

ANDRÉ LUIZ BAPTISTON NUNES

***EFEITOS DA SEPSE NAS ETAPAS INICIAIS DA
SINALIZAÇÃO INSULÍNICA EM RATOS***

CAMPINAS

2001

i

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

ANDRÉ LUIZ BAPTISTON NUNES

***EFEITOS DA SEPSE NAS ETAPAS INICIAIS DA
SINALIZAÇÃO INSULÍNICA EM RATOS***

*Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção de título de Doutor em Clínica
Médica, na área de Clínica Médica*

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRIO JOSÉ ABDALLA SAAD

CAMPINAS

2001

ii

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
Nº	N922e
V	EX
TOMBO BC/	48303
PROC/	16-837100
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/04/00
Nº CPD	

BIBID. 238356

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

CM00165624-2

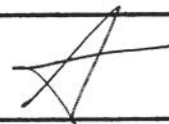
N922e Nunes, André Luiz Baptiston
 Efeitos da sepse nas etapas iniciais da sinalização insulínica em
 ratos. / André Luiz Bapstiton Nunes. Campinas, SP : [s.n.], 2001

 Orientador : Mário José Abdalla Saad
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Ciências Médicas.

 1. Septcemia. 2. Insulina- receptores. 3. Fisiologia. I. Mário
 José Abdalla Saad . II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Ciências Médicas. III. Título.

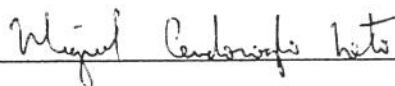
Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

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



Membros:

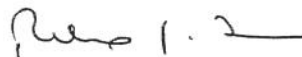
1. Professor Doutor Miguel Cendoroglo Neto



2. Professora Doutora Eliane Beraldi Ribeiro



3. Professor Doutor Renato Giovani Giuseppe Terzi



4. Professor Doutor Sigisfredo Luis Brenelli



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

Data: 19.11.01

200215905

DEDICATÓRIA

Dedico o significado da finalização deste trabalho a minha família, que abriu mão da única coisa que não pode ser restituída: tempo de convívio.

Adriane, Eduarda, Fernada e Gabriela

Sem a compreensão e estímulo das pessoas que conviveram comigo durante esses anos, é pouco provável que este trabalho chegasse ao final. Escolher algumas delas para citação talvez tenha sido a parte mais difícil da confecção desta tese, uma vez que durante o seu desenvolvimento, além de ter aprendido muito, fiz muitos novos amigos.

A todos vocês, meu muito obrigado.

Ao meu amigo e orientador Mário Saad, capaz de transmitir seu entusiasmo por atitudes cotidianas

Ao Prof Dr Renato Terzi, obrigado pelo exemplo e estímulo, que servem como orientação nos dias “nublados”.

Aos Srs Luiz Janeri e Conceição Aparecida da Silva, incansáveis no carinho com os animais e na bancada, além da psicoterapia gratuita...

E a todos os amigos da UTI do HC – UNICAMP, Laboratório de Biologia Molecular do Depto de Clínica Médica da FCM – UNICAMP, Disciplina de Clínica Médica da FCM – UNICAMP e Intensimed – Cuidados Médicos Intensivos.

	PÁG
RESUMO.....	<i>xi</i>
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Características gerais dos animais.....	31
4.2. Efeito da septicemia nas etapas iniciais da ação insulínica.....	31
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÃO.....	66
7. SUMMARY.....	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
9. PUBLICAÇÕES.....	81

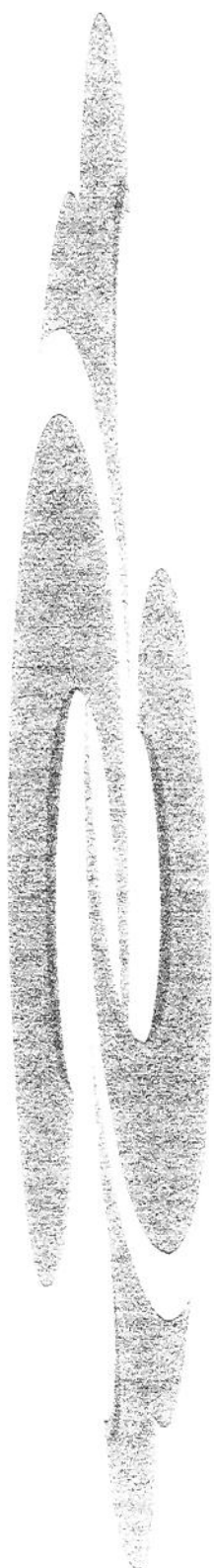
μCi	microCuri
ATP	adenosina trifosfato
DNA	ácido desoxiribonucleico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendinitrilotetracético
EGF	fator de crescimento epidérmico
ERK	quinase reguladora da sinalização extracelular
FAK	proteína quinase de adesão focal
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
GH	hormônio de crescimento
GLUT	transportador de glicose
GRB2	proteína ligadora do receptor do fator de crescimento
GTP	guanosina trifosfato
I ¹²⁵	iodo marcado radioativamente na posição 125
IGF-1	fator de crescimento 1
IR	receptor de insulina
IRS-1	substrato 1 do receptor de insulina
JAK 1 e 2	proteínas citoplasmáticas quinases da família Janus
MAPK	proteína quinase ativadora da mitogênese
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PI 3-K	fosfatidilinositol 3-quinase
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoreto

pp120	proteína fosforilada de 120 kDa
pp185	proteína fosforilada de 185 kDa
pp95	proteína fosforilada de 95 kDa
Raf	serina quinase citoplasmática ativada pelo Ras e ativadora das MAPKs
Ras	proteína identificada como oncogene que mostrou participar da regulação do crescimento celular
RIE	radioimunoensaio
RNA	ácido ribonucleico
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida e sódio dodecil-sulfato para eletroforese
SH2	segunda homologia ao Src
SH3	terceira homologia ao Src
Shc	molécula adaptadora e substrato do recepto de insulina
SHPTP2	fosfotirosina fosfatase ativada pelo IRS-1 fosforilado em tirosina
SOS	fator ativador do Ras, apresenta homologia à Drosophila Son-of-sevenless
Src	oncogene produto do sarcoma virus Rous
Tris	tri(hidroximetil)-aminometano

LISTA DE TABELAS

	PÁG
Tabela 1.....	31

	PÁG.
FIGURA 1. Nível protéico de IR em tecido hepático.....	33
FIGURA 2. Nível protéico de IRS-1 em tecido hepático.....	34
FIGURA 3. Fosforilação do IR em tecido hepático.....	35
FIGURA 4. Fosforilação do IRS-1 em tecido hepático.....	36
FIGURA 5. Associação IRS-1/PI3-K em tecido hepático.....	37
FIGURA 6. Nível protéico de IR em tecido muscular.....	39
FIGURA 7. Nível protéico de IRS-1 em tecido muscular.....	40
FIGURA 8. Fosforilação do IR em tecido muscular.....	41
FIGURA 9. Fosforilação do IRS-1 em tecido muscular.....	42
FIGURA 10. Associação IRS-1/PI3-K em tecido muscular.....	43
FIGURA 11. Nível protéico de IR em tecido muscular cardíaco.....	45
FIGURA 12. Nível protéico de IRS-1 em tecido muscular cardíaco.....	46
FIGURA 13. Fosforilação do IR em tecido muscular cardíaco.....	47
FIGURA 14. Fosforilação do IRS-1 em tecido muscular cardíaco.....	48
FIGURA 15. Associação IRS-1/PI3-K em tecido muscular cardíaco.....	49
FIGURA 16. Nível protéico de IR em tecido adiposo.....	51
FIGURA 17. Nível protéico de IRS-1 em tecido adiposo.....	52
FIGURA 18. Fosforilação do IR em tecido adiposo.....	53
FIGURA 19. Fosforilação do IRS-1 em tecido adiposo.....	54
FIGURA 20. Associação IRS-1/PI3-K em tecido adiposo.....	55



RESUMO

A insulina estimula a atividade quinase do seu receptor, resultando na fosforilação de substratos citosólicos, entre eles o IRS-1, que se associam à fosfatidilinositol 3-quinase, ativando-a. A resistência à insulina é uma condição fisiopatológica associada à sepse. Entretanto, o mecanismo molecular envolvido nesta situação de resistência não é conhecido.

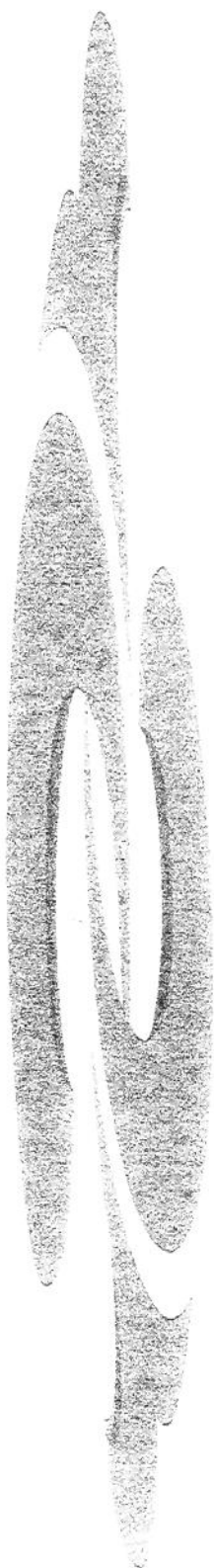
Neste estudo, examinamos a regulação das proteínas envolvidas nas etapas iniciais da ação insulínica em fígado, músculo, coração e gordura de ratos sépticos.

Não foram observadas alterações na concentração do receptor de insulina dos ratos sépticos, em quaisquer dos tecidos estudados, determinado por “immunoblotting” com anticorpo anti-receptor de insulina após imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1. O grau de fosforilação em tirosina da subunidade β do receptor de insulina, que reflete sua autofosforilação, também não sofreu variações significativas, sugerindo a preservação da função do receptor de insulina nesta condição.

Os níveis protéicos do IRS-1 estavam preservados em três dos tecidos estudados: fígado, coração e gordura, e reduzido a $61 \pm 12\%$ ($p < 0,05$) no tecido muscular dos ratos sépticos. A incubação de amostras de tecido muscular previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 com anticorpo anti-fosfotirosina, documentou uma consistente redução da fosforilação do IRS-1 a $59 \pm 9\%$ ($p < 0,05$) dos valores observados no grupo controle, fato não observado nos demais tecidos.

A exposição do “blotting” utilizado para determinação da fosforilação do IRS-1 ao anticorpo anti PI3-quinase, após “stripping” da membrana de nitrocelulose, permite o estudo da associação IRS-1 com a subunidade reguladora da PI3-quinase. Utilizando esse método, observamos uma redução tecido-específica da associação entre essas proteínas, reduzida a $56 \pm 7\%$ ($p < 0,05$) em músculo de ratos sépticos, consistente com a redução da fosforilação do IRS-1 previamente observada.

Estes dados sugerem que alterações nas etapas iniciais da transmissão do sinal insulínico estão presente em tecido muscular de ratos sépticos e podem contribuir para a resistência à insulina observada nesses animais.



1. INTRODUÇÃO

A insulina é o principal hormônio no controle 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.

O efeito da insulina é exercido através da ligação a um receptor específico na membrana plasmática (FREYCHET, ROTH, NEVILLE, 1971; CUATRECASAS, 1972). O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituído por duas subunidades α , cada uma com peso molecular de 135.000, e duas subunidades β , cada uma com peso molecular de 95.000, ligadas por pontes de dissulfeto para dar a estrutura final β - α - α - β (MASSAGUE, PILCH, CZECH, 1981). A subunidade α é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade β é uma proteína transmembrana e responsável pela transmissão do sinal.

Em 1982 KASUGA *et al.* descreveram que a subunidade β do receptor de insulina é uma proteína quinase, estimulada pela insulina, sendo capaz de autofosforilar-se e fosforilar outros substratos em aminoácidos tirosina. A insulina liga-se à subunidade α e estimula a fosforilação em tirosina da subunidade β de seu receptor. O ATP atua como doador de fósforo e a fosforilação ocorre exclusivamente em tirosina (WHITE *et al.*, 1984).

A autofosforilação do receptor de insulina ocorre através de uma cascata intramolecular de reações de fosforilação (WHITE *et al.*, 1988). Como resultado, pelo menos cinco tirosinas na porção intracelular da cadeia β são fosforiladas, estando três delas nas posições 1158, 1162 e 1163. Quando estão fosforiladas, a atividade quinase é então implementada em direção a outros substratos (YU & CZECH, 1984).

Evidências diretas de que a atividade tirosina quinase do receptor de insulina é importante para ação insulínica vêm de diversas fontes. A mais convincente deriva de experimentos com indução de mutações *in vitro*, em que a lisina na porção 1030 da subunidade β foi trocada por outro aminoácido como a alanina (EBINA *et al.*, 1987). Em analogia com outras quinases, esta lisina é o sítio crítico de ligação do ATP. Quando a lisina é mudada e o receptor mutante é expresso em células, a ligação da insulina ocorre

normalmente, mas o ATP não se liga à subunidade β , ficando o receptor totalmente inativo como quinase e totalmente inefetivo para mediar a ação estimulatória do hormônio no metabolismo celular (EBINA *et al.*, 1987). Mutações de uma ou mais das tirosinas no sítio de autofosforilação, nas posições 1158, 1162, e 1163, produzem efeito similar, mas menos dramático (ELLIS *et al.*, 1986; WILDEN *et al.*, 1992). Mutações de todas essas tirosinas, entretanto, produz um receptor completamente inativo, semelhante ao mutante da posição 1030 ou sítio de ligação do ATP (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, 1988).

Embora muitas proteínas e peptídeos sintéticos possam ser fosforilados *in vitro*, por receptores de insulina parcialmente purificados, essas reações não ocorrem *in vivo*, tornando seu significado fisiológico incerto (ROTHENBERG, WHITE, KHAN, 1990). Alguns substratos endógenos foram descritos (WHITE, MARON, KAHN, 1985; BERNIER, LAIRD, LANE, 1987; KARASIK *et al.*, 1988; SUN, ROTHENBERG, KAHN, 1991), proteínas que são rápida e diretamente fosforiladas em tirosina pela ativação da quinase do receptor de insulina. O primeiro substrato melhor caracterizado é uma proteína que migra no gel de poliacrilamida como uma banda larga entre 160 e 180 kDa denominada pp185. (WHITE *et al.*, 1985).

Em células transfectadas com o cDNA do receptor de insulina humano, há um aumento marcante na fosforilação da pp185 coincidente com um incremento na ação insulínica. A fosforilação da pp185 está reduzida em células expressando receptores com mutações no sítio de ligação do ATP ou nos sítios de autofosforilação, em proporção à redução na atividade quinase do receptor (WILDEN *et al.*, 1992; SUN *et al.*, 1992).

Entretanto, a evidência mais importante do papel da fosforilação da pp185 na ação insulínica veio de um resultado inesperado, em células expressando um receptor de insulina com mutação induzida na tirosina 960, na região justamembrana do mesmo. O receptor mutante se liga à insulina e é autofosforilado normalmente, apresentando também uma atividade quinase normal, dirigida a substratos exógenos *in vitro*. Entretanto, ele é incapaz de fosforilar a pp185, que provoca uma ausência de efeito insulínico no metabolismo de glicogênio e na síntese de DNA (WHITE *et al.*, 1988).

Em 1991, a pp185 foi clonada e denominada substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) (SUN *et al.*, 1991). O DNA complementar do IRS-1 de fígado de rato codifica uma proteína com 1235 aminoácidos e diversas características surpreendentes. Primeiro, não há porção transmembrana, e é uma proteína de localização citoplasmática. Há uma sequência consistente com uma de consenso para a ligação de nucleotídeos (ATP ou GTP), embora não haja nenhuma homologia com proteínas quinases conhecidas. Ainda em análise de sequências de consenso, há múltiplos sítios de fosforilação em serina, treonina e tirosina. Seis dos sítios de fosforilação nesta última têm a sequência repetitiva YMXM, em que Y é a tirosina, M a metionina e X significa qualquer aminoácido. Dois outros sítios de fosforilação em tirosina têm a porção similar YXXM. A porção YXXM não existe no receptor de insulina, mas é observada em diversas tirosina-quinases. Nestas, a porção YMXM parece estar envolvida na interação não covalente dessas proteínas com moléculas de sinalização, caracterizadas pela presença de uma porção que se liga ao YMXM, denominado SH2 (homologia com o src 2, que é um oncogene).

Em estudos *in vivo* em cultura de células e em sistemas reconstituídos *in vitro*, o IRS-1 fosforilado associa-se à enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) ativando-a (BACKER *et al.*, 1992; FOLLI *et al.*, 1992). Demonstrou-se posteriormente que esta associação e ativação também ocorrem em dois importantes tecidos insulino-sensíveis de ratos, fígado e músculo, em concentração fisiológicas de insulina (FOLLI *et al.*, 1992; SAAD *et al.*, 1993). A enzima PI 3-quinase apresenta uma subunidade de 110 kDa e uma regulatória de 85 kDa que contém duas porções SH2 e uma 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 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.

Estudos recentes demonstraram que a ativação da PI 3-quinase é essencial para muitos efeitos metabólicos da insulina, incluindo no transporte de glicose, ativação da síntese de glicogênio e a inibição da fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK), a enzima chave para a gliconeogênese (CHEATHAM & KANH, 1995). Recentemente, demonstrou-se que a AKT/PKB, uma serina-treonina quinase, com peso molecular de 57 kDa, participa da transmissão do sinal da PI 3-quinase após o estímulo com insulina.

Apesar da AKT/PKB apresentar potencial oncogênico, sua função e regulação normal não era conhecida, até ser clonada e relacionada como um intermediário distal à ativação da PI 3-quinase. Esta ativação foi baseada em duas observações: a ativação do fator de crescimento induzido pela AKT/PKB pode ser completamente bloqueada pela adição de “wortmonnim” (inibidor da PI 3-quinase); mutações dos receptores dos fatores de crescimento que inibem a ativação da PI 3-quinase, também inibem a PKB/AKT (COFFER, JING, WOODGETT, 1998). Estes dados sugerem que a PI 3-quinase ou seus produtos mediam a ativação da AKT/PKB. O principal fator regulador da ativação da AKT/PKB é a ativação da PI 3-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).

Além da PI 3-quinase, outras proteínas com porção SH2 também interagem com o IRS-1 fosforilado, como as proteínas GRB2, Nck e Syp (SHP2). 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 GRB-2 age como uma molécula adaptadora, que compõe um complexo ativador da proteína ras, ativadora das MAP quinases (proteínas 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.

Nos últimos anos demonstrou-se em diversos modelos animais da resistência à insulina uma redução na fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1, em fígado e músculo, após a estimulação *in vivo* com insulina, indicando defeitos na transmissão do sinal insulínico em etapas distais à ligação do hormônio em seu receptor (SAAD *et al.*, 1992; ARMSTRONG *et al.*, YAMAUCHI *et al.*, 1996). É importante ressaltar que em todos estes modelos havia uma modulação da fosforilação do substrato do receptor de insulina, e é possível que a ligação do IRS-1 à PI 3-quinase possa também estar alterada nestes modelos.

A ocorrência de resistência a insulina na infecção natural e experimental foi documentada por hiperglicemia e hiperinsulinemia (NELSON, *et al.*, 1981; WHITE, *et al.*, 1987; WESTFALL, *et al.*, 1988; SHANGRAW, *et al.*, 1989; MACLANE, *et al.*, 1991), e a existência de diversos fatores que contribuem para o seu desenvolvimento como a resposta orgânica à febre, hipercatabolismo e níveis elevados de hormônios contra-reguladores, entre estes o hormônio do crescimento, cortisol e glucagon, têm sido implicados na fisiopatologia dessa alteração metabólica (ZENSER, *et al.*, 1974; GELFAND, *et al.*, 1984).

Alguns estudos (HENDERSON, *et al.*, 1991; SHANGRAW, *et al.*, 1996) descreveram alterações na utilização, oxidação e produção endógena de glicose na sepse, além de desvios no metabolismo lipídico (BLACK, *et al.*, 1982; SHAW & WOLFE, 1986). Nesses estudos demonstrou-se a existência de um aumento da produção hepática dessa hexose não suprimida pela hiperglicemia e hiperinsulinemia. Por outro lado, Shangraw *et al.* mostraram resultados discordantes, sugerindo que apenas concentrações séricas elevadas de insulina eram capazes de suprimir a produção hepática de glicose (SHANGRAW, *et al.*, 1989). Nesse estudo, a utilização de glicose era maior em voluntários sadios do que em pacientes sépticos em condições basais, mas não se estimulados por infusão de glicose e(ou) insulina (SHANGRAW, *et al.*, 1989). Entretanto, tais observações podem ser questionadas por algumas limitações metodológicas deste trabalho, que incluía o “clamp hiperglicêmico”, onde a concentração plasmática de glicose é elevada, podendo alterar, *per se*, tanto a utilização quanto a produção endógena de glicose (YKI-JARVINEN, 1990).

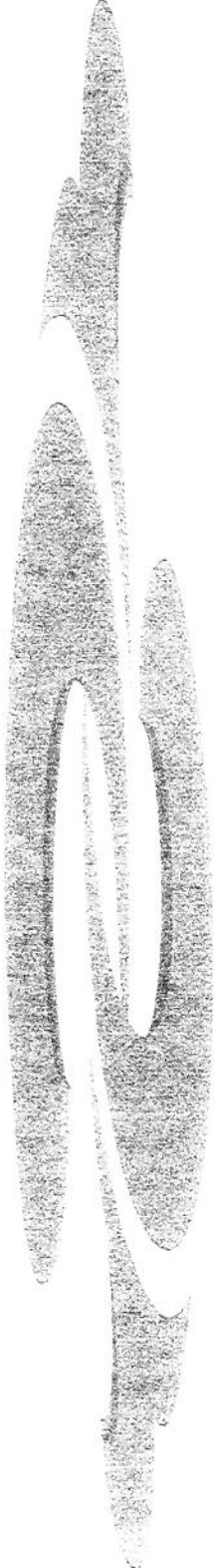
Quando utilizado o “clamp” normoglicêmico, onde se infunde quantidades crescentes de insulina mantendo a glicemia plasmática dentro dos limites de normalidade com infusão de glicose, observou-se que nas condições basais, pacientes sépticos têm glicemia e lactato séricos significativamente elevados em relação aos controle. Níveis séricos de ácido graxos livres e corpos cetônicos eram semelhantes nos dois grupos. A insulinemia não se alterou nos pacientes sépticos, enquanto a concentração sérica de glucagon era a metade do valor observado no grupo controle (CHAMBRIER, *et al.*, 2000).

Durante a infusão crescente de insulina com manutenção da glicemia em seus valores iniciais, a concentração plasmática de insulina foi semelhante nos dois grupos até 280 minutos de infusão, aumentando 20% nos sépticos. Não foram observadas alterações nas concentrações séricas de glucagon em nenhum tempo, e a necessidade de glicose exógena para manutenção da glicemia foi significativamente menor nos pacientes sépticos.

A produção endógena de glicose só foi suprimida no grupo de sépticos com uma quantidade maior de insulina, e sua utilização aumenta com a infusão de insulina no grupo controle e não nos sépticos. A ação inibitória da insulina sobre a lipólise e cetogênese está claramente reduzida nos pacientes sépticos, e de maneira semelhante ao observado na produção hepática de glicose, a quantidade de insulina necessária foi muito superior no grupo de sépticos (CHAMBRIER, *et al.*, 2000).

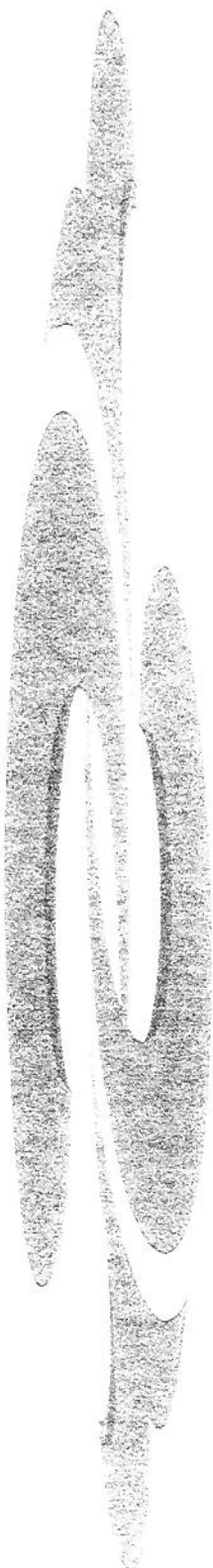
Assim, a sepse induz resistência à insulina com redução da sua ação sobre a produção endógena e utilização periférica de glicose, bem como sua ação inibidora da lipólise e cetogênese.

