Também ocorreu uma redução na associação do IRS-2/PI 3-quinase para $55 \pm 11\%$, $p < 0.05$, e da fosforilação da Akt para $70 \pm 6\%$, $p < 0.05$ neste tecido.

No fígado de ratos tratados cronicamente com dexametasona observamos uma diminuição significativa no grau de fosforilação do IRS-2 para $50 \pm 11\%$, $p < 0.05$, quando comparamos com os ratos controle. Também houve uma diminuição na associação do IRS-2/PI 3-quinase para $80 \pm 10\%$, $p < 0.05$ e da fosforilação da Akt para $70 \pm 17\%$, $p < 0.05$.

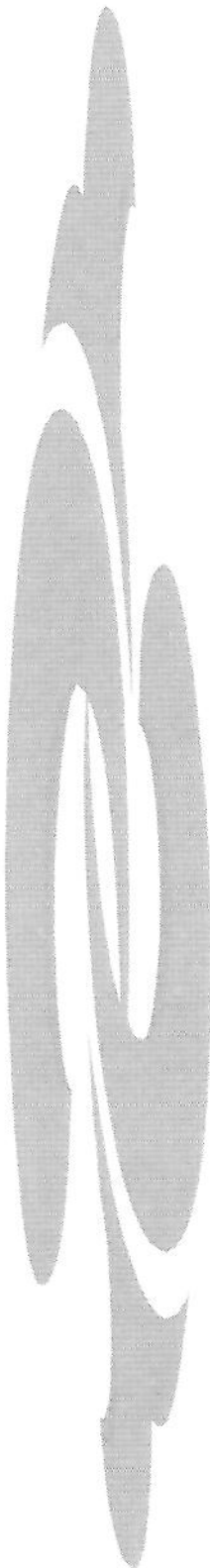
Em tecido muscular destes animais houve uma redução para $63 \pm 1\%$, $p < 0.05$, no grau de fosforilação do IRS-2 dos ratos tratados quando comparados com os ratos controle. Também ocorreu uma redução na associação do IRS-2/PI 3-quinase para $84 \pm 10\%$, $p < 0.05$. Não houve alteração no grau de fosforilação da Akt neste tecido.

No fígado de ratos mantidos em jejum prolongado observamos um aumento significativo no grau de fosforilação do IRS-2 para $174 \pm 11\%$, $p < 0.05$, quando comparamos com os ratos controle. Também houve um aumento na associação do IRS-2/PI 3-quinase para $124 \pm 6\%$, $p < 0.05$ e da fosforilação da Akt para $170 \pm 6\%$, $p < 0.05$. Em tecido muscular destes animais houve um aumento para $207 \pm 11\%$, $p < 0.05$, no grau de fosforilação do IRS-2 dos ratos tratados quando comparados com os ratos controle. Também ocorreu um aumento na associação do IRS-2/PI 3-quinase para $128 \pm 7\%$, $p < 0.05$, e da fosforilação da Akt para $152 \pm 8\%$, $p < 0.05$ neste tecido.

No fígado de ratos com diabetes induzida com STZ observamos um aumento significativo no grau de fosforilação do IRS-2 para $187 \pm 15\%$, $p < 0.05$, quando comparamos com os ratos controle. Também houve um aumento na associação do IRS-2/PI 3-quinase para $136 \pm 10\%$, $p < 0.05$ e uma redução na fosforilação da Akt para $65 \pm 6\%$, $p < 0.05$. Em tecido muscular destes animais houve um aumento para $168 \pm 15\%$, $p < 0.05$, no grau de fosforilação do IRS-2 dos ratos tratados quando comparados com os ratos controle. Também ocorreu um aumento na associação do IRS-2/PI 3-quinase para $122 \pm 5\%$, $p < 0.05$, e uma diminuição na fosforilação da Akt para $70 \pm 7\%$, $p < 0.05$ neste tecido.

A análise integrada destes 4 modelos animais sugere que a regulação do grau de fosforilação do IRS-2, bem como da interação destes com a PI 3-quinase depende dos níveis insulinêmicos do animal: animais hipoinsulinêmicos, jejum de 3 dias e ratos tratados com STZ, apresentam um aumento no grau de fosforilação do IRS-2., enquanto que os modelos hiperinsulinêmicos, apresentam diminuição da fosforilação do IRS-2.

Também parece ter um papel importante o aumento da glicemia, influenciando os passos seguintes da via de sinalização, a fosforilação da proteína Akt, e provavelmente desenvolvendo um papel importante no mecanismo molecular de resistência à insulina.



1. INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da insulina em 1921, muito esforço tem sido dedicado ao entendimento do mecanismo molecular da ação deste hormônio. Este é o principal hormônio regulador da glicemia em mamíferos, que age estimulando a captação de glicose em tecidos muscular e adiposo, e inibindo a neoglicogênese no tecido hepático como também modificando a expressão ou atividades de uma série de enzimas e sistemas de transporte.

A importância do estudo da ação da insulina é dada pela prevalência da resistência à insulina, e pelo fato de que a resistência tem um importante papel na patogênese de diversas doenças, incluindo obesidade, Diabetes Mellitus, hipertensão e da intolerância à glicose associada a diversas enfermidades endócrinas.

A ação da insulina na célula é iniciada pela união da mesma ao seu receptor de membrana plasmática (Freytchet *et al.*, 1971; Cuatrecasas *et al.*, 1972; Kahn *et al.*, 1985). Estes receptores estão presentes em praticamente todos os tecidos de mamíferos, mas suas concentrações variam desde cerca de 40 receptores nos eritrócitos circulantes, até mais de 200.000 receptores nas células adiposas e hepáticas. O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituída por 2 subunidades α cada uma de Mr: 135.000, e duas subunidades β cada uma de Mr: 95.000, unidas por ligações dissulfeto (Kahn *et al.*, 1985). A subunidade α é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação à insulina. A subunidade β é uma proteína transmembrana e é responsável pela transmissão do sinal.

Em 1982 demonstrou-se que a subunidade β do receptor era uma proteína quinase, estimulada pela insulina, capaz de se autofosforilar e de fosforilar outros substratos nos resíduos tirosina (Kasuga *et al.*, 1982). Assim, a insulina une-se à subunidade α e estimula fosforilação de tirosinas da subunidade β do receptor de insulina. O ATP atua como doador de fosfatos e a fosforilação ocorre em aminoácidos tirosina. Previamente à união da insulina ao receptor, a subunidade α parece exercer um efeito negativo na atividade quinase do mesmo, que é removido com a estimulação da insulina, mas o mecanismo exato é ainda desconhecido.

Acredita-se que a insulina estimula a quinase pelo aumento da velocidade catalítica ($V_{\text{máx}}$) mais do que alterando a afinidade pelo substrato (White *et al.*, 1984). A evidência de que a atividade tirosina quinase do receptor de insulina é necessária para a ação da insulina, veio de diversas fontes. A maior evidência provém de experimentos com mutagênese, “*in vitro*”, na qual um aminoácido de lisina na posição 1030 foi trocado por qualquer outro aminoácido. Com base na analogia com outras quinases, este aminoácido é o sítio de união do ATP na quinase (Ebina *et al.*, 1987; Ullrich *et al.*, 1987). Quando essas mutações são expressas em células, a ligação da insulina ocorre normalmente, mas como quinases são totalmente inativas e são totalmente ineficientes em captar glicose estimulada por insulina (Ebina *et al.*, 1987). Isto é verdadeiro também para outros efeitos da insulina, como incorporação de timidina e síntese de glicogênio. A mutação de um dos principais sítios de autofosforilação, nas posições 1158, 1162 e 1163, produzem efeitos similares, mas menos dramáticos (Wilden *et al.*, 1992). Alterações na atividade quinase em estados de resistência à insulina são também consistentes com a importância da fosforilação normal do receptor para uma efetiva ação insulínica (Kahn & White, 1998).

Ainda não é completamente conhecido como a quinase do receptor transmite posteriormente o sinal. A maioria das investigações tem focalizado um modelo no qual está envolvida uma cascata de fosforilação, isto é, a insulina induz uma autofosforilação do receptor, o qual ativa a capacidade quinase do receptor que fosforilará um ou mais substratos celulares. Inicialmente postulou-se que os substratos poderiam ser enzimas (serine quinase ou fosfoproteínas fosfatases) ou enzimas de inibição cuja atividade seria modificada por esta fosforilação, guiando uma cascata de reações de fosforilação e desfosforilação secundárias. Posteriormente demonstrou-se que o receptor de insulina pode fosforilar substratos iniciais que não são enzimas, mas sim proteínas ancoradoras, e o passo posterior à tradução do sinal é a ativação de enzimas (Cheatam & Kahn, 1995).

Têm sido descritos vários substratos endógenos para o receptor de insulina (Bernier *et al.*, 1987; White *et al.*, 1985). Estas proteínas são rapidamente fosforiladas em tirosina pela ativação do receptor. A primeira, e provavelmente a melhor estudada, é uma proteína de aproximadamente 185 kDa chamada de pp185 ou substrato 1 do receptor de insulina (White *et al.*, 1985). Em células transfectadas com cDNA de receptor de insulina humano, vê-se um marcado aumento na fosforilação da pp185 coincidente com o aumento

da ação da insulina (Sun *et al.*, 1991). As células que apresentam receptores com mutação no sítio de união ao ATP, ou aos sítios de autofosforilação, apresentam uma redução da fosforilação da pp185, proporcionalmente à redução da ativação da quinase do receptor de insulina (Wilden *et al.*, 1992). Outras evidências do papel da fosforilação da pp185 na ação da insulina foram encontradas inesperadamente em experimentos de mutação “*in vitro*” no receptor de insulina na tirosina 960. Estas moléculas mutadas do receptor apresentam ligação à insulina de forma normal, e apresentam a sua função como quinase também completamente normal “*in vitro*”. Isto não surpreende, já que a Tyr-960 não é um sítio de autofosforilação nem um sítio ativo da quinase. Mas quando estes receptores mutados são transfectados às células, estas não fosforilam a pp185, nem são capazes de transmitir o sinal insulínico, resultando em redução na sínteses de glicogénio e menor incorporação da timidina no DNA (White *et al.*, 1988). Em 1991 foi clonado o maior componente da pp185 e foi denominado substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) (Sun *et al.*, 1991). O cDNA do IRS-1 codifica para uma proteína de 1.235 aminoácidos e muitas das características da proteína são surpreendentes. O IRS-1 é de localização citoplasmática. Quando se analisa a sequência básica, encontram-se muitos sítios de fosforilação em serina, treonina e tirosina potencialmente ativáveis. Seis dos sítios de ativação em tirosina têm a sequência repetida YMXM onde Y é tirosina, M é metionina, e X é qualquer aminoácido. Dois sítios de fosforilação adicionais têm a sequência YXXM. A sequência YMXM não ocorre no receptor de insulina, mas foi observada em outras quinases. Esta sequência parece estar envolvida nas interações não covalentes das proteínas com as moléculas de sinalização. Estas moléculas de sinalização apresentam domínios que unem YMXM em porções SH2 (Src homologia 2).

Foi demonstrada uma associação entre a enzima fosfatidilinositol 3'-quinase (PI 3-quinase) com IRS-1 após estimulação com insulina em dois importantes tecidos insulino-sensíveis de ratos, fígado e músculo, completando a hipótese de que o IRS-1 fosforilado une-se a moléculas de tradução de sinais (Folli *et al.*, 1992). A enzima PI 3-quinase é uma proteína que apresenta uma subunidade catalítica de 110 kDa e uma regulatória de 85 kDa que contém dois sítios SH2 e um SH3 (Carpenter & Cantley, 1990). A ligação e ativação descritas envolvem as tirosinas fosforiladas do IRS-1 próximas a metioninas YMXM, e a porção da subunidade regulatória da enzima PI 3-quinase. A insulina aumenta a

concentração intracelular de fosfatidilinositol 3-fosfato, sugerindo que a PI 3-quinase é realmente ativada durante a estimulação com este hormônio. Embora a subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase seja fosforilada após o estímulo com outros fatores de crescimento, isto não parece ocorrer após o estímulo com insulina. Ao invés disso, a ativação parece advir simplesmente como consequência da ligação do IRS-1 à PI 3-quinase. Todas as evidências recentes sugerem que a PI 3-quinase, associada e ativada pelo IRS-1, está relacionada com muitos efeitos metabólicos da ação da insulina como a ativação do transporte de glicose, ativação da síntese de glicogênio e a inibição da fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK), a enzima chave para a gliconeogênese (Cheatham e Kahn, 1995).

Recentemente demonstrou-se que a Akt, uma serina treonina quinase, com peso molecular de 57 kDa, participa da transmissão do sinal da PI3-quinase e está relacionada ao transporte da glicose após o estímulo com insulina. A Akt é uma proteína com N-terminal, que contém um sítio SH2, recentemente redefinido como sítio homólogo da “pleckstrina” (PH), um sítio central catalítico e um sítio C-terminal. Apesar da Akt apresentar potencial oncogênico, sua função e regulação normal não era conhecida, até ser clonada e relacionada como um intermediário distal à ativação da PI3-quinase. Esta ativação foi baseada em duas observações: a ativação do fator de crescimento induzido pela Akt pode ser completamente bloqueada pela adição de wortmanina (inibidor da PI3-quinase); mutações dos receptores dos fatores de crescimento que inibem a ativação da PI3-quinase, também inibem a Akt (Coffer, Jing, Woodgett, 1998). Estes dados sugerem que a PI3-quinase ou seus produtos medeiam a ativação da Akt. O principal fator regulador da ativação da Akt é a ativação da PI3-quinase, mas podem existir vários mecanismos alternativos que são utilizados por estímulos específicos, tais como choque térmico, hiperosmolaridade, hipoxia, fator de crescimento neural e interleucinas (Coffer *et al.*, 1998).

Vários estudos sugerem que a hiperglicemia crônica contribui diretamente no desenvolvimento de resistência à insulina periférica (Rossetti *et al.*, 1987; Kahn *et al.*, 1991). Alguns trabalhos demonstraram que a PI 3-quinase é necessária e suficiente para a ativação da Akt. Por outro lado, a expressão da forma constitutivamente ativa da Akt é suficiente para promover a translocação do GLUT4 e aumentar o transporte de glicose nas células adipócitas 3T3-L1 (Kohn *et al.*, 1996; Tanti *et al.*, 1997), portanto, tendo esta

proteína um papel importante na via de sinalização da insulina envolvida no transporte de glicose. Um trabalho feito pelo grupo de Krook, demonstrou que a estimulação da proteína Akt está significativamente diminuída no modelo animal de ratos diabéticos Goto-Kakizaki não obesos, comparado com os controles. Quando a hiperglicemia foi normalizada após 4 semanas de tratamento com florizina, estes animais apresentaram uma melhora na tolerância à glicose e no transporte deste hexose. Houve também uma normalização na atividade da Akt após o estímulo com insulina (Krook *et al.*, 1997). Portanto, neste modelo animal de diabetes tipo 2, onde a estimulação da proteína Akt e o transporte de glicose estavam reduzidos, ambos defeitos foram revertidos com a melhora nos níveis de glicose. Outro estudo demonstrou que o estímulo com insulina aumenta a atividade da Akt em músculo esquelético de humanos e que pacientes com diabetes tipo 2 que apresentam resistência muscular à insulina, tem reduzida a atividade da Akt. A alteração da ação da insulina na atividade da Akt parece não estar relacionada com uma diminuição na quantidade protéica desta proteína. Pelo contrário, a expressão dela está aumentada no músculo esquelético dos pacientes com Diabetes Mellitus 2, podendo ter um efeito compensatório tentando aumentar a atividade da Akt estimulada pela insulina (Krook *et al.*, 1998). Desta forma, a ativação da Akt foi relacionada com a sinalização dependente da PI 3-quinase, destacando a importância desta quinase na mediação dos sinais metabólicos e mitogênicos. Estes estudos foram ampliados demonstrando que a expressão de uma forma constitutivamente ativa da PI 3-quinase leva a um aumento na ativação da Akt, e a expressão de um mutante duplamente negativo da subunidade regulatória p85 da PI 3-quinase, suprime a ativação da Akt pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (Burgering *et al.*, 1995).

Assim, a insulina estimula a fosforilação do IRS-1 e este fosforilado se liga a outras moléculas de sinalização intracelular, propagando o sinal insulínico. Além da PI 3-quinase, outras proteínas com porções SH2, Grb2, Nck, SHP2, também interagem com o IRS-1 após exposição à insulina. A GRB2 é uma pequena proteína citoplasmática que contém duas porções SH3 e uma SH2 que se liga à tirosina 895 do IRS-1. A GRB2 age como molécula adaptadora, que compõe um complexo ativador da proteína ras, ativadora das MAP quinases (proteína de ativação da mitogênese). A Nck, é uma proteína adaptadora com três porções SH3 e uma SH2, e que une o IRS-1 às vias de crescimento celular

(Cheatham & Kahn, 1995). A proteína SHP2 é uma fosfotirosina fosfatase que contém duas porções SH2, que pode ter importância no crescimento celular e exercer uma auto-regulação no sinal gerado pela insulina.

Fica claro que o IRS-1 é uma proteína de grande importância no processo de transmissão do sinal insulínico, localizada estrategicamente na fase inicial desta sinalização e, atua como proteína ancoradouro que ativa diversas enzimas.

Em camundongos transgênicos (knockout) sem IRS-1, os efeitos metabólicos da insulina parecem ser parcialmente compensados por um outro substrato do receptor de insulina, que é uma proteína rapidamente fosforilada em tirosina após o estímulo insulínico, que migra em SDS-PAGE um pouco mais alto que o IRS-1. Demonstrou-se que este tinha características idênticas à proteína 4PS, que é também um substrato do receptor de IL-4. Através da purificação da proteína 4PS em células FDC-P2, foi possível a clonagem de um cDNA que codifica para uma proteína com várias características estruturais e funcionais semelhantes ao IRS-1, que foi denominada IRS-2 (Sun *et al.*, 1995).

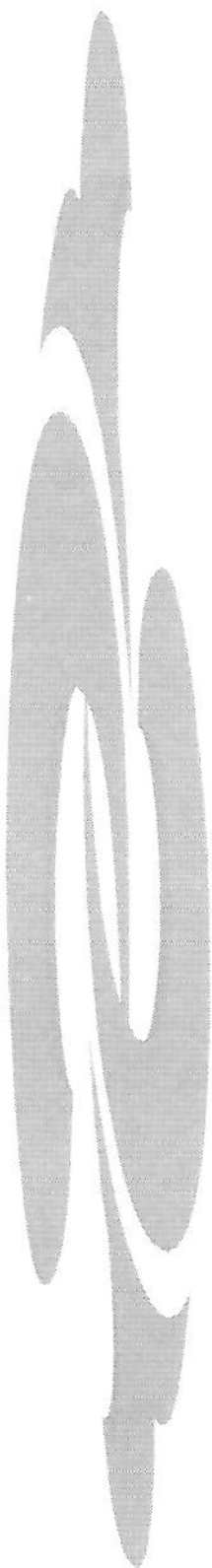
O IRS-2 apresenta uma porção amino terminal contendo um sítio homólogo ao da "pleckstrina" (PH), um domínio de união à fosfatases altamente conservado, e uma porção carboxiterminal com várias sequências de fosforilação em tirosina pouco conservadas quando comparadas com o IRS-1. Nos camundongos transgênicos sem o IRS-1, o IRS-2 foi encontrado em células hematopoiéticas, no músculo esquelético, nos pulmões, no cérebro, fígado, rim, coração e baço, sugerindo que possa ser um substrato alternativo do receptor de insulina (Sun *et al.*, 1995).

A leitura da sequência genômica do IRS-2 revelou uma proteína com 1324 aminoácidos, incluindo três resíduos adicionais na porção C-terminal que não tinham sido descritos previamente (Sun *et al.*, 1997). O IRS-2 migra conjuntamente com o IRS-1 durante a corrida eletroforética do SDS-PAGE (White *et al.*, 1995), apresentando aproximadamente 35% de identidade na região C-terminal com IRS-1, principalmente nos sítios potenciais de fosforilação (Sun, Wang, Zhang, 1997). Juntas, estas duas proteínas formam uma família de proteínas com capacidade multipotencial de transmissão do sinal, que se unem a proteínas que contém domínios SH2 (Src homology-2). O IRS-2 também se liga e ativa as proteínas PI 3-quinase e GRB2.

O IRS-2 parece adquirir importância em camundongos com ausência de IRS-1 (IRS-1^{-/-}). Nestes animais, o tecido hepático apresenta uma hiperfosforilação em tirosina do IRS-2 e mantém uma resposta significativa à insulina e ao IGF-1. Em contraste, o músculo não apresenta este aumento compensatório da fosforilação do IRS-2 e desenvolve resistência à insulina. Sun *et al.* (1997) demonstraram que durante a diferenciação de fibroblastos 3T3-L1 em adipócitos, ocorre um aumento nos níveis de fosforilação do IRS-1 mas não do IRS-2, sugerindo que estas proteínas têm uma regulação diferente, podendo inclusive mediar o sinal insulínico de maneira diferente.

Em 1998 o grupo de White desenvolveu um trabalho no qual utilizaram camundongos transgênicos sem o IRS-2 (IRS-2^{-/-}). Os resultados desse estudo demonstraram que a ausência do gene para o IRS-2 alterava tanto a sinalização periférica como o desenvolvimento das células β pancreáticas, manifestando progressivamente o fenótipo de camundongos com diabetes tipo 2. Desde o nascimento, estes animais apresentavam resistência periférica à insulina e deficiência nas células β pancreáticas, entretanto ocorria uma secreção compensatória de insulina no período de várias semanas. Ao contrário disto, o subsequente aumento da falência da célula β e a resistência periférica à insulina, levou a uma hiperglicemia de jejum sem cetose, a característica mais comum do diabetes Mellitus tipo 2 em humanos. Este trabalho proporciona potenciais diferenças fisiológicas entre o IRS-1 e o IRS-2. Os camundongos IRS-2^{-/-} apresentam anormalidades marcadas no que respeita a homeostase da glicose, mas mínimos defeitos em relação ao crescimento, situação contrária aos camundongos IRS-1^{-/-}. Portanto o IRS-1 e o IRS-2 não podem ser intercambiados na estimulação das vias mitogênicas estimuladas pelo IGF-1, como foi sugerido *in vitro* previamente (Bruning *et al.*, 1997), nem na regulação metabólica estimulada pela insulina, como demonstrado pelo grupo de White. Quando foi feito o estudo da atividade da PI 3-quinase no músculo e fígado, observou-se que os diferentes IRSs não apresentavam os mesmos padrões de associação, indicando o IRS-2 como o regulador mais crítico *in vivo* da via de sinalização da insulina mediadora de vários dos efeitos metabólicos (White *et al.*, 1998).

Entretanto, a regulação integrada de IRS-1 e IRS-2, a interação destes substratos com a PI 3-quinase e a fosforilação/ativação da Akt em tecidos insulino-sensíveis de modelos animais de resistência à insulina, não foram ainda investigados.



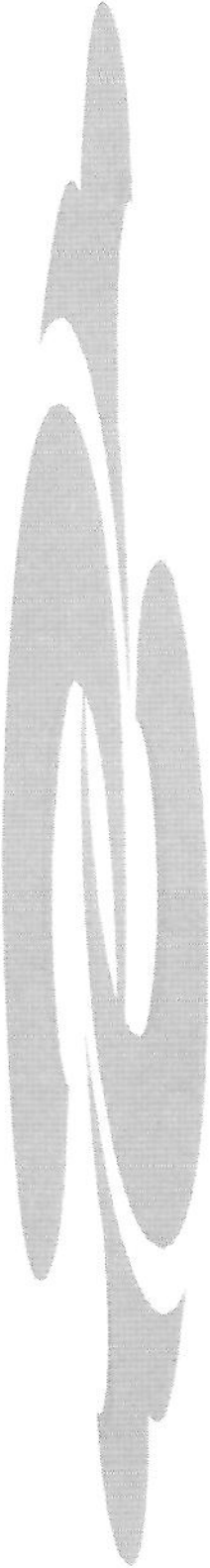
2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

Estudar o grau de fosforilação em tirosina do IRS-2 após o estímulo com insulina, a associação deste substrato com a PI 3-quinase, assim como também o grau de fosforilação em serina da Akt em fígado e músculo de ratos normais e em modelos animais de resistência à insulina que apresentam hipoinsulinemia, hiperinsulinemia ou normoinsulinemia:

Utilizamos seis grupos experimentais:

- a) Ratos normais (jejum 12-14h)
- b) Ratos tratados agudamente com adrenalina (normoinsulinemia)
- c) Ratos tratados com dexametasona por 5 dias (hiperinsulinemia)
- d) Ratos submetidos a jejum por três dias (hipoinsulinemia)
- e) Ratos alimentados até o momento do experimento
- f) Ratos tratados com estreptozotocina (hipoinsulinemia)



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Em todos os experimentos foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar, fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp, a idade dos animais usados será mencionada ao descrever os modelos experimentais estudados.

Uma semana antes de qualquer experimento, os animais foram acomodados em gaiolas plásticas, contendo cinco ratos/gaiola e mantidos em ciclos de 12h de luz (06:00-18:00h) e 12h de escuro (18:00-06:00h), recebendo água e dieta à vontade.

Com exceção do grupo de animais submetidos a jejum prolongado por 72h e seus controles, alimentados à vontade, a alimentação foi suspensa por 12h a 14h antes da coleta do material a ser analisado.

Após determinarmos a curva tempo-resposta da fosforilação do IRS-2 em tecido hepático e muscular estes animais foram divididos em grupos experimentais.

3.1.1. Grupos experimentais

• *Animais submetidos a jejum*

Ratos da linhagem Wistar, com média de idade de 8 semanas, do sexo masculino, com peso em torno de 200g, em número de 10 por experimento, sendo 4 a 8 no grupo controle e o mesmo número no grupo jejum. Os animais foram mantidos em jejum por 72h, ingerindo apenas água à vontade, enquanto o grupo controle permaneceu com oferta de alimento até o momento do experimento.

• *Animais tratados com adrenalina*

Ratos machos da linhagem Wistar, com 8 semanas de idade, do sexo masculino, peso em torno de 200g, em número de 8 por experimento, submetidos a tratamento agudo com adrenalina e o número idêntico de animais no grupo controle, que receberam injeções de salina intraperitoneal. A administração da adrenalina foi feita sob a forma de injeção

intraperitoneal de 25µg por 100g de peso corporal, aproximadamente 5 minutos antes da extração do material. Os animais de ambos grupos permaneceram em jejum por 12 a 14h antes dos experimentos, com ingestão hídrica à vontade.

- *Animais tratados com dexametasona*

Ratos da linhagem Wistar com aproximadamente 8 semanas de idade, do sexo masculino, com peso em torno de 200g, em número de 8 por experimento, submetidos ao tratamento crônico com corticosteróides, através de injeções intraperitoneais diárias de 1mg/kg de peso corporal de dexametasona (Ogawa et al, 1992) ou volume igual de solução salina (grupo controle), no período da manhã durante os 5 dias que antecedem o estudo e no momento do experimento. A alimentação foi suspensa por 12 a 14h antes da coleta do material, com oferta de água à vontade.

