

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
	F/Unicamp
	T349r
V.	
	299,35
	282/97
C	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/04/97
N.º CPD	

CM-00097607-3

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

Thirone, Ana Cláudia Pelegrinelli

T349r Regulação da transmissão do sinal insulínico em fígado e músculo de ratos tratados cronicamente com hormônio do crescimento / Ana Cláudia Pelegrinelli Thirone. Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Mario José Abdalla Saad

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

1. Insulina. 2. Hormônio do crescimento. 3. Receptores de insulina. I. Mario José Abdalla Saad. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof.Dr. Mario José Abdalla Saad

Membros:

1. Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad

2. Prof. Dr. Milton Foss

3. Prof. Dr. Antonio Carlos Boschetto

Curso de pós-graduação em Medicina, Área de Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 14/11/96

*Aos meus pais,
Celso e Rita, e ao meu
esposo André Luiz*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad que tem mostrado a possibilidade da conciliação entre a prática médica e a pesquisa básica aplicada pois, com seu exemplo pessoal, demonstra como fazê-lo de forma brilhante e eficaz.

Ao meu pai, Celso, meu primeiro e maior exemplo de que a medicina requer sempre muita dedicação e aprendizado e que o respeito mútuo é fundamental para qualquer relacionamento, sobretudo entre médico e paciente.

À minha mãe, Rita, que, com sua doçura e resignação, é capaz de transmitir tranquilidade e conforto nos momentos mais conturbados.

Ao meu marido, André, pelo apoio, compreensão e pela participação efetiva e amável durante a realização dos experimentos e elaboração desta tese.

Ao meu irmão, Luciano, pelo exemplo constante na busca de perfeição e crescimento profissional.

À colega e grande amiga, Carla, pelo apoio decisivo, pela infinidade de conhecimentos transmitidos e pela sua prontidão em colaborar e participar.

Aos funcionários Luiz e Conceição, que desempenham suas tarefas com eficiência, além de transmitir incentivo, carinho e atenção.

À Profa. Dra. Berenice Bilharinho Mendonça, pelo aprendizado, pela acolhida fraternal e amiga, pela simplicidade marcante dos que são verdadeiramente grandes.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Enes de Barros e Profa. Dra. Maria de Fátima Borges, da disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, pelo meu encaminhamento à pós-graduação.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	<i>i</i>
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	56
7. SUMMARY	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9. ANEXOS	74

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1.....	27
Figura 2.....	28
Figura 3.....	29
Figura 4.....	30
Figura 5.....	31
Figura 6.....	32
Figura 7.....	33
Figura 8.....	34
Figura 9.....	35
Figura 10.....	38
Figura 11.....	39
Figura 12.....	40
Figura 13.....	41
Figura 14.....	42
Figura 15.....	43
Figura 16.....	44
Figura 17.....	45
Figura 18.....	46
Tabela 1.....	23
Tabela 2.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP - trifosfato de adenosina
- DAG - diacilglicerol
- DNA - ácido desoxirribonucléico
- EGF - fator de crescimento epidérmico
- ERKs - quinases reguladoras da sinalização extracelular
- GH - hormônio do crescimento
- GRB2 - proteína ligadora do receptor para fator de crescimento
- GTP - trifosfato de guanosina
- IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina
- IR - receptor de insulina
- IRS-1 - substrato-1 do receptor de insulina
- IRS-2 - substrato-2 do receptor de insulina
- JAK1 e 2 - quinases da família Janus
- Kitt - velocidade de desaparecimento da glicose
- MAPK - quinase ativadora da atividade mitogênica
- PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas
- PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase
- Raf - serina quinase citoplasmática ativada pelo Ras e ativadora das MAPKs
- Ras - proteína originalmente identificada como um oncogene, tem participação na regulação do metabolismo e crescimento celular
- RIE - radioimunoensaio
- RNA - ácido ribonucléico
- SDS-PAGE - gel de poliacrilamida para eletroforese dodecil sulfato de sódio
- Shc - molécula adaptadora e substrato do receptor de insulina
- SH2 - segunda homologia ao Src
- SH3 - terceira homologia ao Src
- SOS - fator ativador do Ras, apresenta homologia à *Drosophila* son-of-sevenless
- Src - oncogene originalmente definido como produto da sarcoma vírus Rous
- SHPTP2 - fosfotirosina fosfatase ativada pelo IRS-1 fosforilado



Resumo

A insulina estimula a atividade tirosina quinase de seu receptor, resultando na fosforilação de substratos citoplasmáticos, substratos 1 e 2 do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2). Estes dois substratos, por sua vez, ativam a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase). Sabe-se que um excesso crônico de hormônio do crescimento (GH) produz resistência insulínica, mas o exato mecanismo permanece não esclarecido. No presente estudo, examinamos os níveis protéicos e graus de fosforilação do receptor de insulina, do IRS-1 e do IRS-2, bem como a associação destes substratos com a PI 3-quinase, no fígado e músculo de ratos tratados cronicamente com GH. Os níveis de receptor de insulina no fígado e músculo foram semelhantes nos grupos tratados com GH e controle. A autofosforilação do receptor, estimulada pela insulina, não mudou no fígado, mas mostrou-se reduzida para $56 \pm 5\%$ ($p < 0,001$) no músculo dos ratos tratados com GH. Em contraste, o nível protéico de IRS-1 diminuiu para $40 \pm 6\%$ ($p < 0,001$) no fígado dos ratos tratados com GH, mas não no músculo. A fosforilação do IRS-1, estimulada pela insulina, mostrou-se diminuída para $67 \pm 11\%$ ($p < 0,05$) e $64 \pm 9\%$ ($p < 0,01$) no fígado e músculo, respectivamente. A quantidade de IRS-2 ficou semelhante nos animais tratados com GH, em relação aos controles, tanto em fígado quanto em músculo, enquanto a fosforilação deste substrato, após estímulo com insulina, reduziu para $43 \pm 4\%$ ($p < 0,001$) no fígado e $72 \pm 8\%$ ($p < 0,05$) no músculo dos ratos tratados com GH. A associação do IRS-1 com a PI 3-quinase, estimulada pela insulina, mostrou-se diminuída para $45 \pm 5\%$ ($p < 0,001$) no fígado e para $63 \pm 10\%$ ($p < 0,05$) no músculo dos ratos tratados com GH. Também a associação do IRS-2 com a PI 3-quinase decresceu para $47 \pm 10\%$ ($p < 0,05$) e $68 \pm 10\%$ ($p < 0,05$) em fígado e músculo, respectivamente. Concomitantemente, houve redução para $75 \pm 4\%$ ($p < 0,001$) no nível hepático da PI 3-quinase. Estes dados sugerem que estas alterações, nas etapas iniciais de transmissão do sinal insulínico, possam desempenhar alguma função na resistência insulínica observada nos animais tratados cronicamente com GH.



1. Introdução

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

É usual dividir-se os efeitos da insulina em duas grandes categorias: metabólicos e de promoção de crescimento. Os efeitos metabólicos, em geral, são observados a baixas concentrações de insulina (KAHN, 1985), sendo seu efeito dominante na regulação da homeostase da glicose, predominantemente em tecidos hepático e periférico (músculo e gordura), apresentando também ação integrada no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lípidos (FELIG & BERGMAN, 1990). No fígado, a insulina inibe a gliconeogênese e a glicogenólise, levando à inibição da produção de glicose e estímulo ao armazenamento de glicogênio. No músculo e tecido adiposo, a insulina estimula a captação, armazenamento e utilização de glicose. Somam-se a estes efeitos principais na homeostase da glicose outros metabólicos que incluem estímulo à lipogênese, inibição da lipólise, síntese de glicogênio e estímulo à captação de aminoácidos e ao fluxo iônico (FELIG & BERGMAN, 1990).

Considerando-se a segunda categoria de eventos, onde a insulina promove o crescimento e diferenciação celular, seus efeitos dão-se a altas concentrações (KAHN, 1985) e através da modificação da atividade de uma variedade de enzimas e sistemas de transporte protéico, levando à estimulação na síntese de RNA e DNA, estímulo à síntese e inibição da degradação de proteínas (KAHN, 1985; MOLLER & FLIER, 1991; CHEATAM & KAHN, 1995).

Como outros hormônios peptídeos e alguns neurotransmissores, a insulina liga-se a seu receptor protéico específico, situado na membrana plasmática da célula, e assim inicia uma cadeia de reações que leva a seus efeitos biológicos característicos

(KAHN, 1985). O receptor serve para dois propósitos: o primeiro é para reconhecer o hormônio entre todas as outras substâncias do sangue, ligando-o com alta afinidade e especificidade. O segundo é para transmitir um sinal transmembrânico que resulta em uma ativação, nas vias metabólicas intracelulares. Este receptor está presente, praticamente, em todos os tecidos de mamíferos, embora em concentrações tais que variam de 40, em eritrócitos circulantes, a mais de 200 000 em adipócitos e hepatócitos (KAHN, 1985). Os níveis plasmáticos normais de insulina variam de 10^{-10} a 10^{-9} M, e são menores que a média de afinidade de ligação da mesma. Assim, o maior número de receptores de insulina, localizados no tecido alvo, proporciona o componente necessário para a mais rápida cinética de ligação (CHEATAM & KAHN, 1995).

Na sua conformação nativa, o receptor de insulina é composto por duas subunidades α e duas subunidades β covalentemente ligadas por pontes dissulfeto para formar um heterotetrâmero $\alpha_2\beta_2$ (MOLLER & FLIER, 1991; CHEATAM & KAHN, 1995). Ambas as subunidades são glicoproteínas com cadeias laterais de carboidratos complexos (KAHN, 1985). Todo o receptor ($\alpha_2\beta_2$) tem um aparente peso molecular de 350 000, estimado por eletroforese não redutora, em gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE). A subunidade α tem um peso molecular de aproximadamente 95 000 (KASUGA et al., 1982a), inteiramente extracelular, contendo o sítio de ligação da insulina. A subunidade β é responsável pela transmissão do sinal, sendo uma proteína de localização transmembrana (KASUGA et al., 1982a; ROSEN, 1987). Uma propriedade importante da subunidade β do receptor deve-se ao fato desta ser uma proteína-quinase (KASUGA, KARLSSON, KAHN, 1982b). Proteínas-quinases são enzimas envolvidas na transferência de grupos fosfato do ATP para aminoácidos específicos de proteínas (KAHN, 1985).

Embora as exatas mudanças moleculares que resultam em ativação do receptor de insulina sejam incertas, dados consideráveis sugerem que o receptor de insulina sofre uma mudança conformacional após a ligação da insulina. Esta mudança conformacional resulta em alterações na sensibilidade do receptor à proteólise (LIPSON et al., 1986), na suscetibilidade a modificações bioquímicas (SCHENKER &

KOHANSKI, 1988; WILDEN & PESSIN, 1987; WAUGH & PILCH, 1989) e nas propriedades de sedimentação (FLORKE, KLEIN REINAUER, 1990). Está também associada a alterações no reconhecimento das subunidades por anticorpos específicos (PERLMAN et al., 1989; BARON et al., 1990). A mudança conformacional propaga-se através de ambas as subunidades e a atividade quinase da subunidade β é estimulada, levando à fosforilação do receptor, que ocorre em resíduos tirosina da subunidade β (KASUGA et al., 1982b). Há evidências diretas de que a atividade tirosina quinase do receptor de insulina é necessária para a ação insulínica (MAEGAWA et al., 1988). Uma evidência convincente é originária de experimentos com mutagênese *in vitro* nos quais a lisina, na posição 1030, foi substituída por vários outros aminoácidos. Com base em analogia com outras quinases, este resíduo está no sítio de ligação de ATP da quinase. Quando tais mutantes são expressos em células, a ligação insulínica é normal, mas são totalmente inativos como quinases e totalmente ineficazes na mediação dos estímulos da insulina, no metabolismo celular (EBINA et al., 1987; CHOU et al., 1987).

A autofosforilação do receptor de insulina ocorre através de uma cascata de fosforilações intramoleculares. Como resultado, pelo menos seis tirosinas, na porção intracelular da subunidade β , são fosforiladas (GOREN, WHITE, KAHN, 1987). Três destas tirosinas estão nas posições 1158, 1162 e 1163. Quando estas três são fosforiladas, a atividade quinase é então implementada (CHEATAM & KAHN, 1995). Isto pode ter papel importante na transmissão do sinal, desde que a atividade quinase permanece aumentada, enquanto não ocorrer desfosforilação, mesmo que a insulina dissocie-se do receptor (SAAD, 1994). A substituição das tirosinas 1162 e 1163 por fenilalaninas através de mutagênese específica *in vitro* resulta em um receptor que não é totalmente ativado como quinase e é ineficiente na transmissão do sinal (ELLIS et al., 1986). Em células intactas, o receptor também pode ser fosforilado em serina e treonina (KASUGA et al., 1982c). Em contraste à fosforilação em tirosina, a qual ativa a quinase, a fosforilação em serina inativa a quinase. Esta regulação da atividade quinase do receptor de insulina, por multisítios de fosforilação, proporciona um mecanismo importante para

regulação da sinalização da insulina em estados fisiológicos e patológicos (TAKAYAMA, WHITE, KAHN, 1988).

A porção citoplasmática da subunidade β apresenta homologia com outros receptores transmembrânicos que têm atividade tirosina-quinase, incluindo o receptor para IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina), o receptor para EGF (fator de crescimento epidérmico) e o receptor para PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) (CHEATAM & KAHN, 1995).

As conseqüências imediatas da ativação da capacidade tirosina quinase permanecem incertas. Para propagar o sinal, a maioria dos receptores tirosina-quinase, uma vez autofosforilados, liga-se diretamente a proteínas SH2, assim chamadas por apresentarem homologia com o produto de um oncogene viral Src. O receptor insulínico, assim como o de IGF-1, representa uma variação deste modelo. Uma vez autofosforilado estimula sua atividade tirosina-quinase e fosforila substratos intermediários responsáveis pela formação de um complexo de multisubunidades de sinalização (CHEATAM & KAHN, 1995).

Têm sido descritos vários substratos endógenos para o receptor insulínico. Estas proteínas são rápida e diretamente fosforiladas em seus resíduos tirosina pela atividade quinase do receptor. A primeira proteína alvo descrita e, talvez, a melhor estudada, foi inicialmente chamada de pp185, por migrar entre 165-185 kDa em SDS-PAGE e, posteriormente, denominada substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) (WHITE, MARON, KAHN, 1985; SUN et al., 1992). O IRS-1 foi purificado e clonado de várias fontes e exibe alta conservação de seqüência entre as espécies. O gene humano do IRS-1 está localizado no cromossomo 2q36-37 (CHEATAM & KAHN, 1995; WHITE & KAHN, 1994).