A constatação da existência de resistência à insulina em animais sépticos por clamp hiper e normoglicêmicos (BLACK, *et al.*, 1982; HENDERSON, *et al.*, 1990; THORELL, *et al.*, 1994) e outros métodos, não discrimina os eventos moleculares pós-receptor envolvidos, e esse estudo tem como objetivo a investigação da regulação das etapas iniciais da sinalização insulínica em animais com sepse induzida por infecção peritonial grave.



2. OBJETIVOS

Esse estudo tem como objetivo a investigação da regulação das etapas iniciais da sinalização insulínica avaliando os níveis e grau de fosforilação do receptor de insulina, do IRS-1 e a interação deste com a PI-3 quinase em fígado, músculo, coração e tecido adiposo de animais com sepse induzida por infecção peritonial grave.



3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, variedade albina) da linhagem *Wistar-Hannover*, machos, com 16 semanas de vida, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, Campinas-SP. Após o desmame, os animais receberam como alimentação ração para ratos Labina, marca Purina, que contém 0,3 a 0,5g de sódio/100g de ração (85% do sódio na forma de Cloreto de Sódio) e 0,75 g de potássio/100g de ração, superior, portanto, ao nível mínimo recomendado para se promover crescimento e reprodução dos animais que é de 0,05g/% (REEVES, NIELSEN, HAHEY, 1993). Foram divididos em 2 grupos pela indução ou não de septicemia por ligadura e punção de ceco.

Uma semana antes de qualquer experimento, os animais foram acomodados em gaiolas plásticas, contendo, cada uma, no máximo cinco espécimes, e mantidos em condições de fotoperíodo normal (12 x 12h), com ração e água fornecidos *ad libitum*. Permaneceram em jejum noturno, por 12 - 14 horas, prévias aos experimentos, quando eram submetidos a laparotomia mediana após anestesia inalatória com éter até a perda de reflexos corneano e retirada da pata a dor, com exposição do ceco. O grupo controle tinha as alças intestinais recolocadas na cavidade peritoneal que era fechada em dois planos, peritônio junto com musculatura e pele. No grupo séptico, era feita uma ligadura na transição íleo-cecal que não provocava a interrupção do trânsito, mas pela disposição longitudinal da vascularização das alças intestinais, induzia tanto a isquemia arterial quanto a estase venosa local, comprovada pela imediata alteração da cor da alça após o procedimento. A seguir uma dupla perfuração na borda ante-mesentérica do ceco era realizada com uma agulha número 12 e confirmada pela saída de conteúdo fecal pelos orifícios com uma leve expressão do ceco. De maneira semelhante ao grupo controle, era realizado o fechamento da cavidade em dois planos. Ambos os grupos recebiam 10 mL de solução salina/100g de peso intraperitonealmente após o procedimento cirúrgico.

Foram, então, realizadas as séries de experimentos, ratos controle x sépticos. Em cada série, foram estudados animais estimulados (+) ou não (-) com insulina regular.

As soluções empregadas nos diversos experimentos estão descritas a seguir.

1. MATERIAIS

1.1. Tampão de extração A (extrato total):

Utilizado para a extração das proteínas celulares dos tecidos estudados. Contém: Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100 mM, SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, EDTA (Ácido etileno-diamino tetracético) 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM e ortovanadato de sódio 10 mM.

1.2. Tampão de Laemmli (5X):

Para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida. Contém: Azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50%, SDS 10%.

1.3. Solução Tampão para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE):

Empregada para a realização da eletroforese no SDS-PAGE. Contém: Trisma base 200 mM, glicina 1,5 M, EDTA 7 mM, SDS 0,4%. Para uso, a solução deve ser diluída 1:4.

1.4. Solução tampão para transferência:

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

1.5. Solução tampão para SDS-PAGE, Gel de resolução (“resolving”):

Empregada para a manufatura do SDS-PAGE, gel de resolução, um tampão composto de : EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 750 mM e tem o pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

1.6. Solução tampão para SDS-PAGE, gel de empilhamento (“stacking”):

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

1.7. Solução Basal:

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

1.8. Solução bloqueadora:

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

1.9. Solução tampão de extração B, para imunoprecipitação:

Para a extração de proteínas, para imunoprecipitação dos tecidos estudados. Contém: Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM (diluído em álcool etílico), triton X 100 1%, 0,1 mg/ml de aprotinina. Esta solução deve ser mantida a quatro graus. O ortovanadato, PMSF e a aprotinina devem ser acrescentados no momento do uso.

1.10. Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado:

Contém: Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 2 mM, triton X-100 0,5%.

1.11. Solução para anticorpos:

Solução contendo os anticorpos específicos que marcarão as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal. Os anticorpos utilizados foram os seguintes, nas diluições indicadas: anticorpo antifosfotirosina, diluído 1:400; anticorpo anti-receptor de insulina e anti-IRS-1, diluídos cada um 1:100 e anticorpo anti-PI 3-k, diluído 1:400.

1.12. Solução com proteína A marcada com ^{125}I :

Contém a proteína A anti-Ig-G inespecífica com ^{125}I Iodo para a marcação dos anticorpos específicos, prestando-se à visualização em auto-radiografia. Contém 0,1% de leite desnatado, dissolvido em solução basal, com 2 μCi de proteína A ^{125}I (30 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), fornecida pela *Armestham UK*.

2. MÉTODOS

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

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental sódico, na dose de 25mg/100g de peso, e utilizados após a abolição dos reflexos corneano e retirada da pata à dor.

A veia porta foi exposta por laparotomia mediana e a incisão ampliada para expor a musculatura da pata traseira. Nos animais onde se extraiu tecido adiposo, era tracionado o cordão espermático até a exposição do epidídimo onde está a gordura peri-epididimal e a extração de tecido muscular cardíaco era feita do ventrículo esquerdo após toracotomia com o animal ainda vivo. Em 1/3 dos animais de cada grupo foi injetada na veia porta 0,5 ml de solução salina 0,9 % e nos 2/3 restantes foi injetada solução salina, contendo 1,5U de insulina regular ou 60 μg de insulina.

SAAD et al., 1992 demonstraram que a fosforilação máxima do IRS-1, após a infusão com insulina na veia porta, dava-se entre 30 e 60 segundos, no fígado, e entre 1 e 4 minutos em músculo, coração e gordura a concentrações de 6 e 60 μg de insulina. Uma vez que usamos os tempos descritos acima, nossas amostras foram colhidas no pico do evento de fosforilação.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Aos 30 segundos da injeção, foi retirado um fragmento de fígado com cerca de 1 cm de diâmetro. O fragmento foi imediatamente colocado no tampão de extração A, na proporção de 5 partes de tampão para 1 de tecido, que já estava em banho-maria fervente, homogeneizado com o “polytron” e mantido no banho-maria por mais 10 minutos. Noventa segundos após a injeção, retirou-se um fragmento de músculo gastrocnêmio com cerca de 0,5 cm de diâmetro, ou um fragmento de gordura peri-epididimal com cerca de 1 cm de diâmetro ou ainda fragmento de ventrículo esquerdo com cerca de 0,5 cm de diâmetro nos animais onde se extraíram tecidos muscular, adiposo e muscular cardíaco, respectivamente e trabalhado da mesma forma.

A seguir fez-se a toracotomia para coleta de sangue, por punção direta do coração, para dosagem de glicemia e insulinemia basais, nos animais que não receberam insulina e não se extraiu tecido muscular cardíaco.

O material extraído e homogeneizado, após fervura, foi mantido em gelo para o transporte, centrifugado a 12.000 rpm por 40 minutos, a 4°C, para a remoção do material insolúvel, e o sobrenadante foi estocado em tampão de Laemmli, contendo 200 mM de DTT em uma proporção de 5:1 (uma parte de Laemmli para quatro de material extraído), até a fase seguinte. Outra pequena porção do sobrenadante foi utilizada para quantificação da concentração protéica de cada amostra, através do método de biureto.

2.2. “Immunoblotting” ou “Westernblotting”:

Duzentos microgramas de extrato tecidual, por amostra, foram aplicados no gel de poliacrilamida a 6% (SDS-PAGE), de 2 mm de espessura, balizado por marcador de alto peso molecular da *Bio Rad* que contém: miosina (205 kDa), β galactosidade (116 kD), BSA (85 kDa) e ovalbumina (47 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 e depois a 120 volts por mais 2 horas. A seguir, as proteínas, separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência do minigel da *Bio Rad*, que foi mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas, como o descrito por (TOWBIN, STAEHLIN, GORDON, 1979).

Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução bloqueadora, por duas horas, à temperatura ambiente, lavadas com solução basal por três sessões, de dez minutos. Em seguida, incubadas com anticorpo específico por 4 horas à temperatura ambiente, e novamente lavadas com solução basal, e então incubadas com a proteína A, marcada com I^{125} por duas horas. O excesso de proteína A foi lavado com solução basal e então as membranas foram expostas ao filme de RX (Eastman Kodak, Rochester, NY) com intensificador (Cronex Lightning Plus intensifying screens - DuPont, Wilmington, DE). O cassete foi mantido à temperatura de -80°C e, em média, após 12 a 48 horas, o filme foi revelado de forma convencional.

Após a revelação das auto-radiografias e visualização das bandas, estas foram submetidas a densitometria óptica (densitômetro modelo GS 300, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA), e suas áreas foram quantificadas. 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 controles e sépticos.

2.3. Imunoprecipitação:

Em alguns experimentos, os tecidos estudados foram extraídos e homogeneizados no tampão de extração B, em banho de gelo, e mantido nesta temperatura durante todo o processo. Após centrifugação por 25 min, a 12.000 rpm a 4°C , foi usado o sobrenadante para imunoprecipitação com anticorpos anti-receptor de insulina (anti-IR), e anti-IRS-1.

Os volumes das amostras foram normalizados por concentração protéica e os volumes de cada anticorpo aplicado foi fixo (10 μl /amostra). As amostras ficaram incubando por 12-14 horas, a 4°C , acrescentando-se, a seguir, 50 μl de proteína A-Shepharose 6MB, e após mais duas horas, os precipitados foram coletados em centrifugação de 12000 rpm, a 4°C , por 15 minutos. Os precipitados foram lavados por 3 vezes com tampão específico.

As proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) contendo 100 mM de DTT, aquecidas em água fervente por 4 minutos, e então submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 6%. O procedimento segue as etapas já descritas anteriormente.

Nestes experimentos de imunoprecipitação, os anticorpos utilizados para incubar as membranas foram o anti-IR, anti-IRS-1, antifosfotirosina e o anti-PI 3-quinase.

2.4. Outros:

Dosagem da glicemia:

A determinação da glicose plasmática ou glicose sanguínea foi realizada através de método enzimático colorimétrico, segundo TRINDER, 1969 (Glicose E enzimática, Reactoclin) (HENRY, CANNON, WINKILMAN, 1974; LOTT & TURNER, 1975) e os resultados expressos em mg/dl.

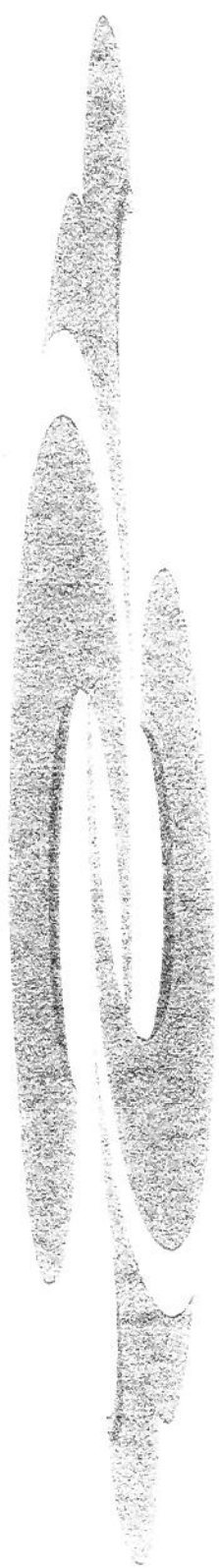
Dosagem da insulina plasmática:

Para a dosagem da insulina sérica, utilizou-se técnica de radioimunoensaio, empregando-se o método do duplo anticorpo para insulina e os resultados expressos em $\mu\text{U/ml}$.

Análise estatística:

Experimentos foram sempre realizados, possibilitando o estudo dos grupos de animais em paralelo.

Para análise estatística dos resultados, utilizou-se o Teste T de Student, não pareado, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), sendo os resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($\bar{X} \pm \text{E.P.M.}$).



4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS:

As características gerais dos animais utilizados nos diferentes experimentos são apresentadas na tabela 1. As determinações de glicose plasmática e insulina sérica descritas a seguir foram coletadas de animais em jejum de 12 a 14 horas.

Os animais do grupo controle não apresentaram idades ou pesos diferentes significativamente dos do grupo séptico. Tanto o nível de glicose plasmática de jejum (Controle: $104 \pm 9,5$ mg/dl x Sépticos: $130 \pm 11,5$ mg/dl, $p < 0,05$), quanto a insulina sérica foram maiores nos animais sépticos, com diferença significativa entre os grupos. (Controle: $38 \pm 7,6$ μ U/ml x Sépticos: $61 \pm 5,3$ μ U/ml, $p < 0,05$) (TABELA 1).

TABELA 1

GRUPOS	PESO (g)	GLICEMIA (Mg/dl)	INSULINA (μ U/ml)
Controle	149 ± 21	$104 \pm 9,5$	$38 \pm 7,6$
Sépticos	154 ± 20	$130 \pm 11,5^*$	$61 \pm 5,3^*$

* $p < 0,05$

4.2. EFEITO DA SEPTICEMIA NAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA:

2.1. Efeito da septicemia na regulação do receptor de insulina, do IRS-1 e na associação IRS-1/PI 3-quinase em tecido hepático de ratos:

Não houve alteração no nível protéico do receptor de insulina, como determinado pelo “immunoblotting”, com anticorpo contra a porção terminal-carboxil do receptor de insulina após a imunoprecipitação do extrato total com anticorpo anti-IR (FIGURA 1). A análise, por densitometria ótica de seis experimentos, mostra que os níveis teciduais de receptor de insulina nos animais sépticos foi de $92 \pm 6\%$, em relação aos animais controles ($p > 0,05$).

Utilizando anticorpos anti-IRS-1 para immunoblotting, após prévia imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1 (FIGURA 2), foi possível a visualização e posterior quantificação desta proteína nos fragmentos hepáticos dos animais sépticos e controles. O nível tecidual do IRS-1 foi semelhante nos dois grupos (Controle: $100 \pm 7\%$ x Sépticos $94 \pm 10\%$, $p > 0,05$; $n=6$).

O grau de fosforilação do receptor de insulina mostrou uma diminuição não significativa para $95 \pm 8\%$ nos animais sépticos, em relação aos controles em experimentos onde o extrato total foi imunoprecipitado com anticorpo anti-IR e “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina ($p > 0,05$; $n=7$) (FIGURA 3).

Amostras de fígado dos animais controles e sépticos foram imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1, e os “immunoblottings” realizados com anticorpos antifosfotirosina (FIGURA 4). O grau de fosforilação do IRS-1 após estímulo insulínico aumentou nos animais sépticos de maneira não significativa, para $112 \pm 7\%$ ($p > 0,05$; $n=8$).

Estudos anteriores (BACKER et al., 1992; FOLLI et al., 1993; ARAKI et al., 1994; GIORGETTI et al., 1993; HADARI et al., 1992; LAVAN et al., 1992; KELLY & RUDERMAN, 1993) sugerem a existência de uma interação relativamente estável e de alta afinidade entre o IRS-1 e a subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase, de tal forma que ambas as proteínas podem ser co-precipitadas com anticorpos específicos, contra qualquer uma destas proteínas. Desta forma, as membranas de nitrocelulose, que continham amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, foram incubadas com anticorpos contra a subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase (FIGURA 5). Foi detectada uma discreta banda correspondente à PI 3-quinase, no estado basal, tanto dos animais controle quanto dos animais sépticos. Após a estimulação com insulina, a intensidade desta banda aumentou visivelmente tanto nos animais controles quanto nos sépticos, de forma consistente, com a formação de uma associação estável entre IRS-1 e PI 3-quinase.

A comparação das bandas estimuladas pela insulina, entre os animais controles e sépticos, revelou que a associação IRS-1/PI 3-quinase não se alterou (Controle: $100 \pm 6\%$ x Sépticos $109 \pm 7\%$, $p > 0,05$; $n=4$)

FIGURA 1. Nível protéico de IR em tecido hepático

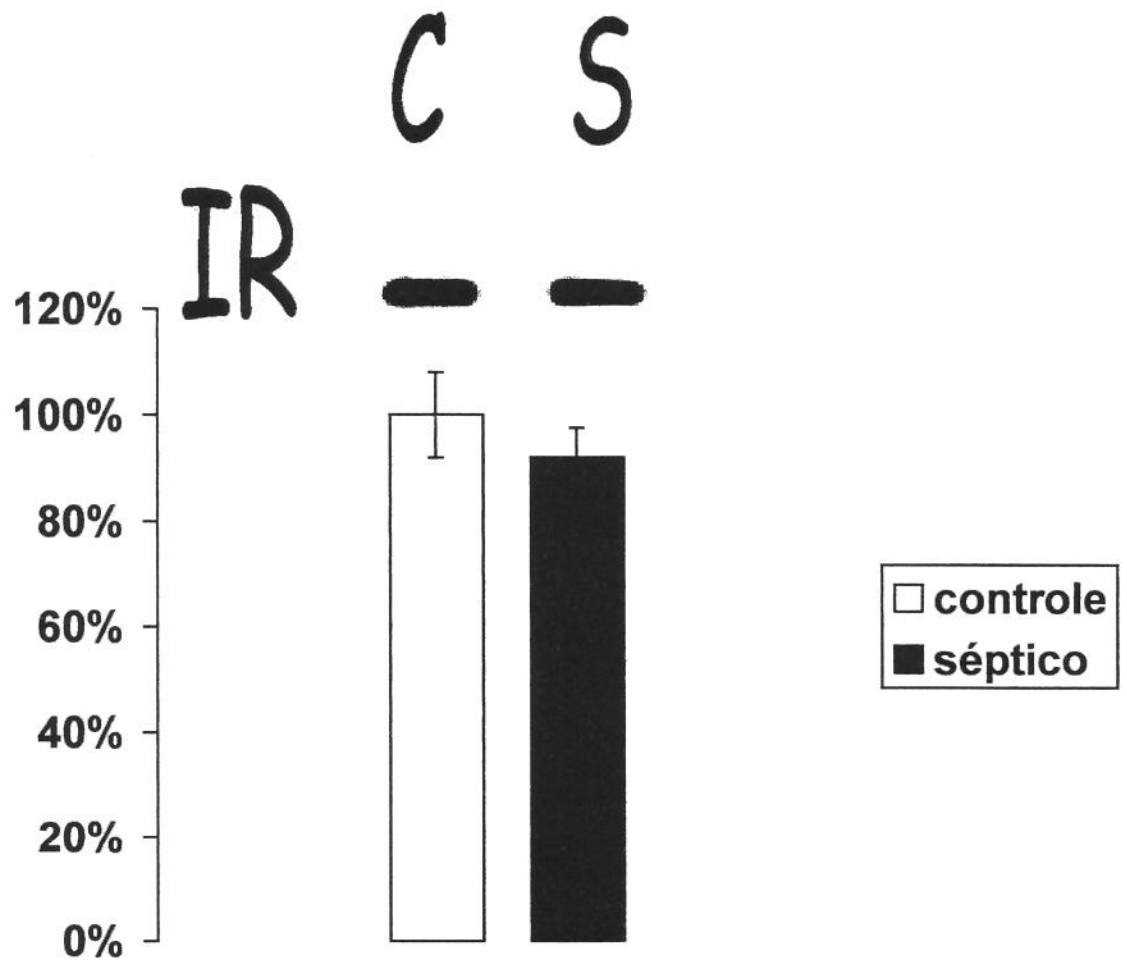


Figura 1. Efeito da sepse sobre a concentração protéica do receptor de insulina (IR) em tecido hepático de ratos controle (C) e sépticos (S). Amostras de tecido hepático de ratos submetido a “immunoblotting” com anticorpo contra a porção terminal-carboxil do receptor de insulina, após imunoprecipitação com anticorpo anti-IR, onde não se observou diferença na quantidade de receptor entre os grupos (Controle: $100 \pm 8\%$ x Sépticos $92 \pm 6\%$, $p > 0,05$).

FIGURA 2. Nível protéico de IRS-1 em tecido hepático

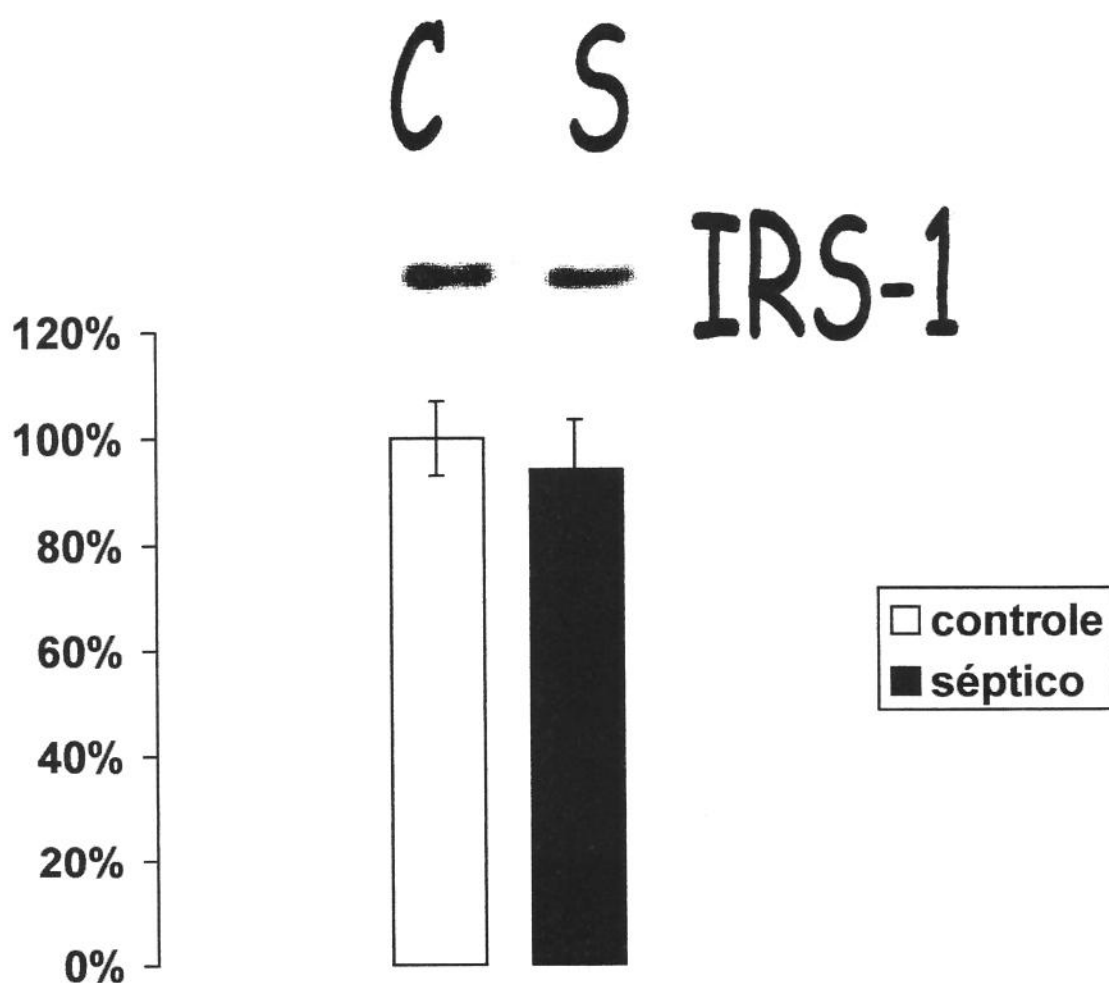


Figura 2. Efeito da sepse sobre a concentração protéica do IRS1 em tecido hepático de ratos controle (C) e sépticos (S). Amostras de tecido hepático de ratos submetido a “immunoblotting” com anticorpo anti-IRS-1, após imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1, onde não se observam alterações na quantidade de IRS-1 entre os grupos (Controle: $100 \pm 7\%$ x Sépticos $94 \pm 10\%$, $p > 0,05$).