- *Animais tratados com STZ*

Ratos da linhagem Wistar, com aproximadamente 8 semanas de idade, do sexo masculino, com peso em torno de 150g, em número de 8 por experimento, submetidos a injeção endovenosa (caudal) de STZ, em dose única de 60mg/kg de peso corporal, ou volume igual de solução de citrato (grupo controle), os animais foram mantidos em jejum alimentar não hídrico aproximadamente 14h antes da administração da STZ e por mais 2h após a administração. Os experimentos foram realizados após 4 dias da administração. A alimentação foi suspensa por 12 a 14h antes da coleta do material, com oferta de água à vontade.

3.2. MATERIAL

Os reagentes e os aparelhos para eletroforese em dodecil sulfato de sódio e gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina e ditioneitol (DTT) da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). Insulina regular fabricada pela Lilly. A proteína A com iodo radioativo (I-125) fornecida pela Amersham (UK). A membrana de nitrocelulose

utilizada (BA85, 0,2m) são de Scheicher e Schuell. Os ratos Wistar são cedidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Os anticorpos monoclonais anti-fosfotirosina, anti- IRS-1, anti-IRS-2 e o anti-PI 3-quinase foram importados da Upstate Biotechnology Incorporated (UBI). O anticorpo anti-Akt (ser473) foi importado da Biolabs (Biolabs, UK).

3.2.1. Soluções utilizadas

Tampão de extração para imunoprecipitação A: para a extração de proteínas para imunoprecipitação dos tecidos estudados. Contém: trisma base a 100 mM, EDTA a 10 mM, pirofosfato de sódio a 10 mM, fluoreto de sódio a 100 mM, ortovanadato de sódio a 10 mM, PMSF a 2 mM (diluído em álcool etílico), triton X 100 a 1% e 0,1 mg/ml de aprotinina. Esta solução foi mantida a 4°C. O ortovanadato, PMSF e a aprotinina foram acrescentados no momento do uso.

Solução Tampão para lavagem do imunoprecipitado: contém: trisma base a 100 mM, EDTA a 10 mM, ortovanadato de sódio a 2 mM, triton X-100 a 0,5%.

Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): contém: trisma base a 200 mM, glicina a 1,52 M, EDTA a 7,18 mM, SDS a 0,4%. Para uso a solução foi diluída 1:4.

Solução tampão para transferência: utilizada para transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Contém: trisma base a 25 mM, glicina a 192 mM, metanol a 20% e SDS a 0,02% para facilitar a eluição de proteína de proteínas alto peso molecular.

Solução para SDS-PAGE, gel de resolução (resolving): utilizada para manufatura do SDS-PAGE, gel de resolução, em tampão composto de EDTA a 4 mM, SDS a 2%, trisma base a 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

Solução para SDS-PAGE, gel de empilhamento (stacking): utilizada na confecção do SDS-PAGE, gel de empilhamento das proteínas. Contém: EDTA a 4 mM, SDS a 2%, trisma base a 50 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

Tampão de Laemmli (5X): utilizada para aplicação do material extraído no gel de poliacrilamida para eletroforese de sódio dodecil-sulfato (SDS-PAGE) a 6%. Contém: azul de bromofenol a 0,1%, fosfato de sódio a 1M pH 7,0, glicerol a 50%, SDS a 10%.

Solução Basal: solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas. Contém: cloreto de sódio 150 mM, trisma base 10 mM, *Tween* 20 a 0,02%.

Solução bloqueadora: utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose logo após a transferência. Contém: 5% de leite em pó desnatado (Molico®) e azida sódica a 0,02%, dissolvidos em solução basal.

Solução para anticorpo: solução na qual se diluem os anticorpos específicos. Contém: 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica a 0,02%, diluídos em solução basal.

Solução com proteína A marcada com ^{125}I : permite a visualização das bandas em autoradiografia, contém 0,1% de leite desnatado, dissolvida em solução basal com 2 μCi de proteína A ^{125}I .

3.3. MÉTODOS

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

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (5mg/100g de peso corporal) e utilizados após a abolição do reflexo corneano e retirada à dor da pata. A cavidade abdominal é aberta e a veia porta exposta. Os animais controle negativo (sem insulina), receberam 0,5 ml de solução salina (NaCl 0,9%), e ratos de controle positivo (+) receberam 60 μg de insulina regular administrados na veia porta. Após trinta segundos

retiramos um pequeno fragmento hepático e o homogeneizamos em 10 volumes de tampão A mantido em gelo, com um polytron PTA 20S (*Brinkmann Instruments* modelo PT 10/35). Cerca de 90 segundos após a injeção, um fragmento do músculo gastrocnemius é retirado e homogeneizado como descrito para o tecido hepático. Ambos os extratos são centrifugados a 15.000 rpm a 4°C por 45 minutos para a remoção do material insolúvel. O sobrenadante é utilizado como amostra para imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-2, IRS-1 ou Akt. Foram utilizados 20µl do sobrenadante para a quantificação da concentração protéica de cada amostra, através do método de biureto.

3.2.2. Análise protéica por *immunoblotting*:

As amostras são tratadas com tampão Laemmli (Laemmli, 1970) contendo DTT 100 mM e aquecidas em água fervente por 4 minutos. Para os extratos totais, alíquotas com de 200g de proteína são aplicadas no SDS-PAGE no aparelho para minigel (*Mini-Protean*). Tem como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos em: miosina (205-195 kDa), β -galactosidase (116 kDa), albumina de soro bovino (80 kDa) e ovoalbumina (49,5 kDa). Realizou-se a eletroforese em cuba de minigel da Bio Rad, com solução tampão previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 25 volts por 2 horas até atingir o tampão de resolving e depois a 120 volts por mais 2 horas.

A transferência das proteínas separadas no gel é feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose. Foi utilizado um aparelho em miniatura para transferência, também da *Bio-Rad*, por 2 horas a 120 volts, como descrito por Towin et al. Porém, no tampão é acrescido SDS 1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose é diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora a 4°C *overnight* ou por 2 horas a temperatura ambiente. Estas membranas foram encubadas em seguida com anticorpos anti-fosfotirosina (1:100), anti-IRS-2 (1:100), anti-IRS-1 (1:100) e anti-Akt (ser473), diluídos em solução bloqueadora (com 0,3% de BSA ao invés de leite). Mantidos assim a 4°C *overnight* ou durante 2 horas a temperatura ambiente e lavados com esta mesma solução sem leite ou

BSA, por 3 sessões de 5 minutos. Estas membranas são, então, encubadas com 60 µl de proteína A com iodo radioativo (30µl/µg) em 10 ml de solução bloqueadora por 4 horas a temperatura ambiente, e a seguir lavadas novamente por três sessões de 5 minutos como descrito acima. A proteína A marcada com iodo radioativo se liga aos anticorpos e pode ser detectada e visualizada em autoradiografias (expostas ao filme de raio X, Kodak XAR-Rochester, NY) usando intensificadores (Cronex Lightning Plus intensifying screens-DuPont, Wilmington, DE), e mantidos a -80°C por 12 a 48 horas. A intensidade das bandas é quantificada por densitometria óptica (*Hoefer Scientific Instrument*, modelo GS300) nas autoradiografias reveladas.

Após a revelação das auto-radiografias e visualização das bandas, estas foram submetidas a densitometria óptica, utilizando o equipamento Eagle Eye scanner (Stratagene). Com estes dados, realizou-se a análise estatística dos diferentes grupos, através da comparação das bandas obtidas. Os resultados finais foram a variação percentual entre os ratos considerados controles e os demais grupos de ratos.

3.3.3. Imunoprecipitação

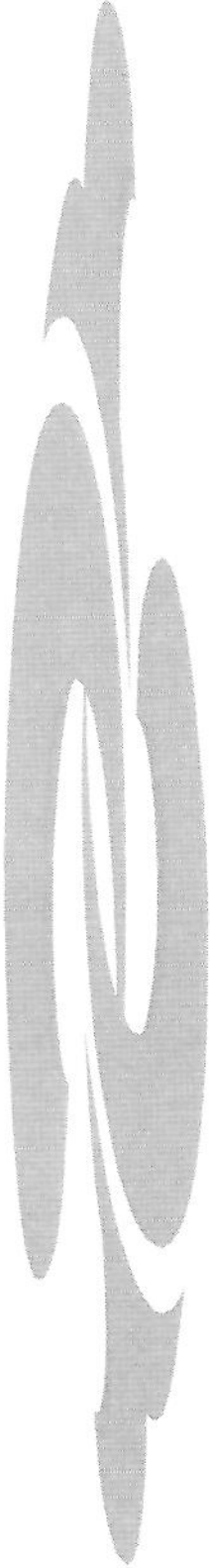
Em alguns experimentos mencionados adiante, os tecidos estudados foram extraídos e homogeneizados no tampão de extração A, em banho de gelo, e mantidos nesta temperatura durante todo o processo. Após a centrifugação por 25 min, a 12000 rpm a 4°C, foi usado o sobrenadante para imunoprecipitação com anticorpos anti-IRS-1 e anti-IRS-2. Os volumes das amostras foram normalizadas por concentração protéica e o volume do anticorpo aplicado foi fixo (10µl/amostra).

As amostras foram incubadas por 12-14h, a 4°C, acrescentando-se, a seguir, proteínas-A Sepharose (50 µl) por 2 horas, a 4°C, por 15 minutos. Os precipitados foram lavados por três vezes com tampão para lavagem do imunoprecipitado.

As proteínas foram tratadas com tampão Laemmli, contendo 100 mM de DTT, aquecidas em água fervente por 5 minutos e então submetidas a eletroforese em SDS-PAGE a 6%. O procedimento de transferência e “imunoblotting” segue as etapas já descritas anteriormente. Nestes experimentos de imunoprecipitação, os anticorpos utilizados para incubar as membranas foram antifosfotirosina e anti-PI3-quinase. As amostras para determinação da fosforilação em serina da Akt foram submetidas a eletroforese e as membranas encubadas com o anticorpo específico.

3.3.4. Análise estatística

Experimentos foram sempre realizados, possibilitando o estudo de todos os grupos de animais em paralelo. Para a análise de significância de 5% ($p < 0,05$), sendo os resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($X \pm E.P.M.$).



4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS

As características gerais dos animais utilizados nos diferentes experimentos são apresentados na tabela I. Os níveis plasmáticos de glicose e de insulina descritos a seguir foram dosados em amostras coletadas de animais que permaneceram em jejum por 12 a 14h, exceto no grupo alimentado e de jejum por 72h.

Os animais que ficaram em jejum por três dias apresentaram uma perda de peso média de 32g em relação aos animais alimentados (Jejum: 179 ± 51 g X Alimentados: 211 ± 62 g, $p < 0,001$). Os níveis plasmáticos de glicose foram significativamente menores no grupo com restrição alimentar (Jejum: 74 ± 2 mg/dl X Alimentados: 165 ± 8 mg/dl; $p < 0,001$) e a insulina sérica também se revelou diminuída nos animais em jejum (Jejum: 13 ± 4 μ U/ml X Alimentados: 38 ± 4 μ U/ml; $p < 0,001$).

Os animais tratados com STZ, após 6 a 7 dias da injeção da droga, apresentaram peso corporal significativamente menor que o daqueles do grupo controle (STZ: 98 ± 4 g X Controle: 141 ± 4 g; $p < 0,001$). Como esperado, houve uma elevação marcante nos níveis glicêmicos dos animais diabéticos em relação ao controle (STZ: 363 ± 6 mg/dl X Controle: 122 ± 6 mg/dl; $p < 0,001$), acompanhada de uma redução significativa nos níveis de insulina sérica (STZ: 6 ± 2 μ U/ml X controle: 29 ± 4 μ U/ml; $p < 0,001$).

Os animais tratados agudamente com adrenalina apresentaram peso semelhante ao do grupo controle (Adrenalina: 214 ± 52 g X Controles: 223 ± 53 g; $p < 0,001$). A comparação entre os níveis de glicose plasmática dos animais do grupo controle e os do grupo tratado com adrenalina não mostrou diferenças significativas (Adrenalina: 108 ± 5 mg/dl X Controle: 93 ± 3 mg/dl; $p < 0,001$). Da mesma maneira, os níveis de insulina sérica também não apresentaram diferenças significativas (Adrenalina: 26 ± 7 μ U/ml X controle: 18 ± 4 μ U/ml; $p < 0,001$).

Os animais tratados com dexametasona, após 5 dias de infusão intraperitoneal da droga, apresentaram peso corporal menor que o grupo controle (Dexametasona: 202 ± 39 g X Controle: 238 ± 47 g; $p < 0,001$). Como esperado, houve uma elevação nos níveis de

glicose plasmática destes animais em relação aos controles (Dexametasona: 224 ± 17 mg/dl X Controle: 122 ± 6 mg/dl; $p < 0,001$), acompanhado de uma elevação significativa nos níveis de insulina séricos (Dexametasona : 46 ± 4 μ U/ml X Controle: 29 ± 4 μ U/ml; $p < 0,001$).

TABELA I

GRUPOS	PESO (g)	GLICEMIA (mg/dl)	INSULINA (total: μ U/ml)
Jejum	179 ± 51	74 ± 2	13 ± 4
Alimentado (n=10)	211 ± 62 $p < 0,001$	165 ± 8 $p < 0,001$	38 ± 4 $p < 0,001$
STZ	98 ± 4	363 ± 6	6 ± 2
Controle (n=8)	141 ± 4 $p < 0,001$	122 ± 6 $p < 0,001$	29 ± 4 $p < 0,001$
Adrenalina	214 ± 52	108 ± 5	26 ± 7
Controle (n=8)	223 ± 53	93 ± 3	18 ± 4
Dexametasona	202 ± 39	224 ± 17	46 ± 4
Controle (n=8)	238 ± 47 $p < 0,001$	122 ± 6 $p < 0,001$	29 ± 4 $p < 0,001$

4.1.1. Determinação do tempo de fosforilação do IRS-2 em fígado

A figura 1 resume os resultados obtidos em amostras de fígado previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e posteriormente submetidas a «imunoblotting» com anticorpo anti-fosfotirosina. Neste tecido a fosforilação é tempo dependente. Observamos que ocorre um aumento máximo da fosforilação 30 segundos após o estímulo com insulina comparando com o basal, e decresce paulatinamente, retornando a níveis próximo ao basal aos 5 minutos (medida em %: Unidades arbitrárias).

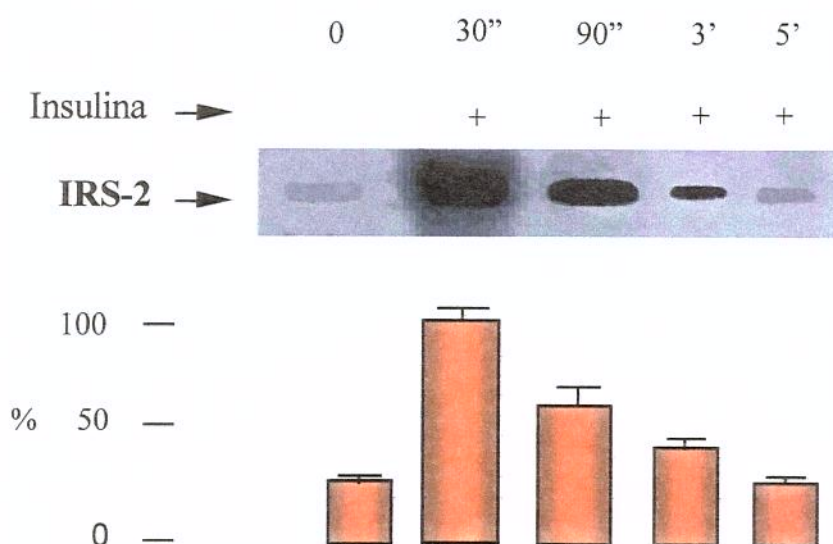


Figura 1: Avaliação do grau de fosforilação do IRS-2 em função do tempo: Avaliação do grau de fosforilação do IRS-2 em tecido hepático, antes (zero) e após a infusão de insulina, em diferentes tempos (0, 30", 90", 3' e 5'). As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2, e submetidas a "imunoblotting" com anticorpo antifosfortirosina.

4.1.2. Determinação do tempo de fosforilação do IRS-2 em músculo

A figura 2 resumem os resultados obtidos em amostras de tecido muscular previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e posteriormente submetidas a «imunoblotting» com anticorpo anti-fosfotirosina. No músculo a fosforilação também é tempo dependente. Observamos que ocorre um aumento na fosforilação do IRS-2, 30 segundos após o estímulo com insulina comparando com o basal, porém o pico máximo de fosforilação ocorre aos 90 segundos e decresce paulatinamente, retornando a níveis próximo ao basal em seguida (medida em %:Unidades arbitrárias).

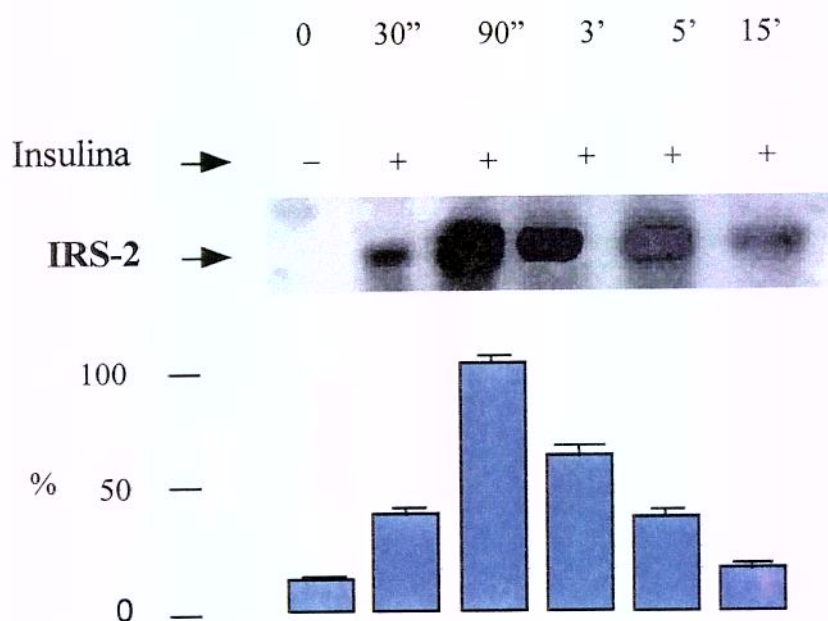


Figura 2: Avaliação do grau de fosforilação do IRS-2 em função do tempo: Avaliação do grau e fosforilação do IRS-2 em tecido muscular antes (zero) e após infusão de insulina, em diferentes tempos (0, 30", 90", 3', 5' e 15'). As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2, e submetidas a "imunoblotting" com anticorpo antifosfotirosina.

4.1.3.a. Efeito do tratamento agudo com adrenalina na determinação do grau de fosforilação do IRS-2 em tecido hepático; associação do IRS-2 com a proteína PI3-quinase. Fosforilação em serina da Akt.

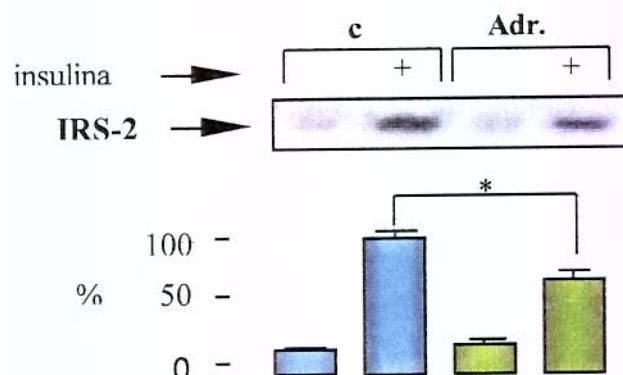
Com o objetivo de investigar o efeito das catecolaminas na fosforilação do IRS-2, injetou-se adrenalina na dose de 25 µg/100 g de animal, e realizou-se o experimento 5 min após. O animal controle recebeu injeção de salina.

A fosforilação em tirosina do IRS-2 após o estímulo com insulina, apresentou uma redução significativa (C: 100±10%; A: 63 ± 11%, $p<0.05$) no fígado de ratos tratados agudamente com epinefrina (Fig.3a). Estas mesmas amostras foram submetidas à técnica de “stripping” de modo a retirar o anticorpo anti-PY e posteriormente foi realizado um novo immunoblotting com o anticorpo anti-p85 da subunidade 85 kDa da PI3-quinase para observar o grau de associação desta proteínas com o IRS-2. O valor de associação da PI3-quinase diminuiu para 73 ± 8% ($p<0.05$) nos ratos tratados com adrenalina em comparação aos ratos controles, acompanhando a diminuição no grau de fosforilação do IRS-2 (Fig.3b). Do mesmo modo, quando foram estudadas amostras de tecido hepático imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e realizado “immunoblotting” com anti-PY e com o anticorpo anti-PI 3-quinase, houve uma diminuição na fosforilação para 62 ± 8% ($p<0.01$) e uma diminuição para 63 ± 8% na associação IRS-1/PI 3-quinase. A fosforilação em serina da Akt após o estímulo com insulina foi significativamente reduzida para 60 ± 5%, $p<0.045$ em tecido hepático dos animais tratados com adrenalina quando comparados com os ratos controle (Fig.3c).

a. Fosforilação do IRS-2

IP: α IRS-2

IB: α PY



b. Associação da PI3-quinase

IP: α IRS-2

IB: α PI3-k

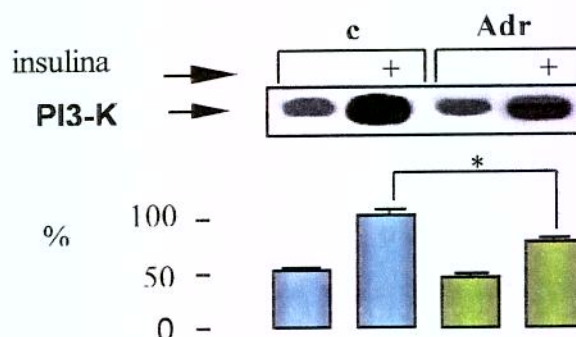


Figura 3: Efeito do tratamento agudo com adrenalina na fosforilação do IRS-2 e na associação com a PI3-quinase em tecido hepático. **a:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-2 em fígado de ratos controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina. **b:** Avaliação da associação do IRS-2/PI3-quinase em fígado de ratos controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com anti-PI3-quinase. A densitometria foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., e a significância expressa como * $p < 0.05$.

c. Fosforilação do AKT
IB: α AKT

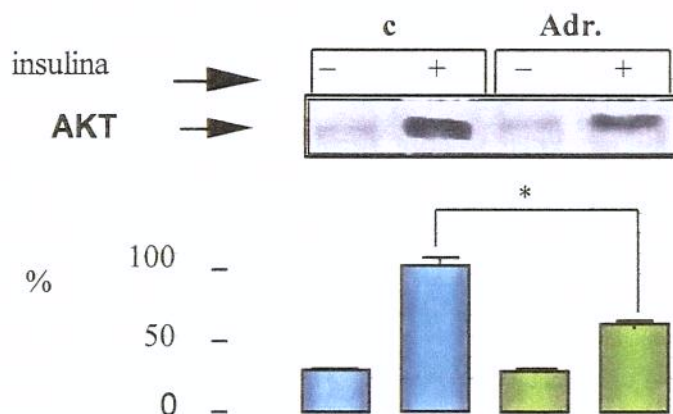
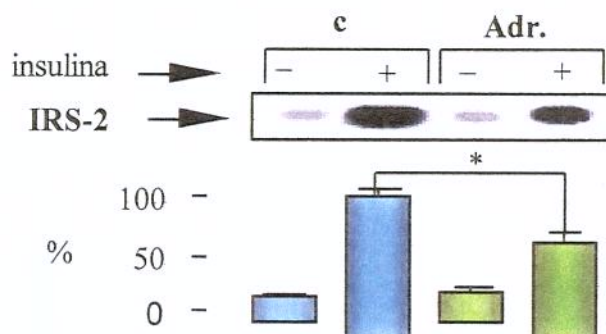


Figura 3: Efeito do tratamento agudo com adrenalina na fosforilação do Akt em tecido hepático. c: Avaliação do grau de fosforilação em serina do Akt em fígado de ratos controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. A densitometria foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., e a significância expressa como $*p < 0.05$.

4.1.3.b. Efeito do tratamento agudo com adrenalina na determinação do grau de fosforilação do IRS-2 em tecido muscular; associação do IRS-2 com a proteína PI3-quinase. Fosforilação em serina da Akt.

A fosforilação em tirosina do IRS-2 após o estímulo com insulina, apresentou uma redução significativa (C: $100 \pm 11\%$; A: $74 \pm 8\%$, $p < 0.01$) (Fig.4a) no tecido muscular de ratos tratados agudamente com epinefrina. Estas mesmas amostras foram submetidas à técnica de “stripping” de modo a retirar o anticorpo anti-PY e posteriormente foi realizado um novo immunoblotting com PI3-quinase para observar o grau de associação desta proteína com o IRS-2. O valor de associação da PI3-quinase no músculo diminuiu para $55 \pm 11\%$ ($p < 0.05$) nos ratos tratados com adrenalina em relação aos ratos controles (Fig.4b), acompanhando a diminuição no grau de fosforilação do IRS-2. Do mesmo modo, quando foram estudadas amostras de músculo imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e realizado immunoblotting com anti-PY e anti-PI 3-quinase, houve uma diminuição na fosforilação para $67 \pm 8\%$ ($p < 0.01$) e uma diminuição para $45 \pm 6\%$ na associação IRS-1/PI 3-quinase. A fosforilação em serina da Akt após o estímulo com insulina foi significativamente reduzida para $70 \pm 6\%$, ($p < 0.01$) em tecido muscular dos animais tratados com adrenalina quando comparada com os ratos controle (Fig.4c).

a. Fosforilação do IRS-2
 IP: α IRS-2
 IB: α PY



b. Associação da PI3-quinase
 IP: α IRS-2
 IB: α PI3-k

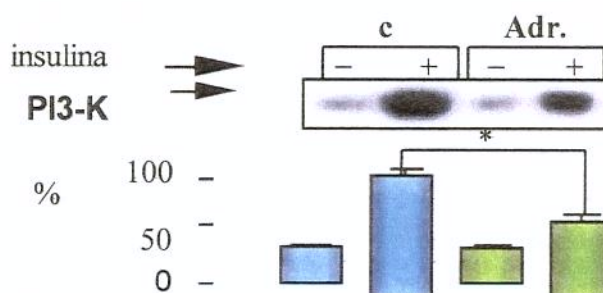


Figura 4: Efeito do tratamento agudo com adrenalina na fosforilação do IRS-2 e na associação com a PI3-quinase no tecido muscular. a: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-2 em tecido muscular de ratos controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com antifosfotirosina. **b:** Avaliação da associação do IRS-2/PI3-quinase em tecido muscular de ratos controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com anticorpo anti-PI3-K. A densitometria foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., e a significância expressa como $*p < 0.05$.

c. Fosforilação do AKT
IB: α AKT

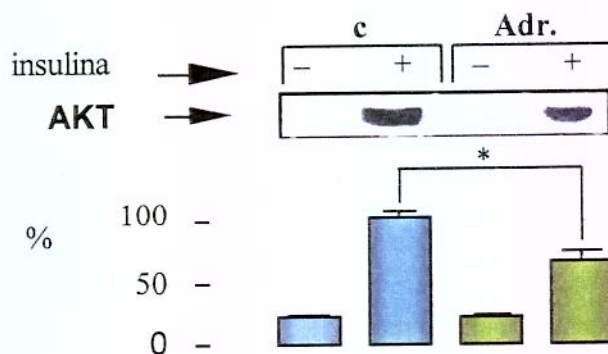


Figura 4: Efeito do tratamento agudo com adrenalina na fosforilação do Akt no tecido muscular. c: Avaliação do grau de fosforilação em serina do Akt em tecido muscular de ratos controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. A densitometria foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., e a significância expressa como *p < 0.05.