A capacidade do IRS-1 de ser fosforilado em tirosina, após estimulação insulínica, e de participar na transmissão do sinal, depende de uma característica estrutural, que é a presença de múltiplos sítios tirosina em localizações estratégicas. Com

base em análise seqüencial, existem 22 sítios tirosina potenciais para fosforilação no IRS-1. Nove destes possuem uma de duas seqüências repetitivas: YMXM ou YXXM, onde Y é tirosina, M é metionina e X é qualquer outro aminoácido. Seguindo-se à estimulação insulínica, estas tirosinas, bem como outras tirosinas potenciais na molécula de IRS-1, são rapidamente fosforiladas, resultando em uma ligação não-covalente do IRS-1 com proteínas específicas (WHITE & KAHN, 1994; KAHN, 1994). O IRS-1 também contém cerca de 30 sítios potenciais de fosforilação em serina/treonina, em localizações reconhecidas por várias quinases (WHITE & KAHN, 1994).

Estudos *in vivo* em cultura de células e em sistemas reconstituídos *in vitro*, o IRS-1 fosforilado associa-se a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) ativando-a (BACKER et al., 1992; FOLLI et al., 1992). Recentemente, ficou demonstrado que esta associação e ativação também ocorrem em dois importantes tecidos insulino-sensíveis de ratos, fígado e músculo, em concentrações fisiológicas de insulina (FOLLI et al., 1992; SAAD et al., 1993). A enzima PI 3-quinase apresenta uma subunidade catalítica 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 SH2 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.

Trabalhos recentes demonstram que a ativação da PI 3-quinase é essencial para o transporte de glicose, pois o tratamento de células com um inibidor específico desta enzima, o *wortmannin*, bloqueia também a captação desta hexose (OKADA et al., 1994).

Assim, a insulina estimula a fosforilação do IRS-1 que, fosforilado, liga-se a outras moléculas de sinalização intracelular, propagando o sinal insulínico. Além da PI 3-quinase, pelo menos três outras proteínas com porção SH2 associam-se ao IRS-1: Syp, Nck e GRB-2 (KUHNE et al., 1993; CHEATAM & KAHN, 1995). A proteína Syp

(SHPTP2) é fosfotirosina fosfatase que contém duas porções SH2 e liga-se à tirosina 1172 do IRS-1 (SUN et al., 1993). Esta união ativa a fosfatase que, potencialmente, pode ter importância no crescimento celular e exercer uma auto-regulação no sinal gerado pela insulina. A Nck de 47 kDa é uma proteína adaptadora com três porções SH3 e uma SH2, sendo fosforilada em aminoácidos tirosina e serina, em resposta a diversos fatores de crescimento. Ela, provavelmente, conecta o IRS-1 a vias metabólicas envolvidas no crescimento celular. A GRB-2 é uma proteína citoplasmática que contém duas porções SH3 e uma SH2, sendo esta última o sítio de ligação à tirosina 895 do IRS-1. A GRB-2 age como uma molécula adaptadora que une o fator permutador de guanina para a p21ras, chamada mSOS (son-of-sevenless), a fosfoproteínas como o receptor do EGF e o IRS-1. O complexo GRB/mSOS ativa a p21ras, estimulando a ligação de GTP. Por analogia, a interação do complexo GRB/mSOS ao IRS-1 pode mediar a estimulação da p21ras pela insulina (KAHN, 1994; WHITE & KAHN, 1994).

Recentemente, surgiram evidências da existência de um substrato alternativo para o receptor. Para elucidar o papel do IRS-1, na ação da insulina/IGF-1, foi criado um camundongo transgênico que não sintetiza IRS-1 (ARAKI et al., 1994; TAMEMOTO et al., 1994). Estes animais não têm IRS-1 e conseqüentemente não apresentam fosforilação deste substrato ou associação IRS-1/PI 3-quinase. Também apresentaram uma redução de 50% no crescimento intra-uterino, intolerância à glicose e diminuição na captação de glicose, estimulada pela insulina *in vivo* e *in vitro*. A ação residual da insulina/IGF-1, nestes animais, correlacionou-se com o aparecimento de uma nova proteína fosforilada em tirosina - IRS-2 - a qual se liga à PI 3-quinase, mas com peso molecular discretamente maior e imunologicamente distinto do IRS-1 (ARAKI et al., 1994). A recente clonagem do IRS-2 revelou grande homologia deste substrato com o IRS-1, com alta conservação de dois domínios da posição NH2-terminal (SUN et al., 1995). Expressa-se IRS-1 e IRS-2, em diferentes proporções, nos vários tecidos e podem mediar sinais alternativos em vias que não estão ainda completamente esclarecidas (MYERS & WHITE, 1995).

Logo, fica claro que o IRS-1 e o IRS-2 são proteínas importantes no processo de transmissão do sinal insulínico, quando localizadas estrategicamente na fase inicial desta sinalização. Atuando como ancoradouro de proteínas, que ativam diversas enzimas, são pontos de ramificação que permitem serem pleiotrópicos os efeitos da insulina. Portanto, o estudo da regulação do IRS-1 e do IRS-2 em tecidos hepático e muscular, de modelos animais de resistência à insulina, pode contribuir para a compreensão de mecanismos moleculares pós-receptores de alteração de sensibilidade a este hormônio.

Vários modelos animais de resistência insulínica têm sido estudados, dentre estes os camundongos obesos (SAAD et al., 1992), ratos tratados com dexametasona (SAAD et al., 1993), ratos espontaneamente hipertensos (KAHN & SAAD, 1992), ratos idosos (CARVALHO et al., 1996), ratos tratados com glucagon ou adrenalina (SAAD et al., 1995a; SAAD et al., 1995b). Estes estudos mostraram diminuição na expressão e fosforilação do receptor e (ou) do IRS-1 que podem levar à redução na associação e na ativação da PI 3-quinase em fígado e músculo destes animais. Os resultados destes estudos sugerem que estas mudanças, nos passos iniciais de transmissão do sinal insulínico, podem ter um importante desempenho na resistência insulínica observada nestes animais.

Entretanto, a função destas etapas iniciais da ação insulínica, em outros modelos fisiopatológicos de resistência a este hormônio, não foi ainda caracterizada, como nas situações de excesso endógeno ou exógeno de hormônio do crescimento.

Há cerca de sessenta anos, surgiram as primeiras evidências de uma relação nítida entre acromegalia e *diabetes mellitus* (HOUSSAY & BIOSATTI, 1932; YOUNG, 1937). Investigações iniciais, na tentativa de esclarecimento do efeito diabetogênico do hormônio do crescimento, mostraram que pacientes portadores de acromegalia apresentam, após sobrecarga oral de glicose, glicemias maiores em relação aos controles, caracterizando um estado de intolerância à glicose (BECK et al., 1965; FINEBERG et al., 1970; SÖNKSEN et al., 1967). Ainda mais marcantes foram as observações de que estes pacientes apresentam, em paralelo, aumento de insulina plasmática até cerca de três vezes

o valor dos controles (BECK et al., 1965; TRIMBLE et al., 1980) e, ainda assim, são incapazes de obter utilização normal de glicose. Isto caracteriza um estado de resistência insulínica, que pode ser também mensurado pela proporção insulina/glicose que se encontra marcadamente aumentada nos acromegálicos em relação aos controles, após teste oral de tolerância à glicose (FINEBERG et al., 1970). Somam-se a estes dados, a observação de que em pacientes acromegálicos, a despeito da hiperinsulinemia, a velocidade de desaparecimento da glicose, após teste de tolerância à glicose endovenosa, encontra-se reduzida em cerca de metade do valor de indivíduos normais (SÖNKSEN et al., 1967). Posteriormente, inúmeras investigações confirmaram esta associação entre acromegalia e *diabetes mellitus* (NABARRO, 1991; DAUGHDAY, 1992), estabelecendo que, aproximadamente, 20% dos pacientes acromegálicos são diabéticos e que 30% apresentam intolerância a carboidratos.

A administração crônica do GH em homens (WEAVER et al., 1995; RIZZA, MANDARINO, GERICH, 1982) ou animais (MALOFF, LEVINE, LOCKWOOD, 1980; MORGAN et al., 1961; BISHOP et al., 1967) está também associada à resistência insulínica. Nos últimos anos, alguns estudos procuraram investigar a participação dos tecidos periféricos e hepático, nesta situação de resistência à insulina, bem como alterações em nível de receptor de insulina em pacientes acromegálicos e em animais tratados cronicamente com altas doses de GH (KAHN et al., 1978; MUGGEO et al., 1979; FOSS et al., 1991; HANSEN & TSALIKIAN, 1986).

KAHN et al. (1978), submetem ratos a tratamento exclusivo com GH bovino subcutâneo durante cinco dias. Observaram que estes animais apresentaram discreta diminuição na sensibilidade à insulina e uma redução na concentração do receptor de insulina. Isto estava associado a um aumento recíproco na afinidade da insulina ao receptor e assim, nenhuma alteração ocorreu na ligação da insulina a concentrações fisiológicas deste hormônio, sugerindo que a resistência insulínica presente na exposição crônica a excesso de GH esteja relacionada com alterações pós-receptor. Resultados semelhantes foram observados, quando a ligação da insulina a seu receptor foi avaliada em monócitos circulantes de pacientes acromegálicos (MUGGEO et al., 1979).

Diversos estudos, utilizando metodologia variada demonstraram redução na captação muscular de glicose e aumento da produção hepática de glicose em pacientes acromegálicos (FOSS et al., 1991; HANSEN & TSALIKIAN, 1986), sendo estas alterações precoces, observadas em pacientes acromegálicos com tolerância normal à glicose (FOSS et al., 1991). HANSEN & TSALIKIAN (1986), utilizando o modelo de “clamp normoglicêmico” associado a métodos isotópicos e estudo de receptores de insulina em eritrócitos e monócitos demonstraram que, em pacientes acromegálicos, a resistência à insulina observada deve-se tanto a uma menor supressibilidade na produção hepática de glicose, quanto a uma menor utilização periférica dessa hexose. A associação de uma redução no uso de glicose a um estímulo máximo de insulina e ausência de alterações na ligação insulina-receptor em eritrócitos e monócitos sugerem uma mudança de função em nível pós-ligação.

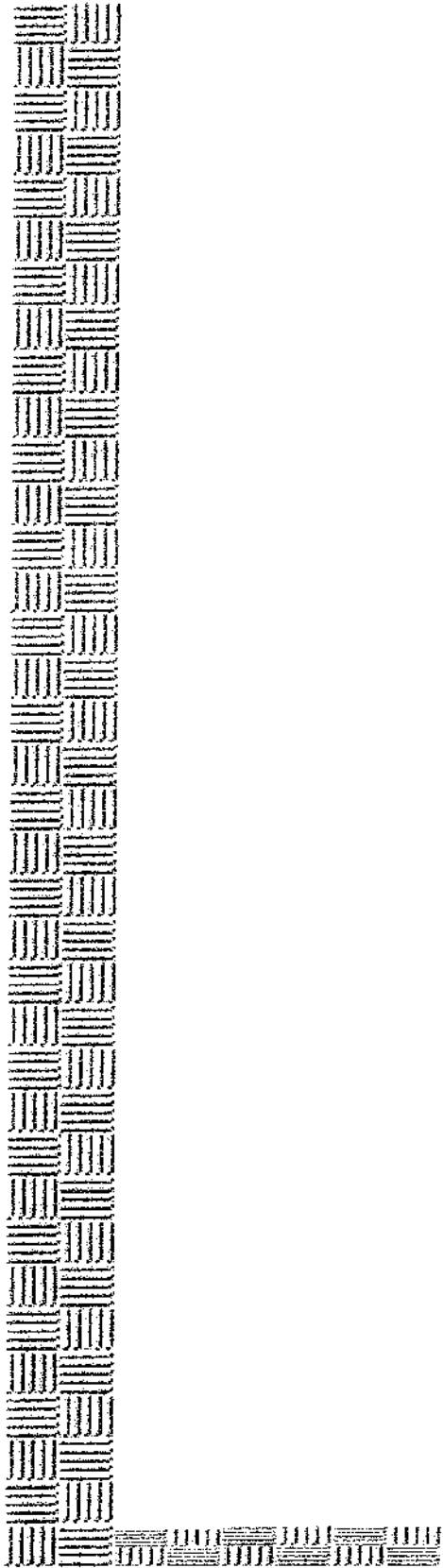
Entretanto, o mecanismo molecular, pelo qual a administração exógena ou aumento de secreção endógena de GH induz resistência à insulina, não está totalmente esclarecido. Neste sentido, a caracterização das etapas iniciais da ação insulínica, em modelo animal de excesso de GH, poderia contribuir para a elucidação do mecanismo de redução na sensibilidade à insulina, associada a excesso de GH.



2. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram:

Estudar os níveis teciduais e graus de fosforilação do receptor de insulina, do IRS-1 e do IRS-2, bem como a interação deste substratos com a PI 3-quinase em fígado e músculo de ratos, tratados cronicamente com hormônio do crescimento.



3. Materiais e Métodos

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, variedade albina), da linhagem Wistar-Hannover, machos, jovens, com seis semanas de vida, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, Campinas-SP. Após o desmame, os animais recebiam como alimentação apenas ração para ratos Labina, marca Purina.

Uma semana antes de qualquer experimento, os animais foram acomodados em gaiolas plásticas, com três espécimes em cada, e mantidos em condições de fotoperíodo (12 x 12h), com ração e água fornecidos *ad libitum*.

3.2. MATERIAIS

Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE) foram da Bio-Rad (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina e ditioneitol (DTT) foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). Sódio amobarbital e insulina regular (Humulin R) fornecidos pela Lilly. Hormônio do crescimento biossintético humano GH - Norditropin- foi adquirido da Novo Nordisk (Bagsvaerd, Dinamarca). Proteína A com iodo radioativo (¹²⁵I) fornecida pela Amersham (UK) e proteína A Sepharose 6 MB da Pharmacia (Uppsala, Suécia). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0.2µm) foi de Schleider e Schuell. O anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina e o anticorpo policlonal anti-PI 3 quinase (p85) foram obtidos da Upstate Biotechnology Incorporated (UBI, Lake Placid, NY). Usado também anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina da Santa Cruz Biotechnology, Inc.. Os anticorpos anti-IRS-1, anti-IRS-2 e anti-receptor de insulina foram obtidos em coelhos (SAAD et al., 1993) e gentilmente cedidos pelos Drs. C.Ronald Kahn, Morris F. White e Xiao Jian Sun (Joslin Diabetes Center). A insulina foi dosada por RIE usando kit da Diagnostic Systems Laboratories (Webster, Texas).

3.3. SOLUÇÕES EMPREGADAS NOS DIVERSOS EXPERIMENTOS

3.3.1. Tampão de extração:

Utilizado para a extração de proteínas para *immunoblotting* e imunoprecipitação do tecidos hepático e muscular. Contém: Trisma base 100mM, EDTA 10mM, pirofosfato de sódio 10mM, fluoreto de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PSMF 2mM (diluído em álcool etílico), triton X 100 1%, aprotinina 3% (0,1 mg/ml). Esta solução deve ser mantida a 4°C. O ortovanadato, PSMF e a aprotinina devem ser acrescentados no momento do uso.

3.3.2. Tampão de Laemmli (5X):

Usado para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de policrilamida para eletroforese dodecil-sulfato de sódio (SDS - PAGE) a 6% (LAEMMLI, 1970). Contém: Azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50%, SDS 20%.