FIGURA 3. Fosforilação do IR em tecido hepático

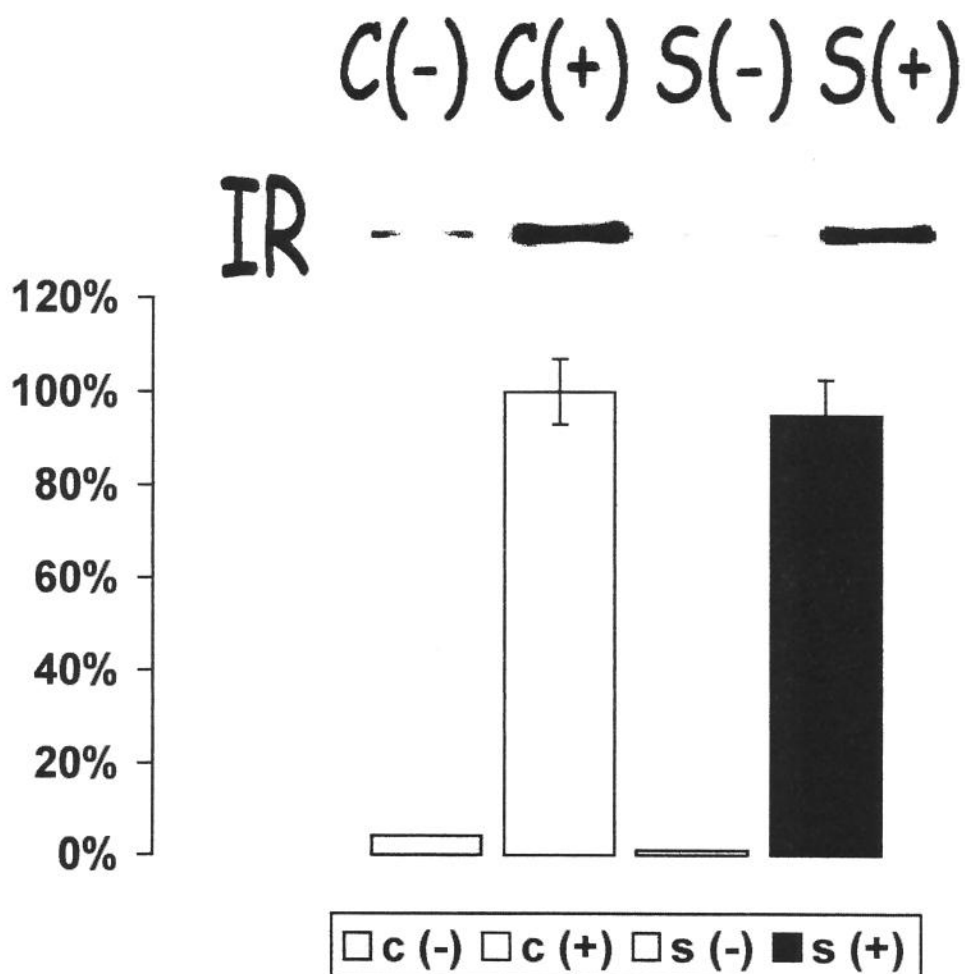


Figura 3. Avaliação do grau de fosforilação do receptor de insulina (IR) em tecido hepático de ratos controle (C) e sépticos (S), antes (-) e depois (+) da infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos submetido a “immunoblotting” com anticorpo anti-fosfotirosina, após imunoprecipitação com anticorpo anti-IR, onde não se verificaram alterações no grau de fosforilação da subunidade β do receptor de insulina entre os grupos (Controle: $100 \pm 7\%$ x Sépticos $95 \pm 8\%$, $p > 0,05$).

FIGURA 4. Fosforilação do IRS-1 em tecido hepático

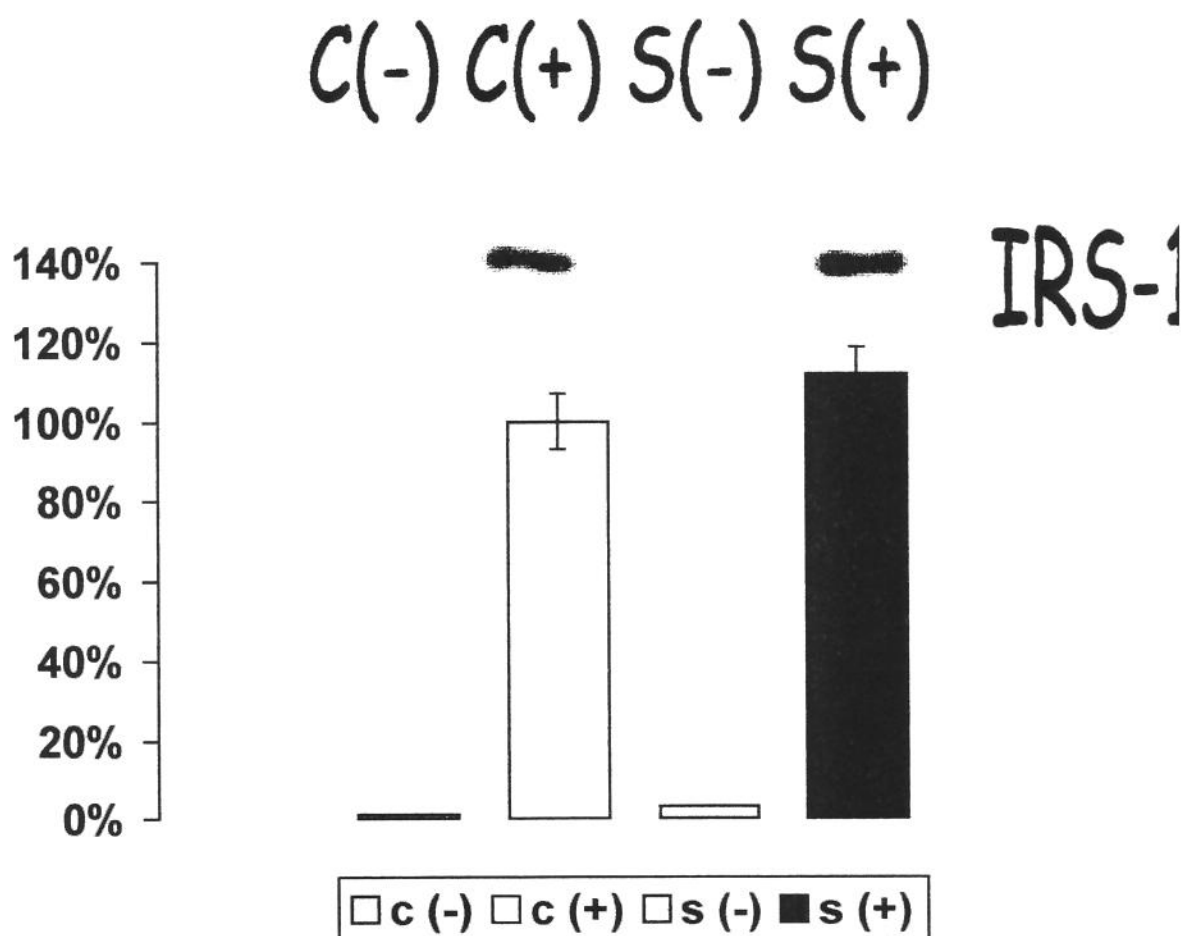


Figura 4. Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em tecido hepático de ratos controle (C) e sépticos (S), antes (-) e depois (+) da infusão de insulina. Com amostras de tecido hepático de ratos controle e sépticos foram realizados experimentos de imunoprecipitação após estímulo com insulina. As amostras foram imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1, e os “immunoblottings” realizados com anticorpos anti-fosfotirosina. O grau de fosforilação do IRS-1 após estímulo insulínico não apresentou diferença entre os grupos (controle $100 \pm 7\%$ x sépticos $112 \pm 7\%$ $p > 0,05$).

FIGURA 5. Associação IRS-1/PI3-K em tecido hepático

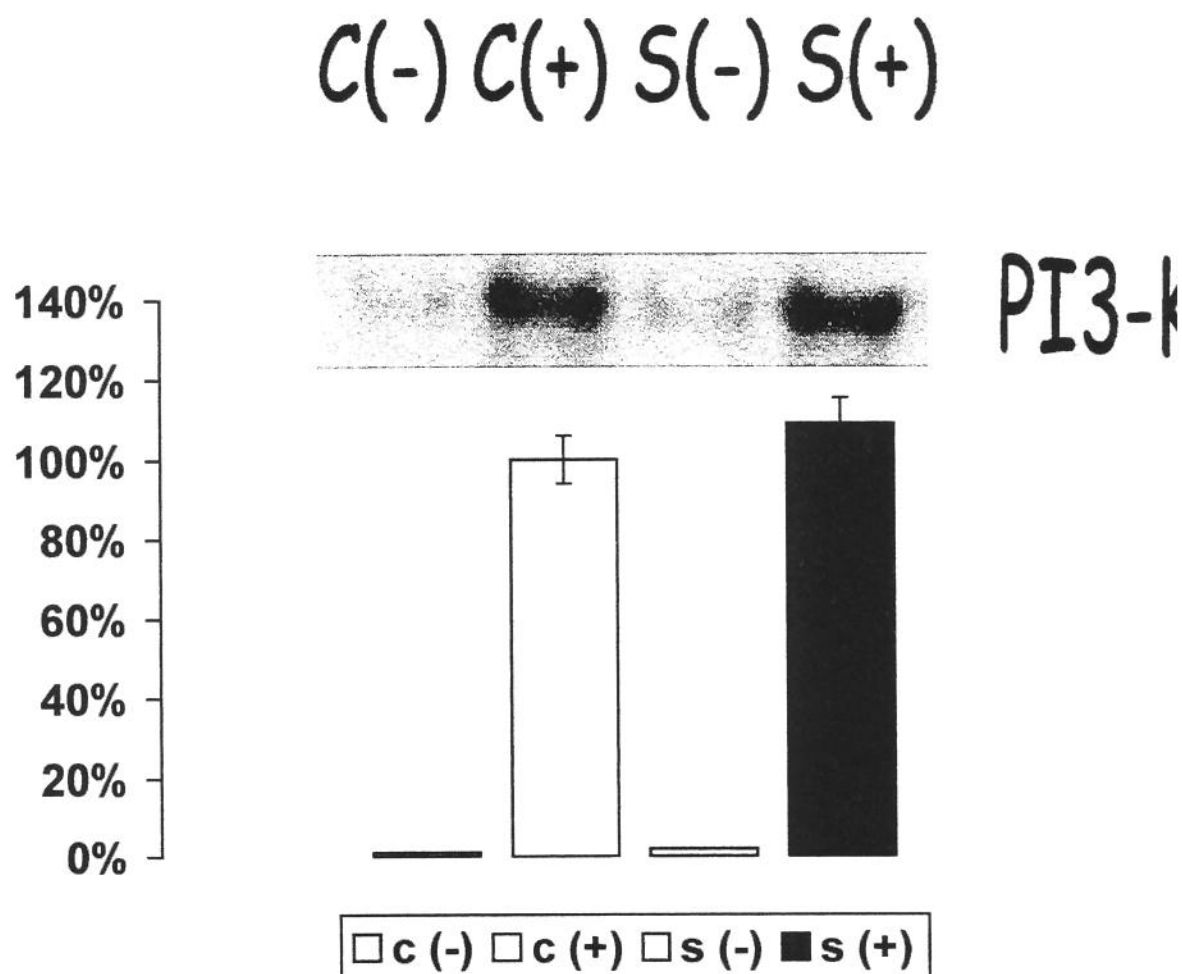


Figura 5. Efeito da sepse na associação IRS-1/PI3-K em tecido hepático de ratos controle (C) e sépticos (S), antes (-) e depois (+) da infusão de insulina. Com amostras de tecido hepático de ratos controle e sépticos previamente imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1, foram realizados “immunoblottings” com anticorpos anti-PI3-K. A associação IRS-1/PI3-K não apresentou alteração (controle $100 \pm 6\%$ x sépticos $109 \pm 7\%$ $p > 0,05$).

Efeito da septicemia na regulação do receptor de insulina, do IRS-1 e na associação IRS-1/PI 3-quinase em músculo de ratos:

De maneira semelhante à observada em tecido hepático, a septicemia não produziu mudanças no nível protéico do receptor de insulina, quando quantificado após imunoprecipitação com anticorpo anti-IR e posterior “blotting” com anticorpo anti-IR no tecido muscular. Os dados de seis experimentos podem ser observados na FIGURA 6 e demonstram uma discreta redução a $94\pm 6\%$ nos ratos sépticos, em comparação com os animais controles ($p>0,05$).

Contrastando ao que foi observado no tecido hepático quanto ao nível tecidual de IRS-1, houve uma drástica e precoce diminuição desta proteína em tecido muscular de animais sépticos observada em experimentos com imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1 e “blotting” anti-IRS-1 (FIGURA 7). Em uma média de seis experimentos, a quantidade de IRS-1 nos ratos sépticos foi $61\pm 12\%$ ($p<0,05$), em comparação aos controles.

A realização de “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina, após a infusão de insulina na veia porta e após imunoprecipitação com anticorpo anti-IR, mostrou que o grau de fosforilação do receptor de insulina apresentou variações não significativas para $91\pm 5\%$ ($p>0,05$; $n=6$) nos animais sépticos, em relação aos controles (FIGURA 8).

De maneira semelhante ao realizado com o tecido hepático, foram feitos experimentos de imunoprecipitação com anticorpos específicos, anti-IRS-1. Assim, amostras de músculo dos animais controles e sépticos foram imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1 e os “immunoblottings” realizados com anticorpo antifosfotirosina (FIGURA 9). O grau de fosforilação do IRS-1, após estímulo insulínico, diminuiu significativamente em animais sépticos para $59\pm 9\%$ ($p<0,05$; $n=7$).

Para avaliar a associação da subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase com o IRS-1, as membranas, cujas amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, foram incubadas com anticorpo anti-PI 3-quinase. Houve o aparecimento de uma banda após o estímulo insulínico, nos animais controles e sépticos, sendo evidente a banda nos animais controles e significativamente reduzida nos animais sépticos, diferente do observado em tecido hepático mas concordante com a redução da fosforilação do IRS-1

observada. Em um total de quatro experimentos, a quantidade de PI 3-quinase associada ao IRS-1, após estímulo insulínico, encontrou-se reduzida para $56\pm7\%$ ($p<0,05$), sugerindo, desta forma, uma associação muito menor entre IRS-1/PI 3-quinase no tecido muscular de ratos sépticos (FIGURA 10).

FIGURA 6. Nível protéico de IR em tecido muscular

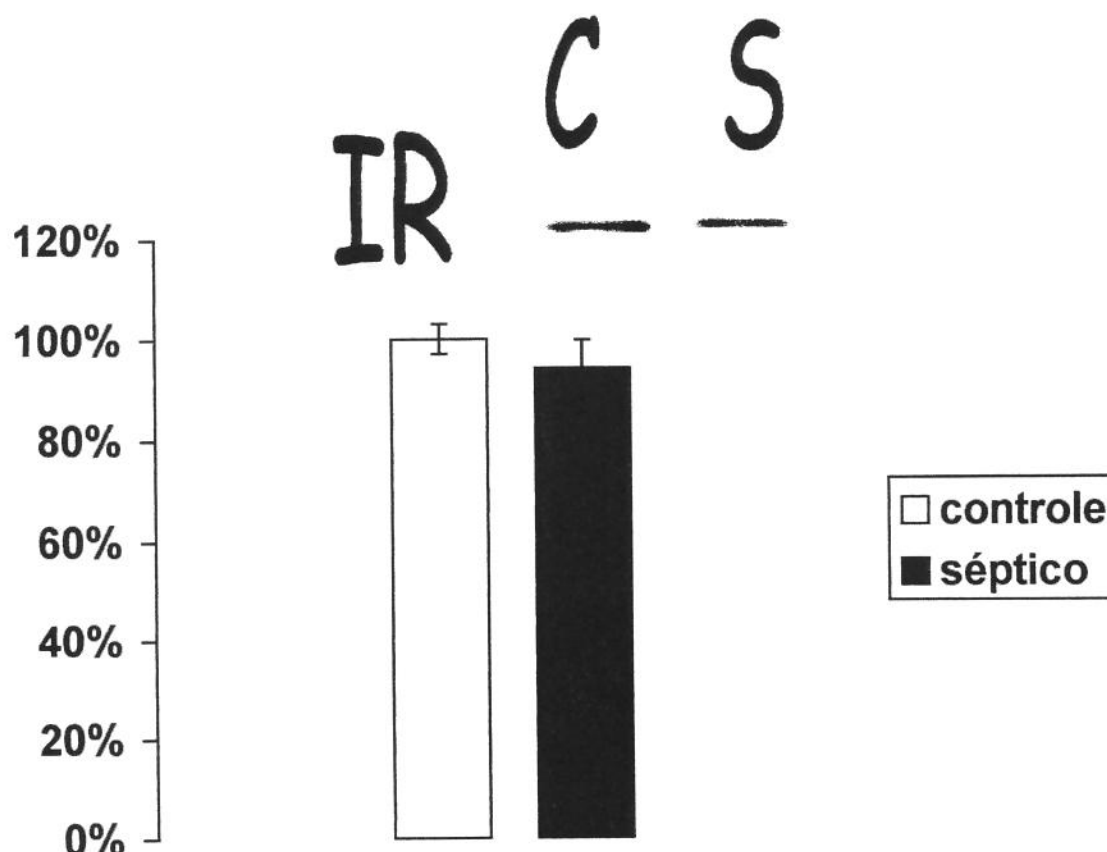


Figura 6. Efeito da sepse sobre a concentração protéica do receptor de insulina (IR) em tecido muscular de ratos controle (C) e sépticos (S). Amostras de tecido muscular de ratos submetido a “immunoblotting” com anticorpo contra a porção terminal-carboxil do receptor de insulina após imunoprecipitação com anticorpo anti-IR, onde não se observou diferença na quantidade de receptor entre os grupos (Controle: $100\pm3\%$ x Sépticos $94\pm6\%$, $p>0,05$).

FIGURA 7. Nível protéico de IRS-1 em tecido muscular

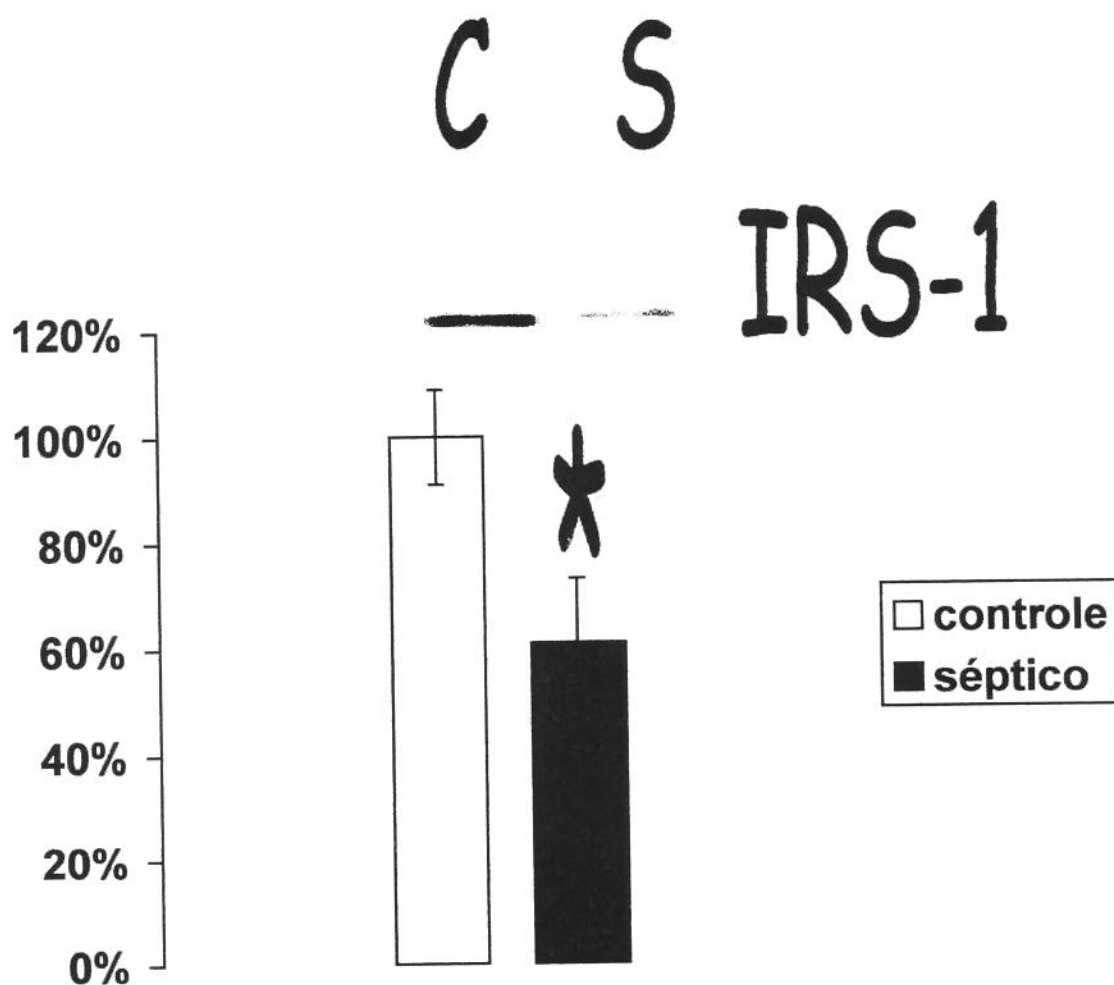


Figura 7. Efeito da sepse sobre a concentração protéica do IRS1 em tecido muscular de ratos controle (C) e sépticos (S). Amostras de tecido muscular de ratos submetido a “immunoblotting” com anticorpo anti-IRS-1 após imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1, onde se observa uma redução significativa na quantidade de IRS-1 em tecido muscular de ratos sépticos (Controle: $100 \pm 9\%$ x Sépticos $61 \pm 12\%$, $p < 0,05$).

FIGURA 8. Fosforilação do IR em tecido muscular

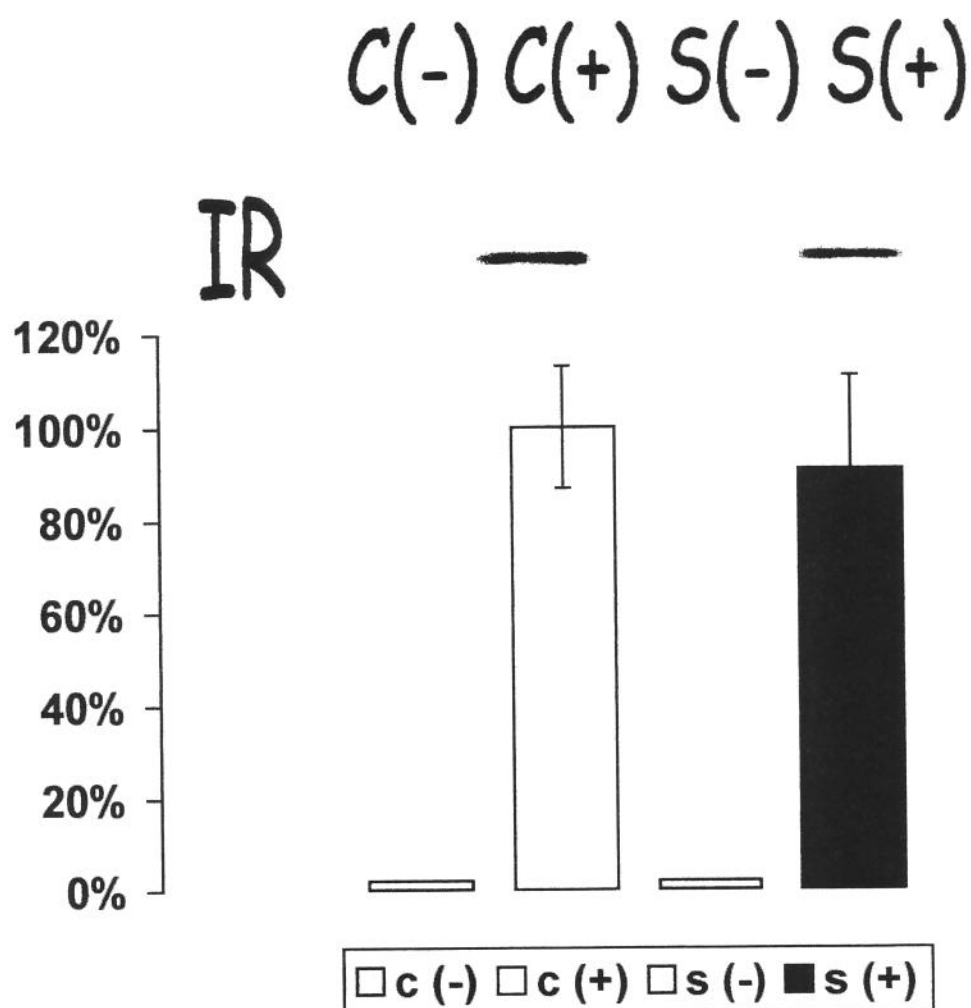


Figura 8. Avaliação do grau de fosforilação do receptor de insulina (IR) em tecido muscular de ratos controle (C) e sépticos (S), antes (-) e depois (+) da infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos submetido a “immunoblotting” com anticorpo anti-fosfotirosina após imunoprecipitação com anticorpo anti-IR, onde não se verificaram alterações no grau de fosforilação da subunidade β do receptor de insulina entre os grupos (Controle: $100 \pm 13\%$ x Sépticos $91 \pm 5\%$, $p > 0,05$).