4.1.4.a. Efeito do tratamento crônico com dexametasona na determinação do grau de fosforilação do IRS-2 em tecido hepático; associação do IRS-2 com a proteína PI3-quinase. Fosforilação da proteína AKT/PKB.

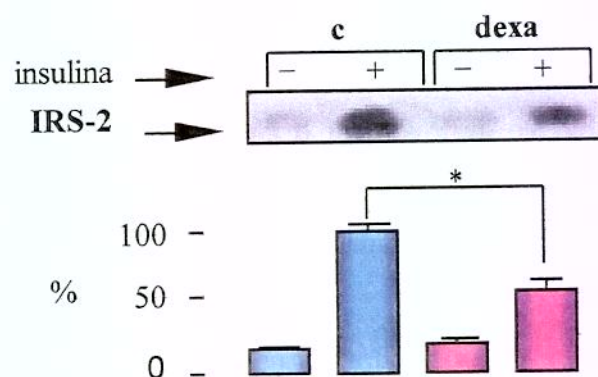
Com o objetivo de investigar o efeito dos glicocorticoides na fosforilação do IRS-2 injetou-se dexametasona na dose de 1mg/kg de peso do animal durante 5 dias. O animal controle recebeu injeção de salina.

A fosforilação em tirosina do IRS-2 após o estímulo com insulina, apresentou uma redução significativa (C: $100 \pm 11\%$; dexta: $50 \pm 11\%$; $p < 0.05$) no tecido hepático de ratos tratados cronicamente com dexametasona (Fig.5a). Estas mesmas amostras foram submetidas à técnica de “stripping” de modo a retirar o anticorpo anti-PY e posteriormente foi realizado um immunoblotting com a PI3-K para observar o grau de associação desta proteína com o IRS-2. Os valores de associação da PI3-quinase neste tecido mostrou uma diminuição significativa (C: 100%; dexta: $80 \pm 10\%$; $p < 0.05$) quando comparados os ratos tratados com os ratos controles (Fig.5b). Do mesmo modo, quando foram estudadas amostras de tecido hepático imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e realizado immunoblotting com anti-PY e anti-PI 3-quinase, houve uma diminuição na fosforilação para $45 \pm 8\%$ ($p < 0.01$) e uma diminuição para $82 \pm 3\%$ na associação IRS-1/PI 3-quinase. A fosforilação em serina da Akt após o estímulo com insulina foi significativamente reduzido para $70 \pm 17\%$, $p < 0.035$ em tecido hepático dos animais tratados com dexametasona quando comparados com os ratos controle (Fig.5c).

a. Fosforilação do IRS-2

IP: α IRS-2

IB: α PY



b. Associação da PI3-quinase

IP: α IRS-2

IB: α PI3-k

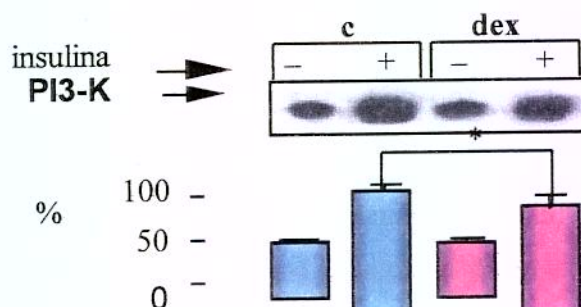


Figura 5: Efeito do tratamento crônico com dexametasona na fosforilação do IRS-2 e na associação com a PI3-quinase no tecido hepático: **a:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina em tecido hepático de ratos controle (C) e tratados (dexa), antes (-) e após (+) infusão de insulina. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com antifosfotirosina. **b:** Avaliação da associação do IRS-2 com a PI3-quinase em tecido hepático de ratos (C) e tratados (dexa), antes (-) e após (+) infusão com insulina. Amostras de fígado foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com anticorpo anti-PI3-K. A densitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., e a significância expressa como * $p < 0,05$.

c. Fosforilação do AKT
IB: α AKT

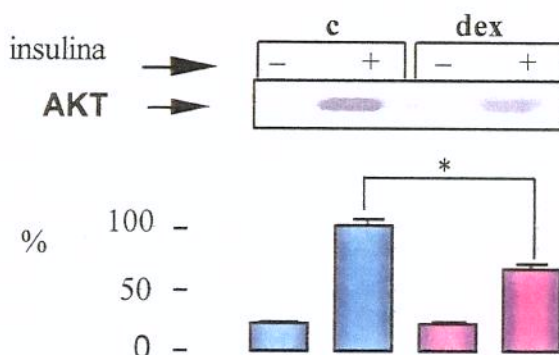


Figura 5: Efeito do tratamento crônico com dexametasona na fosforilação da Akt no tecido hepático: c: Avaliação do grau de fosforilação em serina do Akt em fígado de ratos controle (C) e tratados (dexa), antes (-) e após (+) infusão de insulina. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com anti-Akt. A densitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., e a significância expressa como $*p<0,05$.

4.1.4.b. Efeito do tratamento crônico com dexametasona na determinação do grau de fosforilação do IRS-2 em tecido muscular; associação do IRS-2 com a proteína PI3-quinase. Fosforilação em serina da Akt.

A fosforilação em tirosina do IRS-2 após o estímulo com insulina apresentou uma redução significativa (C: $100 \pm 11\%$; dexta: $63 \pm 1\%$; $p < 0.05$) no tecido muscular de ratos tratados cronicamente com dexametasona (Fig.6a). Estas mesmas amostras foram submetidas à técnica de “stripping” de modo a retirar o anticorpo anti-PY e posteriormente foi realizado um immunoblotting com PI3-quinase para observar o grau de associação desta proteína com o IRS-2. O valor de associação da PI3-quinase neste tecido mostrou uma diminuição significativa (C: 100% ; dexta: $84 \pm 10\%$; $p < 0.05$) quando comparados os ratos tratados com os ratos controles (Fig.6b). Do mesmo modo, quando foram estudadas amostras de tecido muscular imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e realizado immunoblotting com anti-PY e com anti-PI 3-quinase, houve uma diminuição na fosforilação para $36 \pm 5\%$ ($p < 0.01$) (Saad *et al.*, 1995) e uma diminuição para $47 \pm 4\%$ na associação do IRS-1/PI 3-quinase. A fosforilação em serina da Akt após o estímulo com insulina não mostrou mudanças significativas no tecido muscular dos animais tratados com dexametasona quando comparados com os ratos controle (Fig.6c).

c. Fosforilação da AKT
IB: α AKT

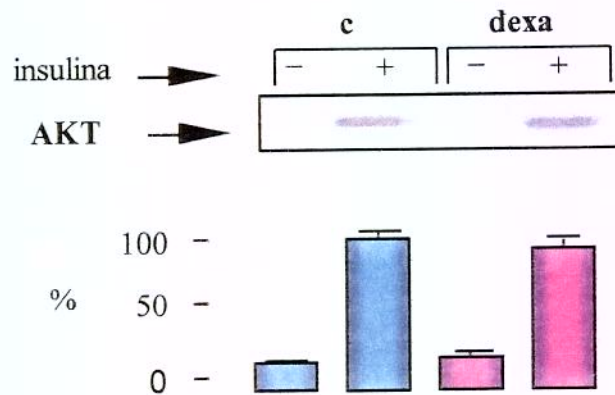


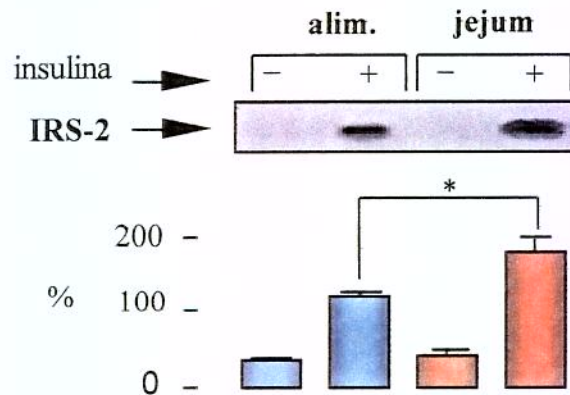
Figura 6: Efeito do tratamento crônico com dexametasona na fosforilação da Akt no tecido muscular: c: Avaliação do grau de fosforilação em serina do Akt em músculo de ratos controle (C) e tratados (dexa), antes (-) e após (+) infusão de insulina. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com anti-Akt. A densitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., e a significância expressa como $*p < 0,05$.

4.1.5.a. Efeito do jejum prolongado na determinação do grau de fosforilação do IRS-2 em tecido hepático de ratos; associação da proteína IRS-2 com a PI3-quinase. Fosforilação em serina da Akt.

Com o objetivo de investigar o efeito do jejum prolongado na fosforilação do IRS-2 no tecido hepático, estes animais foram submetidos a jejum de 72hs. O animal controle foi deixado em alimentação até o momento do experimento.

A fosforilação em tirosina do IRS-2 após o estímulo com insulina, apresentou um aumento significativo (alim: $100 \pm 21\%$; jejum: $174 \pm 11\%$; $p < 0,05$) no tecido hepático dos ratos experimentais (Fig.7a). Estas mesmas amostras foram submetidas à técnica de “stripping” de modo a retirar o anticorpo anti-PY e posteriormente foi realizado um immunoblotting com PI3-K para observar o grau de associação desta proteína com o IRS-2. Os valores de associação da PI3-quinase neste tecido mostraram um aumento significativo (alim: 100% ; jejum: $124 \pm 6\%$) ($p < 0,05$) quando comparados os ratos em jejum com os ratos controles (Fig.7b), acompanhando o aumento no grau de fosforilação do IRS-2. Do mesmo modo, quando foram estudadas amostras de tecido hepático imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e realizado “immunoblotting” com anti-PY e anti-PI 3-quinase, houve um aumento na fosforilação para $152 \pm 7\%$ ($p < 0,01$) e um aumento para $148 \pm 3\%$ na associação do IRS-1/PI 3-quinase. A fosforilação em serina da Akt após o estímulo com insulina foi significativamente aumentada para $170 \pm 6\%$, $p < 0,03$ em tecido hepático dos animais submetidos a jejum de 72hs quando comparada com os ratos alimentados (Fig.7c).

a. Fosforilação do IRS-2
 IP: α IRS-2
 IB: α PY



b. Associação da PI3-K
 IP: α IRS-2
 IB: α PI3-K

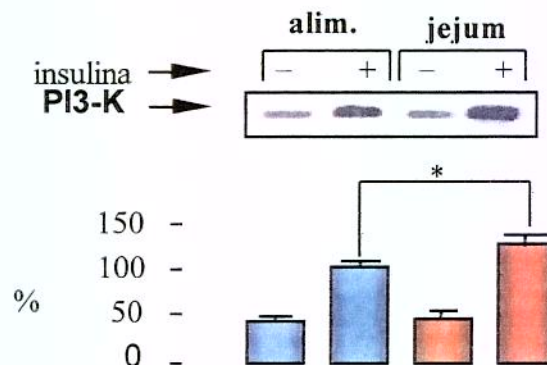


Figura 7: Efeito do jejum prolongado na fosforilação do IRS-2 e na associação com a PI3-quinase no tecido hepático: a: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina em tecido hepático de ratos controle (alim.) e tratados (jejum), antes (-) e após (+) infusão de insulina. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com antifosfotirosina. **b:** Avaliação da associação do IRS-2 com a PI3-quinase em tecido hepático de ratos (alim.) e tratados (jejum), antes (-) e após (+) infusão com insulina. Amostras de tecido hepático foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com anticorpo anti-PI3-K. A densitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., e a significância expressa como * $p < 0,05$.

c.Fosforilação do AKT
IB: α AKT

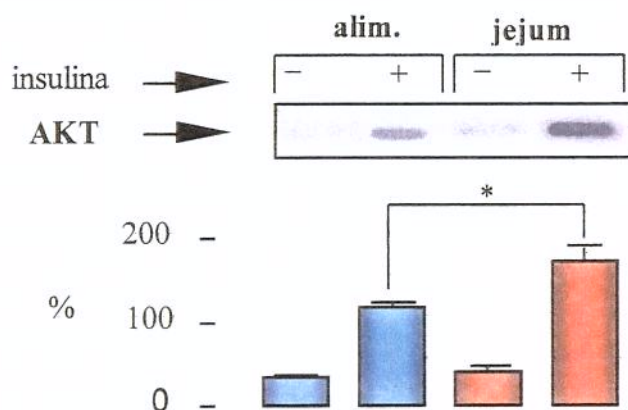


Figura 7: Efeito do jejum prolongado na fosforilação do Akt no tecido hepático: c:
Avaliação do grau de fosforilação em serina do Akt em tecido hepático de ratos controle (alim.) e tratados (jejum), antes (-) e após (+) infusão de insulina. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com anti-Akt. A densitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., e a significância expressa como $*p<0,05$.

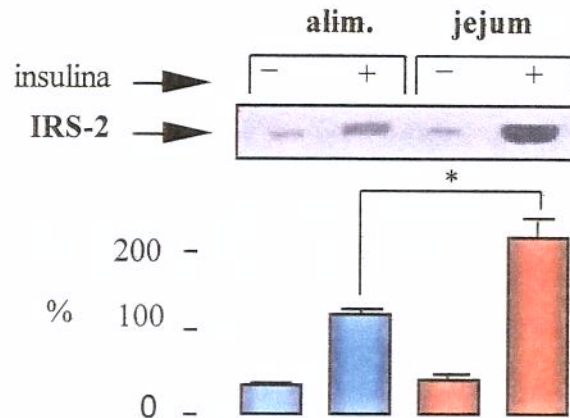
4.1.5.b. Efeito do jejum prolongado na determinação do grau de fosforilação do IRS-2 em tecido muscular de ratos; associação da proteína IRS-2 com a PI3-quinase. Fosforilação em serina da Akt.

A fosforilação em tirosina do IRS-2 após o estímulo com insulina apresentou um aumento significativo (alim: $100 \pm 21\%$; jejum: $207 \pm 11\%$; $p < 0,05$) no tecido muscular dos ratos experimentais (Fig.8A). Estas mesmas amostras foram submetidas à técnica de “stripping” de modo a retirar o anticorpo anti-PY e posteriormente foi realizado um immunoblotting com a PI3-K para observar o grau de associação desta proteína com o IRS-2. Os valores de associação da PI3-quinase neste tecido mostraram um aumento moderado porém significativo (alim: 100% ; jejum: $128 \pm 7\%$) ($p < 0.05$) quando comparados os ratos em jejum com os ratos controles (Fig.8b), acompanhando o aumento no grau de fosforilação do IRS-2. Do mesmo modo, quando foram estudadas amostras de tecido muscular imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e realizado “immunoblotting” com anti-PY e com anti-PI 3-quinase, houve um aumento na fosforilação para $140 \pm 6\%$ ($p < 0.01$) e um aumento para $152 \pm 4\%$ na associação do IRS-1/PI 3-quinase. A fosforilação em serina da Akt após o estímulo com insulina foi significativamente aumentada para $152 \pm 8\%$, $p < 0.03$ em tecido muscular dos animais submetidos a jejum de 72hs quando comparada aos ratos alimentados (Fig.8c).

a. Fosforilação do IRS-2

IP: α IRS-2

IB: α PY



b. Associação da PI3-K

IP: α IRS-2

IB: α PI3-K

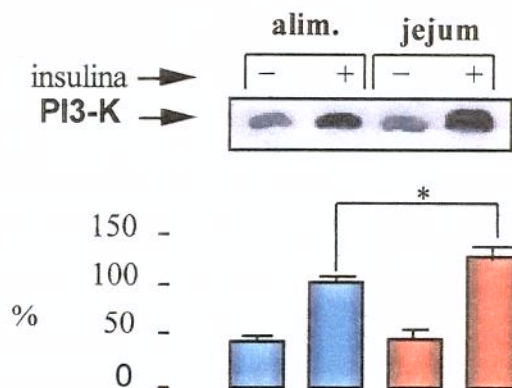


Figura 8: Efeito do jejum prolongado na fosforilação do IRS-2 e na associação com a PI3-quinase no tecido muscular: a: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina em tecido muscular de ratos controle (alim.) e tratados (jejum), antes (-) e após (+) infusão de insulina. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com antifosfotirosina. **b:** Avaliação da associação do IRS-2 com a PI3-quinase em músculo de ratos (alim.) e tratados (jejum), antes (-) e após (+) infusão com insulina. Amostras de tecido muscular foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com anticorpo anti-PI3-K. A densitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., e a significância expressa como * $p < 0,05$.

C: Fosforilação do AKT
IB: α AKT

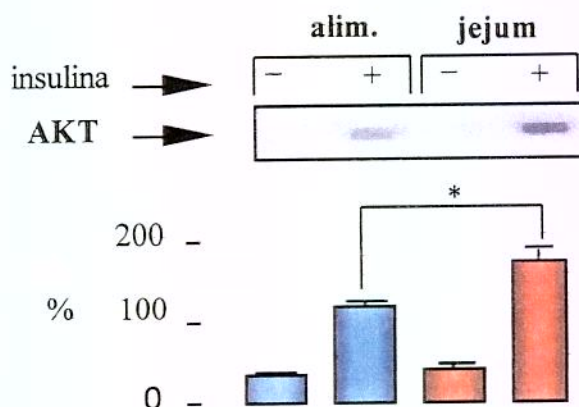


Figura 8: Efeito do jejum prolongado na fosforilação do Akt no tecido muscular: c:

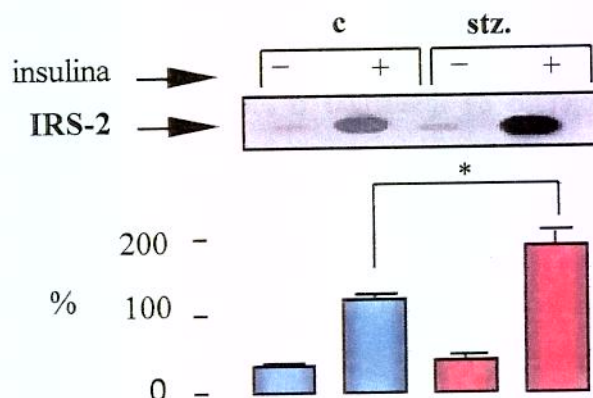
Avaliação do grau de fosforilação em serina do Akt em tecido muscular de ratos controle (alim.) e tratados (jejum), antes (-) e após (+) infusão de insulina. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com anti-Akt. A densitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., e a significância expressa como * $p < 0,05$.

4.1.6.a. Efeito do tratamento com streptozotocina na determinação do grau de fosforilação do IRS-2 em tecido hepático de ratos; associação da proteína IRS-2 com a PI3-quinase. Fosforilação em serina da Akt.

Com o objetivo de investigar o efeito da streptozotocina na fosforilação em tirosina do IRS-2 injetou-se streptozotocina numa dose única de 60 mg/kg de animal e realizou-se o experimento 5 dias após. O animal controle recebeu injeção de salina.

A fosforilação em tirosina do IRS-2 após o estímulo com insulina, apresentou um aumento significativo (C: $100 \pm 15\%$; stz.: $187 \pm 15\%$) no tecido hepático dos ratos experimentais (Fig.9a). Estas mesmas amostras foram submetidas à técnica de “stripping” de modo a retirar o anticorpo anti-PY e posteriormente foi realizado um immunoblotting com a PI3-K para observar o grau de associação desta proteína com o IRS-2. Os valores de associação da PI3-quinase neste tecido mostraram um aumento moderado e significativo (C: 100%; stz: $136 \pm 10\%$, $p < 0.00$) quando comparados os ratos tratados com os ratos controles (Fig.9b). Do mesmo modo, quando foram estudadas amostras de tecido muscular imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e realizado “immunoblotting” com anti-PY e anti-PI 3-quinase, houve um aumento na fosforilação para $267 \pm 17\%$ ($p < 0.05$) e um aumento para $180 \pm 7\%$ na associação do IRS-1/PI 3-quinase. A fosforilação em serina da Akt após o estímulo com insulina foi significativamente reduzido para $65 \pm 6\%$, $p < 0.035$ em tecido hepático dos animais tratados com streptozotosina quando comparada com os ratos controle (Fig.9c).

a. Fosforilação do IRS-2
 IP: α IRS-2
 IB: α PY



b. Associação da PI3-K
 IP: α IRS-2
 IB: α PI3-K

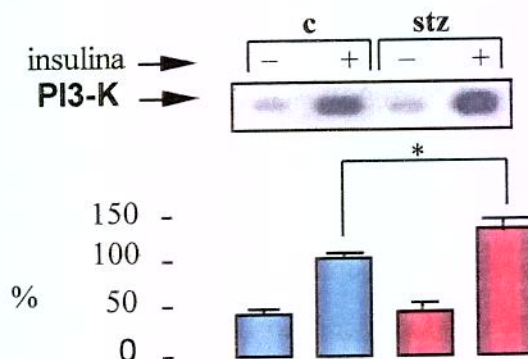


Figura 9: Efeito do tratamento crônico com streptozotocina na fosforilação do IRS-2 e na associação com a PI3-quinase no tecido hepático: **a:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina em tecido hepático de ratos controle (C) e tratados (stz.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com antifosfotirosina. **b:** Avaliação da associação do IRS-2 com a PI3-quinase em tecido hepático de ratos (C) e tratados (stz.), antes (-) e após (+) infusão com insulina. Amostras de tecido hepático foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com anticorpo anti-PI3-K. A densitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., e a significância expressa como * $p < 0,05$.

c. Fosforilação do AKT
IB: α AKT

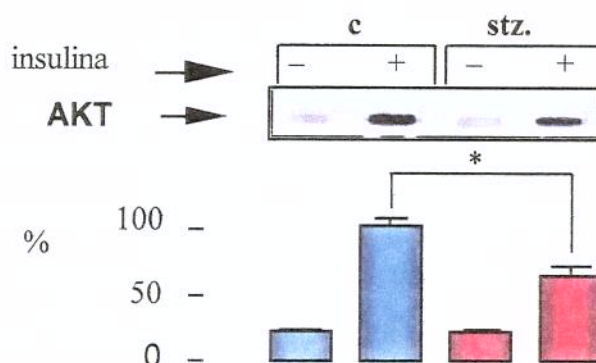


Figura 9: Efeito tratamento crônico com streptozotocina na fosforilação do Akt no tecido hepático: c: Avaliação do grau de fosforilação em serina do Akt em tecido hepático de ratos controle (C) e tratados (stz.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com anti-Akt. A densitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., e a significância expressa como * $p < 0,05$.

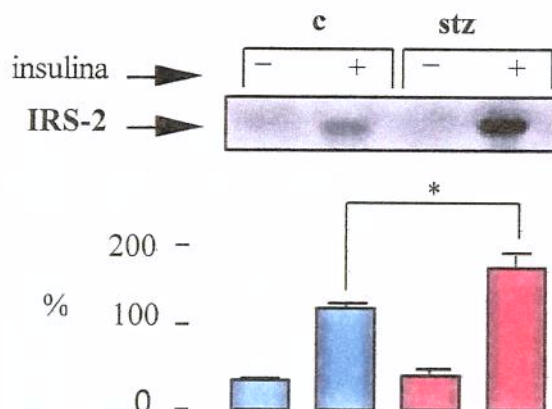
4.1.6.b. Efeito do tratamento com streptozotocina na determinação do grau de fosforilação do IRS-2 em tecido muscular de ratos; associação da proteína IRS-2 com a PI3-quinase. Fosforilação em serina da Akt.

A fosforilação em tirosina do IRS-2 após o estímulo com insulina apresentou um aumento significativo (C: $100 \pm 27\%$; stz.: $168 \pm 15\%$) no tecido muscular dos ratos experimentais (Fig.10a). Estas mesmas amostras foram submetidas à técnica de “stripping” de modo a retirar o anticorpo anti-PY e posteriormente foi realizado um immunoblotting com a PI3-K para observar o grau de associação desta proteína com o IRS-2. Os valores de associação da PI3-quinase neste tecido mostraram um aumento significativo (C: $100 \pm 3\%$; stz.: $122 \pm 5\%$) quando comparados os ratos tratados com os ratos controles (Fig.10b). Do mesmo modo, quando foram estudadas amostras de tecido muscular imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e realizado “immunoblotting” com anti-PY e anti-PI 3-quinase, houve um aumento na fosforilação para $191 \pm 14\%$ ($p < 0.05$) (M.H. Mello) e um aumento para $175 \pm 1\%$ na associação do IRS-1/PI 3-quinase. A fosforilação em serina da Akt após o estímulo com insulina foi significativamente reduzido para $70 \pm 7\%$, $p < 0.035$ em tecido muscular dos animais tratados com streptozotocina quando comparada com os ratos controle (Fig.10c).

a. Fosforilação do IRS-2

IP: α IRS-2

IB: α PY



b. Associação da PI3-K

IP: α IRS-2

IB: α PI3-K

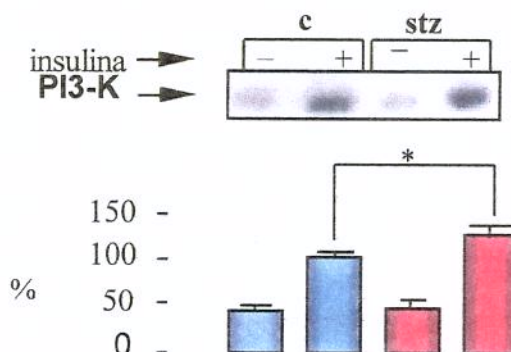


Figura 10: Efeito do tratamento crônico com streptozotocina na fosforilação do IRS-2 e na associação com a PI3-quinase no tecido muscular: **a:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina em tecido muscular de ratos controle (C) e tratados (stz.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com antifosfotirosina. **b:** Avaliação da associação do IRS-2 com a PI3-quinase em músculo de ratos (C) e tratados (stz.), antes (-) e após (+) infusão com insulina. Amostras de tecido muscular foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com anticorpo anti-PI3-K. A densitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., e a significância expressa como * $p < 0,05$.

c. Fosforilação do AKT
IB: α AKT

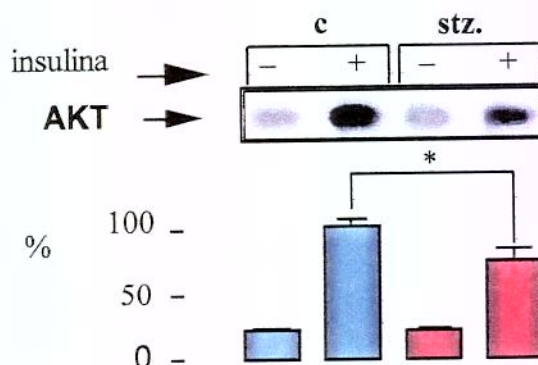
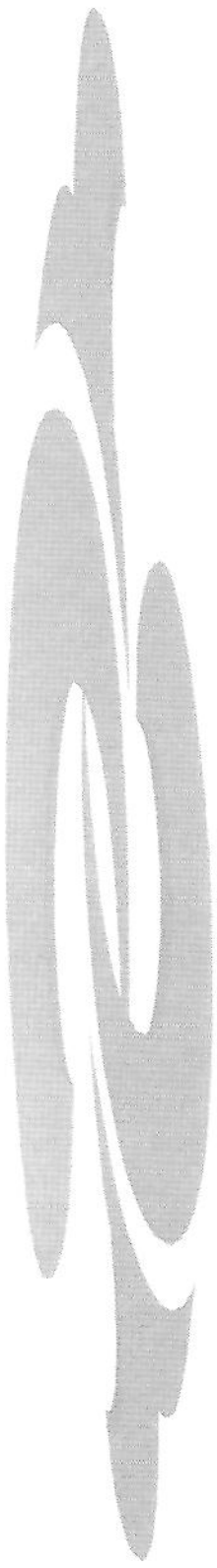


Figura 10: Efeito do tratamento crônico com streptozotocina na fosforilação do Akt no tecido muscular: c: Avaliação do grau de fosforilação em serina do Akt em tecido muscular de ratos controle (C) e tratados (stz.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e submetidas a “imunoblotting” com anti-Akt. A densitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., e a significância expressa como $*p < 0,05$.