3.3.3. Solução Tampão para eletroforese em gel (SDS - PAGE):

Utilizada para a realização da eletroforese no SDS-PAGE, das proteínas extraídas. A solução deve ser diluída 1:4 para uso. Contém: Trisma base 0,2M, glicina 1,52M, EDTA 7,18M, SDS 0,4%.

3.3.4. Solução tampão para transferência:

Empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Contém: Trisma base 25mM, glicina 129 mM, Metanol 20% e

SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Deve ser estocada a 4°C.

3.3.5. Solução tampão para SDS-PAGE, Gel de resolução (resolving):

Para a manufatura do SDS-PAGE, gel de resolução, um tampão composto de : EDTA 4mM, SDS 25%, Trisma base 1,5m e tem o pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

3.3.6. Solução tampão para SDS-PAGE, gel de empilhamento (Stacking):

Necessária na confecção do SDS-PAGE, gel de empilhamento das proteínas. Contém: EDTA 4mM, SDS 2%, trisma base 10 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

3.3.7. Solução Basal:

Solução básica usada para o manuseio da membrana de nitrocelulose, após transferência das proteínas. Contém: Cloreto de sódio 0,15M, trisma base 0,01M, Tween 20 0,05%.

3.3.8. Solução bloqueadora:

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

3.3.9. Solução para anticorpos:

Onde se dilui os anticorpos específicos . Contém: 0,3% de soro albumina bovino (BSA) e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal.

3.3.10. Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado:

Contém: Trisma base 100mM, EDTA 1mM, ortovanadato de sódio 2mM, triton X-100 0,5%.

3.3.11. Solução com proteína A marcada com ¹²⁵ I:

Solução que contém a proteína A com Iodo¹²⁵ para a marcação dos anticorpos específicos, o que permite a visualização em autoradiografia. Contém 0,1% de albumina dissolvida em solução basal com 0,01 µCi de proteína A.

3.4. MÉTODOS

3.4.1. Procedimentos com animais:

Os animais, nas condições anteriormente descritas, apresentando peso conforme Tabela 1, foram classificados em controle ou ratos tratados com GH, e os estudos realizados nos mesmos, em paralelo. Um excesso de GH foi induzido através de injeção subcutânea de GH, 1 mg por dose, tendo sido a primeira dose administrada às 17 horas do primeiro dia. Do segundo ao quarto dia, foram administradas duas doses, às 9 e às 17 horas. No quinto dia, a última dose foi administrada às 9 horas e o experimento iniciado 1 hora e 30 minutos após. O grupo controle recebeu volume equivalente de solução salina normal (0,9% NaCl) nos mesmos horários e pelo mesmo período. Os animais permaneceram em jejum por 12 - 14 horas, previamente aos experimentos, tendo sido

estudados animais estimulados com insulina regular (+) e os não estimulados (-) onde se infundiu solução salina a 0,9%.

3.4.2. Via de acesso e retirada do tecido:

Os experimentos iniciaram-se às 10 horas e 30 minutos. Após jejum alimentar, não hídrico, de 12 - 14 horas, os animais foram submetidos à anestesia por administração intraperitoneal de solução contendo Tionembutal, na dose 15mg/Kg de peso. O procedimento foi iniciado, quando os reflexos corneano e de retirada da pata à dor estivessem abolidos; os animais foram colocados em decúbito ventral e, após tricotomia da região abdominal anterior, realizou-se uma incisão de aproximadamente 3 cm de extensão, longitudinal, subapófise xifóide, atingindo pele e tecido subcutâneo. A seguir, abriu-se com tesoura cirúrgica a musculatura retoabdominal, via linha alba, atingindo a cavidade abdominal e a veia porta, então, individualizada. Após, procedia-se à abertura da pata traseira com exposição do músculo gastrocnêmico. Nos animais do grupo negativo (sem estimulação com insulina), tanto controle quanto tratados com GH, foi injetada, após punção da veia porta, 0,5 ml de solução salina 0,9%. Para os animais do grupo positivo (com estimulação com insulina), insulina regular foi injetada na concentração de 10^{-5} M, juntamente com salina para obtermos homogeneidade do volume aplicado.

Após 30 e 90 segundos da injeção, foram retirados um fragmento hepático e um fragmento do músculo gastrocnêmico, respectivamente. Estes foram homogeneizados com um polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments modelo PT 10/35) em 10 volumes de tampão de extração, mantidos a 4°C. Em experimentos preliminares (SAAD et al., 1992), demonstrou-se que a fosforilação máxima do IRS-1, após infusão de insulina na veia porta, ocorria entre 30 e 60 segundos no fígado, e entre 1 e 4 minutos em músculo, a concentrações de 10^{-5} e 10^{-6} M de insulina, respectivamente.

3.4.3. Manuseio do extrato total:

O material extraído foi centrifugado em microcentrífuga refrigerada a 4°C (Bioanalytical) a 12.000 rpm por 40 minutos; parte do sobrenadante foi utilizada para determinação da concentração de proteínas por fragmento extraído de tecido e outra para aplicação no SDS-PAGE.

Para aplicação no SDS-PAGE, o sobrenadante foi armazenado em alíquotas, com tampão de Laemmli, acrescido de DTT 200mM, na proporção de 1:5 (400 µl do sobrenadante em 100µl do tampão de Laemmli com DDT), mantido sempre a 4°C até a aplicação no gel.

3.4.4. Immunoblotting ou Westernblotting:

Aplicou-se, no SDS - PAGE de 2 mm de espessura, 200 µg de proteína por amostra, e o gel foi balizado por marcador de alto peso molecular, para gel de poliacrilamida, da Bio Rad que contém: miosina (206 kDa), β galactosidade (117 kD), BSA (89 kDa) e ovalbumina (47 kDa).

A eletroforese foi realizada em cuba de minigel Mini-PROTEAN® II Cell da Bio Rad, com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE sempre submetido a 20 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (stacking) e 100 volts até o final do gel de resolução (resolving). A seguir, as proteínas, separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Para tal foi utilizado o equipamento de eletrotransferência do minigel da Bio Rad. A cuba é mantida a 120 volts por 150 minutos (TOWBIN, SRAEHLIN, GORDON,1979). Para manter a temperatura não muito alta, foram efetuadas sucessivas trocas da forma de gelo.

As membranas, com as proteínas transferidas, foram incubadas em solução bloqueadora por duas horas, à temperatura ambiente, após o que foram lavadas em solução

basal por três sessões de dez minutos, para subsequente incubação com anticorpo específico.

Tal incubação foi feita a 4°C por 14 - 16 horas, sob agitação constante, após o que a membrana foi novamente lavada com solução basal, por quatro sessões de dez minutos. A seguir novamente incubada, agora em solução com proteína A marcada com ¹²⁵I, durante quatro horas, à temperatura ambiente. Novamente lavada com solução basal por cinco sessões de dez minutos, secada e exposta em filme de RX que colocado em cassete, foi mantido à temperatura de -80°C. Após 12 a 48 horas, o filme foi revelado de forma convencional.

Uma vez identificadas as bandas das autoradiografias, procedeu-se à leitura por densitometria óptica, quantificando suas áreas. A partir de então, foi realizada a análise dos dados, comparando-se o tecido do animal controle com o outro em experimento, de maneira que sempre houvesse controle intra-experimento. Os resultados foram descritos como variação percentual dos diferentes grupos, em relação a esse controle.

3.4.5. Imunoprecipitação:

Em alguns experimentos, os tecidos hepático e muscular dos animais foram extraídos e homogeneizados em tampão de extração a 4 °C. Após centrifugação por 35 min a 12.000 rpm a 4 °C, a solução sobrenadante dos tecidos foi usada para imunoprecipitação com anticorpo anti-IR, anti-IRS-1 e anti-IRS-2. Também, nessa situação, o volume das amostras foi normalizado por concentração protéica como o realizado para o extrato total dos tecidos e as referidas amostras foram incubadas com o anticorpo anti-IR, anti-IRS-1 e anti-IRS-2 e permaneceram sob agitação contínua, a 4 °C durante 12 horas. A seguir, foram acrescentados 50 µl de proteína A-Sepharose 6 MB para precipitação do complexo proteína-anti-IRS-1, proteína-anti-IRS-2 ou proteína-anti-IR, a qual foi mantida sob agitação contínua a 4°C, por duas horas. Novamente centrifugadas, por 15 minutos, a 12 000 rpm a 4 °C, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi, por três vezes, lavado

com a solução tampão específica para lavagem e, após ressuspensão em tampão de Laemmli, submetido a eletroforese em SDS-PAGE 6%. Os passos seguintes foram realizados nos mesmos padrões daqueles utilizados para *immunoblotting*.

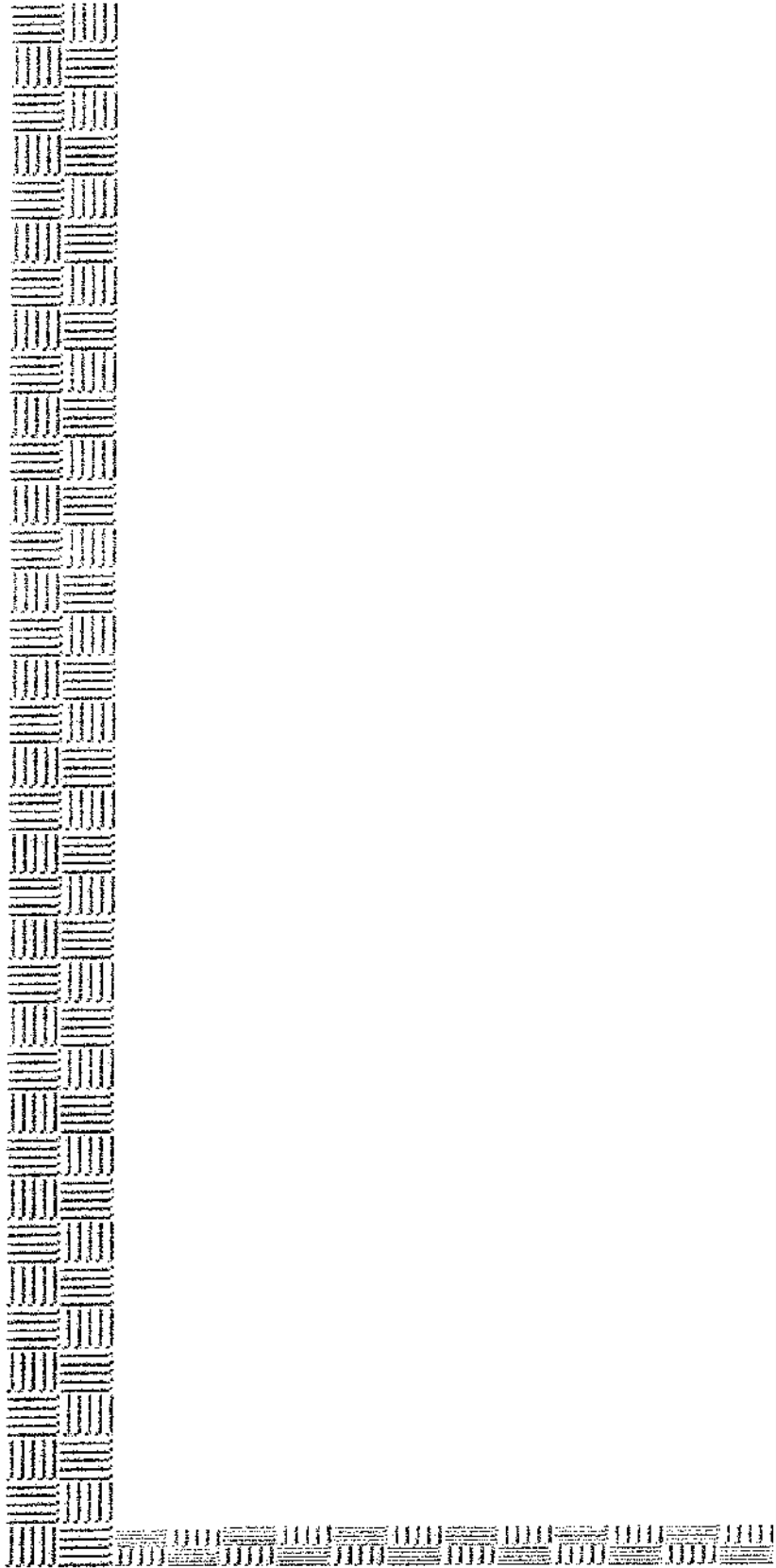
3.4.6. Teste de tolerância à insulina

Alguns animais, de ambos os grupos de controle e GH, foram submetidos a teste de tolerância à insulina endovenosa (ITT). Através de punção da veia cava, procedeu-se à coleta de sangue para dosagem de insulina e glicemias basais. Após infusão endovenosa de insulina 10^{-5} M na veia porta, amostras de sangue para dosagem de glicose foram colhidas, através de corte da extremidade distal da cauda dos animais, nos tempos 4, 8, 12 e 16 minutos. A dosagem plasmática de glicose foi determinada pelo método da glicose oxidase e a dosagem de insulina por radiomunoensaio. A velocidade constante de desaparecimento da glicose (Kitt) foi calculada pela fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima, durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose (BONORA et al., 1989).

3.4.7. Análise estatística

Os experimentos foram realizados, estudando-se todos os grupos de animais em paralelo. Para comparações, teste t de Student para dados pareados e não pareados foi usado, conforme apropriado. O nível de significância empregado foi $p < 0,05$.

Para efeito de comparação, os resultados são expressos como variação percentual, em relação ao controle que foi sempre 100%. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias.



4. Resultados

CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS

A tabela 1 resume os dados dos animais controles e dos tratados com GH, incluindo peso corporal, glicose plasmática, níveis séricos de insulina e velocidade de desaparecimento da glicose durante o teste endovenoso de tolerância à insulina (Kitt) (ANEXO 1). Em relação à glicose plasmática, verificamos que não houve variação significativa entre os dois grupos, sendo a glicemia dos controles de $99 \pm 1,5$ mg/dl e a dos tratados com GH de 91 ± 4 mg/dl ($p=0,086$), enquanto a dosagem de insulina sérica mostrou-se significativamente superior nos animais tratados com GH, em relação aos controles, com os respectivos valores de $0,31 \pm 0,04$ ng/ml e $0,16 \pm 0,04$ ng/ml ($p<0,05$). A velocidade de desaparecimento da glicose (Kitt) durante o teste de tolerância à insulina mostrou-se significativamente inferior nos ratos tratados com GH, sendo a média de $2,06 \pm 0,79$ %/min, enquanto a média dos controles foi de $4,23 \pm 0,51$ %/min ($p<0,05$). Considerando-se a somatória destes dados, constatamos que os animais expostos a excesso de GH apresentam um estado de resistência à insulina caracterizado por níveis aumentados de insulina de jejum, associados com níveis normais de glicose plasmática e marcada diminuição na velocidade de desaparecimento da glicose.