FIGURA 9. Fosforilação do IRS-1 em tecido muscular

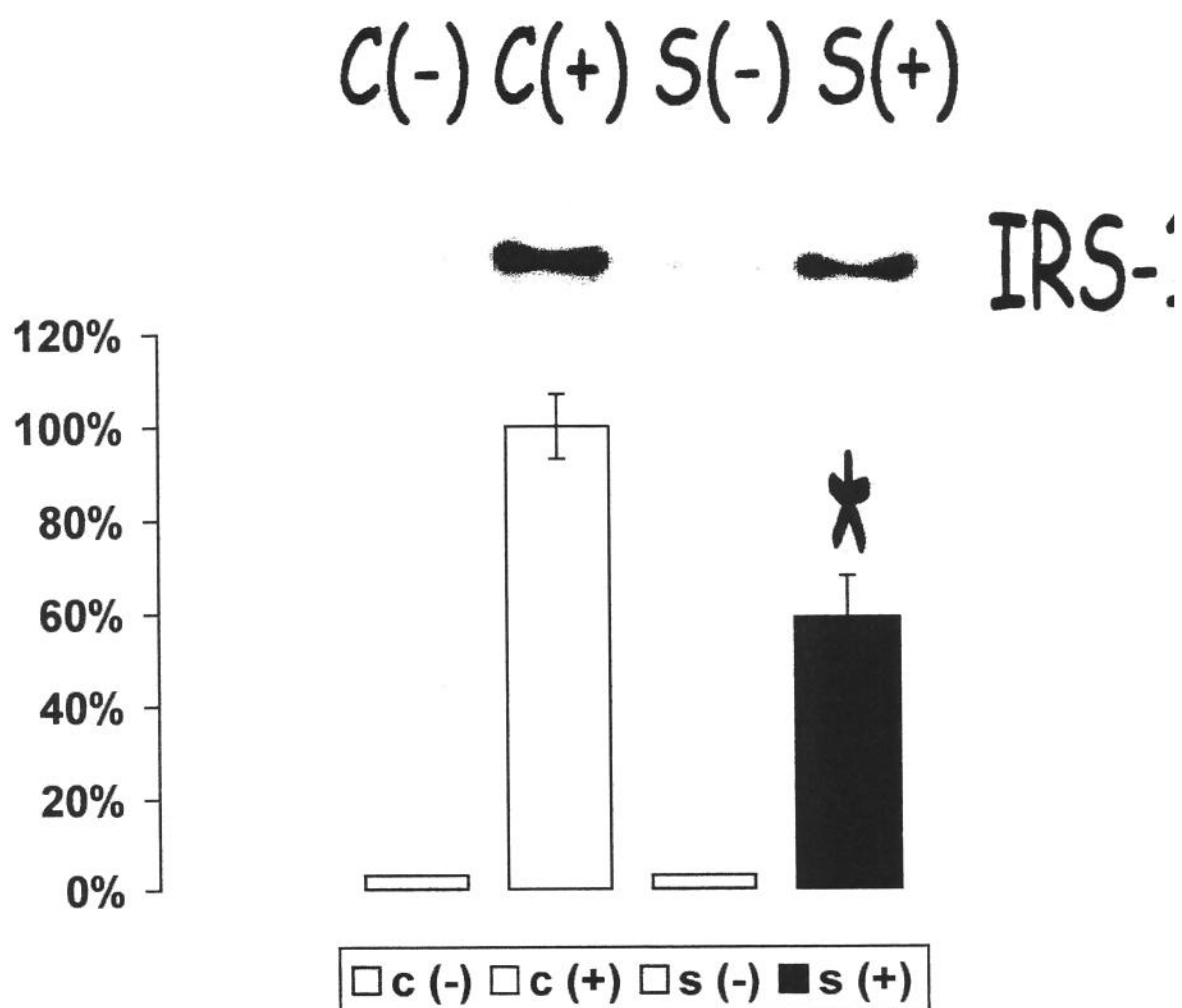


Figura 9. Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em tecido muscular de ratos controle (C) e sépticos (S), antes (-) e depois (+) da infusão de insulina. Com amostras de tecido muscular de ratos controle e sépticos foram realizados experimentos de imunoprecipitação após estímulo com insulina. As amostras foram imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1, e os “immunoblottings” realizados com anticorpos anti-fosfotirosina. O grau de fosforilação do IRS-1 após estímulo insulínico diminuiu nos animais sépticos de maneira significativa (controle $100 \pm 7\%$ x sépticos $59 \pm 9\%$ $p < 0,05$).

FIGURA 10. Associação IRS-1/PI3-K em tecido muscular

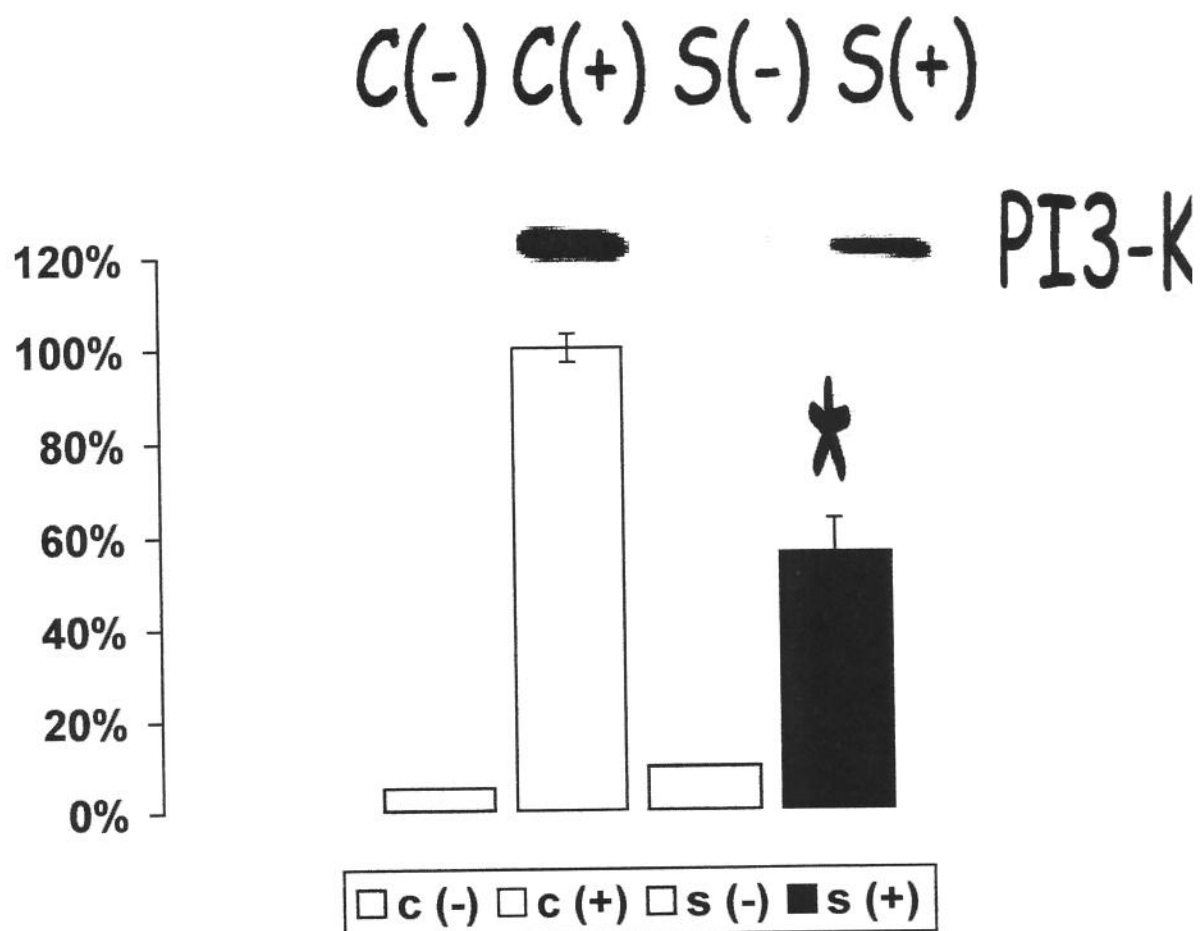


Figura 10. Efeito da sepse na associação IRS-1/PI3-K em tecido muscular de ratos controle (C) e sépticos (S), antes (-) e depois (+) da infusão de insulina. Com amostras de tecido muscular de ratos controle e sépticos previamente imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1, foram realizados “immunoblottings” com anticorpos anti-PI3-K. A associação IRS-1/PI3-K diminuiu nos animais sépticos, de maneira consistente à redução da fosforilação do IRS-1 (controle $100 \pm 3\%$ x sépticos $56 \pm 7\%$ $p < 0,05$).

Efeito da septicemia na regulação do receptor de insulina, do IRS-1 e na associação IRS-1/PI 3quinase em tecido muscular cardíaco de ratos:

De maneira semelhante ao observado no tecido hepático, a septicemia não produziu mudanças nos níveis protéicos do receptor de insulina e do IRS-1, no tecido muscular cardíaco. Os dados de oito experimentos de imunoprecipitação podem ser observados nas FIGURAS 11 e 12, e demonstram aumento não significativo a $101\pm6\%$ ($p>0,05$) e redução a $93\pm5\%$ ($p>0,05$) nos níveis protéicos do receptor de insulina e do IRS-1, respectivamente, nos animais sépticos, em comparação com os animais controles.

O grau de fosforilação do receptor de insulina em experimentos utilizando imunoprecipitação com anticorpo anti-IR e “blotting” com antifosfotirosina, apresentou variações não significativas para $105\pm10\%$ ($p>0,05$; $n=6$) nos animais sépticos, em relação aos controles (FIGURA 13).

O IRS-1 apresentou, após o estímulo insulínico, uma redução não significativa no seu grau de fosforilação nos animais sépticos. De maneira semelhante ao realizado nos tecidos descritos acima, foram feitos experimentos de imunoprecipitação com anticorpos específicos, anti-IRS-1. Assim amostras de tecido muscular cardíaco dos animais controles e sépticos foram imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1 e os “immunoblottings” realizados com anticorpo antifosfotirosina (FIGURA 14). O grau de fosforilação do IRS-1, após estímulo insulínico, reduziu sem significado estatístico em animais sépticos para $97\pm8\%$ ($p>0,05$; $n=7$).

Para avaliar a associação da subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase com o IRS-1, as membranas, cujas amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 foram incubadas com anticorpo anti-PI 3-quinase (FIGURA 15). E, de forma semelhante ao ocorrido com o tecido hepático, houve o aparecimento de uma banda após o estímulo insulínico, nos animais controle e séptico, sendo evidente a banda nos dois grupos de animais. Em um total de quatro experimentos, a quantidade de PI 3-quinase associada ao IRS-1, após estímulo insulínico, encontrou-se reduzida sem significado para $96\pm6\%$ ($p>0,05$).

FIGURA 11. Nível protéico de IR em tecido muscular cardíaco

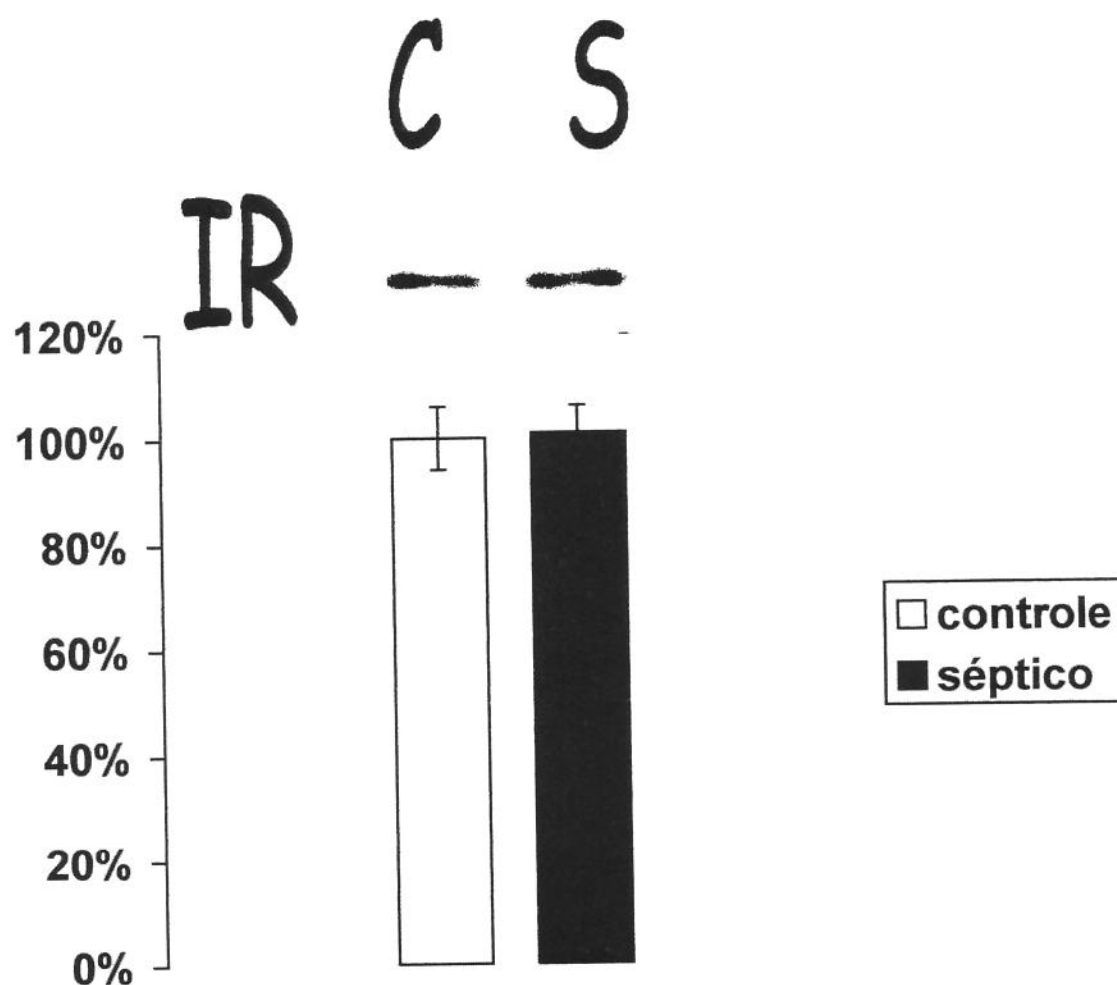


Figura 11. Efeito da sepse sobre a concentração protéica do receptor de insulina (IR) em tecido muscular cardíaco de ratos controle (C) e sépticos (S). Amostras de tecido muscular cardíaco de ratos submetido a “immunoblotting” com anticorpo contra a porção terminal-carboxil do receptor de insulina após imunoprecipitação com anticorpo anti-IR, onde não se observou diferença na quantidade de receptor entre os grupos (Controle: $100 \pm 6\%$ x Sépticos $101 \pm 6\%$, $p > 0,05$).

FIGURA 12. Nível protéico de IRS-1 em tecido muscular cardíaco

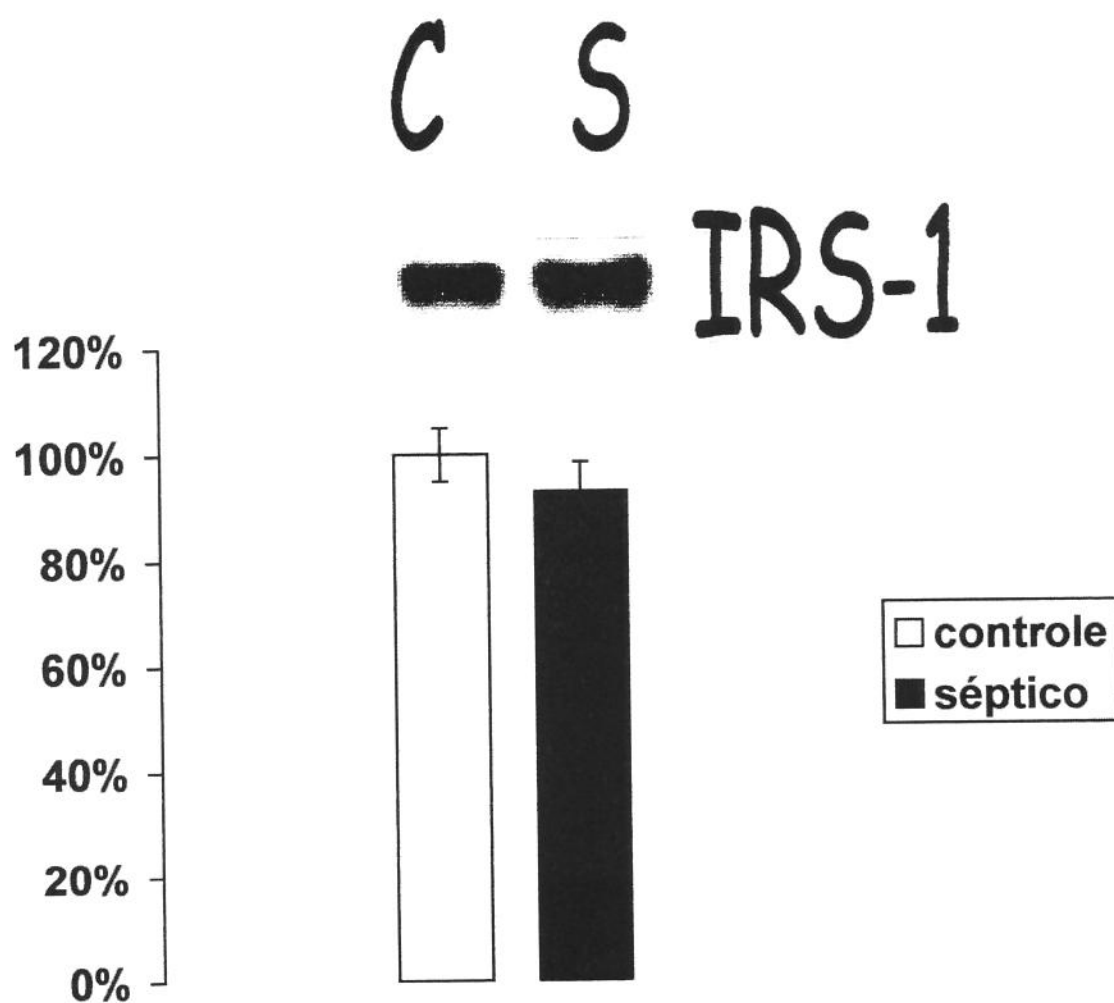


Figura 12. Efeito da sepse sobre a concentração protéica do IRS1 em tecido muscular cardíaco de ratos controle (C) e sépticos (S). Amostras de tecido muscular cardíaco de ratos submetido a “immunoblotting” com anticorpo anti-IRS-1 após imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1, onde não se observam alterações na quantidade de IRS-1 entre os grupos (Controle: $100 \pm 5\%$ x Sépticos $93 \pm 5\%$, $p > 0,05$).

FIGURA 13. Fosforilação do IR em tecido muscular cardíaco

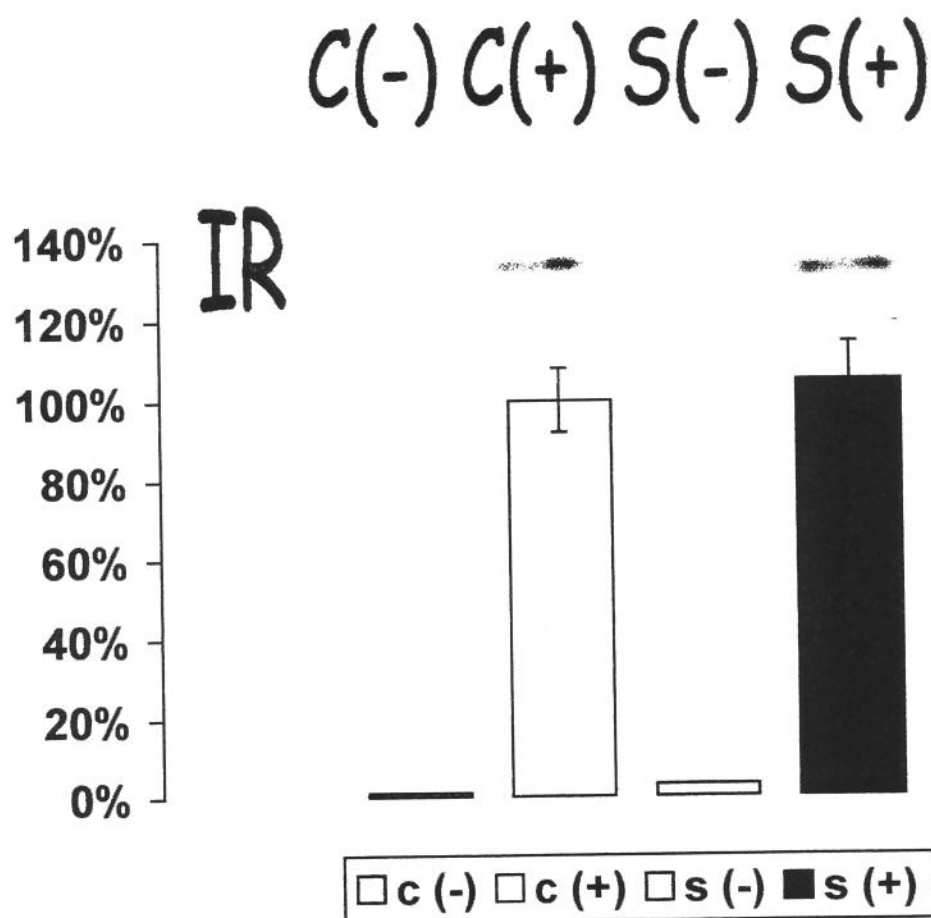


Figura 13. Avaliação do grau de fosforilação do receptor de insulina (IR) em tecido muscular cardíaco de ratos controle (C) e sépticos (S), antes (-) e depois (+) da infusão de insulina. Amostras de tecido muscular cardíaco de ratos submetido a “immunoblotting” com anticorpo anti-fosfotirosina após imunoprecipitação com anticorpo anti-IR, onde não se verificaram alterações no grau de fosforilação da subunidade β do receptor de insulina entre os grupos (Controle: $100 \pm 8\%$ x Sépticos $105 \pm 10\%$, $p > 0,05$).