5. DISCUSSÃO

A insulina é o principal hormônio regulador do metabolismo de nutrientes. Em resposta ao aumento da concentração de glicose sanguínea, as células β das ilhotas pancreáticas liberam a insulina na corrente circulatória, que é conduzida para os tecidos alvos. Nesses tecidos promove o influxo de nutrientes e bloqueia a liberação de outras formas de energia estocadas (Birnanbaum *et al.*, 1993).

Este hormônio inicia suas ações metabólicas e promotoras de crescimento quando se liga à subunidade α extracelular de seu receptor tetramétrico, estimulando assim a capacidade tirosina quinase na subunidade β . Isto catalisa a autofosforilação intramolecular de tirosinas específicas nesta subunidade, aumentando a atividade tirosina quinase dirigida a substratos endógenos intracelulares. Este evento inicial leva à fosforilação de proteínas que conformam uma rede complexa, caracterizada por vias alternativas e diferentes isoformas destas proteínas chaves envolvidas na sinalização. Estas proteínas citoplasmáticas são coletivamente denominadas IRSs (substratos dos receptor de insulina), cujo componente melhor estudado é chamado substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) (Sun *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1992).

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

O protocolo experimental utilizado neste trabalho, estimulação *in vivo* com insulina, extração e homogeneização dos tecidos hepáticos e muscular em tampões com inibidores de fosfatases e proteases ou em condições apropriadas para imunoprecipitação, e

posterior “imunoblotting” com anticorpos específicos, permitiu uma avaliação das etapas iniciais da ação insulínica nestes dois importantes tecidos para a homeostase da glicose (Saad *et al.*, 1989). A metodologia aplicada neste estudo permitiu uma avaliação direta da fosforilação em tirosina do IRS-2, bem como sua associação com outras proteínas, e a fosforilação em serina/treonina da Akt.

Os substratos do receptor de insulina, IRS-1 até o IRS-4, Shc e o Gab-1, todos eles sofrem fosforilação em tirosina após o estímulo com insulina, exercida pela atividade quinase do receptor de insulina e, com exceção do Shc, eles apresentam múltiplos sítios de fosforilação permitindo a interação simultânea deles com outras proteínas sinalizadoras que possuam sítios homólogos com src 2 (SH2) (Sun *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 1995; Smith-Hall *et al.*, 1997; Cheatham e Kahn, 1995; Holgado-Madruga *et al.*, 1996; Lavan *et al.*, 1993). Estas incluem a tirosina fosfatase SHP2, a tirosina quinase Fyn, a molécula adaptadora GRB2 e a subunidade regulatória da PI 3-quinase (Skolnik *et al.*, 1993; Cheatham e Kahn, 1995; Sun *et al.*, 1993; Freeman *et al.*, 1992; Myers *et al.*, 1993; Sugimoto *et al.*, 1994). O tratamento de cultura de células com *wortmannin*, um potente inibidor da PI 3-quinase, inibe a captação de glicose estimulada pela insulina (Okada *et al.*, 1994; Hara *et al.*, 1994). Estes estudos sugerem que a atividade da PI 3-quinase é importante na manutenção da homeostase da glicose.

As alterações ocorridas nos primeiros passos da sinalização insulínica tem sido consideradas como um componente muito importante para o desenvolvimento de alguns estados da resistência à insulina. Em camundongos transgênicos (knockout) sem o IRS-1, o IRS-2 parece atuar como um substrato alternativo, permitindo assim a transmissão do sinal estimulado pela insulina (Yamauchi *et al.*, 1996). Levando isto em consideração, a investigação da regulação do IRS-2 e sua sinalização podem introduzir novas informações nos mecanismos moleculares de resistência à insulina.

A elevação dos níveis circulantes de catecolaminas, tanto pela liberação endógena de adrenalina como a infusão de catecolaminas exógenas, induzem resistência à insulina (Moller & Flier, 1991). Estes hormônios antagonizam a ação da insulina, estimulando a neoglicogênese, a glicogenólise e inibindo a captação periférica

de glicose. A principal ação destes hormônios é elevar a concentração intracelular do AMPc. Um aumento nos níveis intracelulares de AMPc induz resistência à insulina com alteração no receptor e pós-receptor (Kirsch *et al.*, 1983, Haring *et al.*, 1986). Quando são usados receptores purificados e substratos artificiais *in vitro*, pode ser observada uma diminuição na fosforilação do receptor de insulina e sua atividade quinase como consequência de um aumento do cAMP e da PKA (Folli *et al.*, 1993). O papel da fosforilação do IRS-2 e sua associação com a PI3-quinase, na resistência à insulina induzida por adrenalina, não tinha sido ainda examinado.

Diminuições na ligação da insulina ao seu receptor, da atividade quinase do receptor, da fosforilação em tirosina do IRS-1, e da associação da PI 3-quinase ao IRS-1 são alterações encontradas em estudos anteriores em ratos tratados agudamente com adrenalina (Saad *et al.*, 1995b). Apesar disto, a existência de outros substratos e de vias alternativas de sinalização da insulina, sugerem que eventualmente possam ocorrer mudanças compensatórias, minimizando o impacto de alterações na sinalização em situações de redução do grau de fosforilação do IRS-1.

Entretanto, de forma equivalente à regulação do IRS-1, houve diminuição no grau de fosforilação do IRS-2 e na associação deste com a PI 3-quinase em tecido hepático e muscular de animais tratados com adrenalina. A associação da PI 3-quinase com proteínas IRS no fígado, é importante no que respeita aos efeitos metabólicos induzidos por insulina, incluindo a ativação da enzima glicogênio sintetase e inibição da PEPCK, enzima chave da gliconeogênese (Cheatham *et al.*, 1995, Sun *et al.*, 1995).

O mecanismo pelo qual a adrenalina exerce as modificações nas etapas iniciais da ação insulínica não está completamente elucidado, mas pelo menos duas alternativas devem ser consideradas. Estas alterações provavelmente ocorram de forma secundária a um aumento da atividade da proteína quinase A (PKA). Primeiro, é bem estabelecido que agentes que elevam as concentrações intracelulares de AMPc, induzem fosforilação do receptor de insulina em serina e treonina, o que reduz a autofosforilação em tirosina do receptor e sua atividade tirosina-quinase (Stadmauer & Rosen, 1986; Roth & Beaudoin, 1987; Takayama *et al.*, 1988). Assim, o AMPc pode atenuar a ação insulínica alterando o

estado de fosforilação do receptor de insulina. Não está ainda estabelecido se o aumento do AMPc induz fosforilação em serina do IRS-2, mas como a atividade quinase do receptor está reduzida, espera-se uma menor fosforilação em tirosina dos substratos do receptor. Outra possibilidade deriva de estudos demonstrando que o aumento na concentração intracelular do AMPc, ativando a proteína quinase A (PKA), ativa fosfatases fosfotirosinas (PTPases), levando a uma sequência de defosforilações (Wilson & Kaczmarek, 1993; Goldstein *et al.*, 1992).

A etapa distal à associação do IRS-2 com a PI 3-quinase, a fosforilação do Akt também apresentou diminuição em ambos tecidos dos animais que receberam tratamento agudo com adrenalina. A serine/treonine quinase Akt (também chamada de quinase B) é estimulada por receptores tirosine quinase e está situada após a PI 3-quinase, provavelmente através da ativação da proteína quinase dependente da fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (Alessi *et al.*, 1997). A atividade da Akt tem sido considerada essencial para a ativação da síntese de glicogênio e a translocação do GLUT4 estimulado pela insulina em células adiposas 3L3-L1, embora esta informação não seja uniforme (Kitamura *et al.*, 1998; Kohn *et al.*, 1996). É um dado interessante que a fosforilação da Akt encontra-se diminuída nos ratos tratados com epinefrina. Assim, já que a fosforilação da Akt está relacionada com a atividade desta proteína, a diminuição da fosforilação do Akt pode contribuir para a resistência à insulina observada nos animais tratados agudamente com adrenalina.

O tratamento com dexametasona induz resistência à insulina. A hipercortisolemia está associada a um aumento na produção de glicose pelo fígado, a uma diminuição da síntese protéica, a uma diminuição na captação e utilização periférica de glicose, e a um aumento na degradação protéica em músculo (Kahn *et al.*, 1978; Caro & Amatruda, 1982; Amatruda *et al.*, 1985; Moller & Flier, 1991). O mecanismo pelo qual os glicocorticóides exercem esses efeitos não está inteiramente esclarecido.

Sob condições de hipercortisolemia similares aos utilizados neste trabalho, foi demonstrado que a dexametasona reduz a autofosforilação do receptor de insulina e a ativação da PI 3-quinase pelo IRS-1 no fígado e músculo de ratos *in vivo* (Saad *et al.*, 1993).

Nossos resultados adicionam nova informação ao mecanismo molecular da resistência à insulina dos ratos tratados com dexametasona. Este estudo demonstrou uma diminuição da fosforilação do IRS-2 e sua associação com a PI 3-quinase após o estímulo com insulina em tecido hepático e muscular de ratos tratados com dexametasona. No fígado, mas não no músculo desses ratos, houve uma diminuição na fosforilação da Akt induzida por insulina. Estas alterações nas primeiras etapas da ação da insulina podem contribuir para explicar a resistência à insulina e o aumento da neoglicogênese presente no fígado destes animais. A fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), a enzima que controla a neoglicogênese, é regulada pela insulina (O'Brien *et al.*, 1991). Esta proteína parece não estar regulada alostéricamente, portanto a inibição da neoglicogênese estimulada por insulina *in vivo* é provavelmente devido a uma diminuição da quantidade da proteína PEPCK. Junto com isto, sabe-se que a expressão gênica, no fígado, da PEPCK está aumentada em modelos animais de diabetes (Hofmann *et al.*, 1995) e que os animais transgênicos com hiper expressão do gene da PEPCK desenvolvem fenotipo de diabetes (Valera *et al.*, 1994; Rossella *et al.*, 1995). Estes dados confirmam a importância desta enzima na homeostase da glicose *in vivo*. Recentemente foi demonstrado que a ativação da Akt é suficiente para suprimir o efeito dos glicocorticoides e do cAMP na transcrição gênica da PEPCK (Liao *et al.*, 1997). Nossos resultados sugerem que a diminuição na fosforilação da Akt nos ratos tratados com dexametasona deve ser importantes na resistência à insulina e no aumento da neoglicogênese observada nestes animais.

No músculo dos ratos tratados com dexametasona houve uma importante redução na associação do IRS-1 com a PI 3-quinase e uma modesta diminuição na associação IRS-2/PI 3-quinase sem alteração da fosforilação da Akt. É interessante destacar que o grupo de Yamauchi (Yamauchi *et al.*, 1996) demonstrou que o IRS-1 tem um papel central no transporte de glicose induzido por insulina no músculo. Recentemente foi demonstrado que a ativação da Akt não era essencial para o transporte de glicose no músculo (Kitamura *et al.*, 1998). Portanto, considerando todas estas informações, podemos sugerir que a marcada redução na fosforilação do IRS-1 e sua associação com a PI 3-quinase induzida pela insulina, devem ter um papel importante na redução do transporte de glicose no músculo dos ratos tratados com dexametasona, independente do Akt.

Como os animais tratados com dexametasona também apresentam hiperinsulinemia, não podemos atribuir nossos resultados exclusivamente a uma ação direta do excesso de glicocorticóides, uma vez que já está estabelecido que os aumentos nos níveis de insulina sérica em animais ou em culturas de células podem causar alterações nas etapas iniciais de transmissão do sinal insulínico (Saad *et al.*, 1992, 1994, 1995).

A situação de jejum prolongado em ratos está caracterizado por apresentar hipoinsulinemia e resistência à insulina (Almira & Reddy, 1979 ; Okamoto *et al.*, 1986 ; Friedenberg *et al.*, 1985 ; Penicaud *et al.*, 1985). Nesta situação descreve-se uma redução da ação da insulina tanto em tecidos periféricos quanto em tecido hepático, associada a um aumento no número de receptores de insulina nestes tecidos (Almira & Reddy, 1979 ; Okamoto *et al.*, 1986). Nesta mesma situação de resistência à insulina, tem sido observado um aumento induzido pela insulina, na fosforilação em tirosina do IRS-1 e na associação deste com a proteína PI 3-quinase, no músculo e no fígado de ratos (Folli *et al.*, 1993; Saad *et al.*, 1992), os quais provavelmente não são os responsáveis pela situação de resistência à insulina presentes nestes animais. Considerando os substratos e as vias alternativas da sinalização da insulina, é possível que ocorram mudanças diferentes no IRS-2 que poderiam contribuir a uma explicação na redução da sensibilidade à insulina. Este trabalho demonstrou que a fosforilação em tirosina do IRS-2 e sua associação à PI 3-quinase induzida pela insulina, encontram-se aumentadas no fígado e músculo de ratos submetidos a jejum prolongado.

Akt (também denominada PKB ou Rac) é uma proteína serina/treonina quinase de peso molecular 60 kDa, que é estimulada por um amplo número de receptores tirosina quinase (Khon *et al.*, 1995; Burgering BMT e Coffey PJ, 1995; Franke *et al.*, 1995; Didichenko *et al.*, 1996, Klippel *et al.*, 1996). Ela parece ser ativada num passo posterior a ativação da PI 3-quinase na via de sinalização da insulina (Okamoto *et al.*, 1986; Franke *et al.*, 1995; Datta *et al.*, 1996). O resultado de vários estudos tem concluído que a PI 3-quinase é necessária e suficiente para a ativação da atividade da Akt (Kohn *et al.*, 1995; Burgering BMT e Coffey PJ, 1995; Franke *et al.*, 1995; Klippel *et al.*, 1996). Além disto, a Akt parece ter um papel importante no que respeita a regulação da sobrevivência da célula e tem sido implicada nas vias de sinalização que levam à utilização da glicose (Yao R,

Cooper GM, 1995; Kohn *et al.*, 1996; Tanti *et al.*, 1997). Num trabalho recente realizado pelo grupo de Kitamura, foi observado que a atividade da Akt é essencial para a ativação da glicogênio sintetase estimulada pela insulina (Kitamura *et al.*, 1998).

Nossos resultados demonstraram que no jejum prolongado há um aumento no grau de fosforilação da proteína Akt em fígado e músculo de ratos, estando de acordo com o aumento no grau de fosforilação dos IRSs e da associação da PI 3-quinase, induzido pela insulina nestes tecidos. Este aumento na atividade nos primeiros passos da ação da insulina, ocorrem apesar de uma diminuição na sensibilidade à insulina tanto no fígado como no tecido periférico dos animais em jejum (Penicaud *et al.*, 1985; DeFronzo *et al.*, 1982; Almira & Reddy 1979; Okamoto *et al.*, 1986). O fato de que estudos feitos pela técnica de “clamp” euglicêmico mostram que há uma diminuição na utilização da glicose no músculo de ratos em jejum *in vivo*, sugere que fatores circulantes ou específicos de tecidos, como por exemplo ácidos graxos livre, corpos cetônicos, hormônios contrarreguladores e acidose, podem antagonizar a ação estimulatória da insulina na utilização da glicose no músculo. Estes resultados nos levam a pensar que é possível que o aumento na fosforilação em tirosina do IRS-1 e o IRS-2, assim como a sua associação com a PI 3-quinase e a fosforilação da Akt no fígado e músculo de ratos submetidos a jejum de 3 dias, possa ser uma resposta à diminuição da ação da insulina e as alterações moleculares responsáveis pela resistência à insulina devem ser distais à ativação da Akt.

O diabetes induzido por STZ é caracterizado por uma deficiência de insulina e é um modelo atípico de resistência à insulina. O mecanismo molecular pelo qual ocorre a resistência à insulina ainda não está bem elucidado. Estudos anteriores demonstraram que ocorre um aumento no grau de fosforilação do IRS-1 paralelamente a um aumento na associação do IRS-1 com a PI 3-quinase em tecido hepático e muscular desses animais (Folli *et al.*, 1993). Os nossos resultados demonstraram que existe uma regulação similar da fosforilação do IRS-2 e da associação do IRS-2/PI 3-quinase estimulada pela insulina nestes tecidos. Como dado interessante observou-se uma diminuição na fosforilação da proteína Akt no fígado e músculo destes animais de forma contrária a um aumento na associação do IRSs/PI 3-quinase. Este aumento na fosforilação da Akt no tecido hepático e

muscular dos ratos diabéticos induzidos por STZ deve cumprir um papel importante no mecanismo molecular de resistência à insulina presente nestes animais.

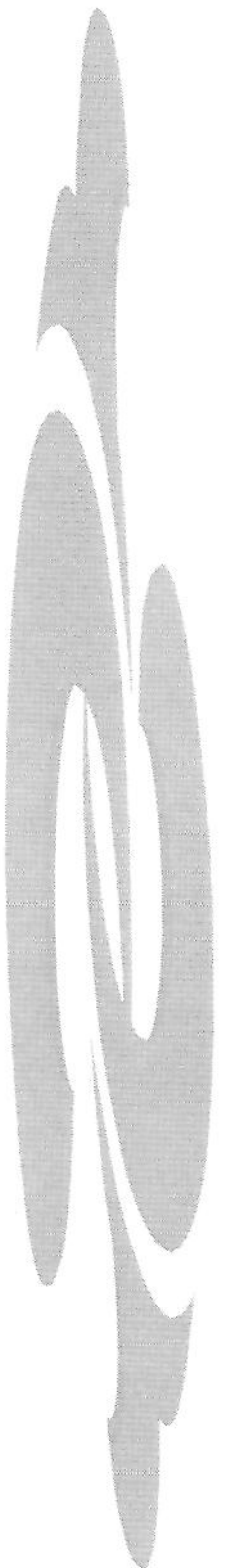
É importante ressaltar que o jejum de 3 dias e o diabetes induzido por STZ são dois modelos de resistência à insulina que ocorrem com hipoinsulinemia, mas com diferentes níveis de glicose plasmática (Folli *et al.*, 1993) e diferentes níveis teciduais de fosforilação de Akt. Muitos estudos levaram a sugerir que a hiperglicemia crônica pode contribuir diretamente com o desenvolvimento de resistência periférica à insulina (Rossetti *et al.*, 1987; Yki-Jarvinen *et al.*, 1994; Pillay *et al.*, 1996, Rossetti *et al.*, 1997). Em ratos diabéticos parcialmente pancreatectomizados, quando se produz uma correção da hiperglicemia fazendo tratamento com florizina, ocorre uma restauração da incorporação de glicose estimulada pela insulina em tecido adiposo isolado e uma melhora na sensibilidade à insulina no corpo inteiro (Rossetti *et al.*, 1987; Kahn *et al.*, 1991; Rossetti *et al.*, 1997). Um trabalho anterior desenvolvido em ratos diabéticos

Goto-Kakizaki (GK), um modelo de animal de diabetes tipo 2 não obeso, demonstrou que há uma diminuição na atividade da Akt que é normalizada quando se corrigem os níveis de glicose. Associando-se esses dados com o resultado deste trabalho, podemos sugerir que nos ratos diabéticos induzidos por STZ, a redução na fosforilação da proteína Akt está provavelmente relacionada à hiperglicemia presente neste modelo animal. Ainda é desconhecido o mecanismo pelo qual a hiperglicemia reduz a atividade da Akt, mas certamente não envolve os passos anteriores da sinalização, já que a fosforilação em tirosina do IRS-1 e do IRS-2, e suas associações com a PI 3-quinase induzidas pela insulina, se encontram aumentadas nos ratos diabéticos induzidos com STZ.

Em resumo, nestes dois modelos que apresentam resistência à insulina e hipoinsulinemia, o jejum prolongado por 3 dias e ratos diabéticos induzidos por STZ, ocorre um aumento na sinalização induzida pela insulina, tanto na fosforilação em tirosina do IRS-1 e do IRS-2 assim como em suas associações com a PI 3-quinase. De forma contrária ocorre uma regulação diferente na fosforilação da Akt, uma proteína ativada a posterior na via de sinalização da insulina, aumentando nos animais em jejum e diminuindo nos animais diabéticos induzidos por STZ. É muito provável que a redução na fosforilação

da Akt no fígado e músculo dos ratos diabéticos tratados com SZT, desempenhe um papel importante no mecanismo molecular de resistência à insulina observado nestes animais.

A análise integrada dos 4 modelos animais sugere que a regulação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-2, induzida por insulina, bem como a associação deste substrato com a PI 3-quinase é muito similar ao do IRS-1, e mantém uma relação inversa com o nível insulinêmico no animal. A fosforilação/ativação da Akt tem uma regulação tecido-específica, mas a redução da fosforilação dependente de insulina em fígado de animais com diabetes induzido por STZ e em animais tratados agudamente com adrenalina ou cronicamente com dexametasona, sugere que esta serina/treonina quinase tem um papel importante no controle da neoglicogênese nestes animais.



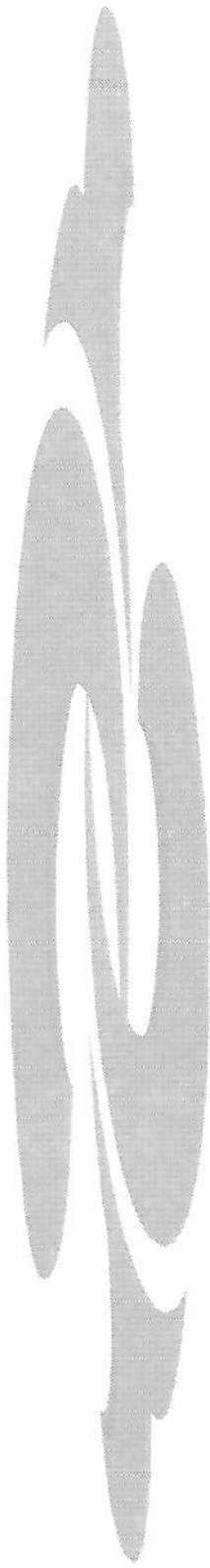
6. SUMMARY

Insulin induced a wide variety of growth and metabolic responses in many cell types. These actions are initiated by insulin binding to its receptor, and involves a series of alternative and complementary pathways created by the multiple substrates of the insulin receptor (IRSs).

In this study we investigated IRS-2 tyrosine phosphorylation, its association with PI 3-kinase and the phosphorylation of Akt, a serine/threonine kinase situated downstream to PI 3-kinase, in liver and muscle of 4 animal models of insulin resistance: the effect of acute epinephrine treatment (normoinsulinemia), the effect of chronic treatment with dexamethasone (hyperinsulinemia), 72 hours fasting and diabetes (STZ) (hipoinsulinemia). We used immunoprecipitation and immunoblotting techniques with specific antibodies: anti-IRS-2, anti-phosphotyrosine, anti-PI 3-kinase and anti-Akt.

There was a downregulation in insulin-induced IRS-2 tyrosine phosphorylation and association with PI 3-kinase in liver and muscle of epinephrine and dexamethasone-treated rats. However, the downstream target of PI 3-kinase, Akt phosphorylation showed different regulation in the muscle of dexamethasone-treated rats. The reduction of insulin-induced Akt phosphorylation may contribute to explain the increase in gluconeogenesis described in the liver of these animals.

There was an upregulation in insulin-induced IRS-2 tyrosine phosphorylation and association with PI 3-kinase in liver and muscle of 72 h fasting and STZ-diabetic rats. However the downstream target of PI 3-kinase, the Akt phosphorylation showed different regulation, increasing in fasting and decreasing in STZ-diabetic rats. Since an important difference between these two animal models of insulin resistance is the plasma glucose levels, we can suggest that in STZ diabetic rats, the reduction in Akt phosphorylation is probably related to hyperglycemia and may certainly contribute to the molecular mechanism of insulin resistance observed in these animals.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALESSI D.R.; JAMES, S.R.; DOWNES C.P.; HOLMES, A.B.; GAFFNEY, P.R.J.; REESE, C.B.; COHEN, P.- Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . **Curr Biol** 7: 261-69, 1997.
- ALMIRA, E.C., REDDY, W.J.- Effect of fasting on insulin binding to hepatocytes and liver plasma membranes from rats. **Endocrinology**. 104, 205-11, 1979.
- AMATRUDA, J.M.; LIVINGSTONE, J.N.; LOCKWOOD, D.H.- Celular mechanism in selected states of insulin resistance: human obesity, glucocorticoid excess and chronic renal failure. **Diabetes Metab Ver**, 3:293-327, 1985.
- BERNIER, M; LAIRD, D.M.; LANE, M.D.-Insulin-activated tyrosine phosphorylation a 15-kilodalton protein in intact 3T3-L1 adipocytes. **Proc Natl acad Sci USA** 84:1844-1848, 1987.
- BIRNANBAUM, M.- The insulin-sensitive glucose transporter. **Int Rev Cytol**, 137: 239-297, 1993.
- BRUNING, J.C., WINNAY, J., CHEATHAM, B., KAHN, C.R.- Differential signaing by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1 deficient cells. **Mol Cell Biol**, 3: 1513-21, 1997.
- BURGERING, B.M.T., COFFER, P.J.- Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. **Nature**, 376, 599-602, 1995.
- CARO, J.F. & AMATRUDA, J.M. Glucocorticoid-induced insulin resistance. **J Clin Invest**, 69:866-75, 1982.
- CARPENTER, C.L. & CANTLEY, L.C.- Phosphoinositide kinase. **Biochemistry** 29: 11147-56, 1990.