Tabela 1. Características dos animais estudados

Grupos	Peso g	Glicemia mg/dl	Insulinemia ng/ml	Kitt %/min
Controle	159 ± 19 (6)	$99 \pm 1,5$ (7)	$0,16 \pm 0,04$ (9)*	$4,23 \pm 0,5$ (7)*
GH	162 ± 15 (5)	$91 \pm 4,0$ (7)	$0,31 \pm 0,04$ (13)*	$2,06 \pm 0,8$ (6)*

Os resultados são expressos como Média \pm SEM (desvio padrão). O número de animais é mostrado entre parênteses. * $p<0,05$

EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NA EXPRESSÃO E FOSFORILAÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA, DO IRS-1 E DO IRS-2 NO FÍGADO DE RATOS

Não houve alteração no nível protéico do receptor de insulina, no fígado dos ratos tratados com GH em relação aos controles, como determinado pelo *immunoblotting* com anticorpo contra a porção COOH-terminal do receptor de insulina (Fig. 1A). Numa média de 13 experimentos, a figura 1B mostra-nos que o nível tecidual do receptor de insulina nos animais tratados com hormônio, comparados aos controles, é de $106 \pm 15\%$ ($p=0,671$).

Em amostras de fígado, previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-receptor de insulina e submetidas a *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina (Fig 2A), observamos que a fosforilação estimulada pela insulina da subunidade β de 95 kDa do receptor de insulina apresenta uma diminuição discreta nos animais tratados com GH em relação aos controles, mas esta diferença não foi significativa. Em um total de 9 experimentos, a fosforilação do receptor de insulina no primeiro grupo foi de $83 \pm 10\%$ ($p=0,117$) em relação ao grupo controle (Fig. 2B).

Usando anticorpos específicos contra IRS-1 (Fig. 3A), o nível desta proteína encontrou-se diminuído para $40 \pm 6\%$ ($n=8$; $p<0,001$) no fígado dos ratos tratados cronicamente com GH. Estes achados foram confirmados, por densitometria óptica de 8 experimentos (Fig. 3B).

Depois do tratamento com GH, as alterações na fosforilação do IRS-1, em nível hepático foram observadas tanto no estado basal quanto após o estímulo insulínico. Antes do estímulo insulínico, a fosforilação basal do IRS-1 foi ~150% maior nos animais tratados com GH em relação aos controles. Após a estimulação com insulina, a intensidade desta banda aumentou em ambos os grupos, quando comparada ao estado basal dos mesmos. Entretanto, comparando-se as bandas estimuladas com insulina, observamos que a fosforilação do IRS-1 mostrou-se reduzida para $67 \pm 11\%$

(n=5; p<0,05) nos animais tratados com GH em relação à mesma banda dos controles (Fig. 4A e Fig. 4B).

Os ratos tratados com GH não diferiram dos controles, significativamente, quanto ao nível protéico de IRS-2 presente em fígado, como foi determinado por *immunoblotting* com anticorpo específico para este substrato (Fig. 5A). Numa média de 5 experimentos, a figura 5B mostra que a quantidade de IRS-2 nos animais tratados com GH foi de $108 \pm 3\%$ (p=0,075) comparado aos controles. Concordante com o comportamento do IRS-1, a fosforilação em tirosina do IRS-2 esteve aumentada para 149% antes do estímulo insulínico nos ratos tratados com GH, enquanto o grau de fosforilação do IRS-2 estimulado pela insulina mostrou-se reduzido para $43 \pm 4\%$ (n=5; p<0,001) na presença de excesso crônico de GH em relação aos controles (Fig.6A e 6B).

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) têm sugerido que existe 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 para as mesmas. Quando as membranas de nitrocelulose, previamente imunoprecipitadas, com anticorpo anti-IRS-1, foram incubadas com anticorpos contra a subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase (Fig. 7A), evidenciou-se pouca ou nenhuma imunorreatividade da PI 3-quinase no estado basal dos animais controles. Mas nos animais tratados com GH, quando comparamos esta mesma banda de estado basal, observamos que ela estava ~180% maior neste grupo, em relação aos controles, sugerindo maior associação entre IRS-1/PI 3-quinase no estado basal deste grupo. Depois da estimulação com insulina, a intensidade desta banda aumentou em ambos os grupos de animais, uma observação consistente com a formação de uma associação estável entre IRS-1 e PI 3-quinase. Entretanto, a comparação das bandas, estimuladas pela insulina, revelou que a quantidade de PI 3-quinase associada ao IRS-1 estava reduzida para $45 \pm 5\%$ (n=6; p<0,001) no

figado dos ratos tratados com GH, sugerindo uma diminuição da associação entre IRS-1 e PI 3-quinase (Fig. 7B).

Desde que o IRS-2 pode, da mesma maneira que o IRS-1, associar-se com a PI 3-quinase, membranas previamente imunoprecipitadas com anti-IRS-2, foram subsequentemente incubadas com anticorpo anti-PI 3-quinase (Fig. 8A). No estado basal, a banda correspondente a PI 3-quinase esteve aumentada para ~119% nos ratos tratados com GH, mas, após o estímulo insulínico, a quantidade de PI 3-quinase associada ao IRS-2 reduziu-se para $47 \pm 10\%$ ($n=4$; $p<0,05$) nos ratos com excesso, em relação aos controles (Fig. 8B).

Para determinar se as diminuições, nas quantidades dos complexos IRS-1/PI 3-quinase e IRS-2/PI 3-quinase, resultaram de mudanças na quantidade total da PI 3-quinase nos tecidos dos animais tratados com GH, investigamos o nível protéico da PI 3-quinase através de *immunoblottings* com anticorpos contra a subunidade de 85 kDa desta enzima em extratos de tecidos (Fig. 9A). Através desta abordagem, observamos que o nível hepático desta enzima apresentou-se diminuído para $75 \pm 4\%$ ($n=9$; $p<0,001$) nos animais tratados com GH (Fig. 9B). Este decréscimo no nível protéico da PI 3-quinase pode ter participação na redução da associação dos substratos com a PI 3-quinase após estímulo insulínico, nos ratos tratados com GH.

A discriminação dos valores acima relatados encontra-se nos ANEXOS 2 e 3.

A) Blot: α IR



B) Nível protéico do receptor de insulina

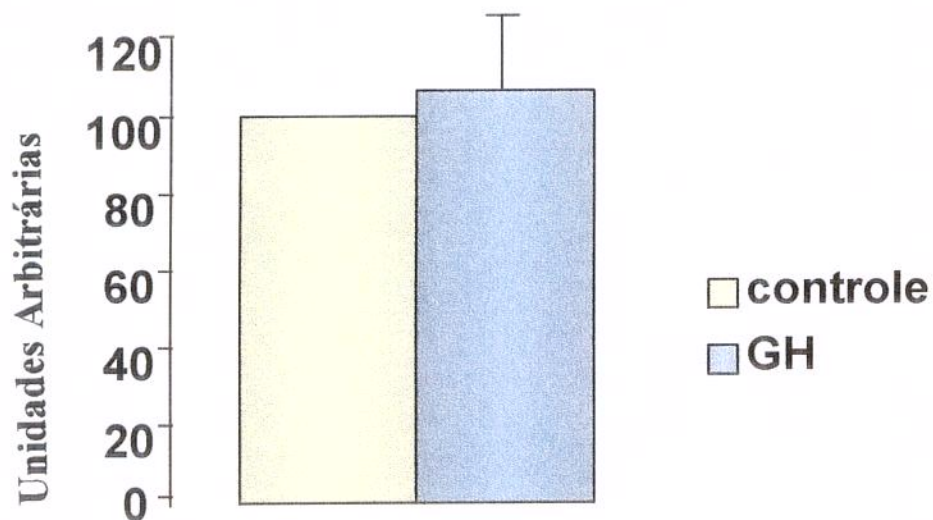
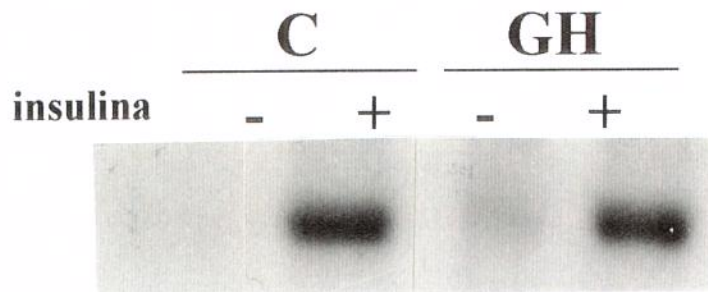


Figura 1 - Amostras de tecido hepático foram submetidas a *immunnoblotting* com anticorpo anti-receptor de insulina. A banda tida como **C** refere-se ao controle e **GH** ao tratado cronicamente com este hormônio (**A**). O valor para o nível protéico de receptor de insulina é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 13 experimentos por densitometria óptica (**B**).

A) IP: α IR
Blot: α PY



B) Fosforilação do receptor de insulina

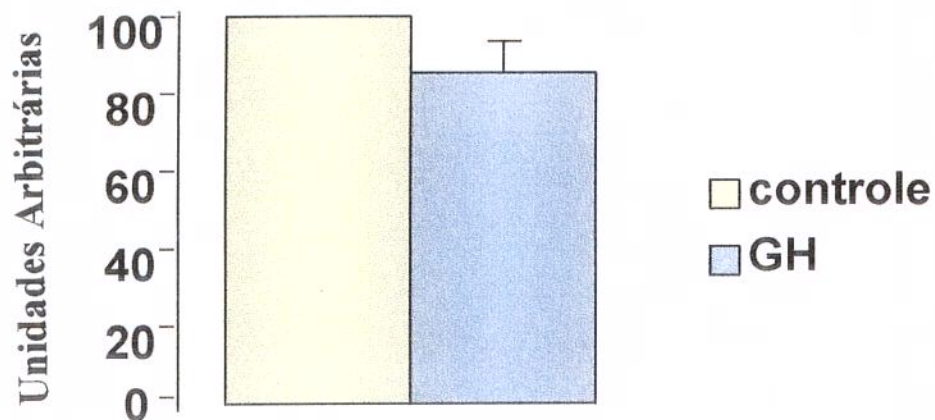


Figura 2 - Amostras de tecido hepático foram submetidas a imunoprecipitação com anticorpo anti-receptor de insulina e *immunnoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina. A bandas tidas como **C** referem-se aos controles e **GH** aos tratados cronicamente com este hormônio, sendo as negativas e positivas antes e após estímulo insulínico, respectivamente (**A**). O valor para o grau de fosforilação do receptor de insulina é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 9 experimentos por densitometria óptica (**B**).

A) Blot: α IRS-1



B) Nível protéico do IRS-1

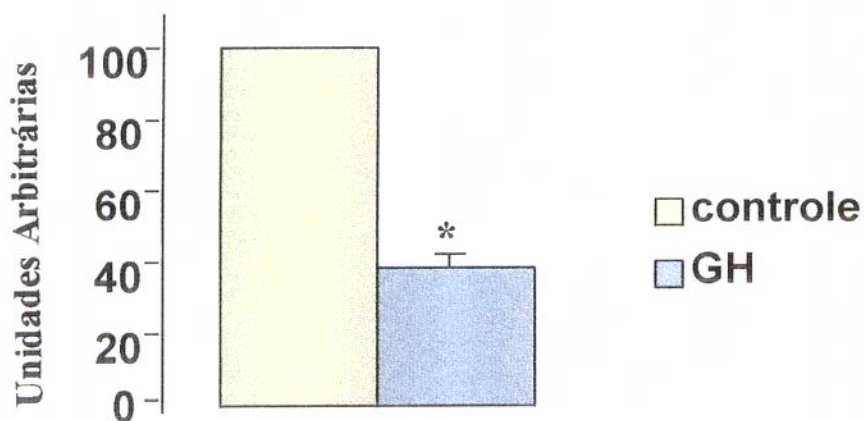
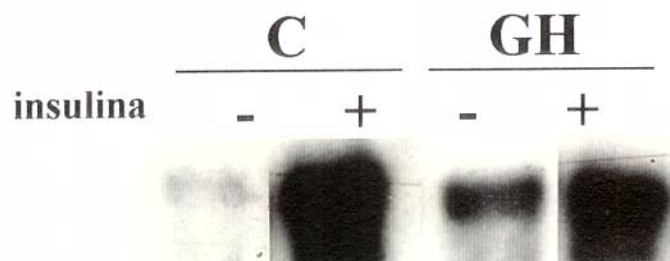


Figura 3 - Amostras de tecido hepático foram submetidas a *immunnoblotting* com anticorpo anti-IRS-1. A banda tida como **C** refere-se ao controle e **GH** ao tratado cronicamente com este hormônio (**A**). O valor para o nível protéico IRS-1 é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 8 experimentos por densitometria óptica (**B**).

A) IP: α IRS-1

Blot: α PY



B) Fosforilação do IRS-1

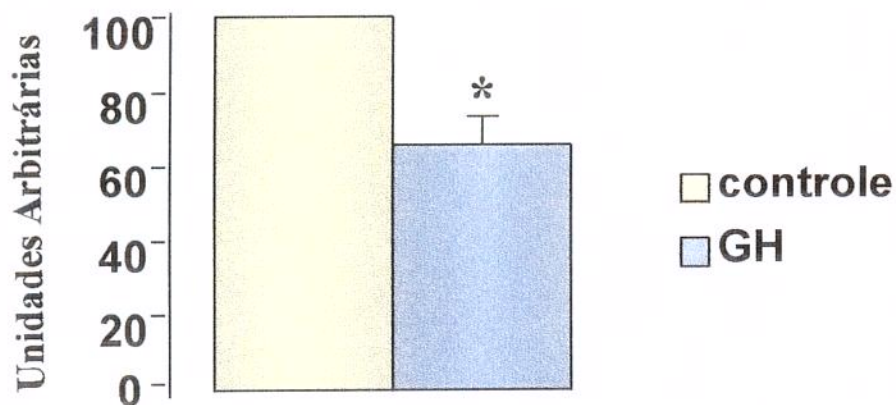
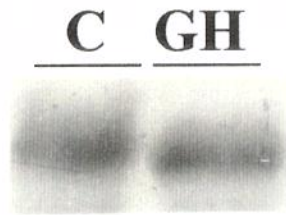


Figura 4 - Amostras de tecido hepático foram submetidas a imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1 e *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina. As bandas tidas como **C** referem-se aos controles e **GH** aos tratados cronicamente com este hormônio, sendo as negativas e positivas antes e após estímulo insulínico, respectivamente (**A**). O valor para o grau de fosforilação do IRS-1 é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 5 experimentos por densitometria óptica (**B**).