FIGURA 14. Fosforilação do IRS-1 em tecido muscular cardíaco

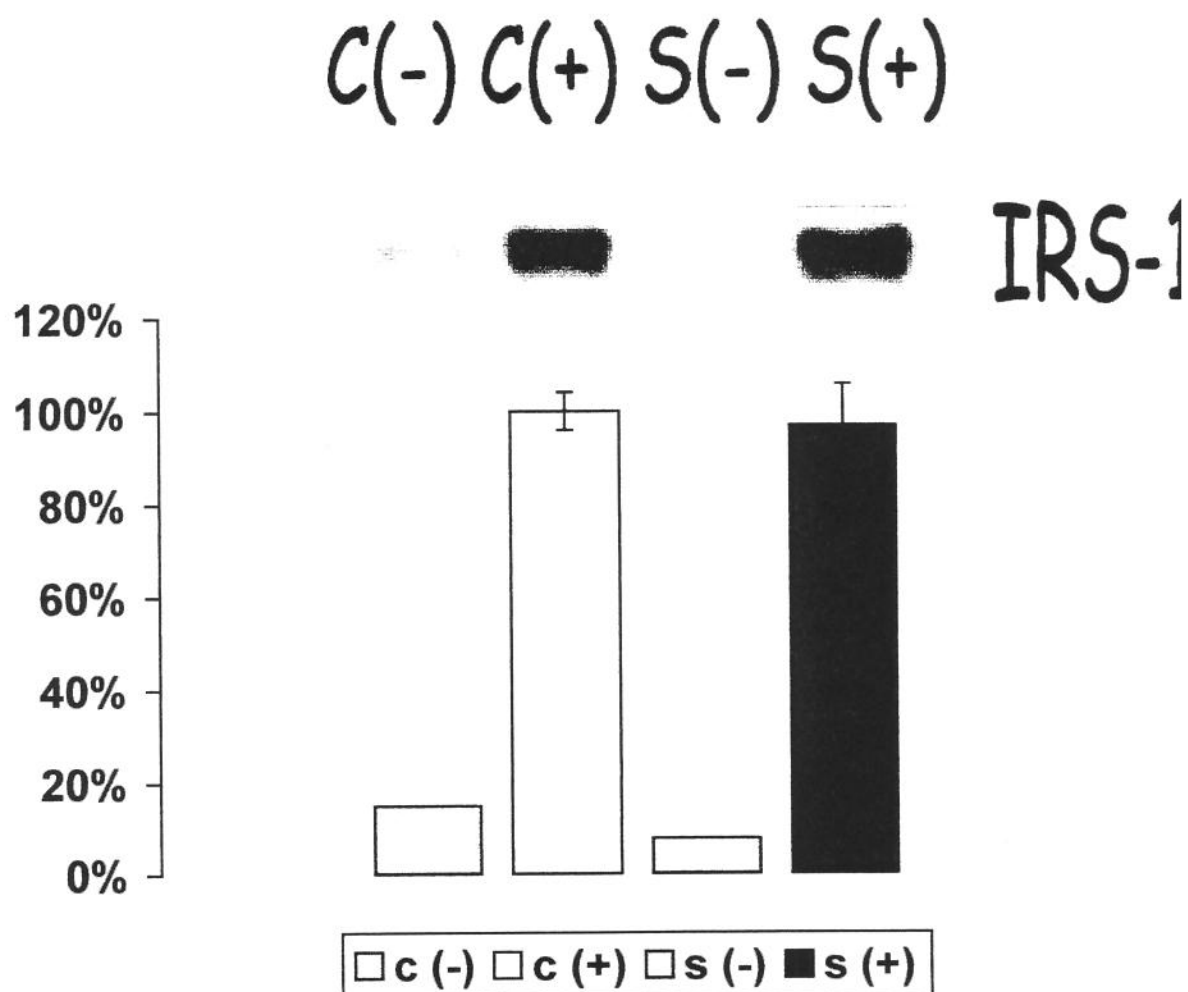


Figura 14. Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em tecido muscular cardíaco de ratos controle (C) e sépticos (S), antes (-) e depois (+) da infusão de insulina. Com amostras de tecido muscular cardíaco de ratos controle e sépticos foram realizados experimentos de imunoprecipitação após estímulo com insulina. As amostras foram imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1, e os “immunoblottings” realizados com anticorpos anti-fosfotirosina. O grau de fosforilação do IRS-1 após estímulo insulínico não apresentou diferença entre os grupos (controle $100 \pm 4\%$ x sépticos $97 \pm 8\%$ $p > 0,05$).

FIGURA 15. Associação IRS-1/PI3-K em tecido muscular cardíaco

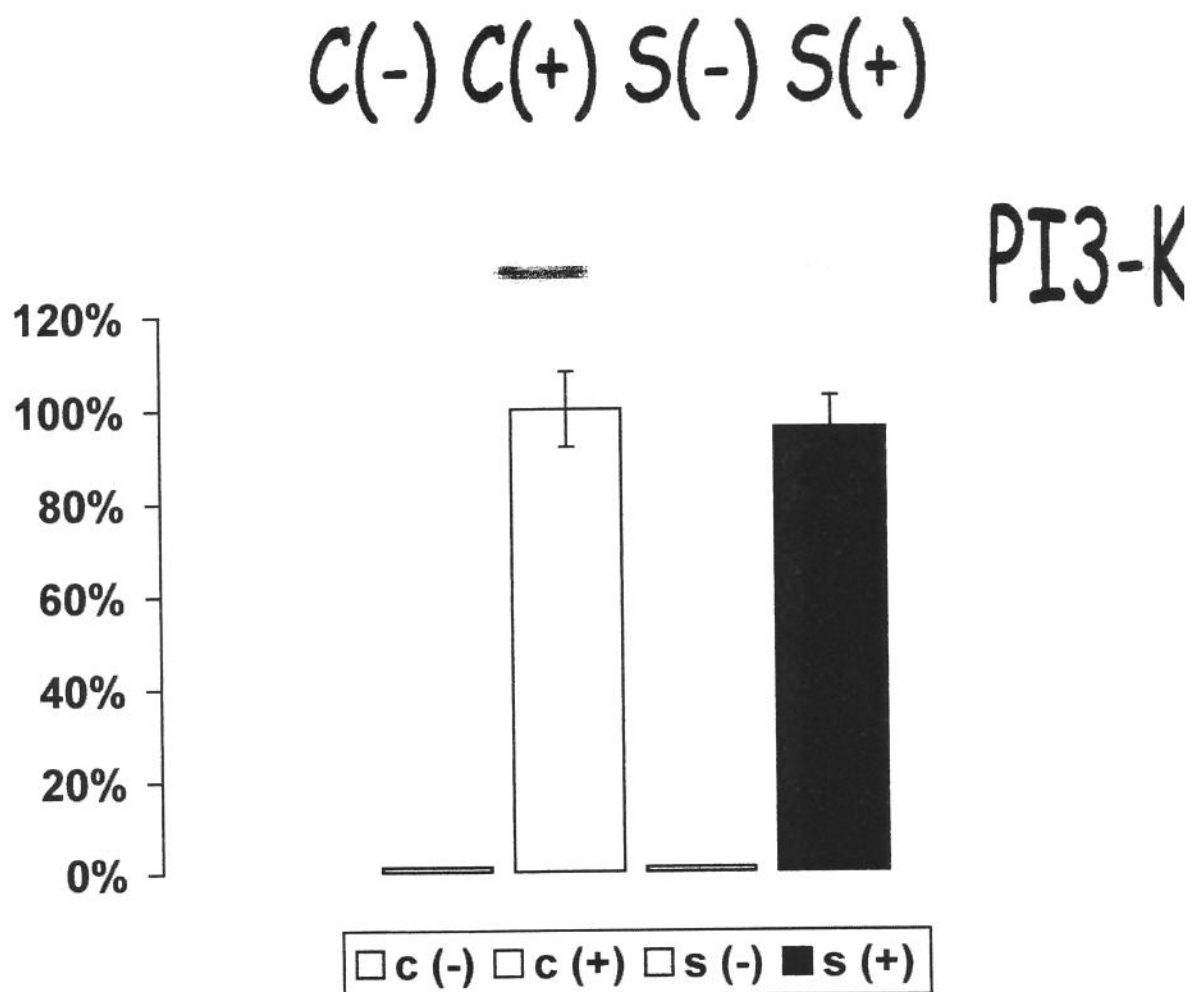


Figura 15. Efeito da sepse na associação IRS-1/PI3-K em tecido muscular cardíaco de ratos controle (C) e sépticos (S), antes (-) e depois (+) da infusão de insulina. Com amostras de tecido muscular cardíaco de ratos controle e sépticos previamente imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1, foram realizados “immunoblottings” com anticorpos anti-PI3-K. A associação IRS-1/PI3-K não apresentou alteração (controle $100 \pm 8\%$ x sépticos $96 \pm 6\%$ $p > 0,05$).

Efeito da septicemia na regulação do receptor de insulina, do IRS-1 e na associação IRS-1/PI 3quinase em tecido adiposo de ratos:

De maneira similar aos resultados obtidos em tecido hepático e muscular cardíaco, a septicemia não produziu mudanças nos níveis protéicos do receptor de insulina e do IRS-1, no tecido adiposo quando se utiliza imunoprecipitação com anticorpos específicos contra essas proteínas. Os dados de sete experimentos podem ser observados na FIGURA 16 demonstram redução a $94\pm4\%$ ($p>0,05$) nos níveis protéicos do receptor de insulina e a $97\pm5\%$ ($p>0,05$; $n=4$) do IRS-1 (FIGURA 17) nos animais sépticos, em comparação com os animais controles, ambos sem significado estatístico.

O grau de fosforilação do receptor de insulina, avaliado pela imunoprecipitação com anti-IR e “blotting” antifosfotirosina, apresentou variações não significativas para $97\pm5\%$ ($p>0,05$; $n=5$) nos animais sépticos, em relação aos controles (FIGURA 18).

De maneira semelhante ao realizado nos tecidos descritos acima, foram feitos experimentos de imunoprecipitação com anticorpos específicos, anti-IRS-1. Assim amostras de tecido adiposo dos animais controles e sépticos foram imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1 e os “immunoblottings” realizados com anticorpo antifosfotirosina (FIGURA 19). O grau de fosforilação do IRS-1, após estímulo insulínico, reduziu sem significado estatístico em animais sépticos para $91\pm14\%$ ($p>0,05$, $n=4$).

Para avaliar a associação da subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase com o IRS-1, as membranas, cujas amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, foram incubadas com anticorpo anti-PI 3-quinase. De forma semelhante ao ocorrido com os tecidos hepático e muscular cardíaco, houve o aparecimento de uma banda após o estímulo insulínico, nos animais controle e séptico, sendo evidente a banda nos dois grupos de animais. Em um total de quatro experimentos, a quantidade de PI 3-quinase associada ao IRS-1, após estímulo insulínico, encontrou-se reduzida para $96\pm8\%$ ($p>0,05$), sem significado estatístico (FIGURA 20).

FIGURA 16. Nível protéico de IR em tecido adiposo

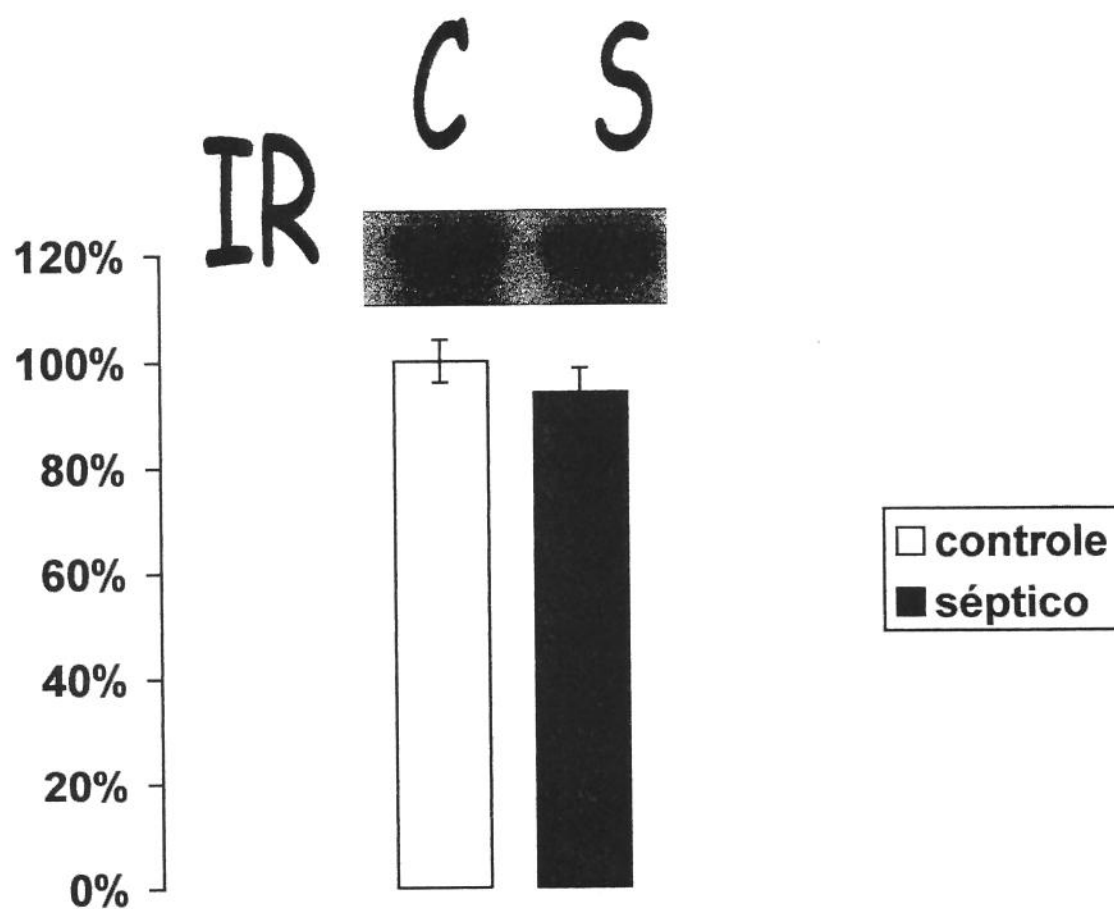


Figura 16. Efeito da sepse sobre a concentração protéica do receptor de insulina (IR) em tecido adiposo de ratos controle (C) e sépticos (S). Amostras de tecido adiposo cardíaco de ratos submetido a “immunoblotting” com anticorpo contra a porção terminal-carboxil do receptor de insulina após imunoprecipitação com anticorpo anti-IR, onde não se observou diferença na quantidade de receptor entre os grupos (Controle: $100 \pm 4\%$ x Sépticos $94 \pm 4\%$, $p > 0,05$).

FIGURA 17. Nível protéico de IRS-1 em tecido adiposo

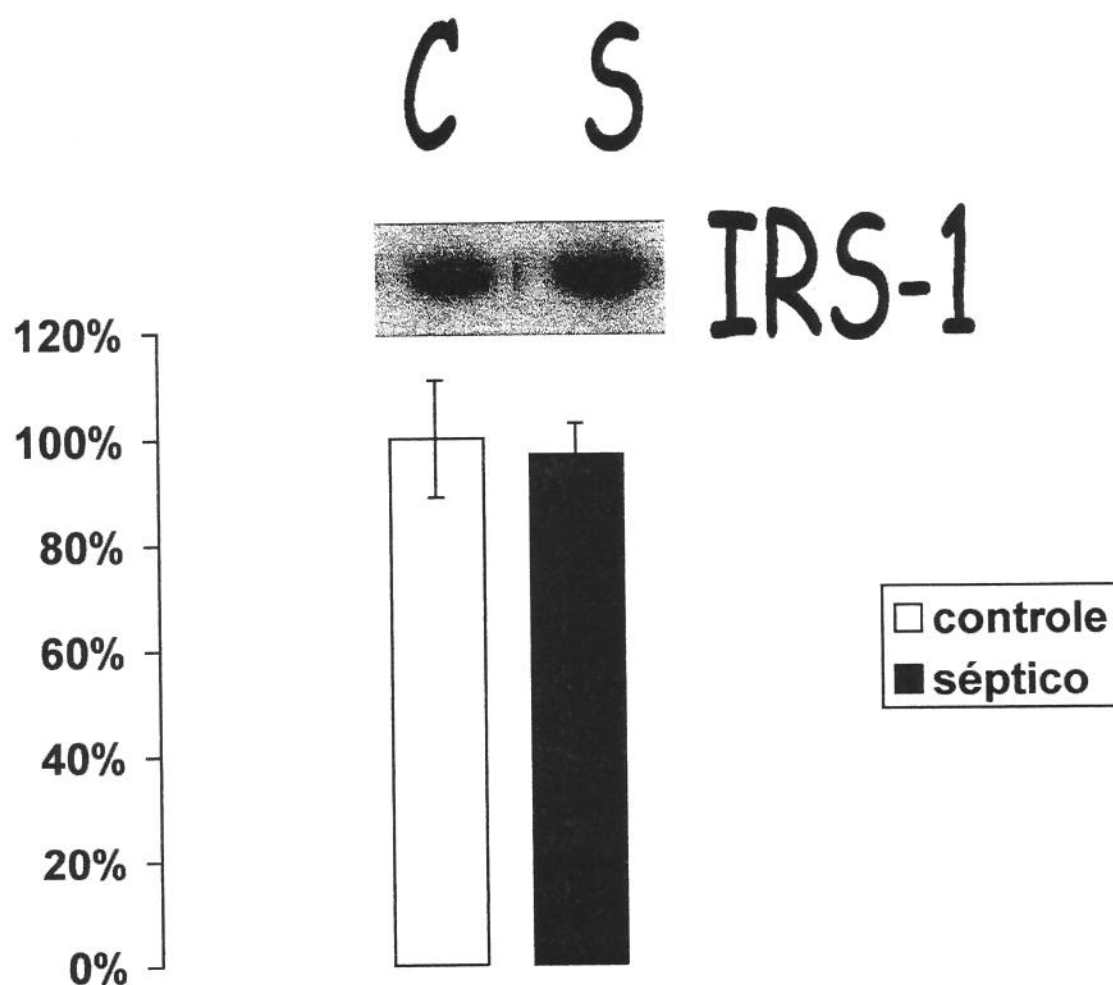


Figura 17. Efeito da sepse sobre a concentração protéica do IRS1 em tecido adiposo de ratos controle (C) e sépticos (S). Amostras de tecido adiposo de ratos submetido a “immunoblotting” com anticorpo anti-IRS-1 após imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1, onde não se observam alterações na quantidade de IRS-1 entre os grupos (Controle: $100 \pm 11\%$ x Sépticos $97 \pm 5\%$, $p > 0,05$).

FIGURA 18. Fosforilação do IR em tecido adiposo

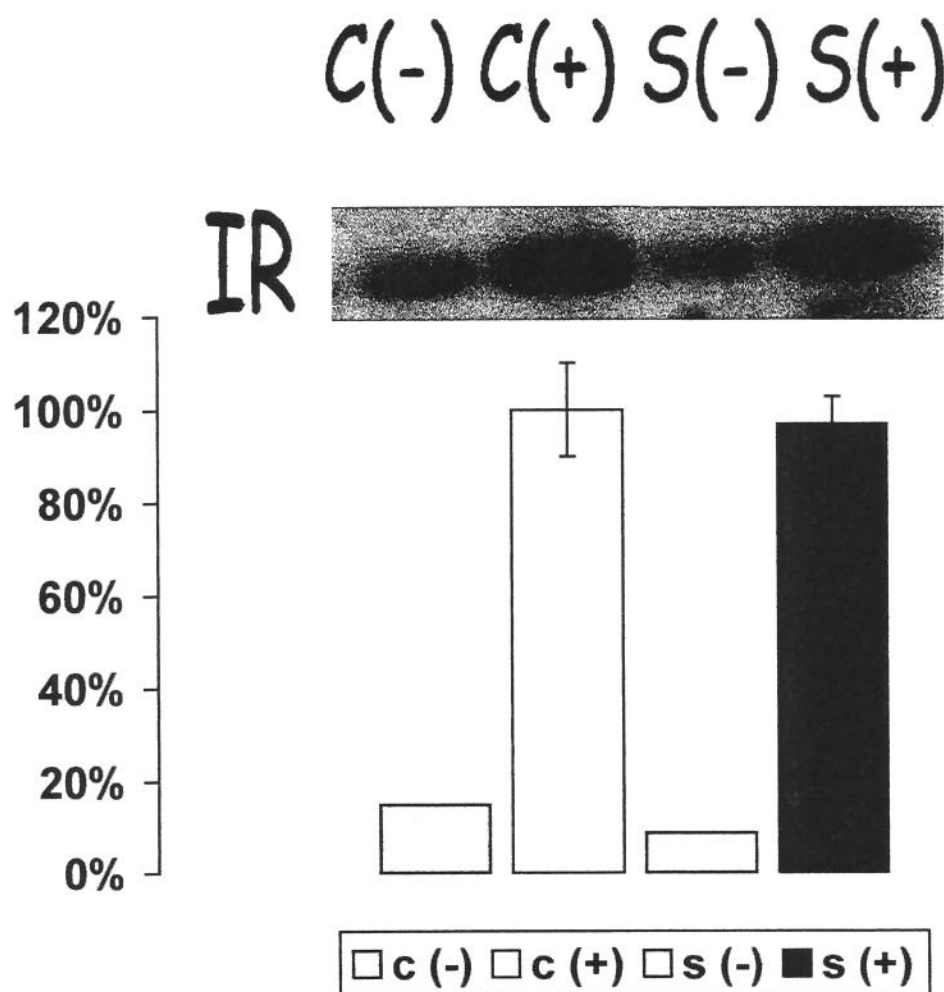


Figura 18. Avaliação do grau de fosforilação do receptor de insulina (IR) em tecido adiposo de ratos controle (C) e sépticos (S), antes (-) e depois (+) da infusão de insulina. Amostras de tecido adiposo de ratos submetido a “immunoblotting” com anticorpo anti-fosfotirosina após imunoprecipitação com anticorpo anti-IR, onde não se verificaram alterações no grau de fosforilação da subunidade β do receptor de insulina entre os grupos (Controle: $100 \pm 10\%$ x Sépticos $97 \pm 5\%$, $p > 0,05$).

FIGURA 19. Fosforilação do IRS-1 em tecido adiposo

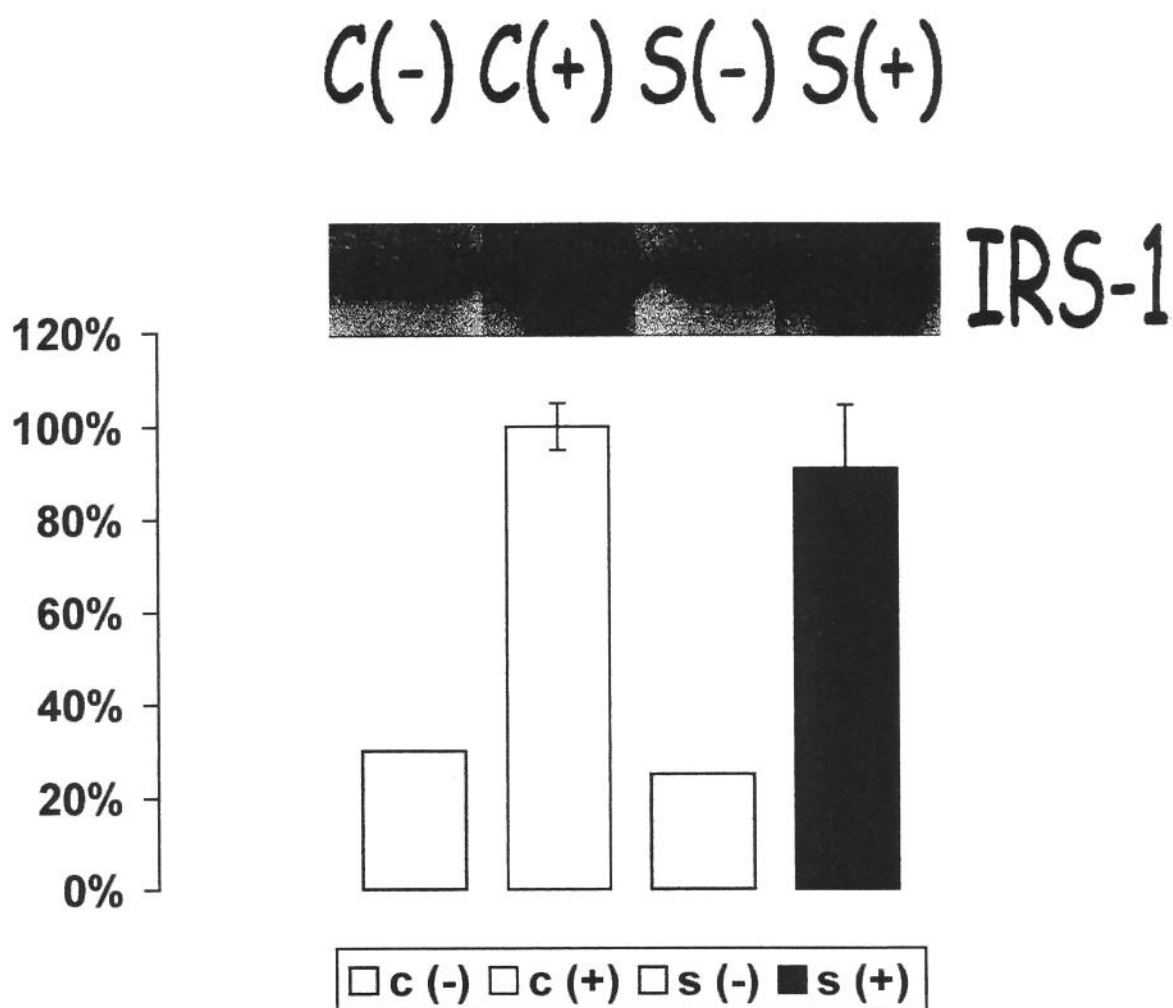


Figura 19. Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em tecido adiposo de ratos controle (C) e sépticos (S), antes (-) e depois (+) da infusão de insulina. Com amostras de tecido adiposo de ratos controle e sépticos foram realizados experimentos de imunoprecipitação após estímulo com insulina. As amostras foram imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1, e os “immunoblottings” realizados com anticorpos anti-fosfotirosina. O grau de fosforilação do IRS-1 após estímulo insulínico não apresentou diferença entre os grupos (controle $100 \pm 5\%$ x sépticos $91 \pm 14\%$ $p > 0,05$).