- COFFER, P.J.; JING, J.; WOODGETT, J.R.- Protein kinase (c-AKT): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. **Biochem J**, 335: 1-13, 1998.
- CUATRECASAS, P.- Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membrane. **Proc Natl Acad Sci USA**, 69: 1277-81, 1972.
- CHEATAM, B.; VLAHOS, C.J.; CHEATAM, L.; WANG, L.; BLENIS, J.; KAHN, C.R.- Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70S6 kinase DNA synthesis and glucose transporter translocation. **Mol. Cell. Biol.**, 14, 4902-4911, 1994.
- CHEATAM, B.; KAHN, C.R.- Insulin action and the insulin signaling network. **Endocr. Rev.**, 16: 117-142, 1995.
- DATTA, K.; BELLACOSA, A.; CHAN, T.O.; TSICHILIS, P.N.- Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase: activation by growth factors, v-src, v-Ha-ras in Sf9 and mammals cells. **J Biol Chem**, 27, 130835-30839, 1996.
- DEFRONZO, R.A.; HENDLER, R.; SIMONSON, D.- Insulin resistance is a prominent feature of insulin-dependent diabetes. **Diabetes**, 31, 795-801, 1982.
- DIDICHENKO, S.A.; TILTON, B.; HEMMINGS, B.A.; BALLMER-HOFER, K.; THELEN, M.- Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47^{phox} by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase. **Curr Biol**, 6: 1271-1278, 1996.
- EBINA, Y.; ARAKI, E.; TAIRA, M.; SHIMADA, F.; MORI, M.; CRAIK, C.S.; SIDDLE, K.; PIERCE, S.B.; ROTH, R.A.; RUTTER, W.J.- replacement of lysine residue 1030 in the putative Atp-binding region of the insulin receptor abolishes insulin and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. **Proc natl Acad Sci USA** 84:704-708, 1987.
- FEHLMAN, M.; PERYON, J.; SAMSON, M.; VAN OBBRGHEN, E.; BRANDENBURG, D.; BROSSETTE, N.- Molecular association between major histocompatibility complex class I antigens and insulin receptors in mouse liver membranes. **Proc natl Acad Sci USA** 82: 8634-37, 1985.

- FOLLI, F.; SAAD, M.J.A.; BACKER, J.M.; KAHN, C.R.- Insulin stimulation of PI 3-kinase activity and association with IRS-1 in liver and muscle of intact rat. **J Biol Chem** 267: 22171-77, 1992.
- FOLLI, F., SAAD, M.J.A., BACKER, J.M., KAHN, C.R.- Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. **J.Clin.Invest.** 92: 1787-1794, 1993.
- FRANKE, T.F.; YANG, S.I.; CHAN, T.O.; DATTA, K.; KAZLAUSKAS, A.; MORRISON, D.K.; KAPLAN, D.R.; TSICHLIS, P.N.- The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF activated phosphatidylinositol 3-kinase. **Cell**, 81: 727-736, 1995.
- FRREMAN, R.M. Jr.; PLUTZKY, J.; NEEL, B.G.- Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of *Drosophila* corkscrew. **Proc Natl Acad Sci USA**, 89: 11239-11243, 1992.
- FREYCHET, P.; ROTH, J.; NEVILLE, D.M. Jr.- Insulin receptor in the liver: Specific binding of 125I-insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. **Proc Natl Acad Sci USA** 68: 1833-37, 1971.
- FRIEDENBERG, G.; KLAEIN, H.; CORDERA, R.; OLEFSKY, J.- Insulin receptor kinase activity in rat liver: regulation by fasting and high carbohydrate feeding. **J Biol Chem** 260: 12444-53, 1985.
- GOLDSTEIN, B.J.- Protein tyrosine phosphatase and regulation of insulin action. **J Cell Biochem**, 48: 33-42, 1992.
- HARA, K., YONEZAWA, K., SAKAUE, H., KOTANI, K., KOJINA, A., WATERFIELD, M.D., KASUGA, M.- Normal activation of p70S6 kinase by insulin in cells overexpressing 85 kDa subunit of phosphoinositide 3-kinase. **Biochem Biophys Res Com**, 2: 735-41, 1995.

- HARING, H.; KIRSCH, D.; OBERMAIER, B.; ERMEL, B.; MACHICAO, F.- Decreased tyrosine kinase activity of insulin receptor isolated from rat adipocytes rendered insulin-resistant by catecholamines treatment *in vitro*. **Biochem J**, 234: 59-66, 1986.
- HOFMANN, C., LORENZ, K., WILLIAMS, D., PALAZUK, B.J., COLCA, J.R.-Insulin sensibilization in diabetic rat liver by an antihyperglycemic agent. **Metabolism** 44: 384-389, 1995.
- HOLGADO-MADRUGA, M.; EMLET, D.R.; MOSCATELLO, D.K.; GODWIN, A.K.; WONG, A.J.- A Grb2-associated docking protein in EGF-and insulin receptor signaling. **Nature**, 379: 560-563, 1996.
- KAHN, C.R.; GOLDFINE, I.D.; NEVILLE, D.M.; DEMEYTS, P. Alterations in insulin binding induced by changes *in vivo* in the levels of glucocorticoids and growth hormone. **Endocrinology**, 103: 1054-66, 1978.
- KAHN, C.R.; & WHITE, M.F. The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. **J Clin Invest**, 82: 1151-56, 1988.
- KAHN, C.R.- Current concepts of molecular mechanism of insulin action. **Annu Rev Med**, 36: 429-451, 1985.
- KHAN, C.R.; NEVILLE, D.M. Jr.; ROTH, J.- Insulin receptor interaction in the obese hyperglycemic mouse. A model of insulin resistance. . **J Biol Chem**, 248: 244-250, 1993.
- KAHN, B.B.; SHULMAN, G.I.; DEFRONZO, R.A.; CUSHMAN, S.W.; ROSSETTI, L.- Normalization of blood glucose in diabetic rats with phlorizin treatment reverses insulin-resistant glucose transporter gene expression. **J Clin Invest**, 87: 561-570, 1991.
- KHAN, C.R. & WHITE, M.F.- The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. **J Clin Invest** , 82: 1151-56, 1988.

- KASUGA, M.; HEDO, J.A.; YAMADA, K.M.; KAHN, C.R.- Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000 dalton subunit of its own receptor. **Science**, 215: 185-187, 1982b.
- KATHURIA, S.; HARTMAN, S.; GRUNFELD, C.; RAMACHANDRAN, J.; YAMAGUCHI, Y.- Differential sensitivity of two functions of the insulin receptor to the associated proteolysis: kinase action and hormone binding. **Proc Natl Acad Sci USA** 83: 8570-74, 1986.
- KIRSCH, D.; KEMMLER, W.; HARING, H.U.- Cyclic AMP modulates insulin binding and induces post-receptor insulin resistance of glucose transport in isolated rat adipocytes. **Biochem Biophys Commun**, 115(1): 389-405, 1983.
- KITAMURA, T.; OGAWA, W.; SAKAUE, H.; HINO, Y.; KURODA, K.; TAKATA, M.; MATSUMOTO, M.; MAEDA, T.; KONISHI, H.; KIKKAWA, U.; KASUGA, M.- Requirement for activation of serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. **Mol Cell Biol**, 18: 3708-3717, 1998.
- KLIPPEL, A.W.M.; KAVANAUGH, D. POT, WILLIAMS, L.T.- A specific product of phosphatidylinositol 3'-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. **Mol. Cell. Biol**, 17: 338-344, 1997.
- KLIPPEL, A.; RHEINHARD, C.; KAVANAUGH, M.; APELL, G.; ESCOBEDO, M.A.; WILLIAMS, L.T.- Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transduction kinase pathway. **Mol Cell Biol**, 16: 4117-4127, 1996.
- KHON, A.D.; KOVACINA, K.S.; ROTH, R.A.- Insulin stimulates the kinase activity of RAK-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. **EMBO J**, 14: 4288-4295, 1995.
- KOHN, A.D.; SUMMERS, S.A.; BIRMAUN, M.J.; ROTH, R.A.- Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. **J Biol Chem**, 271: 31372-31378, 1996.

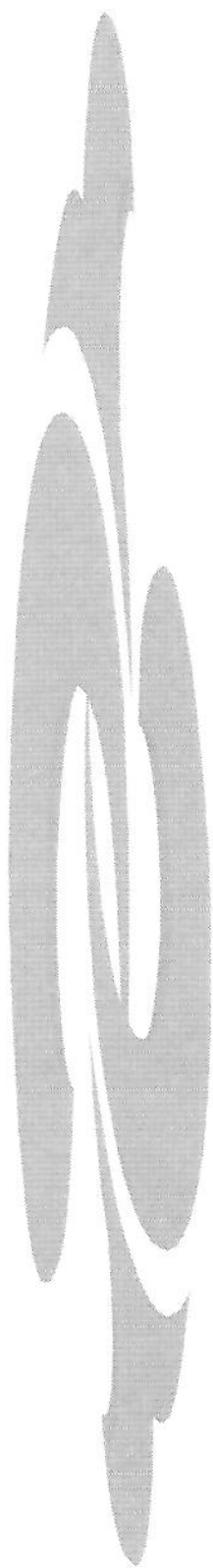
- KROOK, A.; KAWANO, Y.; SONG, X.M.; EFENDIĆ, S.; ROTH, R.A.; WALLBERG-HENRIKSSON, H.; ZIERATH, R.- Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated Akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic Goto-Kakizaki rats. **Diabetes**, 46: 2110-13, 1997.
- KROOK, A.; ROTH, R.A.; JIANG, X.J.; ZIERATH, J.R.; WALLBERG-HENRIKSSON, H.- Insulin-stimulated Akt activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. **Diabetes**, 47: 1281-86, 1998.
- LAEMMLI, U.K.- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.
- LAVAN, B.E.; LIENHARD, G.E.- The insulin-elicited 60 kDa phosphotyrosine protein in rat adipocytes is associated with phosphatidylinositol 3-kinase. **J Biol Chem**, 268: 5921-5928, 1993.
- LIAO J, BASTHEL A, NAKATAMI K, ROTH, RA.- Activation of protein kinaseB/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxikinase gene. **JBC**, 1995.
- MOLER , D.E. & FLIER, J.S.- Insulin resistance-mechanism, syndromes, and implication. New **Engl J Med**, 325: 938-948, 1991.
- MYERS, M.G. Jr; & WHITE, M.F.- Insulin signal transduction and the IRS proteins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 36: 615-658, 1996.
- MYERS, M.G. Jr.; SUN, X.L.; CHEATAM, B.; JACHNA, B.R.; GLASHEEN, M.G.; BACKER, J.M.; WHITE, M.F.- IRS-1 is a common element in insulin and insulin-growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase. **Endocrinology**, 132: 1421-1430, 1993.
- O'BRIEN, R.M., BONOVIĆ, M.T., FOREST, C.D., GRANNER, D.K.- Signal transduction convergence: phospholipid ester and insulin inhibit phosphoenolpyruvate carboxikinase gene transcription through the same 10-base pair sequence. **Proc Natl Acad Sci USA**, 15: 6580-4, 1991.

- OKADA, T.; KAWANO, Y.; SASHIARA, T.; HAZEKI, O.; UI, M.- Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with selective inhibitor wortamanin. **J Biol Chem**, 269: 3568-3573, 1994.
- OKAMOTO, M.; WHITE, M.F.; MARON, R.; KAHN, C.R.- Autophosphorylation and kinase activity of insulin receptor in diabetic rats. **Am J Physiol**, 251:E542-50, 1986.
- PENICAUD, L.; KANDE, J.; LEMAGNEN, J.- Insulin action during fasting and refeeding in rat determined by euglycemic clamp. **Am J Physiol**, 249: E514-E518, 1985.
- PILLAY, T.S.; XIAO, S.; OLEFSKY, J.M.- Glucose-induced phosphorylation on the insulin receptor. **J Clin Invest**, 97: 613-620, 1996.
- ROSELLA, G., ZAJAC, J.D., BAKER, L., KACZMARECZYK, S.J., ANDRIKOPOULOS, S., ADAMS, T.E., PROIETTO, J.- Impaired glucose tolerance and increased weight gain in transgenic rats overexpressing a non- insulin-responsive phosphoenolpyruvate carboxikinase gene. **Mol Endocrinol**. 9: 1396-1404, 1995.
- ROSSETTI, L.; SMITH, D.; SCHULMAN, G.I.; PAPACHRISTOU, D.; DEFRONZO, R.A.- Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. **J Clin Invest**, 79: 1510-1515, 1987.
- ROSSETTI, L.; HAWKINS, M.; CHEN, W.; GINDI, J.; BAIRZILAI, N.- In vivo glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycemic but not hyperglycemic conscious rats. **J Clin Invest**, 96: 132-140, 1997.
- ROTH, R.A., BEAUDOIN, J.- Phosphorylation of purified insulin receptor by camp kinase. **Diabetes**, 36(1): 123-6, 1987.
- ROTHENBERG, P.L.; LANE, W.S.; KARASIK, A.; BACKER, J.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R.- Purification and partial sequence analysis of pp185, the major cellular substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. **J Biol Chem**, 266: 8203-8311, 1991.

- SAAD, M.J.A.; PIMENTA, W.P.; PACCOLA, G.M.G.F.- Effect of glucose ingestion on peripheral glucose metabolism in normal man. **Diabete & Met**, 15: 5-10, 1989.
- 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.A.; 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, J.M.A.; FOLLI, F., KAHN, C.R.- Insulin and dexamethasone regulates insulin receptor substrate 1, and phosphatidylinositol 3-kinase in Fao hepatoma cells. **Endocrinology**, 136:1579-88, 1995a.
- SAAD, M.J.A.; HARTMANN, L.G.C.; CARVALHO, D.S.; GALORO, C.A.O.; BRENELLI, S.L. CARVALHO, C.R.O.- Modulation of early steps in insulin action in the liver and muscle of epinephrine treated rats. **Endocrine**, 3: 755-59, 1995b.
- SKOLNIK, E.Y.; LEE, C.H.; BATZER, A.; VICENTINI, L.M.; ZHOU, M.; DALY, R.; MYERS M.G.; BACKER, J.M.; ULLRICH, A.; WHITE, M.F.; SCHLESSINGER, J.- The SH2/SH3 domain-containing protein Grb 2 interacts with tyrosine phosphorylated IRS-1 and Shc: implication for insulin control of ras signaling. **Embo J**, 12 1929-1936, 1993.
- SMITH-HALL, J.; PONS, S.; PATTI, M.A.; BURKS, D.J.; YENUSH, L.; SUN, X.J.; KAHN, C.R.; WHITE, M.F.- The 60 kDa receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells. **Biochemistry** 27: 304-10, 1997.
- STADTMAUER L., ROSEN, O.M.- Increasing the cAMP content of IM-9 cells alters the phosphorylation state and protein kinase activity of the insulin receptor. **J Biol Chem**, 7: 3402-7, 1986.

- SUGIMOTO, S.; LECHLEIDER, R.J.; SHOELSON, S.E.; NEEL, B.G.; WALSH, C.T.- Expression, purification and characterization of SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SH-PTP2. **J Biol Chem** 268: 22771-22776, 1994.
- SUN, X.J.; ROTHENBERG, P.L.; KAHN, C.R.; BACKER, J.M.; ARAKI, E.; WILDEN, P.A.; CAHILL, D.A.; GOLSTEIN, B.J.; WHITE, M.F.- Struture of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, 352: 73-77, 1991.
- SUN X.J.; MIRALPEIX, M.; MYERS, M. Jr.; GLASHEEN, E.; BACKER, J.M.; KAHN, C.R.; WHITE, M.F.- Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. **J Biol Chem** , 267: 22662-72, 1992.
- SUN, X.J.; CRIMMINS, D.L.; MYERS, M.G.; MIRALPEIX, Jr.; M.; WHITE, M.F.- Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylaion of IRS-1. **Moll Cell Biol**, 13: 7418-7428, 1993.
- SUN, X.J.; WANG, L.M.; ZHANG, Y.; YENUSH, L.; MYERS, M.G.; GLASHEEN, E.M.; LANE, W.S.; PIERCE, J.H.; WHITE, M.F.- Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. **Nature**, 337: 173-177, 1995.
- TAKAYAMA, S.; WHTIE, M.F.; KAHN, C.R.- Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin recpetor decreases its tyrosine kinase activity. **J Biol Chem**, 263: 3440-77, 1988.
- TANTI, J.L.; GROLLO, S.; GREMEAUX, T.; COFFER, P.J.; VAN-OBBERGHEN, E.; LEMARCHAND-BRUSTEL, Y.- Potential role of protein kinase B in glucose transporter translocation in dipocytes. **Endocrinology**, 138: 2005-2010, 1997.
- ULLRICH, A.; BELL, J.R.; CHEN, E.Y.- Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase faily of oncogenes. **Nature**, 313: 756-761, 1987.
- VALERA, A., PUJOL, A., PELEGRIN, M., AND BOSH, F.- Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxikinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Proc Natl Acad Sci USA** 91: 9151-54, 1994.

- WILDEN, P.A. Kahn, C.R.; Siddle, K.; White, M.F.- Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic functions. **J Biol Chem**, 267(23), 16660-16668, 1992.
- WILSON, G.F.; & KACZMAREK, L.K.- Mode-switching of a voltage-gated cation channel is mediated by protein kinase A-regulated tyrosine phosphatase. **Nature**, 366: 433-8, 1993.
- WHITE, M.F.; HARING, H.U.; KASUGA, M.; KAHN, C.R.- Kinetic properties and sites of autophosphorylation of the partially purified receptor from hepatoma cells. **J Biol Chem**, 259: 255-64, 1984.
- WHITE, M.F.; MARON, R.; KAHN, C.R.- Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr=185,11 protein in intact cells. **Nature**, 318: 183-6, 1985.
- WHITE, M.F.; SHOELSON, S.E.; SEUTMANN, H.; KAHN, C.R.- A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the insulin receptor. **J Biol Chem**, 263: 2969-80, 1988.
- WITHERS, D.J.; SANCHEZ-GUTIERREZ, J.; TOWERY, H.; BURKS, D.J.; REN, J.M.; PREVIS, S.; ZHANG, Y.; BERNAL, D.; PONS, S.; SHULMAN, G.I.; BONNER-WEIR, S.; WHITE, M.F.- Disruption of IRS-2 causes diabetes in mice. **Nature**, 391: 900-904, 1998.
- YAMAUCHI, T.; TOBE, K.; TAMAMOTO, H.; UEKI, K.; KABURAGI, Y.; YAMAMOTO-HONDA, R.; TAKAHASHI, Y.; YOSHIZAWA, F.; AIZAWA, S.; AKANUMA, Y.; SONENBERG, N.; YAZAKI, Y.; KADOWAKI, T.- Insulin signaling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. **Mol Cell Biol**, 16: 3074-3084, 1996.
- YAO, R.; COOPER, G.M.- Requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. **Science**, 267: 2003-2006, 1995.
- YKI-JARVINEN, H.; HELVE, E.; KOIVISTO, V.-Hyperglycemia decreases glucose uptake in type I diabetes. **Diabetes**, 36: 892-896, 1987.



8. *ANEXOS*

***REGULATION OF IRS-2 TYROSINE PHOSPHORYLATION IN
ANIMAL MODELS OF INSULIN RESISTANCE***

[†]Fernanda Alvarez Rojas, Aparecida Emiko Hirata, ^{*}Mario JA Saad.

^{*}Departamento de Clínica Médica, FCM., UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

Correspondence to: Mário J.A. Saad, MD

Departamento de Clínica Médica,

FCM-UNICAMP

Campinas, SP, Brasil, 13081-970

Fax: +55 19788 895

ABSTRACT

Insulin induces a wide variety of growth and metabolic responses in many cell types. These actions are initiated by insulin binding to its receptor, and involves a series of alternative and complementary pathways created by the multiple substrates of the insulin receptor (IRSs). In this study we investigated IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation, their association with PI 3-kinase and the phosphorylation of Akt, a serine-threonine kinase situated downstream to PI 3-kinase, in liver and muscle of two animal models of insulin resistance: epinephrine and dexamethasone-treated rats. Immunoprecipitation and immunoblotting were used with anti-IRS-1, IRS-2, anti-PI 3-kinase and anti-Akt antibodies. There was a downregulation in insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation and association with PI 3-kinase in liver and muscle of both animal models of insulin resistance. However, the downstream target of PI 3-kinase, Akt phosphorylation showed different regulation in the muscle of dexamethasone-treated rats. The reduction of insulin-induced Akt phosphorylation may contribute to explain the increase in gluconeogenesis described in the liver of these animals.

INTRODUCTION

The primary role of insulin is to control the plasma glucose concentration by stimulating glucose transport into muscle and adipose cells as by reducing glucose output from the liver. These actions of insulin are initiated by insulin binding to its receptor. Upon binding insulin, the intrinsic tyrosine kinase activity of the membrane β subunit of the receptor increases, allowing it to phosphorylate itself as well as intracellular substrates (1). Numerous studies have shown that insulin receptor has various substrates, including insulin receptor substrate 1 (IRS-1), IRS-2, IRS-3, IRS-4, Shc and possible others (2-9). This cellular response to insulin, phosphorylation of several cytosolic docking proteins (IRS proteins), couple the insulin receptor to various effector molecules, including phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3-K), SHP2, Grb2/SOS, NCK and CRK (10). PI 3-kinase may be involved in mediating several insulin-regulated metabolic pathways, including glucose uptake (11), antilipolysis (12), glycogen synthesis (13) and the

suppression of hepatic gluconeogenesis through the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) expression (14), and abnormalities in this protein association could explain defective glucose homeostasis. Different approaches have demonstrated that Akt, a serine-threonine kinase with a pleckstrin homology domain, is functionally located downstream of PI 3-kinase (15-19) and is important for insulin action in metabolic pathways.

Alterations in the early steps of insulin signaling have been recognized as an important component of many insulin-resistant states. The decreasing of insulin binding, receptor kinase activity, IRS-1 protein phosphorylation, and IRS-1 associated PI 3-kinase activity, have been demonstrated in different animal models of insulin resistance (20-24). It is interesting that in mice made IRS-1-deficient by homologous recombinant gene targeting, IRS-2 serves as an alternative substrate and allows for significant residual insulin signaling (25). In this regard, the investigation of the regulation of IRS-2 and downstream signaling may add new information in the molecular mechanisms of insulin resistance.

In the present study, we investigated the importance of IRS-2 phosphorylation and its association with PI3-kinase, and Akt phosphorylation after insulin stimulation, in two animal models of insulin resistance: epinephrine-treated or dexamethasone-treated rats.

MATERIALS AND METHODS

Materials: The reagents and apparatus for SDS-PAGE and immunoblotting were obtained from Bio-Rad (Richmond, CA). Tris, phenylmethylsulfonylfluoride (PSMF), aprotinin, silicone and dithiothreitol were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Sodium amobarbital and human recombinant insulin (Humulin R) were purchased from Eli Lilly Co. (Indianapolis, IN). Protein A-Sepharose 6MB was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden). [¹²⁵I] Protein A was obtained from Amersham (Aylesbury, UK), and nitrocellulose (BA85; 0.2 µm) was obtained from Schleicher and Schuell (Keene, NH). Male Wistar rats were from the UNICAMP Central Animal Breeding Center. Monoclonal antiphosphotyrosine antibodies were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Anti-IRS-1 and anti-IRS-2 were obtained from Santa

Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), anti-Akt and anti-PI3-K antibodies were from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)

Animals: Male wistar rats 6 weeks old (mean body weight of $131 \text{ g} \pm 6 \text{ g}$) were fed standard rodent chow and water *ad libitum*. Food was withdrawn 12-14 h before the experiments for the epinephrine and dexamethasone treated rats and their respective controls. Chronic hypercortisolism was induced with dexamethasone administered for five days (1 mg/kg/day , i.p.). In experiments with epinephrine the rats were injected with $25 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ body weight 5 min before the abdominal cavity was opened. All experiments were approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas (UNICAMP).

Methods: The rats were anesthetized with sodium amobarbital (15 mg/kg body weight, ip) and used 10-15 min later, as soon as anesthesia was assured by the loss of foot and corneal reflexes. The abdominal cavity was opened, the portal vein exposed and $6 \mu\text{g}$ of insulin was injected. The liver and muscle was removed 30 s and 90 s after the infusion of insulin respectively, minced coarsely, and homogenized immediately in approximately 10 volumes of solubilization buffer A at 4°C , using a Polytron PT 10/35 homogenizer fitted with a PTA 20S blade (Brinkmann Instruments) operated at maximum speed for 30 s. Buffer A (for solubilization) consisted of 1% Triton X-100, 50 mM Hepes (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM phenylmethylsulfonylfluoride, and 0.1 mg of aprotinin/ml.

The liver and muscle was extracted in an identical fashion in each model studied. The extracts were centrifuged at 15,000 rpm in a Beckman 70.1 Ti rotor at 4°C for 20 min to remove insoluble material, and the resulting supernatant was used for immunoprecipitation with $13 \mu\text{l}$ of polyclonal anti-IRS-2 and IRS-1 antibodies. The immune complexes were precipitated with protein A-Sepharose 6MB and were washed three times with 50 mM Tris (pH 7.4), 2 mM sodium vanadate, and 0.1% Triton X-100.

Protein analysis by immunoblotting: After washing, the pellet was resuspended in Laemmli sample buffer (26) with 100 mM dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 5 min. The samples were subjected to SDS-PAGE (8.5% Tris-acrylamide) in a

Bio-Rad miniature slab gel apparatus. Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean) as described by Towbin *et al* (27). Nonspecific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter overnight at 4°C in blocking buffer (3% BSA, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20). The prestained molecular mass standards used were myosin (206 kDa), β -galactosidase (120 kDa), bovine serum albumin (85 kDa), and ovalbumin (47 kDa). The nitrocellulose filter thus treated was then incubated for 4 h at 22°C with anti-phosphotyrosine antibody and anti-PI3-kinase antibody (0.5 μ g/ml, diluted in blocking buffer) and then washed for 30 min in blocking buffer without BSA. Some samples were incubated with anti-phosphoAkt antibody. The blots were then incubated with 125 I-Protein A (30 μ Ci/ μ g) in 10 ml of blocking buffer for 1 h at 22°C and washed again. 125 I-Protein A bound to the antibodies was detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film with Cronex Lightning Plus intensifying screens at -70 °C for 12-48 h. Band intensities were quantified by optical densitometry (Molecular Dynamics) of the developed autoradiogram.

Statistical analysis: The experiments were always performed by studying the physiological or pathological group of rats in parallel with a control group. Comparison of the data in control vs. epinephrine-treated and control vs. dexamethasone-treated rats were analyzed using unpaired Student's *t* test. The level of significance employed was $p < 0.05$.

RESULTS

To investigate the tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 following stimulation by insulin in physiological and pathophysiological states of insulin resistance, we infused insulin into the portal vein of rats and then removed and homogenized the liver and muscle, and immunoprecipitated the proteins with a polyclonal anti-IRS-1 and anti-IRS-2 antibodies. The IRS-1 and IRS-2 immunoprecipitates were analyzed for tyrosyl phosphorylation by immunoblotting with a monoclonal anti-phosphotyrosine antibody. The nitrocellulose membranes were also stripped and reblotted with anti-PI3-K antibodies, in order to assess the association of these proteins with IRS-1 and IRS-2. It was also study the phosphorylation level of Akt

1-Effect of epinephrine on insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylationthe association of PI 3-kinase with these substrates and Akt phsphorylation in the liver of rats. (Fig.1).

Insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation level in liver of treated rats were significantly decreased to $62 \pm 8\%$ and $63 \pm 10\%$ respectively, when compared to control rats ($p < 0.05$).

Previous studies have suggested that there is a relatively stable, high affinity interaction between IRSs/PI3-kinase, such that both proteins are coprecipitated by antibodies to either protein. In liver samples previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 and IRS-2 antibody and then immunoblotted with anti-PI3-K antibody, a band corresponding to the latter protein was seen in both epinephrine and control rats. After stimulation with insulin, the intensity of this band increased in both groups of rats, in agreement with the formation of a stable association between IRS-1 and IRS-2 and PI3-K. Comparison of the bands corresponding to stimulation by insulin showed that the amount of PI3-K associated with IRS-1 and with IRS-2 decreased to $63 \pm 8\%$ and $73 \pm 8\%$ ($p < 0.05$), respectively, in the liver from treated rats ($p < 0.05$). The Akt phosphorylation induced by insulin was significantly decreased to $60 \pm 5\%$ ($p < 0.05$) in liver of epinephrine rats.

2- Effect of epinephrine on insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylationthe association of PI 3-kinase with these substrates and Akt phsphorylation in the muscle of rats. (Fig.2).

Insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation level in muscle of treated rats were significantly decreased to $67 \pm 8\%$ and $74 \pm 4\%$ respectively, when compared to control rats ($p < 0.05$).

In muscle samples previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 and IRS-2 antibodies and then immunoblotted with anti-PI3-K antibody, a band corresponding to the latter protein was seen in both epinephrine and control rats. After stimulation with insulin, the intensity of this band increased in both groups of rats, in agreement with the formation

of a stable association between IRS-1 and IRS-2 and PI3-K. Comparison of the bands corresponding to stimulation by insulin showed that the amount of PI3-K associated with IRS-1 and IRS-2 decreased to $45 \pm 6\%$ and to $55 \pm 11\%$ ($p < 0.05$) respectively, in the muscle from treated rats. The Akt phosphorylation induced by insulin was significantly decreased to $70 \pm 3\%$ ($p < 0.05$) in muscle of epinephrine rats.

3- Effect of dexamethasone on insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation the association of PI 3-kinase with these substrates and Akt phsphorylation in the liver of rats. (Fig.3).

Insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation level in liver of dexamethasone treated rats were significantly decreased to $45 \pm 8\%$ and $50 \pm 6\%$ respectively, when compared to control rats ($p < 0.05$).

Analysis of insulin-induced IRS-1/PI3-K and IRS-2/PI3-K association showed a significant reduction to $82 \pm 3\%$ and to $80 \pm 10\%$ respectively ($p < 0.05$), in these association in liver from dexamethasone-treated rats. The Akt phosphorylation induced by insulin in liver of dexamethasone-treated was significantly decreased to $70 \pm 17\%$ ($p < 0.05$).

4- Effect of dexamethasone on insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation the association of PI 3-kinase with these substrates and Akt phsphorylation in the muscle of rats. (Fig.4).

Insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation level in muscle of dexamethasone treated rats were significantly decreased to $41 \pm 3\%$ and $63 \pm 1\%$ respectively, when compared to control rats ($p < 0.05$).

Analysis of insulin-induced IRS-1/PI3-K and IRS-2/PI3-K association showed a significant reduction to $47 \pm 4\%$ and to $84 \pm 8\%$ respectively ($p < 0.05$), in these association in muscle from dexamethasone-treated rats. There was not change in the Akt phosphorylation induced by insulin in this tissue in dexamethasone-treated rats.

DISCUSSION

Insulin resistance is defined as a subnormal biological response to a given concentration of insulin. Although the effects of insulin are pleiotropic, insulin resistance typically refers to the action of insulin on glucose homeostasis. In animal models of insulin resistance, there is evidence that regulation of IRS-1 may have a role in the modulation of glucose homeostasis (28). In the present study we investigated the regulation of insulin-induced IRS-2 tyrosine phosphorylation and association with PI 3-kinase and Akt phosphorylation, in liver and muscle of epinephrine-treated or dexamethasone-treated rats.

It has long been known that an excess of epinephrine causes insulin resistance (29, 30). Catecholamines antagonized the action of insulin by stimulating gluconeogenesis, glycogenolysis, and lipolysis and by inhibiting peripheral use of glucose (31). High intracellular cyclic AMP-levels seen to induce insulin resistance at both receptor and post-receptor levels (32). Using purified receptors and artificial substrates *in vitro*, decreased insulin receptor phosphorylation and kinase activity has been observed as a consequence of increased cAMP and cAMP kinase (29). It was previously demonstrated that in liver and muscle of epinephrine-treated rats there is a decrease in insulin-induced insulin receptor, and IRS-1 tyrosine phosphorylation levels. The results of the present study extends this information showing that there is also a decrease in IRS-2 tyrosine phosphorylation and in IRS-2/PI 3-kinase association in liver and muscle of epinephrine-treated rats. These alterations may be secondary to an increased activity of protein kinase A (PKA), which can phosphorylate insulin receptor and probably IRS-1 and IRS-2 in serine, thereby reducing the kinase activity and autophosphorylation of the insulin receptors as well the tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2. Another possibility arises from data showing that an increase in cellular cAMP through activating protein kinase A (PKA) increases the activity of endogenous phosphotyrosine phosphatase (PTPase), thus leading to a sequence of dephosphorylation (33). The serine/threoninekinase Akt (also termed kinase B) is stimulated by receptor tyrosine kinases is a downstream target of PI3-kinase (34-38), presumably through activation of the phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent protein kinase (39). Furthermore, expression of a constitutively active Akt is sufficient to promote GLUT4 translocation and increase glucose transport in 3T3-L1 adipocytes (40,

41), although this is not uniformly observed. It is interesting that insulin induced AKT phosphorylation was attenuated in epinephrine treated rats. Recently, Akt activity has been reported to be essential for the activation of glycogen synthase by insulin (19). Since Akt phosphorylation correlates with Akt activity we can suggest that a decrease in insulin-induced Akt phosphorylation may contribute to the insulin resistance observed in epinephrine treated rats.

An excess of glucocorticoids is a well-known situation of insulin resistance (54). Hypercortisolemia is associated with increased glucose production by the liver, decreased transport and utilization of peripheral glucose, decreased protein synthesis, and increased protein degradation in muscle (42-44).

Under conditions of hypercortisolemia similar to those used in this study, dexamethasone has been reported to reduce insulin-induced insulin receptor autophosphorylation in the liver and muscle of rats *in vivo* and also IRS-1 activation of PI 3-kinase in these tissues (45). The results of the present study add new information in the molecular mechanism of insulin resistance in dexamethasone-treated rats, showing that insulin-induced IRS-2 tyrosine phosphorylation and association with PI 3-kinase are also reduced in liver and muscle of these animals.

In liver, but not in muscle of dexamethasone-treated rats there was also a decreased in insulin-induced Akt phosphorylation/activation. The alterations in early steps of insulin action may contribute to explain the insulin resistance and the increased hepatic gluconeogenesis in the liver of these animals. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), a rate controlling enzyme of gluconeogenesis is regulated by insulin (46). Transcription of PEPCK is not known to be subject to allosteric regulation, the inhibition of gluconeogenesis by insulin *in vivo* is probably due to insulin-induced decrease in the amount of PEPCK protein. Moreover, the observations that PEPCK gene expression in the liver is increased in animal models of diabetes (47) and that transgenic animals overexpressing the PEPCK gene develop a diabetic phenotype (48, 49) also indicate the importance of this enzyme in glucose homeostasis *in vivo*. Recently it was demonstrated that the activation of Akt alone is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP-

stimulated increase in PEPCK gene transcription (50). Our results showing that in dexamethasone-treated rats there is a decreased in insulin-induced Akt phosphorylation may suggest a molecular mechanism for insulin resistance and increased gluconeogenesis observed in these animals.

In muscle of dexamethasone-treated rats there was an important decrease in IRS-1/PI 3-kinase association and a modest decrease in IRS-2/PI 3-kinase association, and no alteration in Akt phosphorylation. It is interesting that Yamauchi et al. (51) demonstrated that IRS-1 plays central role in insulin-induced glucose transport in muscle. Recently it was demonstrated that activation of Akt is not essential for glucose transport in muscle (19). Taking together these informations, we can suggest that the marked reduction in insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation and association with PI 3-kinase may have a role in the reduced insulin-stimulated glucose transport in muscle of dexamethasone-treated rats.

In summary, The results of the present study demonstrated that alteration in early steps of insulin action may have a role in the insulin resistance observed in epinephrine or dexamethasone-treated rats. The reduction of insulin-induced Akt phosphorylation may contribute to explain the increase in gluconeogenesis described in the liver of these animals.

REFERENCES

- 1-Wilden PA, Khan CR, Siddle K, White MF 1992 .J. Biol. Chem. 267(23): 16660-16668.
- 2-Sun XJ, Rothenberg PL, Khan CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Golstein BJ, and White MF 1991. Nature. 352:73-77.
- 3-Rothenberg PL, Lane WS, Karasik A, Backer J, White MF, Khan CR 1991. J. Biol. Chem. 266: 8203-8311.
- 4-Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Furuta Y, Ikawa Y, Kasuga M, Yazaki Y, Aizawa S 1994. Nature. 372:182-186.
- 5-Araki E, Lipes MA, Patti MA, Bruning JC, Hagg B, Johnson RS, Khan CR 1994. Nature. 372:186-190.
- 6-Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Glasheen EM, Lane WS, Pierce JH, and White MF 1995. Nature. 337: 173-177.
- 7-Skolnik EY, Lee CH, Batzer A, Vicentini L M, Zhou M, Daly R, Myers MG, Backer JM, Ullrich A, White MF, Schlessinger J 1993. Embo J. 12:1929-1936.
- 8-Smith-Hall J, Pons S, Patti MA, Burks DJ, Yenush L, Sun XJ, Khan CR, White MF 1997. Biochemistry. 36: 27:8304-10.
- 9-Wilks AF, Harpur AG, Kirban RR, Rooph SJ, Zuercker G, Ziemiecki A 1992. Mol. Cell. Biol. 11:2057-2065.
- 10-Myers MG Jr, & White MF 1996. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36:615-658.
- 11-Cheatham B. *et al.* 1994. Mol. Cell. Biol. 14:4902-4911.
- 12-Okada T, Kawano Y, Sahihara T, Hazeki O, Ui M 1994. J. Biol. Chem. 269:3568-3573.
- 13-Shepherd PR, Nave BT, Siddle K 1995. Biochem. J. 271:1890-1897.
- 14-Gabbay RA *et al.* 1996. J .Biol. Chem.271:1890-1897.

- 15-Cohen et al., 1997
- 16-Klippel AWM, Kavanaugh D Pot, Williams LT 1997. *Moll. Cell. Biol.* 17:338-344.
- 17-Tanti JL, Grillo S, Gremeaux T, Coffier PJ, Van-obberghen E, Le-Marchand-Brustel Y 1997. *Endocrinology.* 138:2005-2010.
- 18-Donward J 1998. *Science.* 279:673-674.
- 19-Kitamura T, Ogawa W, Sakaue H, Hino Y, Kuroda K, Takata M, Matsumoto M, Maeda T, Konishi H, Kikkawa U, Kasuga M 1998. *Moll. Cell. Biol.* 18:3708-3717.
- 20-Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG, Miralpeix Jr, M, White MF 1993. *Moll. Cell. Biol.* 13: 7418-7428.
- 21-Holgado-Madruga M, Emlet DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ 1996.
- 22-Lavan BE, Lienhard GE 1993. *J. Biol. Chem.* 268:5921-5928.
- 23-Freeman Jr RM, Plutzky J, Neel BG 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:11239-11243.
- 24-Myers Jr. MG, Sun XL, Cheatham B, Jachna BR, Glasheen MG, Backer JM, White MF 1993. *Endocrinology.* 132: 1421-1430.
- 25-Sugimoto S, Lechleider RJ, Shoelson SE, Neel BG, Walsh CT 1994. *J. Biol. Chem.* 268: 22771-22776.
- 26-Laemmli UK 1970. *Nature.* 227: 680-685.
- 27-Towin H, Staehlin J, Gordon J 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354.
- 28- Saad MJA, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR 1992. *J.Clin.Invest.* 90:1839-1849.
- 29-Folli F, Saad MJA, Backer JM, Kahn CR 1993. *J.Clin.Invest.* 92:1787-1794.

- 30- Saad MJA, Hartmann LGC, Carvalho DS, Galoro CAO, Brenelli SL, Carvalho CRO 1995b. *Endocrine*. 3: 755-59.
- 31- Bennet, A.M., Tang, T., Sugino, S., Walsh, C.T., and Neel, B.G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**:7335-7339.
- 32- Xiao, S., Rose, D.W., Sasakawa, T., Maegawa, H., Burke, T.R.Jr., roller, P.P. Shoelson, S.E., and Olefsky, J.M. (1994) *J.Biol. Chem.* **269**:21244-21248.
- 33- Wilson, G.F., and Kaczmarek, L.K. (1993) Mode-switching as a voltage-gated cation channel is mediated by a protein kinase A-regulated tyrosine phosphatase. *Nature* **366**: 433-438.
- 34-Kohn A.D., Kovacina, K.S., Roth, R.A. *EMBO J* 14: 4288-95, 1995.
- 35- Burgering, B.M.T., Coffey, P.J., 1995. *Nature*. 376, 599-602.
- 36- Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R., Tschlis, P.N., 1995.. *Cell* 81, 727-736.
- 37- Didichenko, S.A., Tilton, B., Hemmings, B.A., Ballmer-Hofer, K., Thelen, M., 1996.. *Curr Biol*. 6, 1271-1278.
- 38- Klippel, A., Reinhard, C., Kavanaugh, M., Apell, G., Escobedo, M.A., Williams, T.L., 1996. *Mol Cell Biol*. 16, 4117-4127.
- 39-Alessi D.R., James, S.R., Downws, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R.J., Reese C.B., Cohen, P. *Curr Biol* 7: 261-269, 1997.
- 40- Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., Roth, R.A., 1996.. *J. Biol. Chem.* 271, 31372-31378.
- 41- Tanti, J.L., Grillo, S., Gremeaux, T., Coffey, P.J., Van-Obberghen, E., Le-Marchand-Brustel, Y., 1997.. *Endocrinology*. 138, 2005-2010.

- 42-Amatruda, J.M., Livingston J.N., and Lockwood D.H. 1985. *Diabetes Metab. Rev.* **3**, 293-317.
- 43-Knutson V.O. 1986. Transient fluctuations in responsiveness. *J. Biol. Chem.* **261**, 10306-10312.
- 44- Moller D.E, Flier J.S.N. 1991. *N. Engl. J. Med.* **325**, 939-948.
- 45-Saad, M.J.A, Folli, F., Kahn, C.R. *J. Clin. Invest*, 92: 2065-72, 1993.
- 46- O'Brien, R.M., and Granner, D.K.1991. *Biochem. J.* 278: 609-619
- 47- Hofmann, C., Lorenz, K., Williams, D., palazuk, B.J., Colca, J.R., 1995. *Metabolism* 44: 384-389
- 48- Valera, A., pujo, A., Pelegrin, M., and Bosh, F., 1994. *proc Natl Acad Sci USA* 91: 9151-54.
- 49- Rosella, G., Zajac, J.D., baker, L., Kaczmareczyk, S.J., Andrikopoulos, S., adams, T.E., Proietto, J. 1995. *Mol Endocrinol.* 9: 1396-1404
- 50- Liao JBC
- 51- Yamauchi, T., Tobe, K., Tamemoto, H., Ueki, K., Kaburagi, Y., Yamamoto-Honda, R., Takahashi, Y., Yoshizawa, F., Aizawa, S., Akanuma, Y., Sonenberg, N., Yazaki, Y., Kadowaki, T. *Mol Cel Biol* . 16: 3074-84, 1996.

LEGENDS

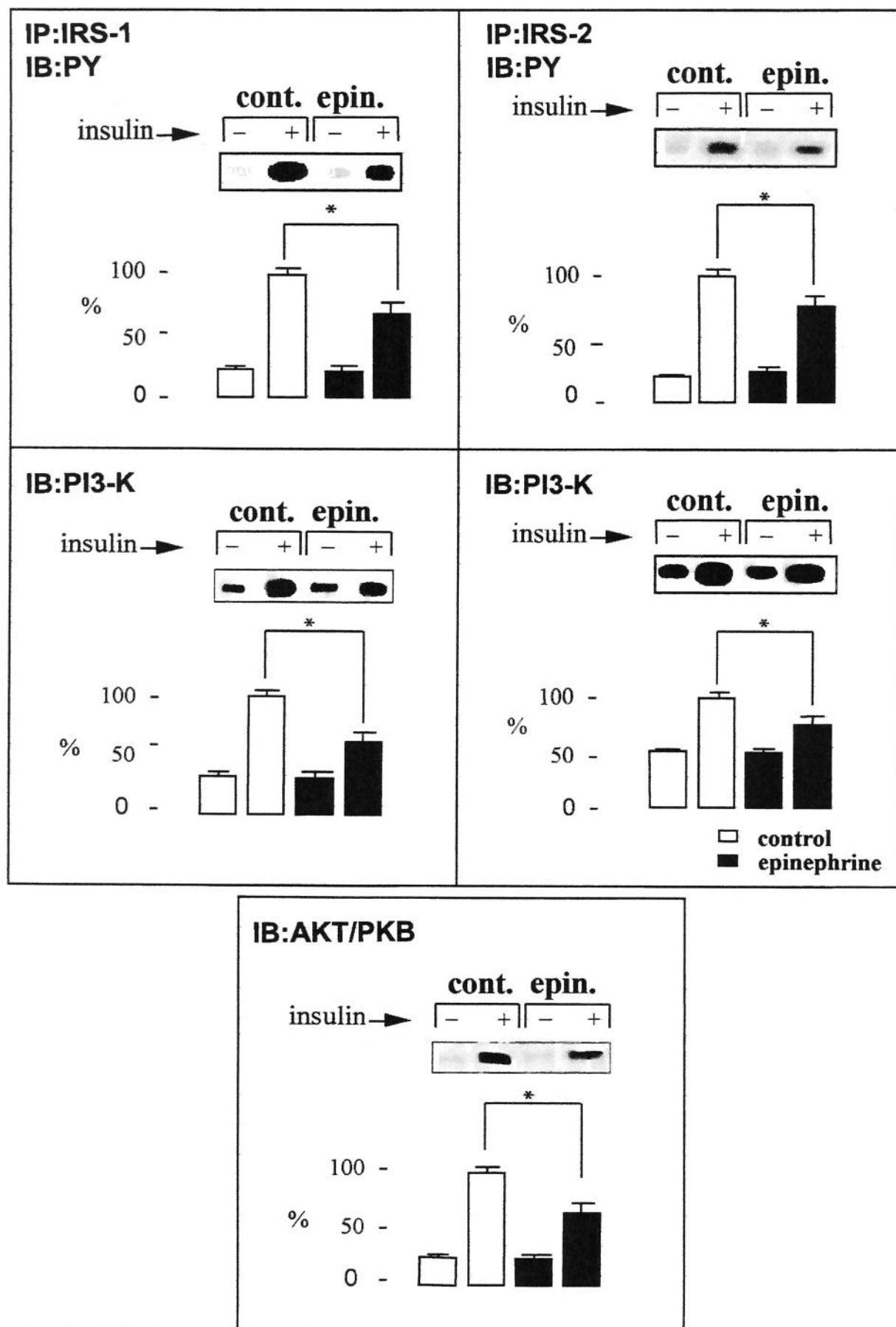
Figure 1. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 in intact liver from epinephrine-treated rats. Saline 0.9% (-) or insulin 6 μ g (+) was administrated into de portal vein as a bolus injection and 30s later the liver was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-IRS-1 and anti-IRS-2 and immunoblotted with antiphosphotyrosine and anti-PI3-kinase. Aliquots of samples were immunoblotted with anti-AKT/PKB. The black bar represent the control group and the white bar represent the epinephrine-treated group. The data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$.

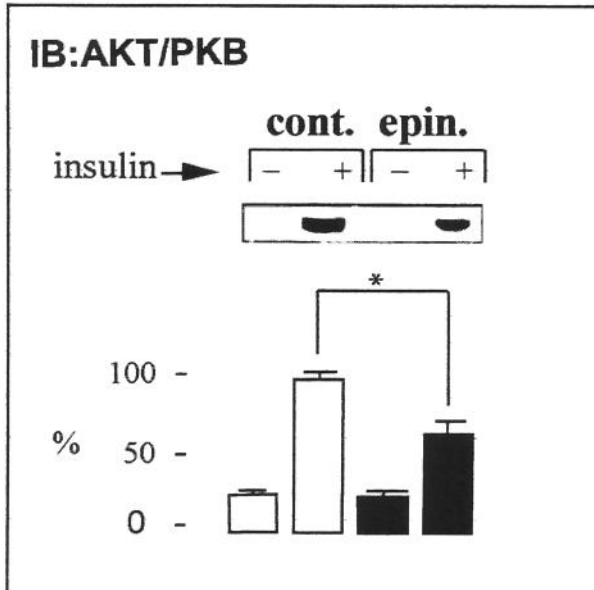
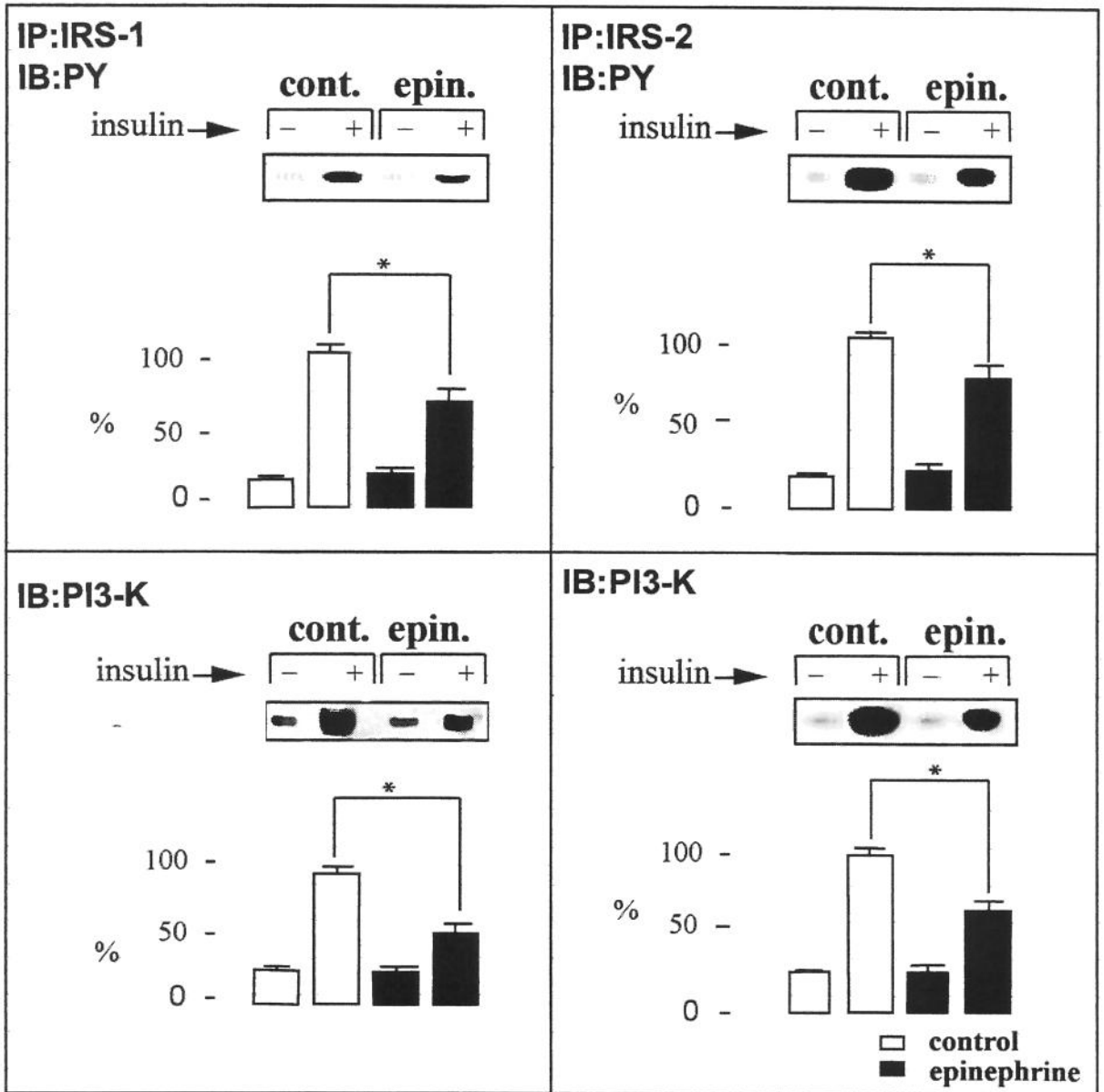
Figure 2. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 in intact muscle from epinephrine-treated rats. Saline 0.9% (-) or insulin 6 μ g (+) was administrated into de portal vein as a bolus injection and 90s later the muscle was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-IRS-1 and anti-IRS-2 and immunoblotted with antiphosphotyrosine and anti-PI3-kinase. Aliquots of samples were immunoblotted with anti-AKT/PKB. The black bar represent the control group and the white bar represent the epinephrine-treated group. The data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$.