A) Blot: α IRS-2



B) Nível protéico do IRS-2

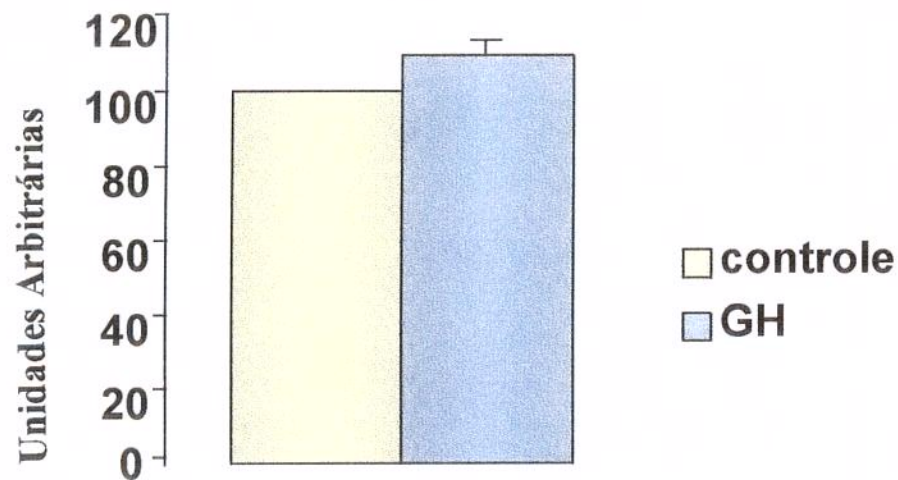
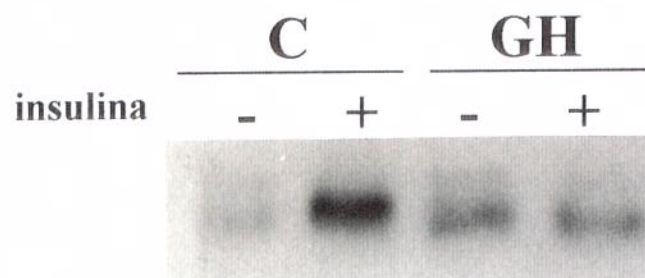


Figura 5 - Amostras de tecido hepático foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-2. A banda tida como **C** refere-se ao controle e **GH** ao tratado cronicamente com este hormônio (**A**). O valor para o nível protéico de receptor de insulina é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 5 experimentos por densitometria óptica (**B**).

**A) IP: α IRS-2
Blot: α PY**



B) Fosforilação do IRS-2

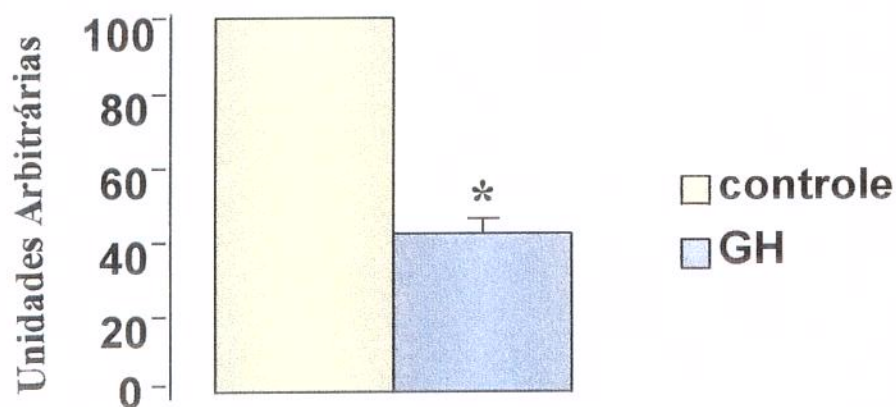
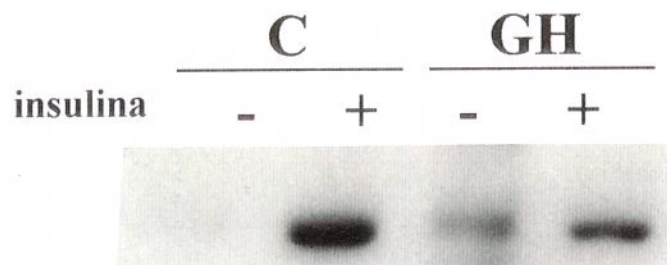


Figura 6 - Amostras de tecido hepático foram submetidas a imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-2 e *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina. As bandas tidas como **C** referem-se aos controles e **GH** aos tratados cronicamente com este hormônio, sendo as negativas e positivas antes e após estímulo insulínico, respectivamente (**A**). O valor para o grau de fosforilação do IRS-2 é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 5 experimentos por densitometria óptica (**B**).

**A) IP:α IRS-1
Blot:α PI3K**



B) Associação IRS-1/PI3K

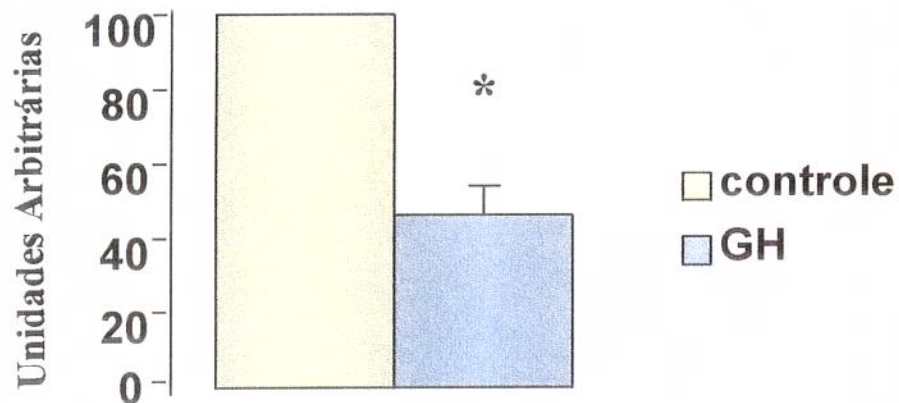
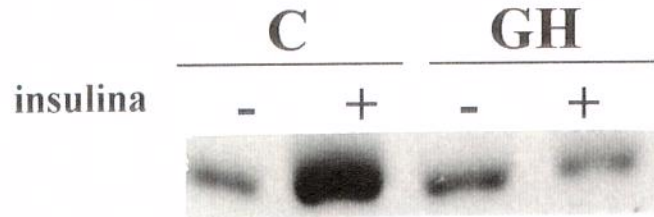


Figura 7- Amostras de tecido hepático foram submetidas a imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1 e *immunoblotting* com anticorpo anti-PI 3-quinase. A bandas tidas como **C** referem-se aos controles e **GH** aos tratados cronicamente com este hormônio, sendo as negativas e positivas antes e após estímulo insulínico, respectivamente (**A**).O valor para o grau de associação IRS-1/PI3K é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 6 experimentos por densitometria óptica (**B**).

A) IP: α IRS-2
Blot: α PI3K



B) Associação IRS-2/PI3K

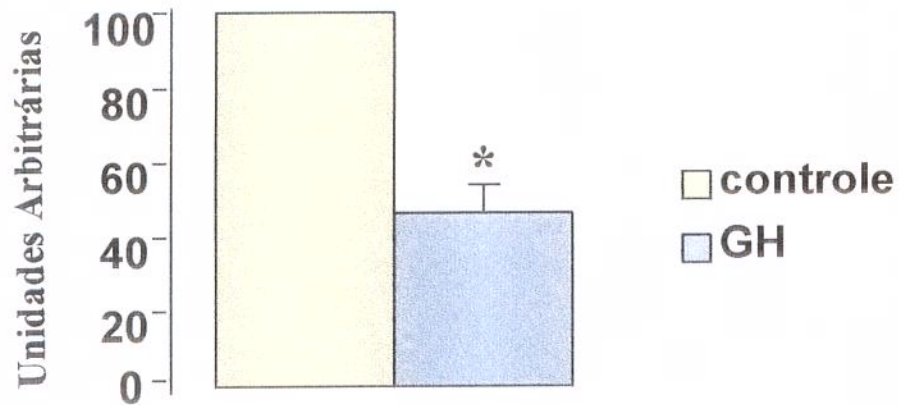
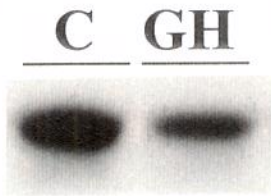


Figura 8 - Amostras de tecido hepático foram submetidas a imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-2 e *immunoblotting* com anticorpo anti-PI 3-quinase. As bandas tidas como **C** referem-se aos controles e **GH** aos tratados cronicamente com este hormônio, sendo as negativas e positivas antes e após estímulo insulínico, respectivamente (**A**). O valor para o grau de associação IRS-2/PI3K é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 4 experimentos por densitometria óptica (**B**).

A) Blot: α PI3K



B) Nível protéico da PI 3-quinase

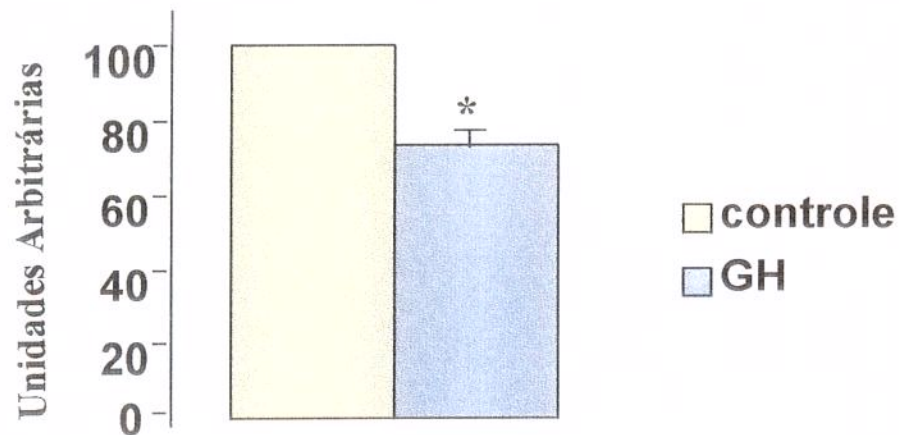


Figura 9 - Amostras de tecido hepático foram submetidas a *immunnoblotting* com anticorpo anti-PI 3-quinase. A banda tida como **C** refere-se ao controle e **GH** ao tratado cronicamente com este hormônio (**A**). O valor para o nível protéico PI3K é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 9 experimentos por densitometria óptica (**B**).

EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NA EXPRESSÃO E FOSFORILAÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA, DO IRS-1 E DO IRS-2 NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS

Como em tecido hepático, o tratamento com GH não produziu mudanças significativas, no nível protéico do receptor de insulina, no músculo esquelético dos ratos (Fig. 10A). Os dados de 9 experimentos podem ser observados na figura 10B ($M=93 \pm 15\%$; $p=0,674$). Por outro lado, após estímulo com insulina, a fosforilação do receptor reduziu-se para $44 \pm 5\%$ ($n=6$; $p<0,001$) nos animais tratados com GH, em relação aos controles (Fig. 11A e 11B).

Em contraste ao que foi observado no fígado, os ratos expostos a excesso crônico de GH não diferiram significativamente dos controles, quanto ao nível tecidual de IRS-1 (Fig. 12A). Numa média de 9 experimentos, a quantidade de IRS-1 nos animais tratados com GH foi de $94 \pm 6\%$ ($p=0,311$) (Fig. 12B). Para melhor definir o grau de fosforilação do IRS-1, realizamos, em ambos os grupos, análise por *Western blot* das proteínas fosforiladas em tirosina, em imunoprecipitados com anti-IRS-1, antes e após estímulo insulínico. As figuras 13A e 13B mostram que houve marcada redução para $64 \pm 9\%$ ($n=6$; $p<0,05$) na fosforilação do IRS-1, estimulada com insulina no músculo dos animais pré-tratados com GH.

O nível protéico do IRS-2, no músculo de ratos tratados com GH, manteve-se inalterado, comparado aos controles (Fig. 14A). No total de 6 experimentos, a quantidade de IRS-2 nos ratos expostos a GH foi de $134 \pm 16\%$ ($p=0,087$) (Fig. 14B). Por outro lado, a fosforilação deste substrato, nos animais tratados com GH, diminuiu para $73 \pm 8\%$ ($n=4$; $p<0,05$) após estímulo com insulina (Fig. 15A e 15B). Em músculo, não observamos nenhuma diferença nos graus de fosforilação do IRS-1 e do IRS-2 em estado basal, entre os grupos estudados.

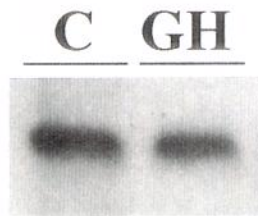
Para avaliar a associação da subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase com o IRS-1, *blots*, previamente imunoprecipitados com anticorpo anti-IRS-1, foram incubados

com anticorpo anti-PI 3-quinase. Como esperado, em ambos os grupos uma banda de 85 kDa esteve presente em imunoprecipitados de IRS-1 após exposição à insulina. Uma diminuição na intensidade desta banda para $63 \pm 10\%$ ($n=4$; $p<0,05$) foi observada nos animais tratados com GH (Fig. 16A e 16B). Procedimento semelhante utilizou-se para investigar a associação IRS-2 com PI 3-quinase e observou-se uma redução para $68 \pm 11\%$ ($n=5$; $p<0,05$) (Fig. 17A e 17B).

Quando o nível protéico da PI 3-quinase foi mensurado, no músculo destes animais, não observamos diferença significativa entre os dois grupos (Fig. 18). Em um total de 9 experimentos, a quantidade de PI 3-quinase em nível muscular dos animais expostos a GH foi de $107 \pm 17\%$ ($p=0,713$), em relação aos controles (Fig 18B). Isto sugere que o GH pode reduzir a associação entre IRS-1 e PI 3-quinase, sem alterar a quantidade de PI 3-quinase, presente no tecido.

A discriminação dos valores acima relatados encontra-se nos ANEXOS 4 e 5.

A) Blot: α IR



B) Nível protéico do receptor de insulina

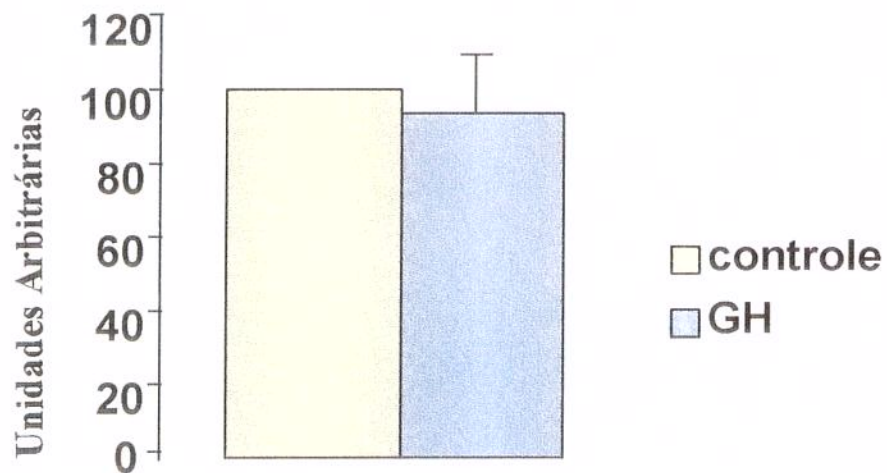
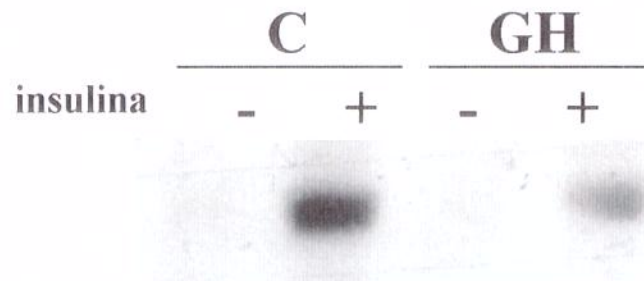


Figura 10 - Amostras de tecido muscular foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-receptor de insulina. A banda tida como **C** refere-se ao controle e **GH** ao tratado cronicamente com este hormônio (A). O valor para o nível protéico de receptor de insulina é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 9 experimentos por densitometria óptica (B).