FIGURA 20. Associação IRS-1/PI3-K em tecido adiposo

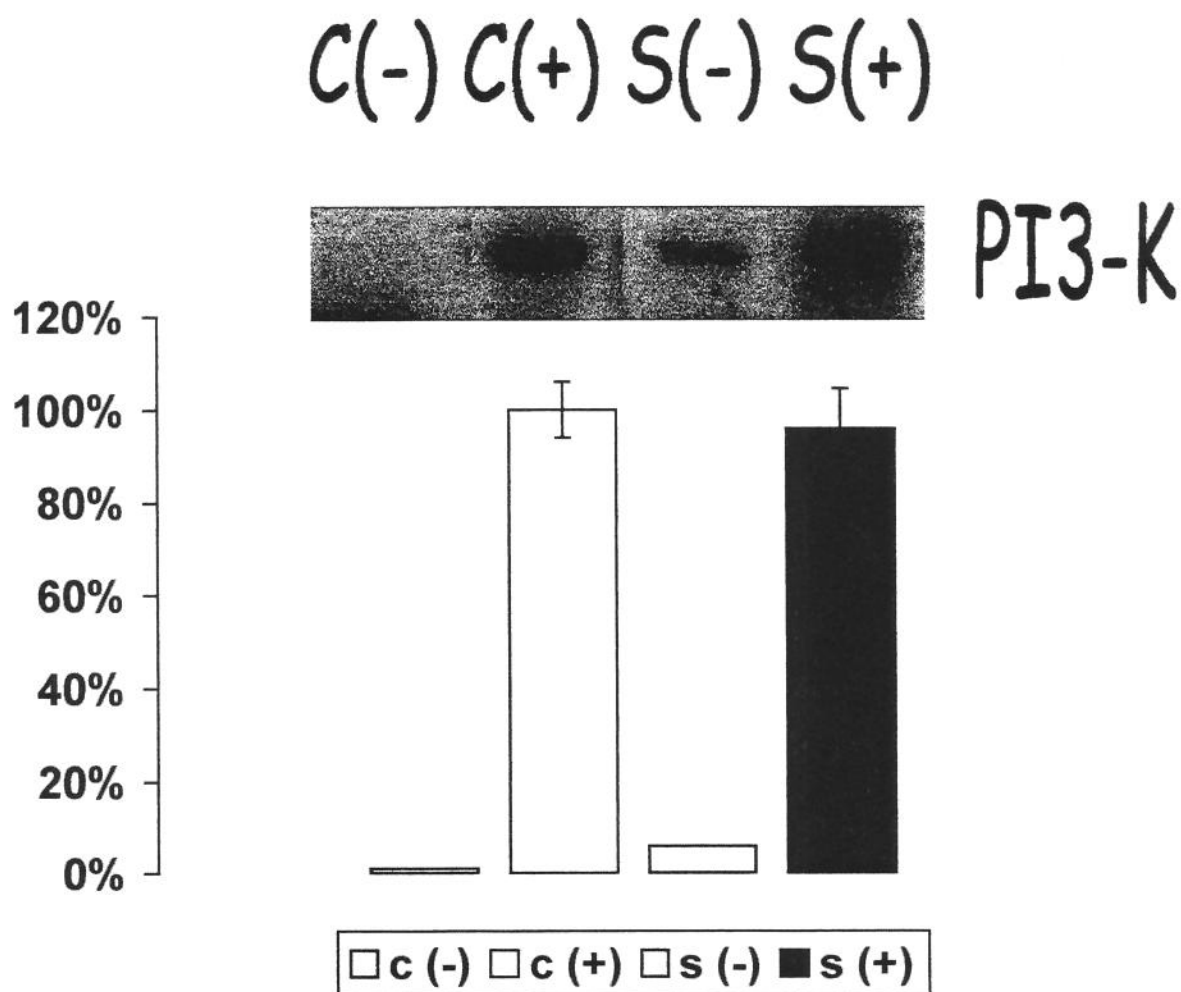
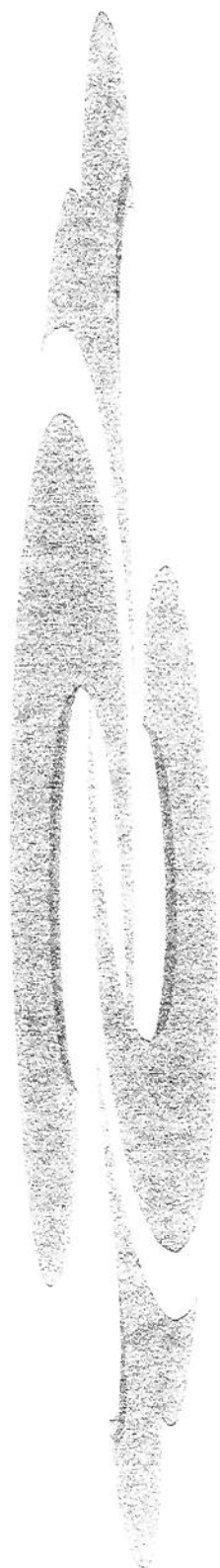


Figura 20. Efeito da sepse na associação IRS-1/PI3-K em tecido adiposo de ratos controle (C) e sépticos (S), antes (-) e depois (+) da infusão de insulina. Com amostras de tecido adiposo de ratos controle e sépticos previamente imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1, foram realizados “immunoblottings” com anticorpos anti-PI3-K. A associação IRS-1/PI3-K não apresentou alteração (controle $100 \pm 6\%$ x sépticos $96 \pm 8\%$ $p > 0,05$).



5. DISCUSSÃO

A insulina inicia suas ações metabólicas e promotoras de crescimento quando se liga à subunidade α extracelular de seu receptor tetramérico, estimulando assim a capacidade tirosina quinase na subunidade β . Isto leva a uma mudança conformacional do receptor que ativa tirosinas específicas nesta subunidade, aumentando a atividade tirosina quinase dirigida a substratos endógenos intracelulares. Estas proteínas citoplasmáticas são coletivamente denominadas IRSs (substratos do receptor de insulina), cujo primeiro componente descrito, e melhor estudado até o momento é chamado substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1). O IRS-1 fosforilado associa-se a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) ativando-a.

Evidências provenientes de trabalhos que se utilizam de metodologias variadas provam que a atividade tirosina quinase do receptor, a fosforilação do IRS- 1 e a ativação da PI 3-quinase são essenciais para a maioria dos efeitos biológicos da insulina (KAHN & GOLDFINE, 1993, YAMAUCHI & PESSIN, 1994).

O estudo da regulação das etapas iniciais da ação insulínica pode ser realizado *in vitro*, utilizando-se receptores de insulina parcialmente purificados e substratos exógenos, ou pode ser realizado *in vivo*, após o estímulo com insulina.

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

O protocolo experimental utilizado neste trabalho, estimulação *in vivo* com insulina, extração e homogeneização dos tecidos hepático, adiposo, cardíaco e muscular em tampões desnaturantes ou em condições apropriadas para imunoprecipitação, e posterior “immunoblotting” com anticorpos específicos, permitiu uma avaliação das etapas iniciais da ação insulínica nestes quatro importantes tecidos para a homeostase da glicose (SAAD, *et al.*, 1989). A metodologia aplicada neste estudo permite uma avaliação direta da fosforilação em tirosinas do IRS-1, bem como sua associação com outras proteínas (SAAD, *et al.*, 1992).

Em estudos *in vivo* em cultura de células e em sistemas reconstituídos *in vitro*, o IRS-1 fosforilado associa-se à enzima fosfatidilinositol -3-quinase (PI3-quinase) ativando-a (BACKER, *et al.*, 1992, FOLLI, *et al.*, 1992). Em estudos anteriores, demonstrou-se que esta associação e ativação também ocorrem em tecidos insulino-sensíveis de ratos, em concentração fisiológicas de insulina (FOLLI, *et al.*, 1992, SAAD, *et al.*, 1993). A enzima PI 3-quinase apresenta uma subunidade de 110 kDa e uma regulatória de 85 kDa que contém duas porções SH2 e uma SH3 (CARPENTER & CANTLEY, 1990). A ativação da PI 3-quinase é essencial para o transporte de glicose (CHEATHAM, *et al.*, 1994), pois o tratamento de células com um inibidor específico desta enzima, o “wortmannin”, bloqueia também a captação dessa hexose.

Assim, a insulina estimula a fosforilação do IRS-1 e o IRS-1 fosforilado se liga a outras moléculas de sinalização intracelular, propagando o sinal insulínico. Além da PI3-quinase, pelo menos três outras proteínas com porção SH2 associam-se ao IRS-1: Syp, Nck, e GRB-2 (KUHNE, *et al.*, 1993, CHEATHAM & KAHN, 1995).

A escolha do modelo experimental de indução de sepse por ligadura e punção de ceco utilizado em nossos experimentos foi resultado da pesquisa de um modelo animal com evolução clínica semelhante a apendicite aguda, com isquemia de alça, contaminação do peritônio por conteúdo fecal e bloqueio local por omento. O tempo de desenvolvimento da sepse também foi considerado, uma vez que a infusão de bactérias viáveis ou mesmo lipopolissacáride A (LPS-A) na corrente sanguínea leva a uma intensa resposta hemodinâmica com hipofluxo precoce que poderia interferir nos resultados.

A resistência à insulina ficou caracterizada não só pela hiperglicemia verificada após jejum no grupo de ratos sépticos como pela hiperinsulinemia. Neste estudo, investigamos as etapas iniciais da ação insulínica “in vivo” em tecidos metabolicamente ativos, a procura de um mecanismo molecular para a resistência à insulina presente em animais sépticos.

A pesquisa da quantidade de receptor de insulina presente nos quatro tecidos estudados utilizando “immunoblotting” com anticorpo anti porção terminal-carboxil do receptor de insulina após a imunoprecipitação do extrato total com anticorpo anti-IR, não encontrou diferença entre os dois grupos, assim como a fosforilação deste, avaliada por imunoprecipitação com anti-IR e “immunoblotting” com antifosfotirosina também não se alterou.

A seguir, foi verificado que a quantidade de IRS-1 estava inalterada em tecidos hepático, cardíaco e adiposo, mas significativamente reduzida no tecido muscular de ratos sépticos. A fosforilação do IRS-1 (determinada por imunoprecipitação com anti-IRS-1 e “blotting” com antifosfotirosina) também apresentou redução em músculo de ratos sépticos quando comparada ao grupo controle.

Como demonstrado em outros estudos de nosso laboratório (SAAD, *et al.*, 1992, SAAD, *et al.*, 1993), a redução da fosforilação do IRS-1 foi acompanhada pela diminuição da sua associação à PI3-quinase, também encontrava-se reduzida em tecido muscular de ratos sépticos, quando medida através de imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1 e “immunoblotting” anti PI3-K.

Os resultados obtidos em tecido muscular de ratos sépticos, indicadores da existência de alterações moleculares na via de sinalização da insulina, podem contribuir para explicar a menor sensibilidade à insulina demonstrada nestes animais.

A insulina induz a captação de glicose em tecido muscular através da translocação de vesículas contendo GLUT 4 do citoplasma para a membrana plasmática (QUON, *et al.*, 1994, RICE & GARNER, 1994, STEPHENS & PILCH, 1995). O GLUT 4 é o transportador de glicose específico do músculo e tecido adiposo. Diferentes métodos

experimentais têm evidenciado o papel da PI 3-quinase na translocação do GLUT 4 estimulada pela insulina (CHEATHAM, *et al.*, 1994, HARA, *et al.*, 1994, HARUTA, *et al.*, 1995). Em um estudo em que se induziu uma mutação inativadora na PI 3-quinase, demonstrou-se que a captação de glicose estimulada pela insulina diminuiu (HARA, *et al.*, 1994).

A utilização de inibidores da PI 3-quinase como wortmannin e o LY 294002 reduz a captação de glicose induzida pela insulina (CLARKE, *et al.*, 1994, SANCHEZ-MARGALET, *et al.*, 1994, YEH, *et al.*, 1995). Essas evidências são importantes e sugerem que a ativação da PI 3-quinase é necessária para a captação de glicose induzida pela insulina.

Assim, a diminuição dos níveis e grau de fosforilação do IRS-1, bem como a menor interação IRS-1/PI 3-quinase em tecido muscular de animais sépticos podem contribuir para a menor captação muscular de glicose que estes animais apresentam e para a resistência à insulina descrita.

(ZELLER, *et al.*, 1994) demonstraram que os níveis de GLUT 4 não se modificam em tecido adiposo e muscular de animais sépticos, sugerindo que nestes animais a menor sensibilidade à insulina é consequência de uma menor translocação do GLUT 4 induzida por insulina, o que vem ao encontro de nossos dados de alterações na transmissão do sinal de insulina em tecido muscular na sepse.

As alterações moleculares observadas apenas na via da sinalização da insulina em tecido muscular de ratos sépticos, sugerem uma interferência tecido-específica da sepse que ocorre após a ligação da insulina com o seu receptor, que poderia ser mediada por citocinas como o TNF- α , alterações hemodinâmicas, hormonais ou do ciclo glicose-AGL, presentes durante o desenvolvimento desta. A possibilidade de interações multifatoriais é a mais provável, uma vez que a cascata inflamatória e humoral produzida pela sepse tem grande proporções.

Um mecanismo regulatório importante das etapas iniciais da ação insulínica é através da fosforilação do IRS-1 em aminoácidos serina e treonina (MYERS & WHITE, 1996). Esta regulação do IRS-1 pode ser evidenciada em culturas de células, utilizando metodologia variada (TANTI, *et al.*, 1994).

Há evidências de que a fosforilação do IRS-1 em serina e (ou) treonina reduz, de maneira significativa, a capacidade do receptor de insulina fosforilar este substrato em tirosina, dificultando a transmissão do sinal insulínico.

Modelos animais de obesidade e resistência à insulina têm expressão de TNF- α elevada em tecidos adiposo e muscular (TNF- α mRNA e proteína), quando comparados com outros tecidos (HOTAMISLIGIL, SHARGILL & SPIEGELMAN, 1993). Humanos com obesidade e resistência a insulina têm achados semelhantes (HOTAMISLIGIL, *et al.*, 1995, SAGHIZADEH, *et al.*, 1996). Existem evidências de causalidade entre TNF- α e resistência à insulina. A infusão de anticorpos anti- TNF- α foi capaz de neutralizá-lo “*in vivo*” e melhorar a ação insulínica em ratos Zucker (HOTAMISLIGIL, SHARGILL & SPIEGELMAN, 1993); enquanto a administração de proteína ligante ao TNF- α solúvel em animais resistentes à insulina melhorou a ação insulínica *in vivo* (HOTAMISLIGIL & SPIEGELMAN, 1994). Ratos geneticamente obesos com supressão dos receptores p55 e p75 de TNF- α são mais sensíveis à insulina do que os com receptores intactos (HOTAMISLIGIL, 1999).

Em humanos, há fortes evidências do papel fisiopatológico do TNF- α na resistência a insulina associada à obesidade, à diabetes mellitus tipo II, a sepse, ao câncer e ao pós-operatório (MICHIE, *et al.*, 1988, OFFNER, *et al.*, 1990).

A exposição de culturas de células (adipócitos 3T3-L1 ou 3T3-F442A) ao TNF- α por 3 a 5 dias provoca uma redução na fosforilação induzida pela insulina no IR e IRS-1 (HOTAMISLIGIL & SPIEGELMAN, 1994, GUO & DONNER, 1996), além de uma diminuição na quantidade de mRNA e proteína do GLUT 4, IR e IRS-1 (STEPHENS & PEKALA, 1991, STEPHENS, LEE & PILCH, 1997). Essas alterações observadas na fosforilação induzida pela insulina no IR e IRS-1, após tratamento com TNF- α , podem

também ser reproduzidas em culturas de células Fao (de hepatoma de ratos) (FEINSTEIN, *et al.*, 1993, KANETY, *et al.*, 1995), fibroblastos NIH3T3 (KRODER, *et al.*, 1996) e miócitos L6 (BEGUM & RAGOLIA, 1996), embora não sejam uniformemente observadas (NOLTE, *et al.*, 1998).

Os possíveis alvos teóricos da ação inibitória do TNF- α incluem a fosforilação do IR e IRS-1 em tirosina e a associação do IRS-1 fosforilado à PI 3-quinase. Há evidências de que a ligação do TNF- α com seus receptores p55 ou p75 induz a fosforilação do IRS-1 em serina, bloqueando a sinalização da insulina (HOTAMISLIGIL, 1999). A conexão entre ativação do receptor de TNF- α e fosforilação em serina do IR e IRS-1 não está completamente esclarecida, mas pode, pelo menos em parte, ser mediada por proteína quinase C (PKC).

A ligação do TNF- α a seu receptor ativa a formação de diacilglicerol via fosfolipase C, que estimula a atividade serina/treonina kinase, da PKC, o que poderia induzir a fosforilação do IRS-1 em serina (HAYAKAWA, *et al.*, 1993, HOTAMISLIGIL, *et al.*, 1996).

Em resumo, a elevação dos níveis de TNF- α observada na sepse poderia induzir fosforilação do IRS-1 em serina, dificultando sua fosforilação em tirosina e ainda facilitando o processo de degradação deste substrato, contribuindo para explicar as alterações moleculares nas etapas iniciais da ação insulínica em músculo de animais sépticos demonstradas em nosso estudo.

Além disso, a administração aguda de TNF- α induz a resistência à insulina caracterizada por diminuição da captação periférica de glicose, que desaparece quando os efeitos hemodinâmicos da insulina são bloqueados (YOUUD, RATTIGAN & CLARK, 2000), sugerindo também um componente vascular associado.

Vários estudos demonstraram que além dos efeitos metabólicos, a insulina possui efeitos hemodinâmicos capazes de aumentar o acesso da glicose e insulina ao tecido muscular (BARON & CLARK, 1997, RATTIGAN, CLARK & BARRETT, 1997, YKI-JARVINEN & UTRIAINEN, 1998). Os efeitos hemodinâmicos da insulina podem ser

divididos em dois componentes: Um aumento do débito cardíaco mediado por uma vasodilatação óxido-nítrico dependente (STEPHENS & PEKALA, 1991) que na presença de um inibidor da oxido nítrico-sintetase diminui 30% (BARON & CLARK, 1997) e um aumento no recrutamento capilar, que não parece ter relação com o aumento do débito cardíaco (RATTIGAN, CLARK & BARRETT, 1997). A utilização de α -metil serotonina, um inibidor do recrutamento capilar, reduz não apenas o efeito hemodinâmico da insulina, mas também a captação de glicose em aproximadamente 40% (RATTIGAN, CLARK & BARRETT, 1997).

Os efeitos hemodinâmicos produzidos pela insulina dificilmente contribuiriam para a resistência à insulina na sepse, por ter como efeito fisiológico um aumento da chegada da glicose aos tecidos, além de não explicar as alterações moleculares observadas em tecido muscular de animais sépticos.

Em animais sépticos ocorre um aumento dos níveis circulantes de cortisol, que poderia contribuir para a menor sensibilidade da insulina desses animais. É fato reconhecido que glicocorticóides causam resistência à insulina (DEPIRRO, *et al.*, 1981, AMATRUDA, LIVINGSTON & LOCKWOOD, 1985). A hipercortisolemia está associada ao aumento da produção hepática de glicose (AMATRUDA, LIVINGSTON & LOCKWOOD, 1985), redução do transporte e utilização periféricos de glicose (DEPIRRO, *et al.*, 1981) além da diminuição da síntese e aumento da degradação protéica muscular (RANNELS & JEFFERSON, 1980), sem alterações na capacidade de ligação da insulina com o seu receptor, sugerindo um defeito pós-membrana (BLOCK & BUSE, 1989). Entretanto, em modelos animais de hipercortisolemia as alterações na fosforilação do IRS-1 e associação deste com a PI 3-quinase também estão presentes em tecido hepático, e não apenas em tecido muscular como observado em ratos sépticos.

A fosforilação do IRS-1 em músculo de animais hipercortisolêmicos apresenta resultados discrepantes (GIORGINO, *et al.*, 1993). Assim, a hipercortisolemia pode contribuir, mas de maneira menos efetiva, para as alterações moleculares encontradas nas etapas iniciais da ação da insulina em músculo de ratos sépticos.

Outra característica hormonal importante da septicemia, é a elevação dos níveis de catecolaminas na circulação sistêmica desde as suas fases iniciais. É fato bem estabelecido que a estimulação do receptor β -adrenérgico por isoproterenol é capaz de inibir o transporte de 3-O-metilglicose em músculo esqueléticos de humanos (ZIERATH, *et al.*, 1996). Trabalhos visando esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos no evento descrevem aumento da quantidade de receptor de insulina em tecido adiposo epididimal, redução em tecido hepático e manutenção da quantidade em tecido muscular com a infusão prolongada de adrenalina em ratos (CAMPION, *et al.*, 1997), e redução tanto da fosforilação do IRS-1 quanto da sua associação com a PI-3 quinase, sem alterar suas concentrações, em tecido muscular e hepático de animais expostos a doses agudas de adrenalina (THIRONE, *et al.*, 1998). Os resultados descritos são semelhantes aos nossos em tecido muscular exposto agudamente a adrenalina mas é pouco provável que este mecanismo isoladamente justifique as alterações encontradas. O modelo utilizado é de peritonite fecal evoluída, onde dificilmente os níveis circulantes de adrenalina se aproximariam dos utilizados por Thirone, e alterações das vias de transmissão do sinal insulínico também seriam esperadas em outros tecidos.

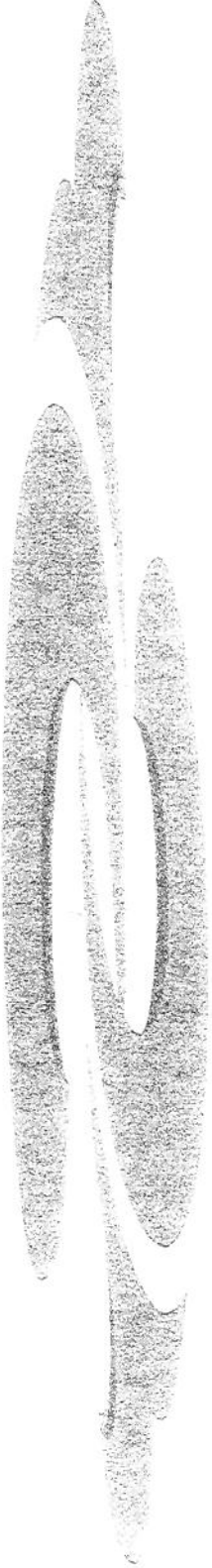
A infecção por bactérias gram (-) aumenta a oxidação de lipídeos (WOLFE & SHAW, 1985) e a relação entre disponibilidade plasmática de glicose e metabolismo lipídico pode estar alterada nestas condições (WOLFE, SHAW & DURKOT, 1985).

É fato bem estabelecido que na sepse ocorre elevação dos níveis circulantes de ácidos graxos livres (AGL) (WOLFE & SHAW, 1985, LANZA-JACOBY & ROSATO, 1994, CHAMBRIER, *et al.*, 2000, WOLFE & MARTINI, 2000), e o aumento da concentração plasmática de AGL está associado a diversos estados de resistência à insulina, incluindo diabetes tipo II e obesidade (REAVEN & CHEN, 1988), e o aumento artificial da concentração plasmática de AGL em indivíduos saudáveis pode induzir, agudamente, resistência à insulina (THIEBAUD, *et al.*, 1982, WOLFE, SHAW & DURKOT, 1985).