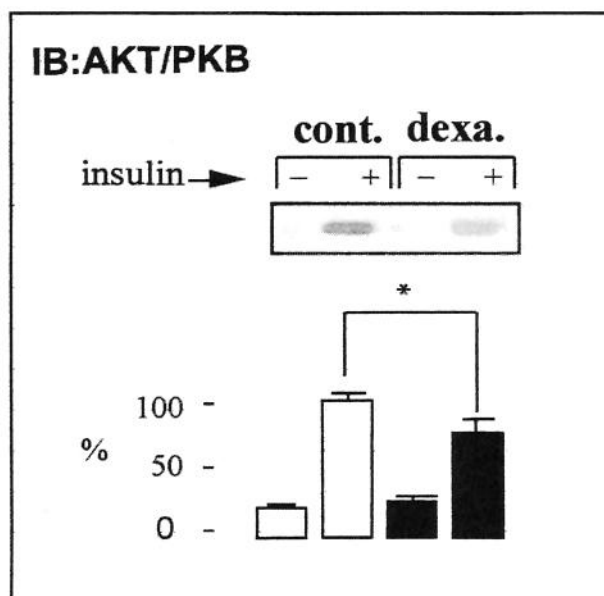
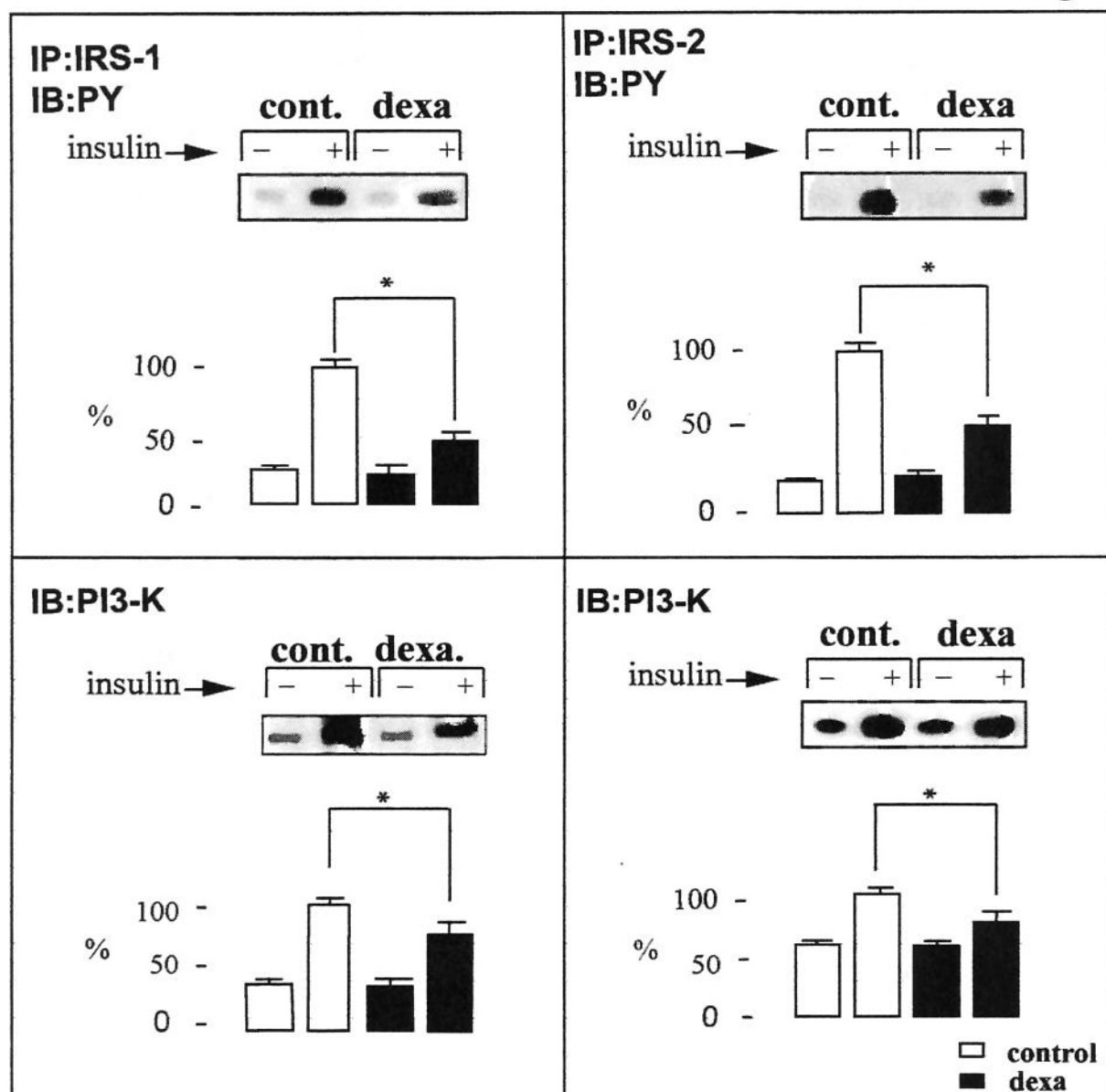
Figure 3. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 in intact liver from dexamethasone-treated rats. Saline 0.9% (-) or insulin 6 μ g (+) was administrated into de portal vein as a bolus injection and 30s later the liver was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-IRS-1 and anti-IRS-2 and immunoblotted with antiphosphotyrosine and anti-PI3-kinase. Aliquots of samples were immunoblotted with anti-AKT/PKB. The black bar represent the control group and the white bar represent the dexamethasone-treated group. The data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$.

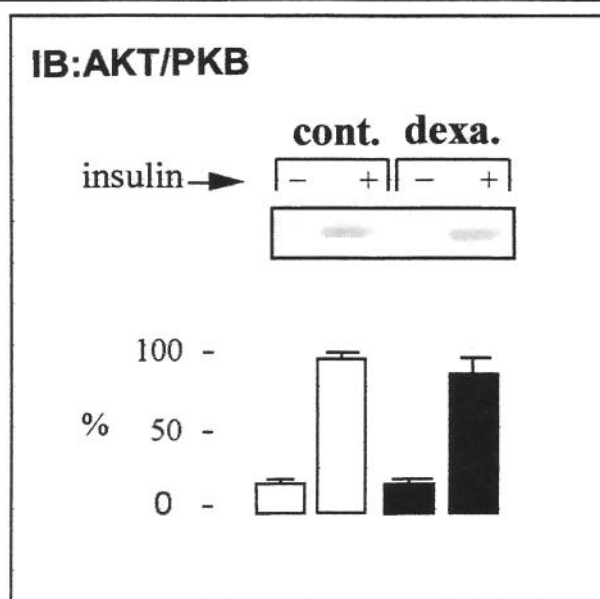
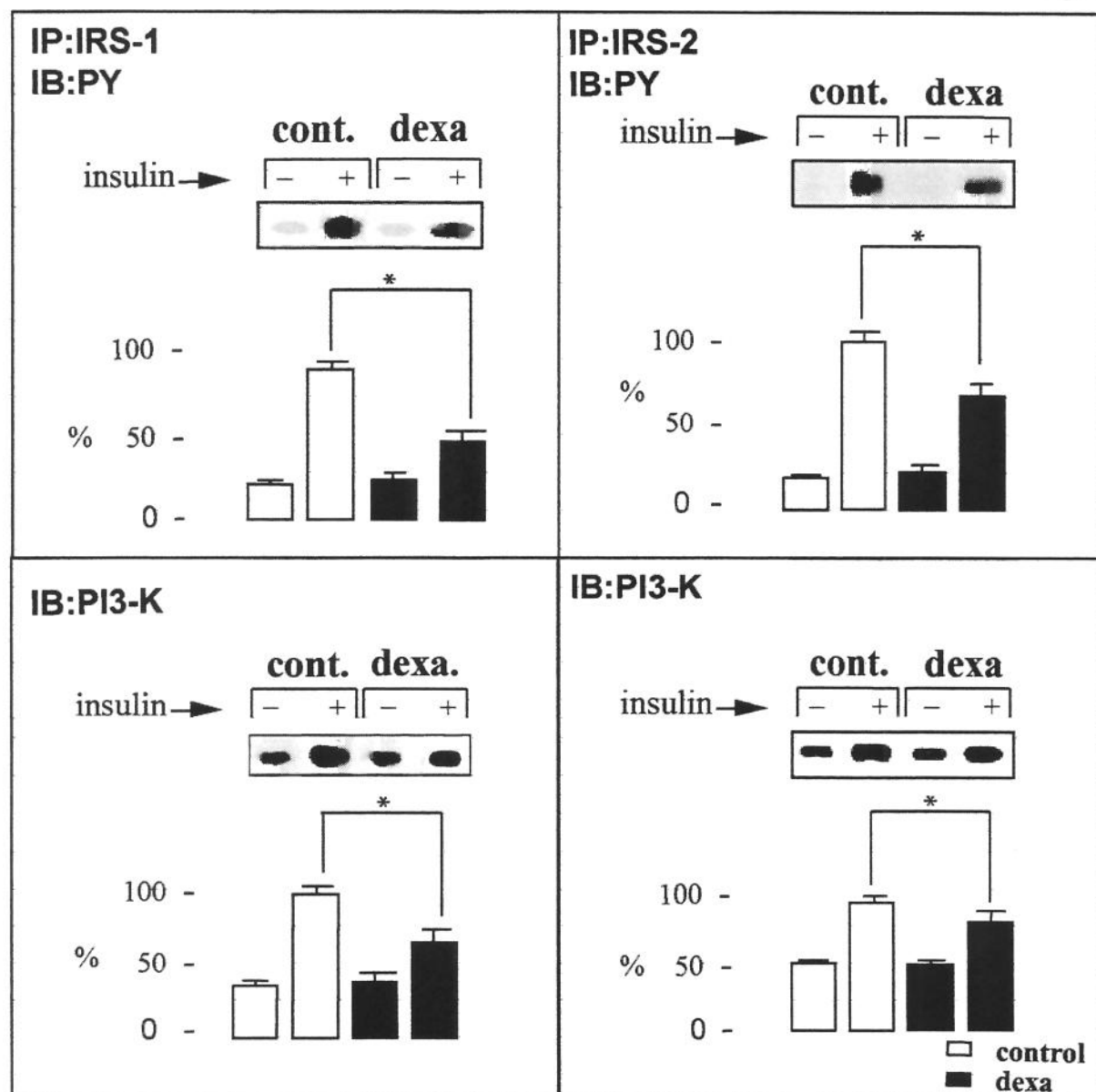
Figure 4. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 in intact muscle from dexamethasone-treated rats. Saline 0.9% (-) or insulin 6 μ g (+) was administrated into de portal vein as a bolus injection and 90s later the muscle was excised

and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-IRS-1 and anti-IRS-2 and immunoblotted with antiphosphotyrosine and anti-PI3-kinase. Aliquots of samples were immunoblotted with anti-AKT/PKB. The black bar represent the control group and the white bar represent the dexamethasone-treated group. The data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$.









***REGULATION OF IRS-2 TYROSINE PHOSPHORYLATION IN
FASTING AND DIABETES***

[†]Fernanda Alvarez Rojas, Aparecida Emiko Hirata, ^{*}Mario JA Saad.

^{*}Departamento de Clínica Médica, FCM., UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

Correspondence to: Mário J.A. Saad, MD

Departamento de Clínica Médica,

FCM-UNICAMP

Campinas, SP, Brasil, 13081-970

Fax: +55 193788 8950

ABSTRACT

Intracellular insulin signaling involves a series of alternative and complementary pathways created by the multiple substrates of the insulin receptor (IRS) and the various isoforms of the SH2 domain signaling molecules that can interact with substrate. In this study we investigated IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation, their association with PI3-kinase and the phosphorylation of Akt, a serine-threonine kinase situated downstream to PI 3-kinase, in liver and muscle of two animal models of insulin resistance: 72 h of fasting and STZ-diabetic rats. There was an upregulation in insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation and association with PI3-kinase in liver and muscle of both animal models of insulin resistance. However, Akt phosphorylation showed different regulation, increasing in fasting and decreasing in STZ-diabetic rats. Since an important difference between these two animal models of insulin resistance is the plasma glucose levels, we can suggest that in STZ diabetic rats, the reduction in Akt phosphorylation is probably related to hyperglycemia and may certainly contribute to the molecular mechanism of insulin resistance observed in these animals.

Keywords: insulin, IRS-2, liver, muscle.

INTRODUCTION

The insulin receptor is the principal mediator of insulin action in the cellular mitogenic and metabolic responses to this hormone. Upon binding insulin, the intrinsic tyrosine kinase activity of the membrane β subunit of the receptor increases, allowing it to phosphorylate itself as well as intracellular substrates (Wilden et. al., 1992). Numerous studies have shown that insulin receptor has various substrates, including insulin receptor substrate 1 (IRS-1), IRS-2, IRS-3, Shc and possible others (Sun et. al., 1991; Rothenberg et. al., 1991; Tamemoto et .al., 1994; Araki et. al., 1994; Sun et. al., 1995; Skolnik et. al., 1993; Smith-Hall et. al., 1997; Wilks et. al., 1992). This cellular response to insulin, phosphorylation of several cytosolic docking proteins (IRS proteins), couple the insulin receptor to various effector molecules, including phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI 3-kinase), SHP2, Grb2/SOS, NCK and CRK (Myers et. al., 1996). PI 3-kinase may be involved in mediating several insulin-regulated metabolic pathways, including glucose uptake (Cheatam et. al., 1994), antilipolysis (Okada et. al., 1994), glycogen synthesis (Shepherd et. al., 1995) and the suppression of hepatic gluconeogenesis through the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) expression (Gabbay et. al., 1996), and abnormalities in the activation of this protein association may explain defective glucose homeostasis. Different approaches have demonstrated that Akt, a serine-threonine kinase with a pleckstrin homology domain, is functionally located downstream of PI3-kinase (Klippel et. al., 1997; Tanti et. al., 1997; Donward et. al., 1998; Kitamura, 1998).

Alterations in the early steps of insulin signaling have been recognized as an important component of many insulin-resistant states. The decreasing of insulin binding, receptor kinase activity, IRS-1 protein phosphorylation, and IRS-1 associated PI3-kinase activity, have been demonstrated in different animal models of insulin resistance (Soll et. al., 1975; Kahn et. al., 1993; Folli et.al., 1993; Saad et. al., 1992; Saad et. al., 1993). It is interesting that in mice made IRS-1-deficient by homologous recombinant gene targeting, IRS-2 serves as an alternative substrate and allows for significant residual insulin signaling (Yamauchi et. al., 1996). Therefore, the investigation of the regulation of IRS-2 and downstream signaling may add new information in the molecular mechanisms of insulin resistance.

In the present study, we investigated the regulation of insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation, their association with PI 3-kinase and the Akt phosphorylation level in the liver and muscle of two rat models of insulin resistance: 72 h fasting, and STZ-diabetes.

MATERIALS AND METHODS

Materials: The reagents and apparatus for SDS-PAGE and immunoblotting were obtained from Bio-Rad (Richmond, CA). Tris, phenylmethylsulfonylfluoride (PSMF), aprotinin, silicone and dithiothreitol were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Sodium amobarbital and human recombinant insulin (Humulin R) were purchased from Eli Lilly Co. (Indianapolis, IN). Protein A-Sepharose 6MB was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden). [125 I] Protein A was obtained from Amersham (Aylesbury, UK), and nitrocellulose (BA85; 0.2 μ m) was obtained from Schleicher and Schuell (Keene, NH). Male Wistar rats were from the UNICAMP Central Animal Breeding Center. Monoclonal antiphosphotyrosine antibodies were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Anti-IRS-1 and anti-IRS-2 were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), anti-PI 3-K antibodies were from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY), and anti-phosphoAkt (ser475) was obtained from New England Biolab, Inc.

Animals: Male wistar rats 6 weeks old (mean body weight of $131\text{g} \pm 6\text{ g}$) were fed standard rodent chow and water *ad libitum*. Food was withdrawn 12-14 h before the experiments for the streptozotosin treated rats and their respective controls. To examine the influence of starvation, some rats were fasted for 72 h and their controls were fed rats. The other group of rats was render diabetic by a single injection of STZ (60mg/kg i.v.). All experiments were approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas (UNICAMP).

Methods: The rats were anesthetized with sodium amobarbital (15 mg/kg body weight, ip) and used 10-15 min later, as soon as anesthesia was assured by the loss of foot and corneal reflexes. The abdominal cavity was opened, the portal vein exposed and 6 μ g

of insulin was injected. The liver and the muscle were removed 30 s and 90 s respectively, after the infusion of insulin, minced coarsely, and homogenized immediately in approximately 10 volumes of solubilization buffer A at 4 °C, using a Polytron PT 10/35 homogenizer fitted with a PTA 20S blade (Brinkmann Instruments) operated at maximum speed for 30 s. Buffer A (for solubilization) consisted of 1% Triton X-100, 50 mM Hepes (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM phenylmethylsulfonylfluoride, and 0.1 mg of aprotinin/ml.

The liver and muscle were extracted in an identical fashion in each model studied. The extracts were centrifuged at 15,000 rpm in a Beckman 70.1 Ti rotor at 4 °C for 20 min to remove insoluble material, and the resulting supernatant was used for immunoprecipitation with 13 µl of polyclonal anti-IRS-1 and IRS-2 antibody. The immune complexes were precipitated with protein A-Sepharose 6MB and were washed three times with 50 mM Tris (pH 7.4), 2 mM sodium vanadate, and 0.1% Triton X-100.

Protein analysis by immunoblotting: After washing, the pellet was resuspended in Laemmli sample buffer (Laemmli UK, 1970) with 100 mM dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 5 min. The samples were subjected to SDS-PAGE (6.5% Tris-acrylamide) in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus. Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean) as described by Towbin *et al* (Towin et. al., 1979). Nonspecific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter overnight at 4°C in blocking buffer (3% BSA, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20). The prestained molecular mass standards used were myosin (206 kDa), β -galactosidase (120 kDa), bovine serum albumin (85 kDa), and ovalbumin (47 kDa). The nitrocellulose filter thus treated was then incubated for 4 h at 22°C with anti-phosphotyrosine antibody (0.5 µg/ml, diluted in blocking buffer) and with anti-PI3-kinase antibody, and then washed for 30 min in blocking buffer without BSA. Some samples were incubated with anti-Akt antibody. The blots were then incubated with ¹²⁵I-Protein A (30 µCi/µg) in 10 ml of blocking buffer for 1 h at 22°C and washed again. ¹²⁵I-Protein A bound to the antibodies was detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film

with Cronex Lightning Plus intensifying screens at -70°C for 12-48 h. Band intensities were quantified by optical densitometry (Molecular Dynamics) of the developed autoradiogram.

Statistical analysis: The experiments were always performed by studying the physiological or pathological group of rats in parallel with a control group. Comparison of the data in fed (0) vs. fasted (72 h) and control vs. STZ-diabetes rats were analyzed using unpaired Student's *t* test. The level of significance employed was $p < 0.05$.

RESULTS

To investigate the tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 following stimulation by insulin in pathophysiological states of insulin resistance, we infused insulin into the portal vein of rats. After that, the liver and muscle were removed and homogenized and the proteins were immunoprecipitated with a polyclonal anti-IRS-1 and anti-IRS-2 antibody. The IRS-1 and IRS-2 immunoprecipitates were analyzed for tyrosyl phosphorylation by immunoblotting with a monoclonal anti-phosphotyrosine antibody. The nitrocellulose membranes were also stripped and reblotted with anti-PI3-kinase antibodies, in order to access the association of these proteins with IRS-1 and IRS-2. The phosphorylation level of Akt, using whole tissue extracts and blotting with anti-phospho Akt (ser 475) antibody, was also studied.

1- Effect of fasting on insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation, the association of PI3-kinase with these substrates and Akt phosphorylation in the liver of rats. (Fig.1).

Insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation level in liver of fasted rats were significantly increased to $155 \pm 13\%$ and $174 \pm 11\%$ respectively, when compared to fed rats ($p < 0.05$).

Previous studies have suggested that there is a relatively stable, high affinity interaction between IRSs/PI 3-kinase, such that both proteins are coprecipitated by antibodies to either protein. In liver samples, previously immunoprecipitated with anti-IRS-

1 and IRS-2 antibody and then immunoblotted with anti-PI 3-kinase antibody, a band corresponding to the latter protein was seen in both fed and fasted rats. After stimulation with insulin, the intensity of this band increased in both groups of rats, in agreement with the formation of a stable association between IRS-1 or IRS-2 with PI 3-kinase. Comparison of the bands corresponding to stimulation by insulin, in liver of fasted rats, showed that the amount of PI3-kinase associated with IRS-1 and IRS-2 increased to $148 \pm 3\%$ and to $124 \pm 6\%$ ($p < 0.05$) respectively. The Akt phosphorylation induced by insulin in liver of fasted rats was significantly increased to $160 \pm 6\%$ ($p < 0.05$).

2- Effect of fasting on insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation, the association of PI3-kinase with these substrates and Akt phosphorylation, in the muscle of rats. (Fig.2).

Insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation level in muscle of fasted rats were significantly increased to $140 \pm 6\%$ and to $217 \pm 11\%$ respectively, when compared to fed rats ($p < 0.05$).

In muscle samples, previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 and IRS-2 antibody and then immunoblotted with anti-PI 3-kinase antibody, a band corresponding to the latter protein was seen in both fed and fasted rats. After stimulation with insulin, the intensity of this band increased in both groups of rats, in agreement with the formation of a stable association between IRS-1 or IRS-2 with PI 3-kinase. Comparison of the bands corresponding to stimulation by insulin in muscle of fasted rats, showed that the amount of PI 3-kinase associated with IRS-1 and IRS-2 increased to $152 \pm 4\%$ and to $128 \pm 7\%$ ($p < 0.05$) respectively. The Akt phosphorylation induced by insulin in muscle of fasted rats, was significantly increased to $152 \pm 8\%$ ($p < 0.05$).

3- Effect of STZ on insulin-induced IRS1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation, the association of PI3-kinase with these substrates and the Akt phosphorylation, in the liver of rats. (Fig.3).

Insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation level in liver of STZ-treated rats, were significantly increased to $141 \pm 12\%$ and to $187 \pm 11\%$ respectively when compared to controls ($p < 0.05$).

Analysis of the insulin-induced IRS-1/PI 3-kinase and IRS-2/PI 3-kinase association showed a significant increase to $180 \pm 7\%$ and to $136 \pm 1\%$ respectively, in these associations in liver of STZ-treated rats ($p < 0.05$). The Akt phosphorylation induced by insulin in liver of STZ treated rats was significantly reduced to $65 \pm 6\%$ ($p < 0.05$).

4- Effect of STZ on insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation, the PI3-kinase association with these substrates and the Akt phosphorylation in the muscle of rats. (Fig.4).

Insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation level in the muscle of STZ-treated rats were significantly increased to $150 \pm 12\%$ and to $168 \pm 15\%$ respectively when compared to control rats ($p < 0.05$).

Analysis of the insulin-induced IRS-1/PI 3-kinase and IRS-2/PI 3-kinase association showed a significant increase in muscle of STZ-treated rats to $175 \pm 1\%$ and to $122 \pm 5\%$ respectively, in these associations ($p < 0.05$). The Akt phosphorylation induced by insulin in muscle of STZ-treated rats, was significantly reduced to $70 \pm 7\%$ ($p < 0.05$).

DISCUSSION

Insulin action at the cellular level is a complex network characterized by both alternative pathways and isoforms of the key proteins involved. At the first intracellular level are the multiple substrates of the insulin receptor. IRS-1 through IRS-4, Shc, and Gab-1 are all phosphorylated by the insulin receptor kinase and, with exception of Shc, each of these possesses multiple phosphorylation sites allowing to the interaction with several src homology 2 (SH2) signaling proteins simultaneously (Sun et. al., 1991; Sun et. al., 1995; Smith-Hall et. al., 1997; Cheatham, B and Kahn, CR, 1995; Sun et. al., 1993; Holgado-Madruga et. al., 1996; Lavan et. al., 1993). These include the tyrosine phosphatase SHP2, the tyrosine kinase Fyn, the adaptor molecule GRB2, and the regulatory subunits of PI 3-kinase (Skolnik et. al., 1993; Cheatham B, Kahn, CR. 1995; Sun et. al., 1993; Freeman et. al., 1992; Myers et. al., 1993; Sugimoto et. al., 1994).

Alterations in the early steps of insulin signaling have been recognized as an important component of many insulin-resistant states. In mice made IRS-1-deficient by homologous recombinant gene targeting, IRS-2 serves as an alternative substrate and allows for significant residual insulin signaling (Yamauchi et. al., 1996). In this regard, the investigation of the regulation of IRS-2 and downstream signaling may add new information in the molecular mechanisms of insulin resistance.

In the present study, we investigated the importance of IRS-2 phosphorylation and its association with PI3-kinase and a downstream target Akt phosphorylation, after insulin stimulation, in two animal models of insulin resistance, which have in common hypoinsulinemia but different plasma glucose levels.

Prolonged fasting in rats is characterized by insulin deficiency and insulin resistance, despite an increase in the number of insulin receptors in liver and peripheral tissues (Penicaut et. al., 1985; Defronzo et. al., 1982; Almira, EC, Reddy, WJ, 1979; Okamoto et. al., 1986). Increased insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation and association with PI3-kinase have been reported in liver and muscle of fasted rats (Folli et. al., 1993; Saad et. al., 1992), and certainly is not responsible for the insulin resistance observed in these animals. However, in view of the alternative substrates and pathways of insulin signaling, it is possible that there could be different changes in IRS-2, which can contribute to explain the reduced insulin sensitivity. The present data indicate that insulin induced IRS-2 tyrosine phosphorylation and association with PI 3-kinase, are increased in liver and muscle of fasted rats.

Akt (also termed PKB or Rac) is a 60 kDa serine-threonine kinase, which is stimulated by a wide range of receptor tyrosine kinase (Kohn et. al., 1995; Burgering BMT, Coffe PJ, 1995; Franke et. al., 1995; Didichenko et. al., 1996; Klippel et. al., 1996). Akt is thought to be a downstream target of PI 3-kinase (Okamoto et. al., 1986; Franke et. al., 1995; Datta et. al., 1996). Several lines of evidence suggest that PI 3-kinase is both necessary and sufficient for insulin activation of Akt activity (Kohn et. al., 1995; Burgering BMT, Coffe PJ, 1995; Franke et. al., 1995; Klippel et. al. 1996). Furthermore, Akt is thought to play an important role in regulation of cell survival (Yao R, Cooper GM, 1995;

Kulik et. al., 1997; Peso et. al., 1997; Dudek et. al., 1997), and is has been implicated in signaling pathway to glucose utilization (Kohn et. al., 1996; Tanti et. al., 1997). Recently, Akt activity has been reported to be essential for activation of glycogen synthase by insulin (Kitamura et. al., 1998). The data of the present study demonstrating that in fasted rats there is an increase in insulin-induced Akt phosphorylation in liver and muscle, which is in agreement with the increase in insulin-induced IRS-1 and IRS-2/PI 3-kinase association in these tissues. This increase in early steps in insulin action with fasting, occurs despite a state of decreased insulin responsiveness in both liver and peripheral tissues of fasted animal (Penicaud et. al., 1985; DeFronzo et. al., 1982; Almira EC, Reddy WJ 1979; Okamoto et. al., 1986). The fact that euglycemic clamp studies show decreased insulin-stimulated glucose utilization in muscle in vivo with fasting, suggests that tissue or circulating factors such as fatty acids, ketones, countrarregulatory hormones, and acidosis may antagonized the stimulatory action of insulin in glucose utilization in muscle. It is possible that the increase in insulin induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation and association with PI 3-kinase, and also the increase in Akt phosphorylation in liver and muscle during 3-days fast could be a response to the impairment of insulin action.

STZ diabetes is characterized by insulin deficiency and insulin resistance. The molecular mechanisms responsible for this insulin resistance is not clear, but al least alterations in early steps in insulin action have been demonstrated. It was previously described that in liver and muscle of these animals there is an increase in insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation levels, in parallel with an increase in IRS-1/PI 3-kinase association (Folli et. al., 1993). The results of the present study demonstrated a similar regulation of the IRS-2 tyrosine phosphorylation and IRS-2/PI 3-kinase association. It is interesting that Akt phosphorylation was reduced in liver and muscle of STZ-diabetic animals in spite of an increase in IRS-2/PI 3-kinase association. This decrease in Akt phosphorylation in liver and muscle of STZ-diabetic rats may have a role in the molecular mechanism of insulin resistance in these animals.