**A) IP: α IR
Blot: α PY**



B) Fosforilação do receptor de insulina

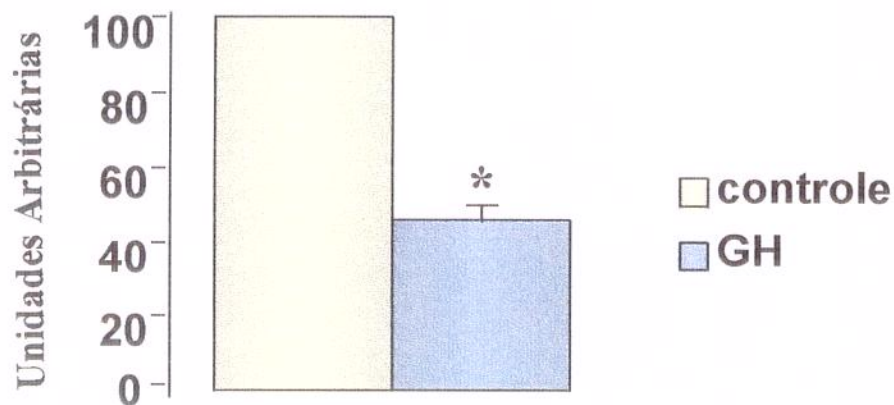


Figura 11- Amostras de tecido muscular foram submetidas a imunoprecipitação com anticorpo anti-receptor de insulina e *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina. As bandas tidas como **C** referem-se aos controles e **GH** aos tratados cronicamente com este hormônio, sendo as negativas e positivas antes e após estímulo insulínico, respectivamente (*A*). O valor para o grau de fosforilação do receptor de insulina é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 6 experimentos por densitometria óptica (*B*).

A) Blot: α IRS-1



B) Nível protéico do IRS-1

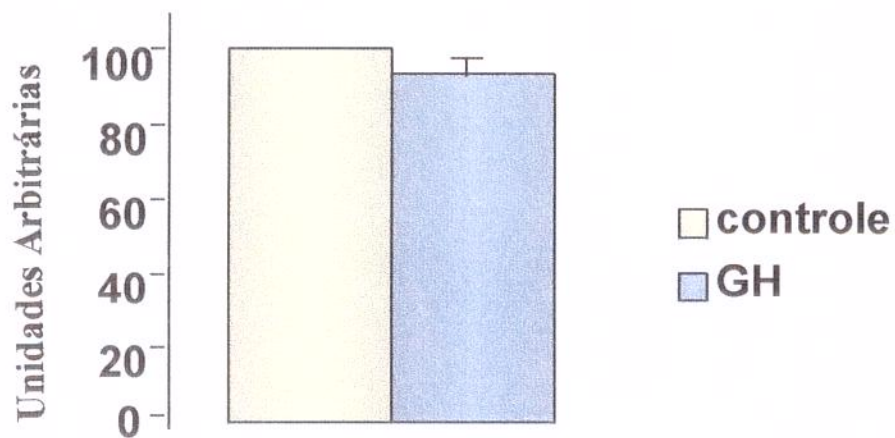
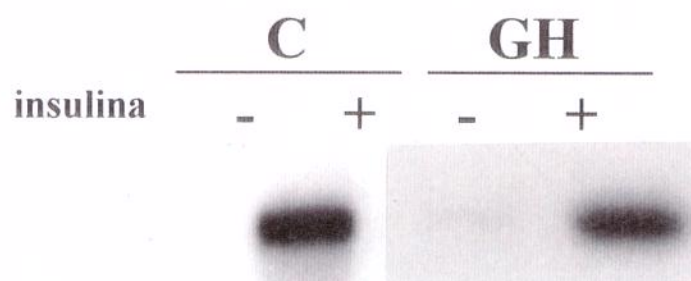


Figura 12 - Amostras de tecido muscular foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1. A banda tida como **C** refere-se ao controle e **GH** ao tratado cronicamente com este hormônio (**A**). O valor para o nível protéico IRS-1 é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 9 experimentos por densitometria óptica (**B**).

**A) IP: α IRS-1
Blot: α PY**



B) Fosforilação do IRS-1

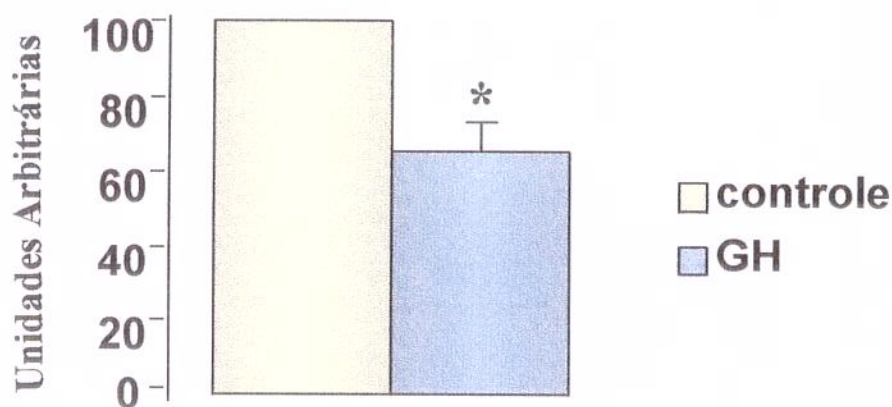


Figura 13 - Amostras de tecido muscular foram submetidas a imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1 e *immunnoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina. As bandas tidas como **C** referem-se aos controles e **GH** aos tratados cronicamente com este hormônio, sendo as negativas e positivas antes e após estímulo insulínico, respectivamente (**A**). O valor para o grau de fosforilação do IRS-1 é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 6 experimentos por densitometria óptica (**B**).

A) Blot: α IRS-2



B) Nível protéico do IRS-2

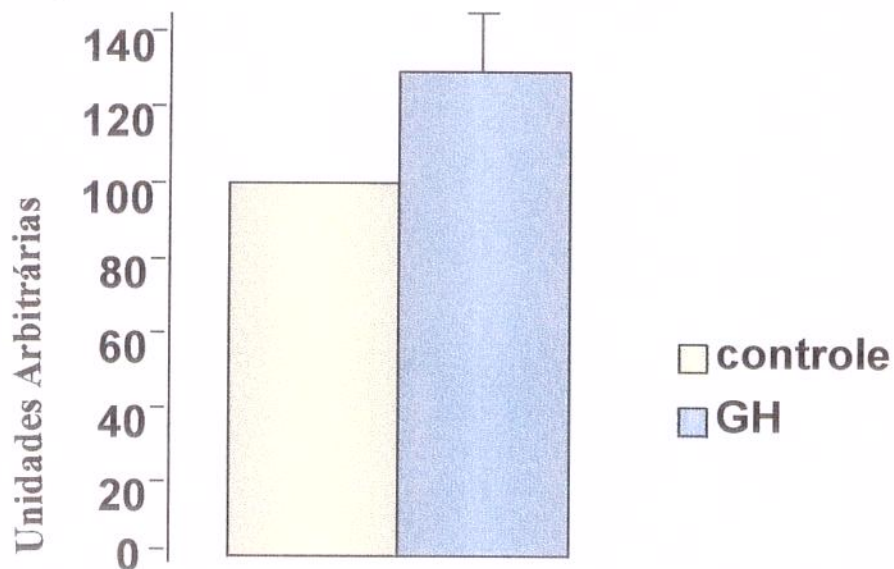
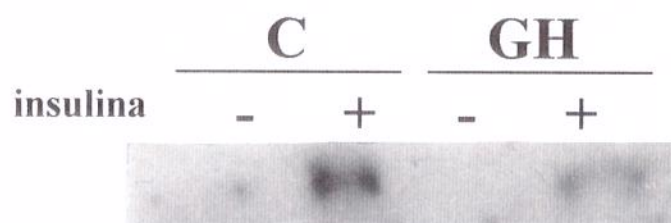


Figura 14 - Amostras de tecido muscular foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-2. A banda tida como **C** refere-se ao controle e **GH** ao tratado cronicamente com este hormônio (A). O valor para o nível protéico de receptor de insulina é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 6 experimentos por densitometria óptica (B).

A) IP: α IRS-2
Blot: α PY



B) Fosforilação do IRS-2

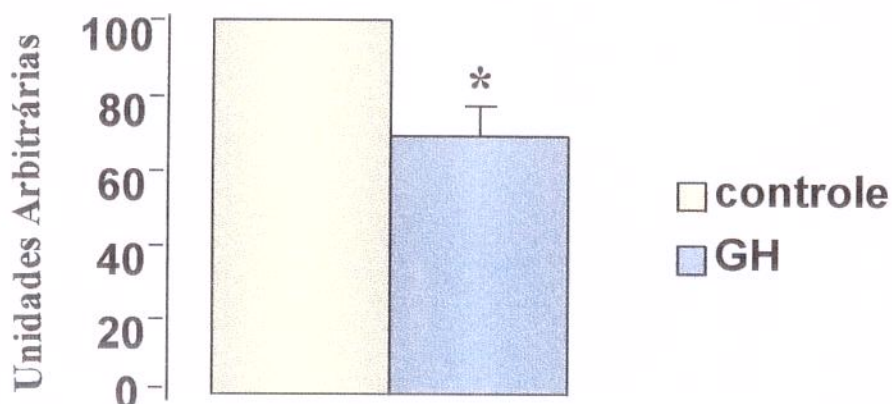
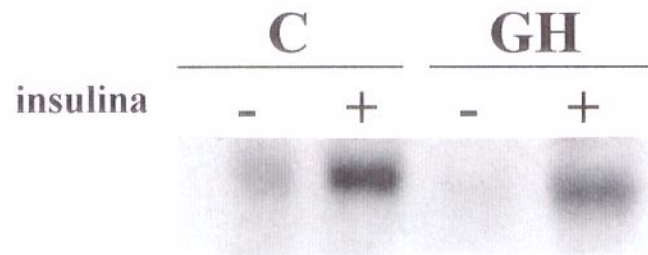


Figura 15 - Amostras de tecido muscular foram submetidas a imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-2 e *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina. A bandas tidas como **C** referem-se aos controles e **GH** aos tratados cronicamente com este hormônio, sendo as negativas e positivas antes e após estímulo insulínico, respectivamente (**A**). O valor para o grau de fosforilação do IRS-2 é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 4 experimentos por densitometria óptica (**B**).

**A) IP: α IRS-1
Blot: α PI3K**



B) Associação IRS-1/PI3K

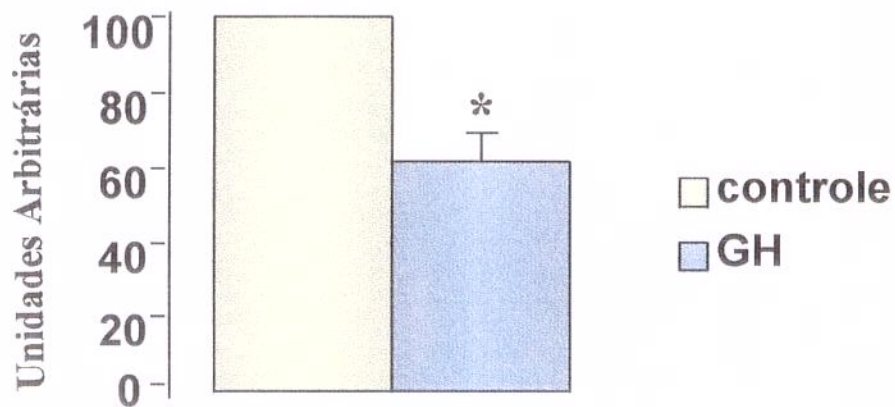
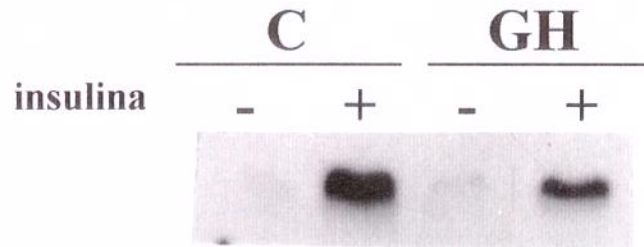


Figura 16 - Amostras de tecido muscular foram submetidas a imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1 e *immunoblotting* com anticorpo anti-PI 3-quinase. As bandas tidas como **C** referem-se aos controles e **GH** aos tratados cronicamente com este hormônio, sendo as negativas e positivas antes e após estímulo insulínico, respectivamente (**A**). O valor para o grau de associação IRS-1/PI3K é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 4 experimentos por densitometria óptica (**B**).

**A) IP:α IRS-2
Blot:α PI3K**



B) Associação IRS-2/PI3K

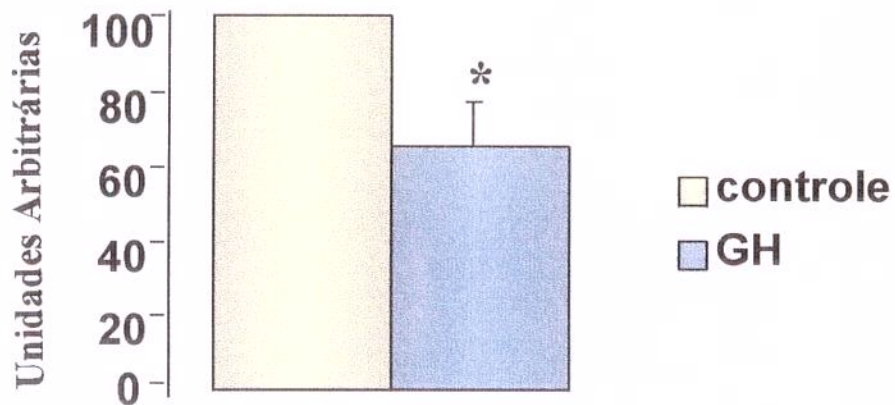
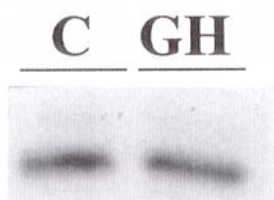


Figura 17 - Amostras de tecido muscular foram submetidas a imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-2 e *immunoblotting* com anticorpo anti-PI 3-quinase. As bandas tidas como **C** referem-se aos controles e **GH** aos tratados cronicamente com este hormônio, sendo as negativas e positivas antes e após estímulo insulínico, respectivamente (**A**). O valor para o grau de associação IRS-2/PI3K é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 5 experimentos por densitometria óptica (**B**).