O estudo clássico de Randle (RANDLE, *et al.*, 1963) demonstrou a existência de um ciclo glicose-AGL, interligados de tal forma que um aumento nos níveis circulantes de AGL reduz a captação e oxidação da glicose. Os mecanismos moleculares para explicar

tal ciclo tiveram diversas interpretações ao longo desses quase 40 anos, mas recentemente demonstrou-se que a elevação dos níveis de AGL reduz a fosforilação do IRS-1 e a interação deste com a PI 3-quinase (DRESNER, *et al.*, 1999). Assim, é possível que o aumento dos níveis de AGL descrito em animais sépticos possa contribuir, pelo menos em parte, para justificar as alterações moleculares na via de transmissão do sinal da insulina em músculo desses animais.

Os resultados de nosso estudo demonstraram alterações nos níveis e grau de fosforilação do IRS-1 bem como na interação deste substrato com a PI 3-quinase em tecido muscular de ratos sépticos que podem ser consequência de múltiplos fatores. As alterações encontradas podem contribuir para a resistência a insulina existente nesses animais.

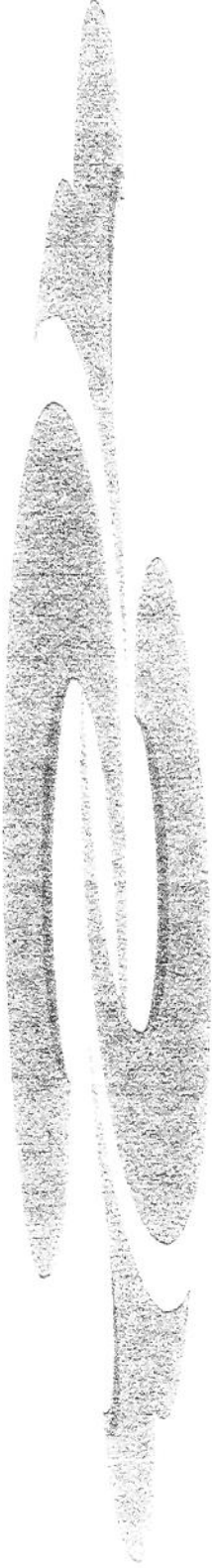


6. CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos em nosso estudo demonstram que não houve alterações nas etapas iniciais da ação insulínica em fígado, tecido adiposo e coração de ratos sépticos.

2. Demonstrou-se menores níveis teciduais e grau de fosforilação do IRS-1, bem como menor interação deste com a PI 3-quinase em músculo esquelético de ratos sépticos.

3. Essa regulação tecido-específica das vias de transmissão do sinal insulínico pode contribuir para a resistência à insulina observada nesses animais.

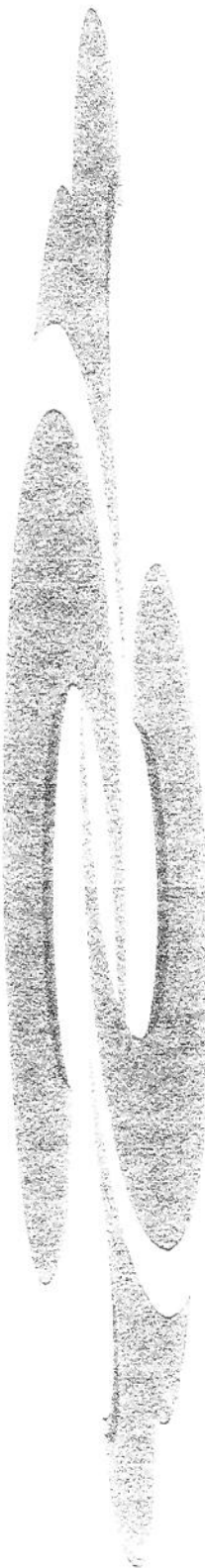


7. SUMMARY

Sepsis is known to induce insulin resistance, but the exact molecular mechanism involved is unknown. In the present study we have examined the levels and phosphorylation state of the insulin receptor and insulin receptor substrate 1 (IRS-1), as well as the association between IRS-1 and phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) in the liver, muscle, heart and fat of septic rats by immunoprecipitation and immunoblotting with anti-insulin receptor, anti-IRS-1, anti-PI 3-kinase and anti-phosphotyrosine antibodies.

There were no changes in the insulin receptor concentration and phosphorylation levels in any tissue of septic rats. IRS-1 protein levels were decreased to $61 \pm 12\%$ ($p < 0.05$) in muscle but not in other tissues of septic rats. In samples previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and blotted with antiphosphotyrosine antibody, the insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation levels in the muscle of septic rats decreased to $59 \pm 9\%$ ($p < 0.05$) and insulin-stimulated IRS-1 association with PI 3-kinase decreased to $56 \pm 7\%$ in muscle ($p < 0.05$), but no changes were seen in liver, heart or fat.

These data suggest that there is a tissue-specific regulation of early steps of insulin signal transduction in septic rats, and the changes observed in muscle may have a role in the insulin resistance of these animals.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMATRUDA, J., LIVINGSTON, J. & LOCKWOOD, D. - Cellular mechanisms in selected states of insulin resistance: human obesity, glucocorticoid excess, and chronic renal failure. **Diabetes Metab Rev**, **1**: p293-317, 1985.
- ARMSTRONG, M., et al. - Relationship between insulin sensitivity and insulin receptor substrate-1 mutations in non-diabetic relatives of NIDDM families. **Diabet Med**, **13**: p341-5, 1996.
- BACKER, J., et al. - Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **EMBO J**, **11**: p3469-79, 1992.
- BARON, A. & CLARK, M. - Role of blood flow in the regulation of muscle glucose uptake. **Annu Rev Nutr**, **17**: 487-99, 1997.
- BEGUM, N. & RAGOLIA, L. - Effect of tumor necrosis factor-alpha on insulin action in cultured rat skeletal muscle cells. **Endocrinology**, **137**: p2441-6, 1996.
- BERNIER, M., LAIRD, D. & LANE, M. - Insulin-activated tyrosine phosphorylation of a 15-kilodalton protein in intact 3T3-L1 adipocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **84**: p1844-8, 1987.
- BLACK, P., et al. - Mechanisms of insulin resistance following injury. **Ann Surg**, **196**: p420-35, 1982.
- BLOCK, N. & BUSE, M. - Effects of hypercortisolemia and diabetes on skeletal muscle insulin receptor function in vitro and in vivo. **Am J Physiol**, **256**: pE39-48, 1989.
- CAMPION, J., et al. - Tissue-specific modulation of insulin receptor mRNA levels in adrenaline-treated rats. **Mol Cell Biochem**, **169**: p165-9, 1997.
- CARPENTER, C. & CANTLEY, L. - Phosphoinositide kinases. **Biochemistry**, **29**: p11147-56, 1990.
- CHAMBRIER, C., et al. - Insulin sensitivity of glucose and fat metabolism in severe sepsis. **Clin Sci (Colch)**, **99**: p321-8, 2000.

- CHEATHAM, B. & KAHN, C. - Insulin action and the insulin signaling network. **Endocr Rev**, **16**: p117-42, 1995.
- CHEATHAM, B., et al. - Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. **Mol Cell Biol**, **14**: p4902-11, 1994.
- CLARKE, J., et al. - Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. **Biochem J**, **300** p631-5, 1994.
- COFFER, P., et al. - Comparison of the roles of mitogen-activated protein kinase kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in neutrophil effector function. **Biochem J**, **329** p121-30, 1998.
- COFFER, P., JIN, J. & WOODGETT, J. - Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. **Biochem J**, **335** p1-13, 1998.
- CUATRECASAS, P. - Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membranes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **69**: p1277-81, 1972.
- DEPIRRO, R., et al. - Effects of prednisolone and dexamethasone in vivo and in vitro: studies of insulin binding, deoxyglucose uptake and glucose oxidation in rat adipocytes. **Diabetologia**, **21**: p149-53, 1981.
- DRESNER, A., et al. - Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. **J Clin Invest**, **103**: p253-9, 1999.
- EBINA, Y., et al. - Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **84**: p704-8, 1987.
- ELLIS, L., et al. - Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. **Cell**, **45**: p721-32, 1986.

- FEHLMANN, M., et al. - Molecular association between major histocompatibility complex class I antigens and insulin receptors in mouse liver membranes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **82**: p8634-7, 1985.
- FEINSTEIN, R., et al. - Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. **J Biol Chem**, **268**: p26055-8, 1993.
- FOLLI, F., et al. - Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. **J Biol Chem**, **267**: p22171-7, 1992.
- FREYCHET, P., ROTH, J. & NEVILLE, D. - Insulin receptors in the liver: specific binding of (125 I)insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **68**: p1833-7, 1971.
- GELFAND, R., et al. - Role of counterregulatory hormones in the catabolic response to stress. **J Clin Invest**, **74**: p2238-48, 1984.
- GIORGINO, F., et al. - Glucocorticoid regulation of insulin receptor and substrate IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle in vivo. **J Clin Invest**, **91**: p2020-30, 1993.
- GUO, D. & DONNER, D. - Tumor necrosis factor promotes phosphorylation and binding of insulin receptor substrate 1 to phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. **J Biol Chem**, **271**: p615-8, 1996.
- HARA, K., et al. - 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **91**: p7415-9, 1994.
- HARUTA, T., et al. - Insulin-stimulated GLUT4 translocation is mediated by a divergent intracellular signaling pathway. **J Biol Chem**, **270**: p27991-4, 1995.

- HAYAKAWA, M., et al. - Arachidonic acid-selective cytosolic phospholipase A2 is crucial in the cytotoxic action of tumor necrosis factor. **J Biol Chem**, **268**: p11290-5, 1993.
- HENDERSON, A., et al. - Dose-response relationships for the effects of insulin on glucose and fat metabolism in injured patients and control subjects. **Clin Sci (Colch)**, **80**: p25-32, 1991.
- HOTAMISLIGIL, G. - Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, **107**: p119-25, 1999.
- HOTAMISLIGIL, G., et al. - Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**, **95**: p2409-15, 1995.
- HOTAMISLIGIL, G., et al. - IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. **Science**, **271**: p665-8, 1996.
- HOTAMISLIGIL, G., SHARGILL, N. & SPIEGELMAN, B. - Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, **259**: p87-91, 1993.
- HOTAMISLIGIL, G. & SPIEGELMAN, B. - Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. **Diabetes**, **43**: p1271-8, 1994.
- KAHN, C. & GOLDFINE, A. - Molecular determinants of insulin action. **J Diabetes Complications**, **7**: p92-105, 1993.
- KAHN, C. & WHITE, M. - The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. **J Clin Invest**, **82**: p1151-6, 1988.
- KANETY, H., et al. - Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. **J Biol Chem**, **270**: p23780-4, 1995.

- KARASIK, A., et al. - Lipocortins 1 and 2 as substrates for the insulin receptor kinase in rat liver. *J Biol Chem*, 263: p11862-7, 1988.
- KASUGA, M., et al. - Insulin stimulation of phosphorylation of the beta subunit of the insulin receptor. Formation of both phosphoserine and phosphotyrosine. *J Biol Chem*, 257: p9891-4, 1982.
- KATHURIA, S., et al. - Differential sensitivity of two functions of the insulin receptor to the associated proteolysis: kinase action and hormone binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: p8570-4, 1986.
- KRODER, G., et al. - Tumor necrosis factor-alpha- and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *J Clin Invest*, 97: p1471-7, 1996.
- KUHNE, M., et al. - The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *J Biol Chem*, 268: p11479-81, 1993.
- LAEMMLI, U. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: p680-5, 1970.
- LANZA-JACOBY, S. & ROSATO, E. - Regulatory factors in the development of fatty infiltration of the liver during gram-negative sepsis. *Metabolism*, 43: p691-6, 1994.
- LOTT, J. & TURNER, K. - Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clin Chem*, 21: p1754-60, 1975.
- MASSAGUE, J., PILCH, P. & CZECH, M. - Electrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unique subunit stoichiometries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77: p7137-41, 1980.
- MICHIE, H., et al. - Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med*, 318: p1481-6, 1988.

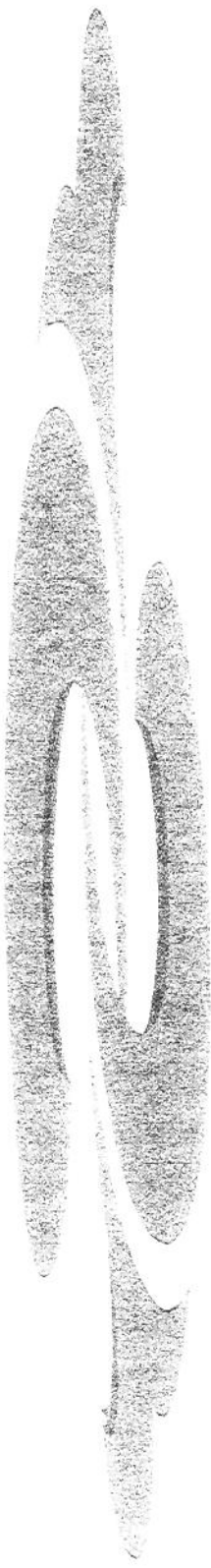
- MYERS, M. & WHITE, M. - Insulin signal transduction and the IRS proteins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, **36**: 615-58, 1996.
- NELSON, K. & TURINSKY, J. - Analysis of postburn insulin unresponsiveness in skeletal muscle. **J Surg Res**, **31**: p404-14, 1981.
- NOLTE, L., et al. - Short-term exposure to tumor necrosis factor-alpha does not affect insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. **Diabetes**, **47**: p721-6, 1998.
- OFFNER, F., et al. - Serum tumor necrosis factor levels in patients with infectious disease and septic shock. **J Lab Clin Med**, **116**: p100-5, 1990.
- QUON, M., et al. - Insulin receptor substrate 1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4 translocation in transfected rat adipose cells. **J Biol Chem**, **269**: p27920-4, 1994.
- RANDLE, P., et al. - The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances in diabetes mellitus. **Lancet**, **1**: 785-89, 1963.
- RANNELS, S. & JEFFERSON, L. - Effects of glucocorticoids on muscle protein turnover in perfused rat hemicorpus. **Am J Physiol**, **238**: pE564-72, 1980.
- RATTIGAN, S., CLARK, M. & BARRETT, E. - Hemodynamic actions of insulin in rat skeletal muscle: evidence for capillary recruitment. **Diabetes**, **46**: p1381-8, 1997.
- REAVEN, G. & CHEN, Y. - Role of abnormal free fatty acid metabolism in the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Am J Med**, **85**: p106-12, 1988.
- REEVES, P., NIELSEN, F. & FAHEY, G. - AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, **123**: p1939-51, 1993.

- RICE, K. & GARNER, C. - Correlation of the insulin receptor substrate-1 with insulin-responsive deoxyglucose transport in 3T3-L1 adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, **198**: p523-30, 1994.
- ROTHENBERG, P., WHITE, M. & KAHN, C. - The insulin receptor tyrosine kinase. In: P Cuatrecasas & S Jacobs, eds. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 92. Berlin:Springer-verlag, 209-43, 1990.
- SAAD, M., et al. - Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. **J Clin Invest**, **90**: p1839-49, 1992.
- SAAD, M., et al. - Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. **J Clin Invest**, **92**: p2065-72, 1993.
- SAAD, M., et al. - Effect of glucose ingestion on peripheral glucose metabolism in normal man. **Diabete Metab**, **15**: p5-10, 1989.
- SAGHIZADEH, M., et al. - The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. **J Clin Invest**, **97**: p1111-6, 1996.
- SANCHEZ-MARGALET, V., et al. - Role of phosphatidylinositol-3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor, LY294002. **Biochem Biophys Res Commun**, **204**: p446-52, 1994.
- SHANGRAW, R., et al. - Differentiation between septic and postburn insulin resistance. **Metabolism**, **38**: p983-9, 1989.
- SHANGRAW, R., et al. - Pyruvate dehydrogenase inactivity is not responsible for sepsis-induced insulin resistance. **Crit Care Med**, **24**: p566-74, 1996.
- SHAW, J. & WOLFE, R. - Determinations of glucose turnover and oxidation in normal volunteers and septic patients using stable and radio-isotopes: the response to glucose infusion and total parenteral feeding. **Aust N Z J Surg**, **56**: p785-91, 1986.

- STEPHENS, J., LEE, J. & PILCH, P. - Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. **J Biol Chem**, **272**: p971-6, 1997.
- STEPHENS, J. & PEKALA, P. - Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. **J Biol Chem**, **266**: p21839-45, 1991.
- STEPHENS, J. & PILCH, P. - The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT4, the major insulin-responsive glucose transporter. **Endocr Rev**, **16**: p529-46, 1995.
- SUN, X., et al. - Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. **J Biol Chem**, **267**: p22662-72, 1992.
- SUN, X., et al. - Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, **352**: p73-7, 1991.
- TANTI, J., et al. - Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. **J Biol Chem**, **269**: p6051-7, 1994.
- THIEBAUD, D., et al. - Effect of long chain triglyceride infusion on glucose metabolism in man. **Metabolism**, **31**: p1128-36, 1982.
- THIRONE, A., et al. - Regulation of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of Shc and IRS-1 in the muscle of rats: effect of growth hormone and epinephrine. **FEBS Lett**, **421**: p191-6, 1998.
- THORELL, A., et al. - Insulin resistance after abdominal surgery. **Br J Surg**, **81**: p59-63, 1994.
- TOWBIN, H., STAEGELIN, T. & GORDON, J. - Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **76**: p4350-4, 1979.

- WESTFALL, M. & SAYEED, M. - Skeletal muscle calcium uptake in bacteremic rats. **Am J Physiol**, **256**: pR201-6, 1989.
- WHITE, M., et al. - Kinetic properties and sites of autophosphorylation of the partially purified insulin receptor from hepatoma cells. **J Biol Chem**, **259**: p255-64, 1984.
- WHITE, M., MARON, R. & KAHN, C. - Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. **Nature**, **318**: p183-6, 1985.
- WHITE, M., et al. - A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. **J Biol Chem**, **263**: p2969-80, 1988.
- WHITE, M., TAKAYAMA, S. & KAHN, C. - Differences in the sites of phosphorylation of the insulin receptor in vivo and in vitro. **J Biol Chem**, **260**: p9470-8, 1985.
- WHITE, R., et al. - Hormonal and metabolic responses to glucose infusion in sepsis studied by the hyperglycemic glucose clamp technique. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, **11**: p345-53, 1987.
- WILDEN, P., et al. - Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. **J Biol Chem**, **267**: p16660-8, 1992.
- WOLFE, R. & MARTINI, W. - Changes in intermediary metabolism in severe surgical illness. **World J Surg**, **24**: p639-47, 2000.
- WOLFE, R. & SHAW, J. - Glucose and FFA kinetics in sepsis: role of glucagon and sympathetic nervous system activity. **Am J Physiol**, **248**: pE236-43, 1985.
- WOLFE, R., SHAW, J. & DURKOT, M. - Effect of sepsis on VLDL kinetics: responses in basal state and during glucose infusion. **Am J Physiol**, **248**: pE732-40, 1985.
- YAMAUCHI, K. & PESSIN, J. - Insulin receptor substrate-1 (IRS1) and Shc compete for a limited pool of Grb2 in mediating insulin downstream signaling. **J Biol Chem**, **269**: p31107-14, 1994.

- YAMAUCHI, T., et al. - Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. **Mol Cell Biol**, **16**: p3074-84, 1996.
- YEH, J., et al. - The effects of wortmannin on rat skeletal muscle. Dissociation of signaling pathways for insulin- and contraction-activated hexose transport. **J Biol Chem**, **270**: p2107-11, 1995.
- YKI-JARVINEN, H. - Acute and chronic effects of hyperglycaemia on glucose metabolism. **Diabetologia**, **33**: p579-85, 1990.
- YKI-JARVINEN, H. & UTRIAINEN, T. - Insulin-induced vasodilatation: physiology or pharmacology? **Diabetologia**, **41**: p369-79, 1998.
- YOUD, J., RATTIGAN, S. & CLARK, M. - Acute impairment of insulin-mediated capillary recruitment and glucose uptake in rat skeletal muscle in vivo by TNF-alpha. **Diabetes**, **49**: p1904-9, 2000.
- YU, K. & CZECH, M. - Tyrosine phosphorylation of the insulin receptor beta subunit activates the receptor-associated tyrosine kinase activity. **J Biol Chem**, **259**: p5277-86, 1984.
- ZELLER, W., et al. - Glucose transporters (GLUT1, 2, & 4) in fat, muscle and liver in a rat model of endotoxic shock. **Biochem Biophys Res Commun**, **198**: p923-7, 1994.
- ZENSER, T., et al. - Infection-induced hyperglucagonemia and altered hepatic response to glucagon in the rat. **Am J Physiol**, **227**: p1299-305, 1974.
- ZIERATH, J., et al. - C-peptide stimulates glucose transport in isolated human skeletal muscle independent of insulin receptor and tyrosine kinase activation. **Diabetologia**, **39**: p306-13, 1996.



9. PUBLICAÇÕES

Tissue-specific regulation of early steps in insulin action in septic rats

André L.B. Nunes, José B.C. Carnevalheira, Carla R.O. Carvalho,
Sigisfredo L. Brenelli, Mario J.A. Saad*

*Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, SP, Brasil*

Received 23 January 2001; accepted 23 April 2001

Abstract

Sepsis is known to induce insulin resistance, but the exact molecular mechanism involved is unknown. In the present study we have examined the levels and phosphorylation state of the insulin receptor and of insulin receptor substrate 1 (IRS-1), as well as the association between IRS-1 and phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) in the liver and muscle of septic rats by immunoprecipitation and immunoblotting with anti-insulin receptor, anti-IRS-1, anti-PI 3-kinase and anti-phosphotyrosine antibodies. There were no changes in the insulin receptor concentration and phosphorylation levels in the liver and muscle of septic rats. IRS-1 protein levels were decreased by $40 \pm 3\%$ ($p < 0.01$) in muscle but not in liver of septic rats. In samples previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and blotted with antiphosphotyrosine antibody, the insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation levels in the muscle of septic rats decreased by $38 \pm 5\%$ ($p < 0.01$) and insulin-stimulated IRS-1 association with PI 3-kinase decreased by $44 \pm 7\%$ in muscle ($p < 0.01$) but no changes were seen in liver. These data suggest that there is a tissue-specific regulation of early steps of insulin signal transduction in septic rats, and the changes observed in muscle may have a role in the insulin resistance of these animals. © 2001 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Insulin action; Insulin receptor substrate-1; Insulin resistance; Sepsis; Tyrosine phosphorylation

Introduction

Gram-negative infection produces characteristic alterations in carbohydrate metabolism that are observed under experimental and clinical conditions [1, 2]. A hallmark of various stress states is a decreased ability of insulin to stimulate glucose uptake [2, 3]. The occur-

* Corresponding author. Departamento de Clínica Médica, FCM—UNICAMP, Campinas, SP, CEP 13083-970, Brasil. Fax: (55)-(19)-37888950.

E-mail address: msaad@head.fcm.unicamp.br (M.J.A. Saad)

0024-3205/01/\$ – see front matter © 2001 Elsevier Science Inc. All rights reserved.
PII: S0024-3205(01)01288-7

rence of insulin resistance during sepsis is evidenced by diminished glucose tolerance and hyperinsulinemia [4, 5]. Factors that have been implicated in the development of insulin resistance during sepsis include the stress response of fever, catabolism, and elevated levels of hormonal antagonists of insulin action such as growth hormone, catecholamines, cortisol, and glucagon [6, 7]. Despite the wide acceptance of these concepts, there is a relative paucity of information about the site and the molecular mechanisms involved in the alterations of insulin action in sepsis.

In recent years, our understanding of the molecular mechanisms of insulin action has increased as evidence of the complex signaling pathways and multiple isoforms of key signaling molecules has accumulated. The initial mechanism of insulin action involves binding of the hormone to specific cell surface receptors, which leads to the autophosphorylation and activation of an intrinsic tyrosine kinase of the insulin receptor (IR) β -subunit [8, 9].

This tyrosine kinase subsequently phosphorylates proteins known as insulin receptor substrates (IRS-1 and IRS-2) [9, 10]. IRS proteins act as messenger molecules activated receptors to signaling proteins with Src homology 2 (SH2) domains, which are important steps in insulin action. After stimulation by insulin, IRS-1 associates with several proteins, including phosphatidylinositol (PI) 3-kinase, phosphotyrosine phosphatase Syp, and adapter molecules as Nck, Grb2, and Fyn [11, 12, 13].