It is important to emphasize that 3-days fasting and STZ are two animals models of insulin resistance and hypoinsulinemia, but with different plasma glucose levels (Folli et. al., 1993) and different levels of Akt phosphorylation in tissues. Substantial

evidence has been accumulated to suggest that chronic hyperglycemia can directly contribute to the development of peripheral insulin resistance (Rossetti et. al., 1987; Yki-Jarvinen et. al., 1987; Ritcher et. al., 1998; Kahn et. al., 1991; Marshall et. al., 1992; Zierath et. al., 1994; Pillay et. al., 1996; Rossetti et. al., 1997). In partially pancreatectomized diabetic rats, correction of hyperglycemia by phlorizin treatment restored insulin-stimulated glucose transport in isolated adipocytes and improved whole body insulin sensitivity (Rossetti et. al., 1987; Kahn et. al., 1991; Rossetti et. al., 1997). Previous studies demonstrated that in Goto-Kakizaki (GK) diabetic rats, a nonobese model of type 2 diabetes, there is a decrease in Akt activity in muscle, which is restored by correcting the hyperglycemia. Taking together these results with the data of this study demonstrating that in fasted rats there is no decrease in Akt activity, we can suggest that in STZ diabetic rats the reduction in Akt phosphorylation is probably related to hyperglycemia. The mechanism by which hyperglycemia reduces Akt activity is not known, but certainly did not involve upstream signaling because insulin induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation and association with PI 3-kinase were upregulated in STZ diabetic rats. Since Akt activity is essential for activation of glycogen synthase, a reduction in Akt phosphorylation in liver and muscle of STZ diabetic rats may certainly contribute to the molecular mechanism of insulin resistance observed in these animals.

In summary, the results of the present study demonstrated that in two animal models of insulin resistance and hypoinsulinemia, there is an upregulation in insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation and association with PI 3-kinase. However, the downstream target of PI 3-kinase, Akt phosphorylation showed different regulation, increasing in fasting and decreasing in STZ-diabetic rats. The decrease in Akt phosphorylation in liver and muscle of STZ-diabetic rats may have a role in the molecular mechanism of insulin resistance observed in these diabetic animals.

REFERENCES

- Almira, E.C., Reddy, W.J., 1979. Effect of fasting on insulin binding to hepatocytes and liver plasma membranes from rats. *Endocrinology*. 104, 205-11.
- Araki, E., Lipes, M.A., Patti, M.A., Bruning, J.C., Hagg, B., Johnson, R.S., Khan, C.R., 1994. Alternative pathway of insulin signal in mice with target disruption of the IRS-1 gene. *Nature*. 372, 186-190.
- Burgering, B.M.T., Coffey, P.J., 1995 Protein kinase B (γ -Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 376, 599-602.
- Cheatham, B., Vlahos, C.J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J., Kahn, C.R., 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70S6 kinase DNA synthesis and glucose transporter translocation. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4902-4911.
- Cheatham, B., Kahn, C.R., 1995. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev.* 16, 117-142.
- Datta, K., Bellacosa, A., Chan, T.O., Tsichilis, P.N., 1996. Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase: activation by growth factors, v-src, v-Ha-ras in Sf9 and mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 271, 13083-13089.
- DeFronzo, R.A., Hendler, R., Simonson, D., 1982. Insulin resistance is a prominent feature of insulin-dependent diabetes. *Diabetes*. 31, 795-801.
- Didichenko, S.A., Tilton, B., Hemmings, B.A., Ballmer-Hofer, K., Thelen, M., 1996. Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47^{phox} by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol*. 6, 1271-1278.
- Donward, J. 1998 Lipid-regulated kinases: some common themes at least. *Science*. 279, 673-674.

- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., Greenberg, M.E., 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661-665.
- Folli, F., Saad, M.J.A., Backer, J.M., Kahn, C.R., 1993. Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. *J.Clin.Invest.* 92, 1787-1794.
- Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R., Tsichlis, P.N., 1995. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81, 727-736.
- Freeman, Jr. R.M., Plutzky, J., Neel, B.G., 1992. Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of *Drosophila* corkscrew. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 11239-11243.
- Gabbay, R.A., 1996. Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase gene expression does not require activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 1890-1897.
- Holgado-Madruga, M., Emlet, D.R., Moscatello, D.K., Godwin, A.K., Wong, A.J., 1996. A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin receptor signaling. *Nature.* 379, 560-563.
- Kahn, C.R., Neville Jr. D.M., Roth, J., 1993. Insulin receptor interaction in the obese hyperglycemic mouse. A model of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 268, 244-250.
- Kahn, B.B., Schulman, G.I., DeFronzo, R.A., Cushman, S.W., Rossetti, L., 1991. Normalization of blood glucose in diabetic rats with phlorizin treatment reverses insulin-resistant glucose transporter gene expression. *J Clin Invest* 87, 561-570.
- Kitamura, T., Ogawa, W., Sakaue, H., Hino, Y., Kuroda, K., Takata, M., Matsumoto, M., Maeda, T., Konishi, H., Kikkawa, U., Kasuga, M., 1998. Requirement for activation of serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3708-3717.

- Klippel, A.W.M., Kavanaugh, D. Pot, Williams, L.T., 1997. A specific product of phosphatidylinositol 3'-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pelckstrin homology domain. *Moll. Cell. Biol.* 17, 338-344.
- Klippel, A., Reinhard, C., Kavanaugh, M., Apell, G., Escobedo, M.A., Williams, T.L., 1996. Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transduction kinase pathway. *Moll Cell Biol.* 16, 4117-4127.
- Kohn, A.D., Kovacina, K.S., Roth, R.A., 1995. Insulin stimulates the kinase activity of RAK-PK, a pelckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *EMBO J.* 14, 4288-4295.
- Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaun, M.J., Roth, R.A., 1996. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-Li adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* 271, 31372-31378.
- Kulik, G., Klippel, A., Weber, M.J., 1997. Antiapoptotic signaling by the insulin-like growth factor I receptor phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *Mol Cell Biol.* 17, 1595-1506.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Lavan, B.E., Lienhard, G.E., 1993. The insulin-elicited 60 kDa phosphotyrosine protein in rat adipocytes is associated with phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 268, 5921-5928.
- Marshall, S., Bacote, V., Traxinger, R.R., 1992. Discovery of a metabolic pathway mediating desensitization of the glucose transport system: role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem* 266, 4706-4712.
- Myers, M.G. Jr, & White, M.F., 1996. Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 615-658.

- Myers, M.G. Jr., Sun, X.L., Cheatham, B., Jachna, B.R., Glasheen, M.G., Backer, J.M., White, M.F., 1993. IRS-1 is a common element in insulin and insulin-growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase. *Endocrinology*. 132, 1421-1430.
- Okada, T., Kawano, Y., Sahihara, T., Hazeki, O., Ui, M., 1994. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with selective inhibitor wortmannin. *J. Biol. Chem.* 269, 3568-3573.
- Okamoto, M., White, M.F., Maron, R., Kahn, C.R., 1986. Autophosphorylation and kinase activity of insulin receptor in diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 251, E542-50.
- Penicaud, L., Kande, J., Lemagnen, J., 1985. Insulin action during fasting and refeeding in rat determined by euglycemic clamp. *Am. J. Physiol.* 249, E514-E518.
- Peso, L.D., González-García, M., Page, C., Herrera, R., Nuñez, G., 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*. 278, 687-689.
- Pillay, T.S., Xiao, S., Olefsky, J.M., 1996. Glucose-induced phosphorylation on the insulin receptor. *J Clin Invest* 97, 613-620.
- Ritcher, E.A., Hansen, B.F., Hansen, S.A., 1998. Glucose-induced insulin resistance of skeletal muscle glucose transport and uptake. *Biochem J.* 252, 733-737.
- Rossetti, L., Smith, D., Schulman, G.I., Papachristou, D., DeFronzo, R.A., 1987. Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J Clin Invest* 79, 1510-1515.
- Rossetti, L., Hawkins, M., Chen, W., Gindi, J., Baird, N., 1997. In vivo glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycemic but not hyperglycemic conscious rats. *J Clin Invest* 96, 132-140.
- Rothenberg, P.L., Lane, W.S., Karasik, A., Backer, J., White, M.F., Khan, C.R., 1991. Purification and partial sequence analysis of pp185, the major cellular substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 266, 8203-8311.

- Saad, M.J.A., Araki, E., Miralpeix, M., Rothenberg, P.L., White, M.F., Kahn, C.R., 1992. Regulation of insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 90, 1839-1849.
- Saad, M.J.A., Folli, F., Kahn, J.A., Kahn, C.R., 1993. 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.
- Shepherd, P.R., Nave, B.T., Siddle, K., 1995. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem. J.* 271, 1890-1897.
- Skolnik, E.Y., Lee, C.H., Batzer, A., Vicentini, L.M., Zhou, M., Daly, R., Myers, M.G., Backer, J.M., Ullrich, A., White, M.F., Schlessinger, J., 1993. The SH2/SH3 domain-containing protein Grb 2 interacts with tyrosine phosphorylated IRS-1 and Shc: implication for insulin control of ras signaling. *Embo J.* 12, 1929-1936.
- Smith-Hall, J., Pons, S., Patti, M.A., Burks, D.J., Yenush, L., Sun, X.J., Khan, C.R., White, M.F., 1997. The 60 kDa receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells. *Biochemistry.* 27, 304-10.
- Soll, A.H., Kahn, C.R., Neville, Jr. D.M., Roth, J., 1975. Insulin receptor deficiency in genetic and acquired obesity. *J.Clin.Invest.* 56, 769-780.
- Sugimoto, S., Lechleider, R.J., Shoelson, S.E., Neel, B.G., Walsh, C.T., 1994. Expression, purification and characterization of SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SH-PTP2. *J. Biol. Chem.* 268, 22771-22776.
- Sun, X.J., Rothenberg, P.L., Khan, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Golstein, B.J., White, M.F., 1991. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature.* 352, 73-77.

- Sun, X.J., Wang, L.M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers, M.G., Glasheen, E.M., Lane, W.S., Pierce, J.H., White, M.F., 1995. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. *Nature*. 337, 173-177.
- Sun, X.J., Crimmins, D.L., Myers, M.G., Miralpeix, Jr, M., White, M.F., 1993. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol. Cell. Biol* 13, 7418-7428.
- Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Furuta, Y., Ikawa, Y., Kasuga, M., Yazaki, Y., Aizawa, S., 1994. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate 1. *Nature*. 372, 182-186.
- Tanti, J.L., Grillo, S., Gremeaux, T., Coffier, P.J., Van-Obberghen, E., Le-Marchand-Brustel, Y., 1997. Potential role of protein kinase B in glucose transporter translocation in dipocytes. *Endocrinology*. 138, 2005-2010.
- Towin, H., Staehlin, J., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76, 4350-4354.
- Wilden, P.A., Khan, C.R., Siddle, K., White, M.F., 1992. Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic functions. *J. Biol. Chem* 267(23), 16660-16668.
- Wilks, A.F., Harpur, A.G., Kirban, R.R., Rooph, S.J., Zuercker, G., Ziemiecki, A., 1992. Two novel protein-tyrosine kinase, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol. Cell. Biol* 11, 2057-2065.
- Yamauchi, T., Tobe, K., Tamemoto, H., Ueki, K., Kaburagi, Y., Yamamoto-Honda, R., Takahashi, Y., Yoshizawa, F., Aizawa, S., Akanuma, Y., Sonenberg, N., Yazaki, Y., Kadowaki, T., 1996. Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 16, 3074-3084.

- Yao, R., Cooper, G.M., 1995. Requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*. 267, 2003-2006.
- Yki-Järvinen, H., Helve, E., Koivisto, V., 1987. Hyperglycemia decreases glucose uptake in type I diabetes. *Diabetes*. 36, 892-896.
- Zierath, J.R., Galuska, D., Nolte, L.A., Thörne, A., Smedegaard-Kristensen, J., Wallberg-Henriksson, H., 1994. Effects of glycemia on glucose transport in isolated skeletal muscle from patient with NIDDM: in vitro reversal of muscular insulin resistance. *Diabetologia*. 37, 270-277.

LEGENDS

Figure 1. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 in intact liver from fasted rats. Saline 0.9% (-) or insulin 6 μ g (+) was administrated into de portal vein as a bolus injection and 30s later the liver was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-IRS-1 and anti-IRS-2 and immunoblotted with antiphosphotyrosine and anti-PI3-kinase. Aliquots of whole tissue extracts were immunoblotted with anti-phospho Akt antibody. The black bar represent the control group and the white bar represent the fasted group. The data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$.

Figure 2. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 in intact muscle from fasted rats. Saline 0.9% (-) or insulin 6 μ g (+) was administrated into de portal vein as a bolus injection and 90s later the muscle was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-IRS-1 and anti-IRS-2 and immunoblotted with antiphosphotyrosine and anti-PI3-kinase. Aliquots of whole tissue extracts were immunoblotted with anti-phospho Akt antiody. The black bar represent the control group and the white bar represent the fasted group. The data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$.

Figure 3. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 in intact liver from STZ-treated rats. Saline 0.9% (-) or insulin 6 μ g (+) was administrated into de portal vein as a bolus injection and 30s later the liver was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-IRS-1 and anti-IRS-2 and immunoblotted with antiphosphotyrosine and anti-PI3-kinase. Aliquots of whole tissue extracts were immunoblotted with anti-phospho Akt antibody. The black bar represent the control group and the white bar represent the STZ-treated group. The data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$.

Figure 4. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 in intact muscle from STZ-treated rats. Saline 0.9% (-) or insulin 6 μ g (+) was administrated into de portal vein as a bolus injection and 90s later the muscle was excised and aliquots

containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-IRS-1 and anti-IRS-2 and immunoblotted with antiphosphotyrosine and anti-PI3-kinase. Aliquots of whole tissue extracts were immunoblotted with anti-phospho Akt antibody. The black bar represent the control group and the white bar represent the STZ-treated group. The data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$.

Fig.1

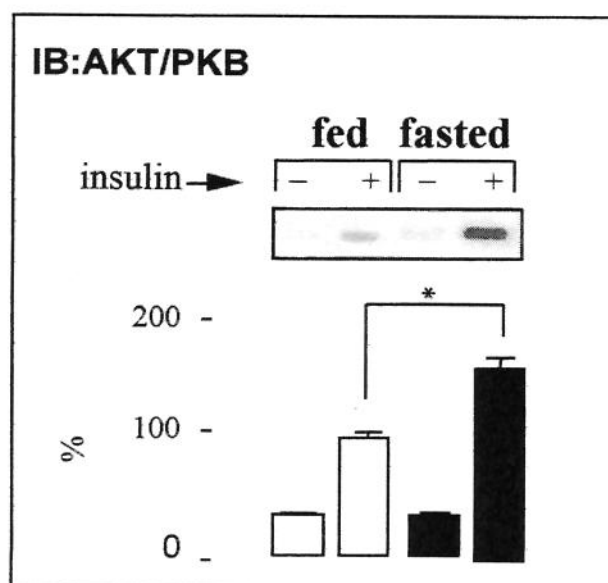
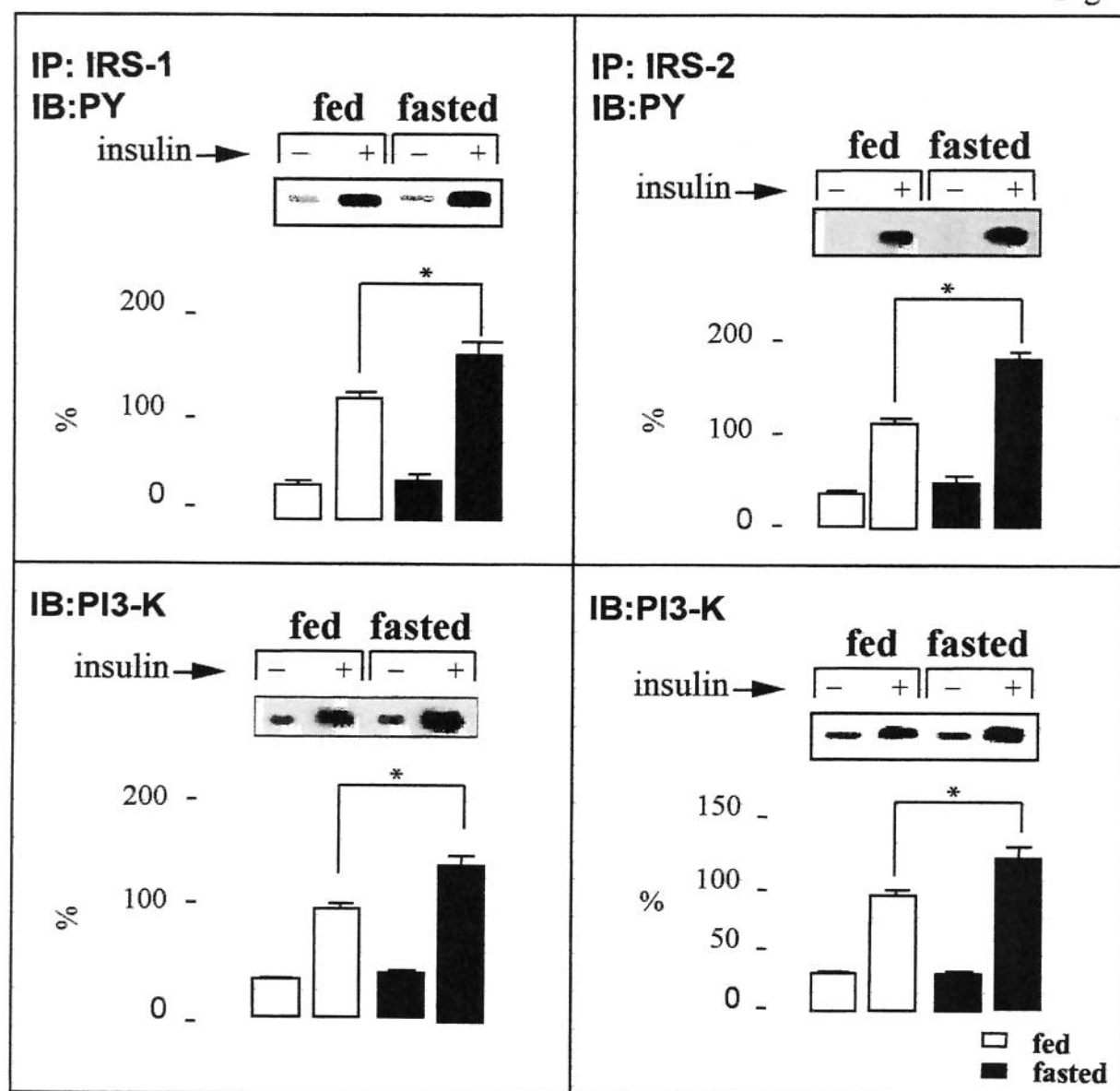
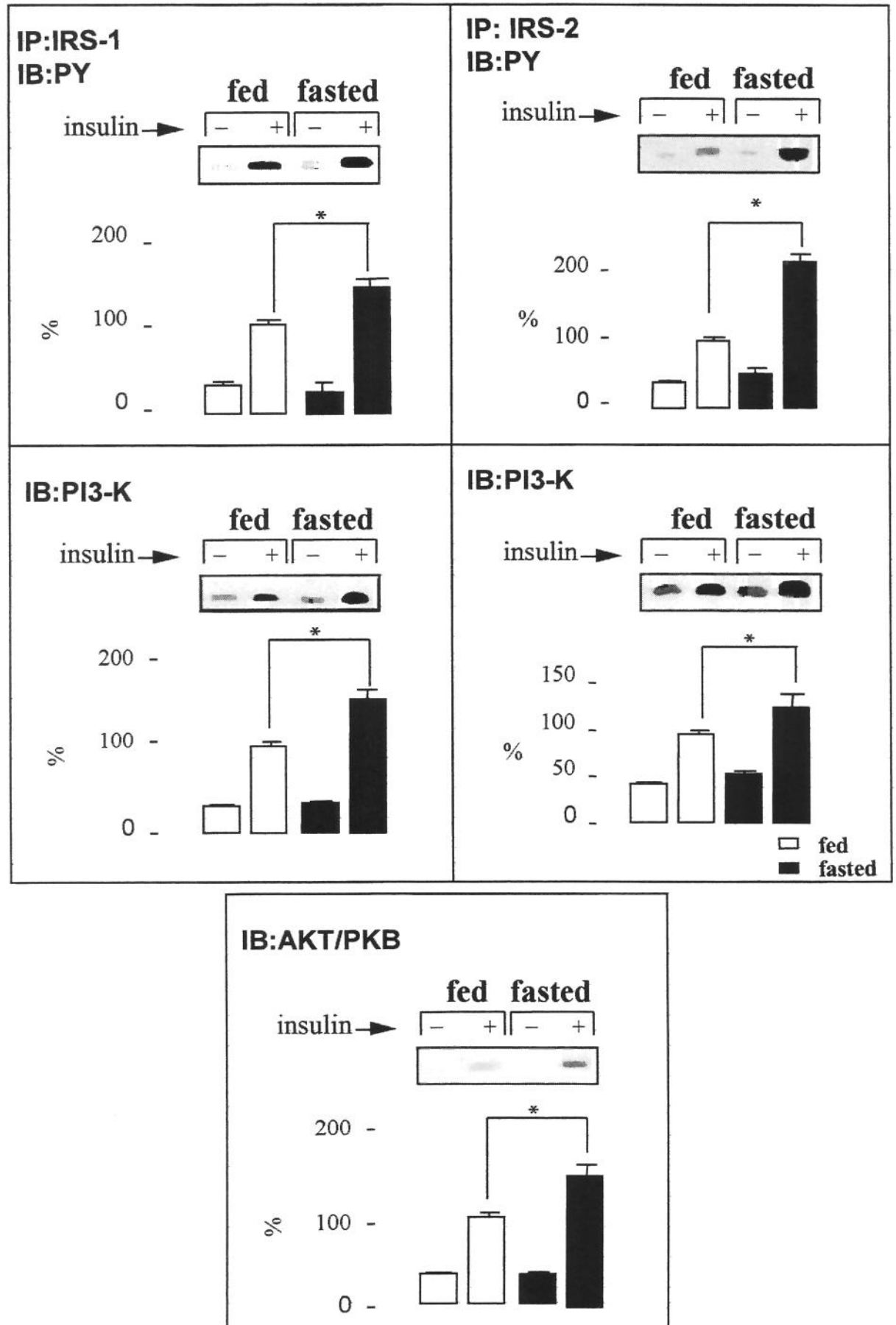


Fig.2



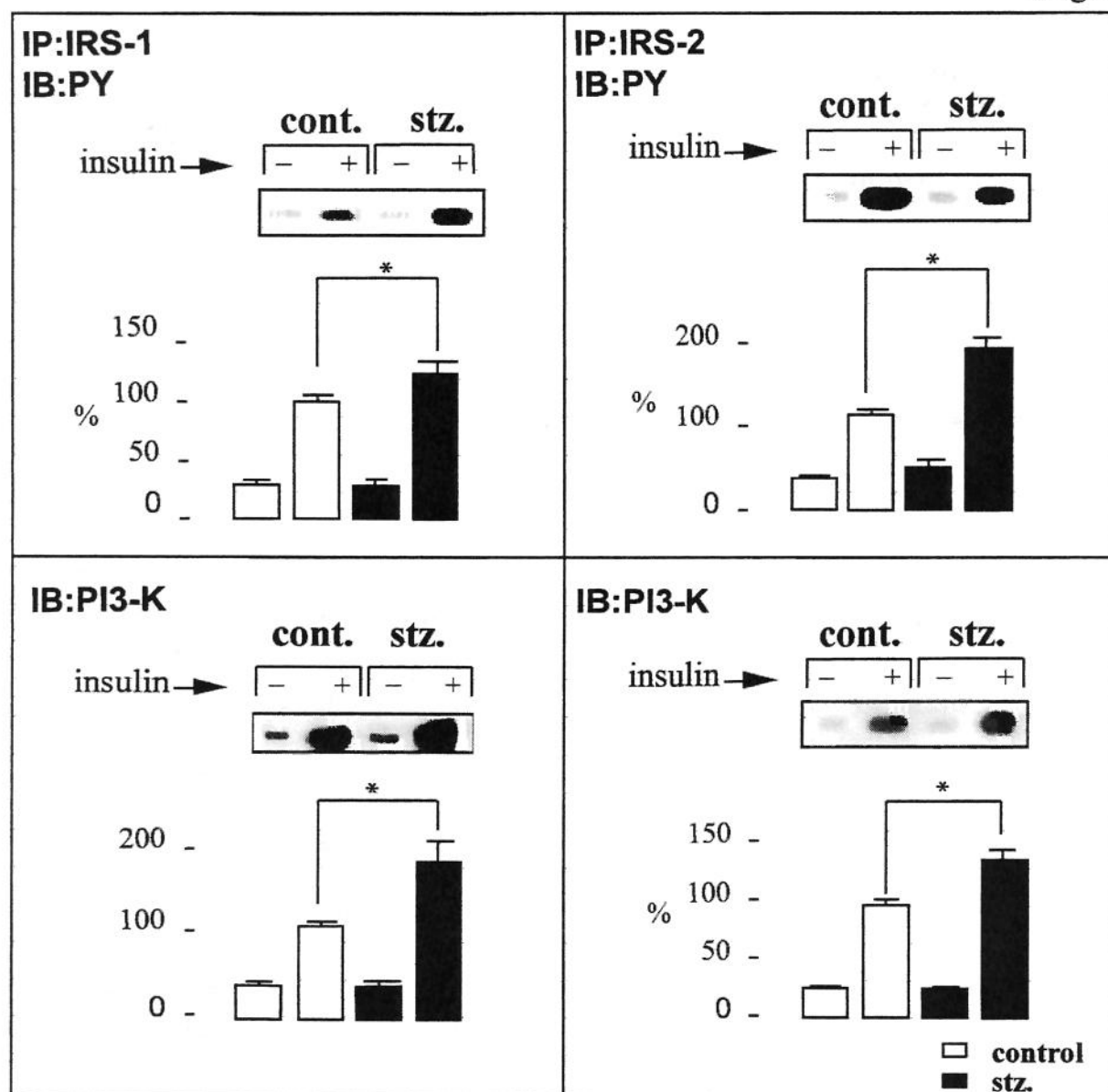
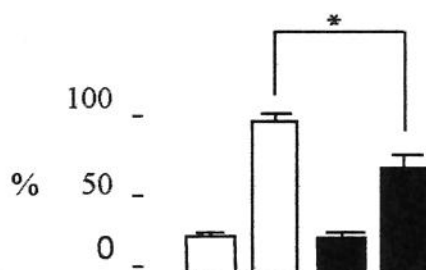
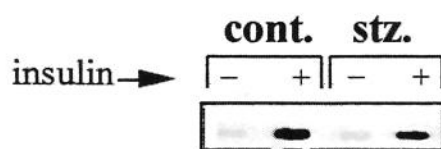
**IB:AKT/PKB**

Fig.4