A) Blot: α PI3K



B) Nível protéico da PI 3-quinase

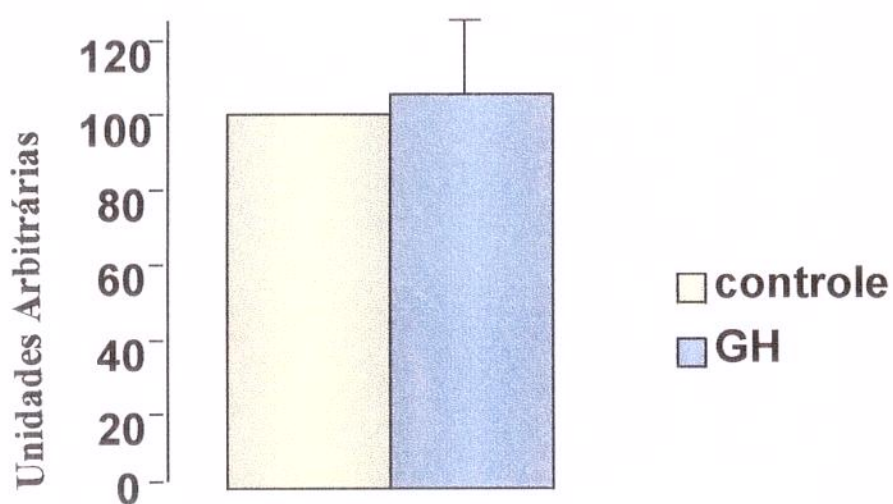
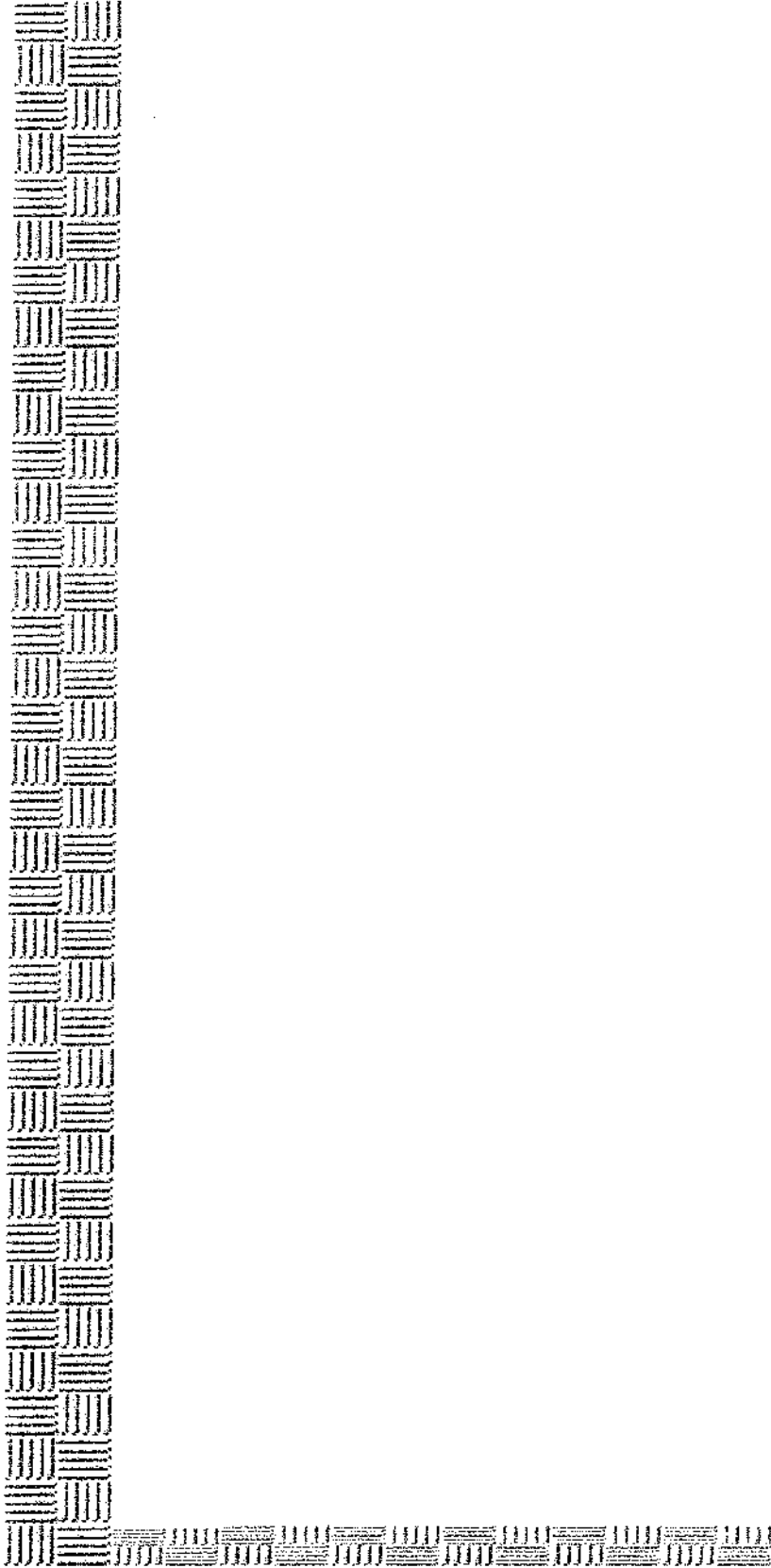


Figura 18 - Amostras de tecido muscular foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-PI 3-quinase. A banda tida como **C** refere-se ao controle e **GH** ao tratado cronicamente com este hormônio (A). O valor para o nível protéico PI3K é representado como a média \pm desvio padrão proveniente da avaliação de 9 experimentos por densitometria óptica (B).



5. Discussão

O receptor de insulina é o principal mediador da ação deste hormônio na mitogênese celular e nos processos metabólicos. A insulina liga-se à subunidade α extracelular de seu receptor que sofre uma mudança conformacional, ativando a capacidade quinase da subunidade β intracelular. Como resultado, o receptor sofre autofosforilação e implementa sua capacidade quinase em direção a outras proteínas citoplasmáticas, determinando a fosforilação de substratos protéicos intracelulares. Dentre estas proteínas estão o substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) (SUN et al., 1992) e o substrato-2 do receptor de insulina, recentemente clonado (SUN et al., 1995). Uma vez fosforilados, estes substratos podem associar-se a proteínas SH2, assim chamadas por apresentarem uma porção que apresenta a segunda homologia ao oncogene Src (LAVAN et al., 1992; KUHNE et al., 1993; PAWSON, 1995; SKOLNIK et al., 1993; YONEZAWA et al., 1992). Dentre estas proteínas que contém SH2, está a PI 3-quinase que é ativada pela sua associação ao IRS-1 ou IRS-2 (BACKER et al., 1992; FOLLI et al., 1992; HADARI et al., 1992). Outras proteínas são descritas como sendo fosforiladas após estímulo insulínico, dentre estas a ecto-ATPase (LIN & GUIDOTTI et al., 1989) , pp60 (LAVAN & LIENHARD, 1993) e o Shc (KOVACINA & ROTH, 1993).

A fosforilação do IRS-1 e a ativação da PI 3-quinase estão diminuídas em células que expressam mutações no receptor de insulina (KAPPELER et al., 1991; WHITE et al., 1988) bem como em modelos animais de resistência insulínica (FOLLI et al., 1993). Estas diminuições correlacionam-se com defeitos nas ações biológicas da insulina e sugerem que o receptor de insulina, o IRS-1 e IRS-2 e a PI 3-quinase são importantes pontos de regulação, em estados de resistência à insulina.

O estudo da regulação destas etapas iniciais da ação insulínica pode ser realizada *in vitro*, utilizando-se receptor de insulina parcialmente purificado e moléculas de IRS-1 e PI 3-quinase recombinantes, também pode ser realizado em cultura de células ou em tecidos animais *in vivo*.

Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho, estimulação *in vivo* com insulina, extração e homogeneização de tecido hepático e muscular em condições

desnaturantes ou em condições apropriadas para imunoprecipitação e posterior *immunoblotting* com anticorpos específicos anti-receptor de insulina, anti-IRS-1, anti-IRS-2 e anti-fosfotirosina permitiram uma avaliação das etapas iniciais da ação insulínica, após a ligação no receptor, em dois tecidos com importante papel na utilização de glicose (SAAD et al., 1989).

Nos estudos anteriores em animais, que investigaram a fisiologia molecular do receptor de insulina, os receptores eram parcialmente purificados e atividade quinase era determinada *in vitro*, utilizando-se substratos exógenos como histonas (ROTHENBERG, WHITE, KAHN, 1990). Embora informativo, tal procedimento é suscetível a artefatos bioquímicos resultantes da homogeneização do tecido e purificação do receptor, como proteólise e desfosforilação do receptor, por fosfatases contaminantes (KATHURIA et al., 1986), bem como da remoção do receptor da membrana plasmática, onde interações com outros componentes celulares podem influenciar a atividade do receptor (FEHLMAN et al., 1985). Ainda, diferenças importantes na atividade quinase do receptor podem manifestar-se *in vitro*, dependendo do substrato exógeno utilizado (ROTHENBERG et al., 1990). O método que utilizamos não é sujeito a estas complicações e permite uma determinação direta do grau de fosforilação do receptor de insulina, do IRS-1 e do IRS-2, o que é também uma avaliação da atividade quinase *in vivo* do receptor, dirigida aos substratos endógenos, IRS-1 e IRS-2.

Assim, utilizando esta metodologia, estudamos as etapas iniciais de ação insulínica em tecidos muscular e hepático de um modelo animal de resistência insulínica: rato tratado cronicamente com GH. Este é um modelo de resistência à insulina pouco investigado e que necessita uma caracterização adequada. O tratamento por cinco dias com GH induziu nos animais uma hiperinsulinemia de jejum, sem alterações nos níveis glicêmicos, sugerindo menor sensibilidade à insulina, que foi bem documentada por uma redução na velocidade de decaimento da glicose, durante o teste de tolerância à insulina.

Os mecanismos responsáveis pela resistência insulínica, encontrada no excesso crônico de GH, não estão totalmente esclarecidos. O tratamento de animais com hormônio

do crescimento induz a um estado de resistência insulínica evidenciado por alteração no metabolismo de glicose tanto em nível periférico (MALLOFF et al., 1980; MORGAN et al., 1961) quanto hepático (BISHOP et al., 1967). Entretanto, não há mudança significativa no nível protéico do receptor de insulina, no fígado e músculo destes animais, como previamente demonstrado (KAHN et al., 1978). Tal dado pode ser confirmado em nosso estudo uma vez que não observamos, também, variação no nível protéico do receptor de insulina, tanto em fígado como em músculo dos animais expostos a excesso crônico de GH.

Apesar de não ter sido verificada alteração no número de receptores de insulina, no fígado e músculo dos ratos tratados com GH, observamos uma redução de 56% no grau de autofosforilação em tirosina do receptor, no músculo destes animais, após estímulo *in vivo* com insulina. Este achado pode ter significado biológico, porque a diminuição de fosforilação do receptor de insulina está correlacionada com a resistência insulínica em modelos animais (GIORGINO et al., 1993). Esta observação fundamenta-se em estudos com mutações no receptor de insulina que fazem com que o mesmo perca sua atividade tirosina quinase, sendo incapaz de se autofosforilar, culminando em defeitos na mediação do sinal insulínico e falência dos efeitos biológicos deste hormônio (KASUGA et al., 1982a; EBINA et al., 1987; CHOU et al., 1987).

A presença de redução da fosforilação do receptor de insulina, no músculo, mas não no fígado dos ratos tratados com GH, parece ser uma importante característica destes animais. Quando buscamos outros modelos animais de resistência insulínica, observamos que esta diminuição de fosforilação do receptor faz-se presente tanto no fígado quanto no músculo (SAAD et al., 1992; CARVALHO et al., 1996) ou somente no fígado (SAAD et al., 1993). Torna-se difícil a explicação para esta alteração tecido-específica do receptor de insulina nos animais expostos a excesso de GH. Parece não estar relacionada à hiperinsulinemia, já que nenhuma alteração foi observada na fosforilação do receptor em nível hepático, sendo que o fígado é exposto a concentração de insulina muito mais alta que o músculo. Em alguns experimentos, usamos doses maiores de insulina (10^{-4} M or 3×10^{-4} M) e os resultados foram os mesmos. Estes dados mostram que a

diminuição de fosforilação em tirosina do receptor, no músculo, não está relacionada com os níveis de insulina que chegam a este tecido.

As alterações ocorridas em nível protéico do IRS-1, nos ratos tratados com GH, mostraram uma regulação tecido-específica com uma diminuição para 40% na quantidade de IRS-1 no fígado, mas não no músculo. Como anteriormente discutido, esta resposta pode ser reflexo da exposição crônica do fígado em níveis de insulina bem mais altos do que aqueles ao que o músculo é exposto. Está claramente caracterizado que, em cultura de células, o tratamento crônico com insulina reduz o nível protéico do IRS-1, principalmente como resultado do aumento da degradação desta proteína (RICE et al., 1993), enquanto a síntese deste substrato não sofre mudanças, já que a quantidade de mRNA permanece inalterada (SAAD et al., 1994; RICE et al., 1993). Assim, a exposição constante dos ratos tratados com GH a níveis insulinêmicos elevados determinaria fosforilação deste substrato e aumento proporcional na sua degradação.

A função do GH e da IGF-1, que se espera estarem elevados nos ratos tratados com GH, na degradação do IRS-1 deve ser ainda esclarecido e necessita investigações posteriores. A existência de efeitos rápidos e transitórios “insulina-like” do GH sugerem que este hormônio deva utilizar moléculas sinalizadoras comuns à via de transmissão do sinal insulínico. O fato é que, diferente do receptor insulínico e do receptor para IGF-1, o receptor do GH não tem atividade tirosina quinase intrínseca, mas é capaz de estimular a atividade de uma proteína quinase citoplasmática, a JAK2, um membro da família Janus de proteínas-quinases (ARGETSINGER et al., 1995). Assim, após ativação da capacidade quinase da JAK2, esta é capaz de fosforilar o IRS-1, embora em uma proporção menor do que aquela determinada pela insulina (ARGETSINGER et al., 1995; SOUZA et al., 1994). Portanto a fosforilação do IRS-1 pelo GH poderia ser fator contribuinte da degradação maior deste substrato, nos animais expostos a excesso deste hormônio.

Interessante foi o fato de que não observamos nenhuma alteração no nível protéico do IRS-2 tanto em fígado quanto em músculo, sugerindo uma regulação diferente para cada um dos substratos nesta situação de excesso de GH.

O aumento nos graus de fosforilação em tirosina do IRS-1 e do IRS-2 em nível hepático, no estado basal (antes do estímulo com insulina) dos ratos tratados com GH, pode estar relacionado à hiperinsulinemia que estes animais apresentam. Entretanto, devemos considerar evidências recentes, já parcialmente relatadas acima, demonstrando que o IRS-1 e o IRS-2 podem ser fosforilados em resposta a IGF-1 (LAVAN et al., 1992), GH (ARGETSINGER et al., 1995), Angiotensina II (SAAD, VELLOSO, CARVALHO, 1996), Interleucina 4 e outras interleucinas (WANG et al., 1993). Assim, valorizando estas últimas observações, o GH bem como a IGF-1 podem desempenhar função importante no aumento de fosforilação destes substratos, no estado basal dos ratos tratados com GH.