The enzyme PI 3-kinase is one of the best studied SH2 domain proteins, and has been shown to play a critical role in many of the metabolic effects of the insulin, including stimulation of glucose transport, activation of glycogen synthase, and inhibition of phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK), the key enzyme of gluconeogenesis [8].

In different animal models of insulin resistance our laboratory have demonstrated changes in the early steps of insulin action in the liver and muscle which may have a role in the molecular mechanism of reduced sensitivity to this hormone [14–17]. Little is known about the regulation of early steps in insulin action in an animal model of sepsis. The aim of this study was to investigate the insulin-induced IR and IRS-1 tyrosine phosphorylation levels and association of the latter with PI 3-kinase in liver and muscle of septic rats.

Methods

Materials

Reagents for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA). N-2-Hydroxyethyl-piperazine-N-2 ethanesulfonic acid (HEPES), phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), aprotinin, dithiotreitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, glycerol and bovine serum albumin (BSA, fraction V) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Protein A-Sepharose 6MB and ^{125}I -protein A were from Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd. (Buckinghamshire, UK). and nitrocellulose paper (BA8S, 0.2 mm) was from Schleicher & Schuell. Sodium amobarbital (Amytal) and human recombinant insulin (Humulin R) were from Eli Lilly. Monoclonal antiphosphotyrosine antibody and anti-PI 3-kinase antiserum was from UBI (Lake Placid, NY). Anti-insulin receptor antibody and anti-IRS-1 antibodies were from Santa Cruz biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA)

Animals and tissue extracts

Male rats (150 – 180 g) were allowed access to standard rodent chow and water *ad libitum*. Initially, the animals were anaesthetized with ether and made septic by ligature and cecum puncture as described by Pedersen et al. [18]. The animals were studied after 20–24 h of induced sepsis. The studies were performed in parallel for the control and septic rats in each pair.

The rats were anaesthetized with sodium amobarbital (15 mg/kg body weight intraperitoneal) and used as soon as anesthesia was assured by loss of the pedal and corneal reflexes. The abdominal cavity was opened, the portal vein exposed and 0.5 ml of normal saline (0.9% NaCl) with or without 6 μ g of insulin was injected.

Thirty seconds later, the livers were removed, minced coarsely and homogenized immediately in approximately 10 volumes of solubilization buffer at 4° C using a Polytron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments model PT 10/35) operated at maximum speed (setting 10) for 40 seconds. The solubilization buffer was composed of 50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF, 0.1 mg/ml aprotinin and 1% triton X-100.

Approximately 90 s after insulin injection, hindlimb muscles were excised and homogenized with a Polytron in 6 volumes of solubilization buffer at 4°C. The extracts were centrifuged at 55000 r.p.m. at 4°C in a Beckman 70.1 Ti rotor for 60 min to remove insoluble material and the supernatant was used for immunoprecipitation with anti IR and IRS-1 antibodies and protein A sepharose 6-MB.

Protein analysis by immunoblotting

After immunoprecipitation the samples were treated with Laemmli sample buffer [19] containing 100 mM DTT and heated in a boiling water bath for 4 min and then subjected to SDS-PAGE (6% Tris acrylamide) in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus. The electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 2 h at 120 V (constant) using a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean) as described by Towbin et al. [20] but with 0.02 % SDS added to the transfer buffer to enhance the elution of high molecular mass proteins. Non-specific 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). Prestained molecular weight standards were myosin (205 kDa), galactosidase (116 kDa), bovine serum albumin (80 kDa) and ovalbumin (49.5 kDa).

The nitrocellulose blot was incubated with antiphosphotyrosine antibodies, anti-insulin receptor antibodies, with anti-IRS-1 antibodies or anti-PI 3-kinase antibodies diluted in blocking buffer for 4 h at 22°C and washed for 60 min in blocking buffer without BSA. The blots were then incubated with 2 μ Ci of [¹²⁵I] protein A (30 μ Ci/ μ g) in 10 ml of blocking buffer for 4 h at 22°C and washed for 60 min in blocking buffer without BSA. Protein A bound to the antiphosphotyrosine, anti-IRS-1, and anti- PI-3-kinase antibodies were detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film with Cronex Lighting Plus intensifying screens at – 70°C for 12–48 h. Band intensities were quantitated by optical densitometry (Molecular Dynamics) of the developed autoradiographs.

Other

Protein determination was performed by the Bradford dye method [21] using the Bio-Rad reagent and BSA as the standard.

The plasma glucose concentrations were measured by the oxidase method. Plasma insulin levels were measured by double-antibody radiimmunoassay (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, Calif., USA).

Statistics

Experiments were always performed by analyzing samples from the septic animals in parallel with a control group. Comparisons were made using Student's unpaired *t* test. The level of significance selected was $P < 0.05$.

Results

Animal characteristics

Fasting plasma glucose concentrations were similar in control and in septic rats (C: 6.11 ± 0.38 X S: 6.44 ± 0.66 mmol/l), and fasting serum insulin concentrations were higher in septic rats than in controls (C: 1.91 ± 0.37 X S: 3.05 ± 0.26 pmol/l). Thus the serum insulin concentration was inappropriately high for the plasma glucose concentrations in septic rats. [insulin-to-glucose ratio (pmol/mmol 0.47 in septic rats vs. 0.31 in control rats), suggesting a state of insulin resistance.

The effect of sepsis on insulin receptor and IRS-1 phosphorylation in rat muscle

In septic rats, there were no changes in the insulin receptor levels in muscle as shown by immunoblotting with anti-insulin receptor antibody (Fig. 1A). In samples from muscle previously immunoprecipitated with anti-IR antibody and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody, insulin-induced insulin receptor phosphorylation in septic rats was similar to that of controls (Fig. 1B).

On the other side, the levels of IRS-1 protein in muscle detected by immunoblotting were reduced by $40 \pm 3\%$ ($P < 0.01$) in septic rats (Fig. 2A). In samples from muscle previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody, there was a clear decrease in insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation by $38 \pm 5\%$ ($P < 0.01$) in septic rats. (Fig. 2B). Previous studies [11, 12, 22] have suggested that there is a relatively stable, high affinity interaction between IRS-1 and the 85 kDa subunit of the PI 3-kinase, such that antibodies to either protein coprecipitate both proteins. In samples from muscle previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with antibody against the 85 kDa subunit of PI 3-kinase, there was little or no detectable PI 3-kinase immunoreactivity in the basal state in either the normal or septic animals (Fig. 2C). After insulin stimulation, a band with the expected molecular weight of the regulatory subunit of the PI 3-kinase (85 kDa) was present in anti-IRS-1 antibody immunoprecipitates of muscle from both groups of rats. This observation is consistent with a stable association of IRS-1 and PI 3-kinase. However, the amount of PI 3-kinase associated with IRS-1 was reduced to $56 \pm 7\%$

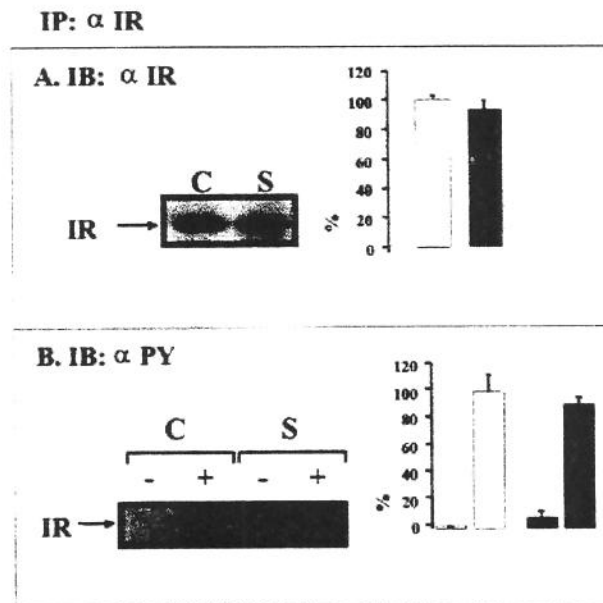


Fig. 1. Insulin receptor protein and tyrosine phosphorylation levels in muscle of control and septic rats. The proteins were isolated with extraction buffer, as described in Methods, and kept on ice. After centrifugation, aliquots of the supernatant were immunoprecipitated with anti-IR antibody and immunoblotted with anti-IR (A) and antiphosphotyrosine (B) antibodies and [125 I] protein A, and then subjected to autoradiography. Scanning densitometry was performed on autoradiograms of seven experiments for IR protein levels and seven experiments for IR tyrosine phosphorylation. Data are expressed as mean $\pm$ SEM and are normalized for protein contents. * $p < 0.01$.

($P < 0.01$) in septic rats, thus suggesting a reduced association between IRS-1 and PI 3-kinase (Fig. 2C).

The effect of sepsis on insulin receptor and IRS-1 phosphorylation in rat liver

As determined by immunoblotting there was no change in the hepatic insulin receptor protein levels in septic animals (C: 100 ± 3 X S: 92.2 ± 5 %). After insulin treatment, insulin receptor phosphorylation in liver was similar in control and septic rats. (C: 100 ± 6 X S: 94.9 ± 4 %) (Fig 3).

The levels of IRS-1 protein in liver detected by immunoblotting were similar in control and in septic rats (C: 100 ± 4 X S: 106 ± 3 %) (Fig. 4A). To better define the levels of IRS-1 phosphorylation, we performed Western blot analysis of tyrosyl-phosphorylated proteins in anti-IRS-1 immunoprecipitates before and after stimulation with insulin in both groups of animals. Figure 4B shows that there is no change in insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation in the liver of septic animals, when compared with controls (C: 79 ± 3 X S: 89.2 ± 5 %). To examine the association of the 85 kDa subunit of PI 3-kinase with IRS-1, the same blot was incubated with anti PI 3 kinase antibody. As expected, in both groups, a band of 85 kDa was present in the IRS-1 immunoprecipitates after exposure to insulin, but the intensity of the bands were similar in both groups (C: 80 ± 4 X S: 86.1 ± 3 %) (Fig. 4C). This result suggests that sepsis does not alter the association between IRS-1 and PI 3-kinase in liver.

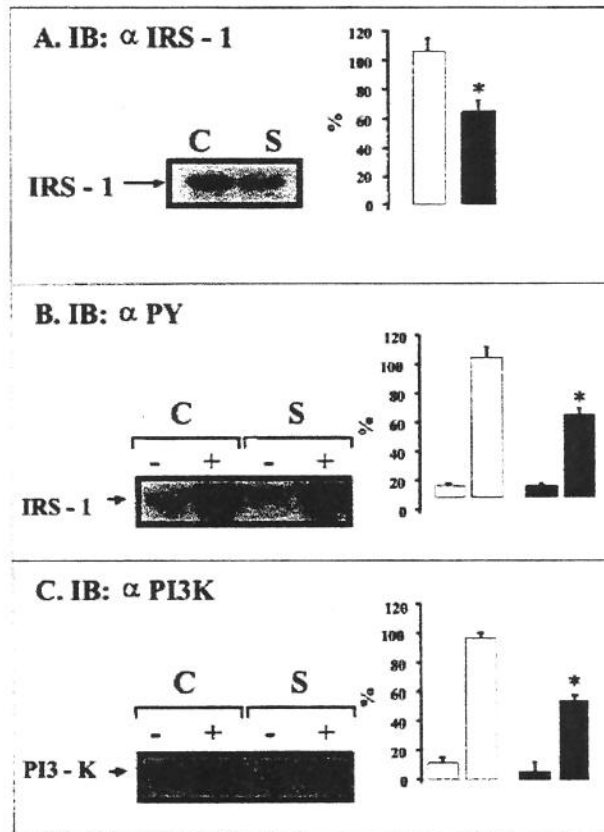
IP: α IRS - 1

Fig. 2. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 and its association with PI 3-kinase in the muscle of control and septic rats. The proteins were isolated with extraction buffer, as described in Methods, and kept on ice. After centrifugation, aliquots of the supernatant were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with anti-IRS-1 (A), antiphosphotyrosine (B) and PI 3-kinase (85 kDa subunit) (C) antibodies and [125 I] protein A, and then subjected to autoradiography. Scanning densitometry was performed on autoradiograms of nine experiments for IRS-1 protein levels and phosphorylation and nine experiments for the association between IRS-1 and PI 3-kinase. Data are expressed as mean $\pm$ SEM and are normalized for protein contents. * $p < 0.01$.

Discussion

Whole body insulin resistance has been demonstrated in septic patients and in the infected animals [3, 4]. It was previously demonstrated that gram-negative sepsis in the rat decreased insulin action in extrahepatic tissues while not altering the insulin-induced suppression of hepatic glucose output [23]. Although skeletal muscle represents a large percentage of the total body mass and is an insulin-sensitive tissue, these data only imply that muscle is the primary site of the sepsis-induced whole body insulin resistance. Muscle insulin resistance has been demonstrated in a canine model of chronic hypermetabolic sepsis, by isolating the gracilis muscle in situ and infusing insulin directly into the muscle bed (24). Similarly, a decreased glucose uptake by muscle following a maximally stimulating dose of insulin has also been

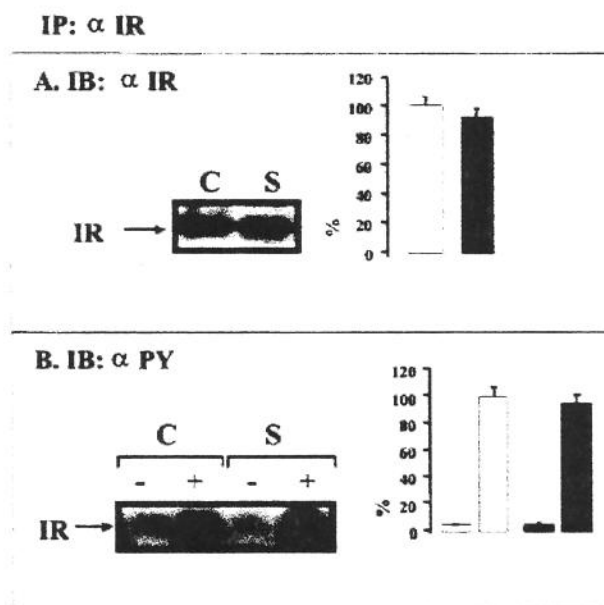


Fig. 3. Insulin receptor protein and tyrosine phosphorylation levels in liver of control and septic rats. The proteins were isolated with extraction buffer, as described in Methods, and kept on ice. After centrifugation, aliquots of the supernatant were immunoprecipitated with anti-IR antibody and immunoblotted with anti-IR (A) and antiphosphotyrosine (B) antibodies and [125 I] protein A, and then subjected to autoradiography. Scanning densitometry was performed on autoradiograms of six experiments for IR protein levels and six experiments for IR tyrosine phosphorylation. Data are expressed as mean $\pm$ SEM and are normalized for protein contents. * $p < 0.01$.

observed during endotoxic and bacteremic shock in dogs (25, 26). Lang et al. (27) demonstrated in rats that a decrease rate of insulin-mediated glucose uptake in muscle is primarily responsible for the whole body insulin resistance seen during hypermetabolic sepsis, and that the impairment of insulin action in skeletal muscle is not dependent on the fiber type or to changes in blood flow.

Our results indicate that sepsis has no significant effect on insulin receptor protein and tyrosine phosphorylation levels in the two tissues studied. However, insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation levels and association with PI 3-kinase is reduced in muscle but not in liver, suggesting a tissue-specific regulation of these pathways in septic rats. The alterations described in early steps in insulin action in muscle may have an important role in the insulin resistance observed in septic rats.

Insulin increases glucose uptake into cell, in part by causing translocation of GLUT4 from intracellular compartments to the plasma membrane in muscle (28). At present, only one downstream signaling molecule is unequivocally essential for insulin-stimulated GLUT4 translocation, the PI 3-kinase (29). Multiple studies using various pharmacological inhibitors, microinjection of blocking antibodies, and expression of dominant-interfering and constitutively active mutants are all consistent with a necessary role for PI 3-kinase activity in insulin-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation (28). Several studies have suggested that the interaction of IRS-1 with PI 3-kinase is necessary for the appropriate activation and/or

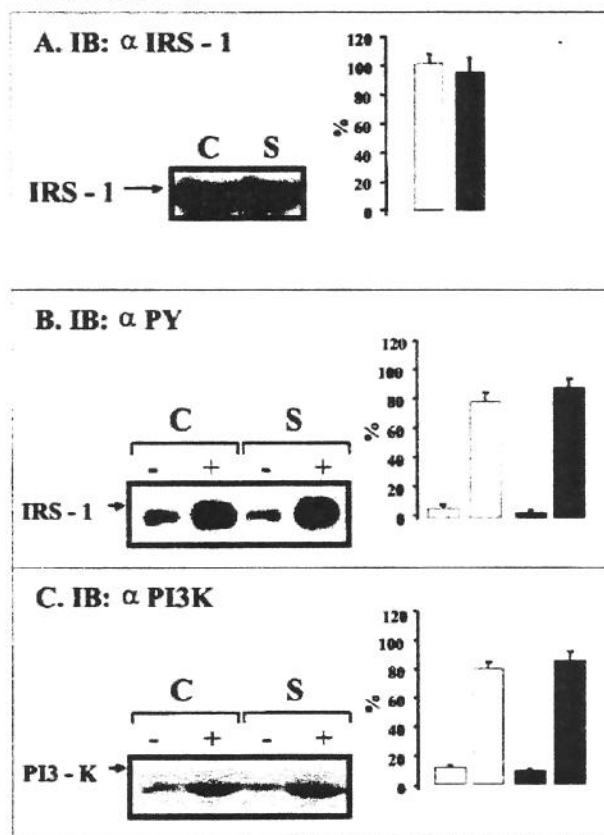
IP: α IRS - 1

Fig. 4. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 and its association with PI 3-kinase in the liver of control and septic rats. The proteins were isolated with extraction buffer, as described in Methods, and kept on ice. After centrifugation, aliquots of the supernatant were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with anti-IRS-1 (A), antiphosphotyrosine (B) and PI 3- kinase (85 kDa subunit) (C) antibodies and [125 I] protein A, and then subjected to autoradiography. Scanning densitometry was performed on autoradiograms of seven experiments for IRS-1 protein levels and phosphorylation and seven experiments for the association between IRS-1 and PI 3-kinase. Data are expressed as mean $\pm$ SEM and are normalized for protein contents. * $p < 0.01$.

targeting of the enzyme to a critical intracellular site, perhaps including its association with GLUT4 vesicles (29). Thus, it is reasonable to suggest that the IRS-1/PI 3-kinase pathway may be linked to the activation of glucose transport in muscle and that a reduction in this association in sepsis may have a role in the insulin resistance observed in these animals.

The mechanism(s) whereby sepsis induces these alterations are unknown but the increased levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) may have a role. TNF- α has previously been reported to diminish insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation in hepatocytes and adipocytes, resulting in impaired insulin action (30–32). Recently it was demonstrated that TNF- α decreased insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation and activation of PI 3-kinase in C2C12 muscle cells (33). These alterations on early steps in insulin action are probably

related to TNF- α induced IRS-1 serine phosphorylation, which can attenuates insulin signal transduction (30).

In summary, this study has shown a reduced insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation and association with PI 3-kinase in muscle of septic rats. These data suggest that changes in these early steps in insulin signal transduction in muscle may have a role in the insulin resistance observed in these animals.

Acknowledgments

The authors thank Luiz Janeri and Conceição A. Silva for their technical assistance. This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-PRONEX).

References

1. Kinney JM, Felig P: The metabolic response to injury and infection. *Endocrinology* 1979; 3 ():1963–1985.
2. Lang CH, Dobrescu C: Sepsis-induced changes in “in vivo” insulin action in diabetic rats. *American Journal of Physiology* 1989; 257 (3 Pt 1):E301–E308.
3. Shangraw RE, Jahoor F, Miyoshi H, Neff WA, Stuart CA, Herndon DN, Wolfe RR: Differentiation between septic and postburn insulin resistance. *Metabolism* 1989; 38 (10):983–989.
4. White RH, Frayn KN, Little RA, Threlfall CJ, Stoner HB, Irving MH: Hormonal and metabolic responses to glucose infusion in sepsis studies by the hyperglycemic glucose clamp technique. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition* 1987; 11 (4):345–353.
5. Westfall MV, Sayeed MM: Basal and insulin-stimulated skeletal muscle sugar transport in endotoxin and bacteremia rats. *American Journal of Physiology* 1988; 254 (4 Pt 2):R673–R679.
6. Gelfand RA, Matthews DE, Bier DM, Sherwin RS: Role of counter-regulatory hormones in the catabolic response to stress. *The Journal of Clinical Investigation* 1984; 74 (6):2238–2248.
7. Zenser TV, DeRubertis FR, George DT, Rayfield EJ: Infection-induced hyperglucagonemia and altered hepatic response to glucagon in the rat. *American Journal of Physiology* 1974; 227 (6):1299–1305.
8. Cheatham B, Kahn CR: Insulin action and the insulin signaling network. *Endocrine Reviews* 1995; 16 (2): 117–142.
9. Myers MG Jr, White MF: New frontiers in insulin receptor substrate signaling. *Trends in endocrinology and metabolism* TEM 1995; 6:209–215.
10. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF: The structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991; 352 (6330):73–77.
11. Backer JM, Myers MG Jr, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Schlessinger J, et al: Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *The EMBO journal* 1992; 11 (9):3469–3479.
12. Hadari YR, Tzahar E, Nadiv O, Rothenberg P, Robert CT Jr, LeRoith D, Yarden Y, Zick Y: Insulin and insulin-mimetic agents induce activation of phosphatidylinositol 3'-kinase upon its association with pp185 (IRS-1) in intact rat livers. *The Journal of Biological Chemistry* 1992; 267 (25):17483–17486.
13. Myers MG Jr, White MF: Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1996; 36:615–658.
14. Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ: Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* 1996; 137 (1):151–159.

15. Folli F, Saad MJ, Kahn CR: Insulin receptor/IRS-1/PI 3-kinase signaling system in corticosteroid-induced insulin resistance. *Acta diabetologica* 1996; 33 (3):185–192.
16. Saad MJ, Hartmann LG, de Carvalho DS, Galoro CA, Brenelli SL, Carvalho CR: Effect of glucagon on insulin receptor substrate-1 (IRS-1) phosphorylation and association with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase). *FEBS letters* 1995; 370 (1–2):131–134.
17. Saad MJ, Folli F, Kahn JA, Kahn CR: Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *The Journal of Clinical Investigation* 1993; 92 (4):2065–2072.
18. Pedersen PV, Warner BW, Bjornson HS, Hiyama DT, Li S, Rigel DF, Hasselgren PO, Fisher JE: Hemodynamic and metabolic alterations during experimental sepsis in young and adult rats. *Surgery, gynecology & obstetrics* 1989; 168 (2):145–156.
19. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227 (259):680–685.
20. Towbin H, Staehelin J, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 1992; 24:145–9.
21. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976; 72:248–254.
22. Folli F, Saad MJ, Backer JM, Kahn CR: Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *The Journal of Biological Chemistry* 1992; 267 (31):22171–22177.
23. Lang CH, Dobrescu C: In vivo insulin resistance during nonlethal hypermetabolic sepsis. *Circulatory shock* 1989; 28 (2):165–178.
24. Raymond RM, Klein DM, Gibbons DA, Jacobs HK, Emerson TE Jr: Skeletal muscle insulin unresponsiveness during chronic hyperdynamic sepsis in the dog. *The Journal of trauma* 1985; 25 (9):845–855.
25. Raymond RM, Harkema JM, Emerson TE Jr: In vivo skeletal muscle insulin resistance during E coli endotoxin shock in the dog. *Circulatory shock* 1981; 8 (4):425–433.
26. Raymond RM, Harkema JM, Emerson TE Jr: Skeletal muscle insulin resistance during Escherichia coli bacteremic shock in the dog. *Surgery* 1981; 90 (5):853–859.
27. Lang CH, Dobrescu C, Meszaros K: Insulin-mediated glucose uptake by individual tissues during sepsis. *Metabolism* 1990; 39 (10):1096–1107.
28. Czech MP, Corvera S: Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274 (38):1865–1868.
29. Pessin JE, Saltiel AR: Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 2000; 106 (2):165–169.
30. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM: IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271 (5249):665–668.
31. Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A: Tumor necrosis factor α -induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *The Journal of Biological Chemistry* 1995; 270 (40):23780–23784.
32. Paz K, Hemi R, Le Roith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y: A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272 (47):29911–29918.
33. del Aguila LF, Claffey KP, Kirwan JP: TNF- α impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. *American Journal of Physiology* 1999; 276 (5 Pt 1):E849–E855.