Nossa observação de que há uma significativa redução nos graus de fosforilação do IRS-1 e do IRS-2 em tecidos hepático e muscular, bem como da associação destes substratos com a PI 3-quinase, após estímulo insulínico nos ratos tratados com GH, sugere que estes eventos tenham papel na resistência insulínica mediada pelo GH. 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, que foi recentemente descrita, pode ser evidenciada em cultura de células utilizando-se metodologia variada (TANTI et al., 1994). Demonstrou-se que a fosforilação do IRS-1 em serina e (ou) treonina reduz, de maneira importante, a capacidade do receptor de insulina fosforilar este substrato em tirosina, dificultando a transmissão do sinal insulínico. Diversas enzimas com capacidade serina quinase como a própria PI 3-quinase, a MAP quinase, a proteína quinase-C, proteína quinase-A, podem fosforilar o IRS-1 em serina ou treonina, induzindo tais alterações. O tratamento com hormônio do crescimento pode determinar aumento na quantidade de diacilglicerol (DAG) (CATALIOTO, AILHAUD, NEGREL, 1990). O DAG ativa a proteína quinase-C e esta induz fosforilação do IRS-1 e (ou) IRS-2 em resíduos de serina e treonina, tornando-os menos receptivos à fosforilação em tirosina e induzindo reduções na associação destes substratos com a PI 3-quinase. Considerando a exposição dos tecidos dos ratos tratados com hormônio do crescimento em níveis elevados de GH, podemos especular que a redução observada nestes

passos iniciais de ação insulínica possa estar mediado pelo aumento da atividade da proteína quinase-C e , por conseguinte, fosforilação do IRS-1 em serina e treonina.

Em adição às ações divergentes do GH no nível protéico do IRS-1 em níveis hepático e muscular, observamos também efeitos diferenciados no nível tecidual da enzima PI 3-quinase, que se encontra diminuída no fígado, mas não no músculo dos ratos expostos cronicamente a GH. Não nos está claro o fator determinante da diminuição, no nível protéico, desta enzima, em tecido hepático, mas é pouco provável que esteja ligado à hiperinsulinemia. RICE et al. (1993), utilizando cultura de adipócitos 3T3-L1, demonstraram que o tratamento crônico com insulina induz a uma elevação ~20% nos níveis de PI 3-quinase. É possível que a diminuição de PI 3-quinase, observada em tecido hepático, em nosso modelo de resistência insulínica, esteja ligado diretamente aos elevados níveis de GH e (ou) de IGF-1, mas esta hipótese necessita maiores observações.

A insulina estimula a captação de glicose em tecidos muscular e adiposo em parte pelo estímulo à translocação do GLUT4 (transportador de glicose) de um compartimento intracelular para a membrana plasmática (STEPHENS & PILCH, 1995; RICE & GARNER, 1994; QUON et al., 1995). A conclusão de que a PI 3-quinase é necessária para a translocação do GLUT4, estimulada pela insulina, tem sido sustentada por diferentes métodos experimentais (HARA et al., 1994; OKADA et al., 1994; HARUTA et al., 1995; CHEATAM et al., 1994). A captação de glicose estimulada pela insulina em células adiposas, é inibida pelo *wortmannin* e LY90024, dois inibidores da PI 3-quinase (CLARKE et al., 1994; YEH et al., 1995; SANCHES-MARGALET et al., 1994). Mais ainda, uma mutação na PI 3-quinase com deleção no sítio de ligação da subunidade p110 inibe a captação de glicose estimulada pela insulina (neste caso, translocação do GLUT1 para a membrana) (HARA et al., 1994). Somados, estes resultados sugerem que a ativação da PI 3-quinase é necessária para a captação de glicose estimulada pela insulina.

Recentemente, foi criado um camundongo transgênico, com mutação no gene do IRS-1, sem nenhuma evidência de fosforilação do IRS-1 ou associação deste substrato ativando a PI 3-quinase (TAMEMOTO et al., 1994; ARAKI et al., 1994). Este

camundongo, além de apresentar uma redução de 50% no crescimento intra-uterino, mostrou-se resistente aos efeitos da insulina e IGF-1 com intolerância à glicose (ARAKI et al., 1994). Estes animais apresentam hiperinsulinemia ao jejum e durante o teste endovenoso de tolerância à glicose. Estes resultados correlacionaram-se com marcada redução no transporte de glicose estimulado pela insulina em adipócitos isolados (ARAKI et al., 1994), sendo mais uma evidência da importância da atividade da PI 3-quinase para o transporte de glicose. A ativação desta enzima tem sido descrita como essencial para o efeito biológico da insulina de estimular síntese de glicogênio (CROSS et al., 1994; WELSH et al., 1994).

Parece-nos razoável especular que os passos envolvidos na associação IRS-1/PI 3-quinase e IRS-2/PI 3-quinase estejam relacionados com a ativação do transporte de glicose no músculo e com a síntese de glicogênio no fígado e músculo e que a redução, nesta associação, nos ratos tratados com GH tem papel na resistência insulínica presente nestes animais.

Em resumo, os dados apresentados na tabela 2 mostram que a reduzida expressão e (ou) fosforilação do IRS-1 e do IRS-2 podem levar à diminuição na associação entre estes substratos e a PI 3-quinase no fígado e músculo de ratos tratados com GH. Estes dados sugerem que mudanças nas etapas iniciais de transmissão do sinal insulínico podem ter papel na resistência insulínica observada nos animais expostos a excesso crônico de GH.

Tabela 2. Regulação do receptor de insulina (**IR**), substrato-1 do receptor de insulina (**IRS-1**) e substrato-2 do receptor de insulina (**IRS-2**). Fosforilação e associação destes substratos com a PI 3-quinase (**PI3K**) no fígado e músculo de ratos tratados com GH por cinco dias.

	Fígado		Músculo	
	Proteína	Fosforilação ou Associação	Proteína	Fosforilação ou Associação
IR	↔	↔ †	↔	↓ ↓ †
IRS-1	↓ ↓	↓ ↓ †	↔	↓ ↓ †
IRS-2	↔	↓ ↓ †	↔	↓ †
PI3K	↓	∅	↔	∅
PI3K/IRS-1	∅	↓ ↓ ‡	∅	↓ ↓ ‡
PI3K/IRS-2	∅	↓ ↓ ‡	∅	↓ ↓ ‡

∅ - não se aplica

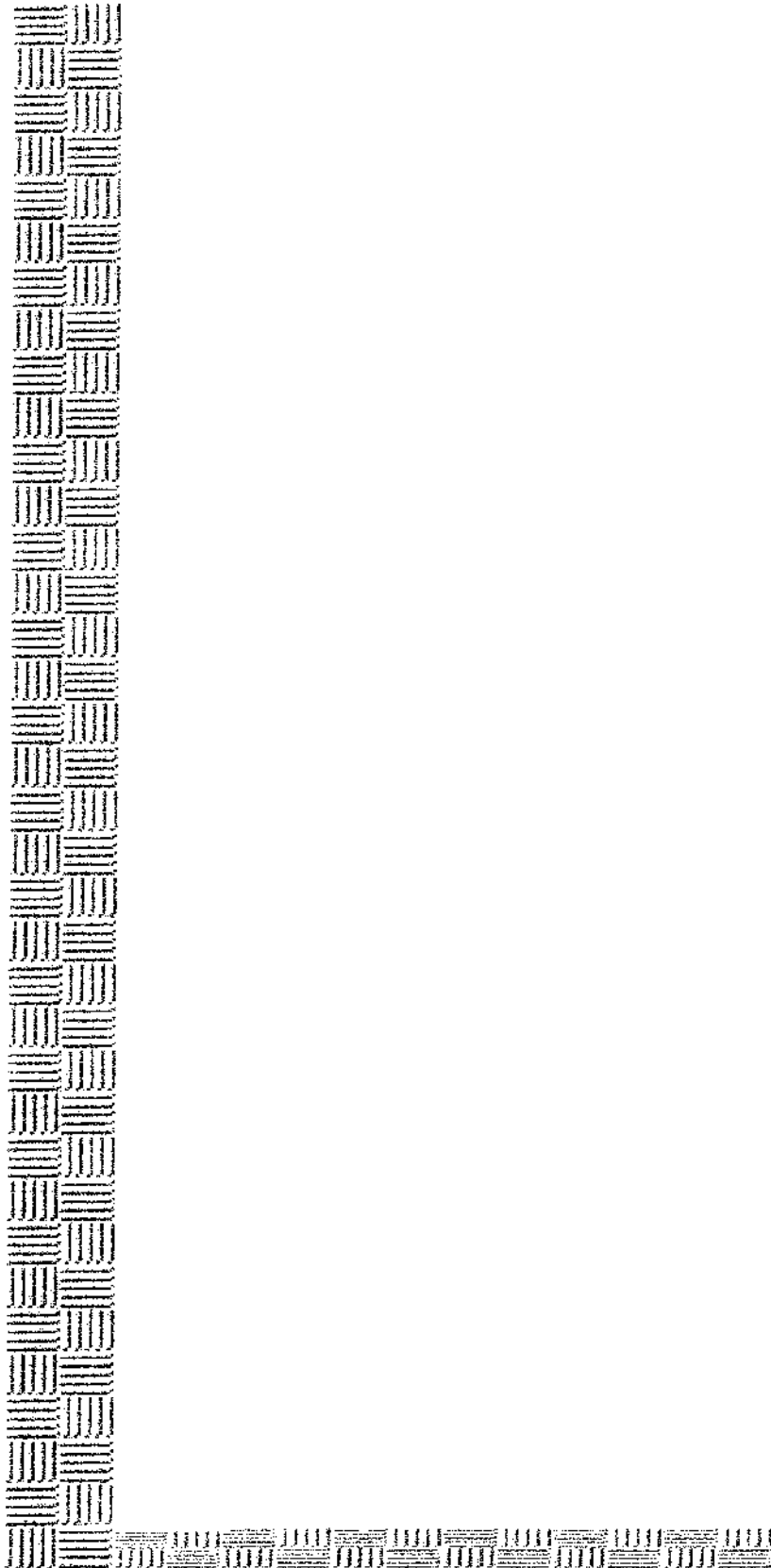
† - fosforilação

‡ - associação

↔ - redução menor que 20%, sem significado estatístico

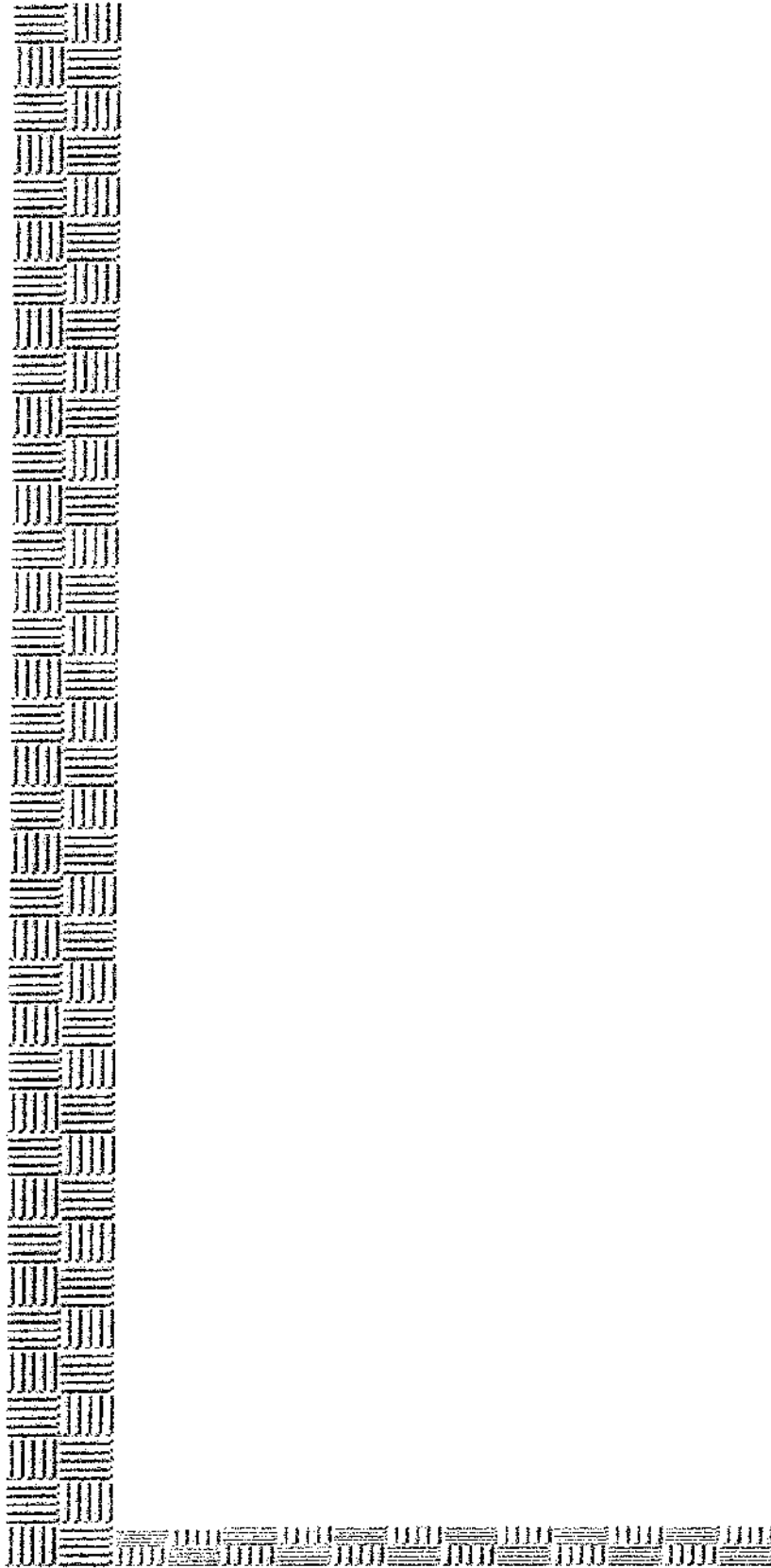
↓ - redução entre 21 e 30%, p<0,05.

↓ ↓ - redução maior que 30%, p<0,05.



6. Conclusões

- A exposição crônica a excesso de GH altera os passos iniciais da transmissão do sinal insulínico, em nível de fosforilação, do receptor em tecido muscular e isso pode contribuir na redução da fosforilação dos substratos neste tecido.
- Um importante achado comum a ambos os tecidos hepático e muscular foi a diminuição da fosforilação em tirosina do IRS-1 e do IRS-2, com diminuição da associação destes substratos com a PI 3-quinase.
- As alterações nos níveis protéicos do IRS-1 e da PI 3-quinase parecem colaborar para a redução da interação destas proteínas no fígado, mas não no músculo.
- Estes dados sugerem que alterações, nos passos iniciais da transmissão do sinal insulínico, podem ter um papel na resistência insulínica observada nos ratos expostos a excesso de GH.



7. Summary

Insulin stimulates the tyrosine kinase activity of its receptor which results in the phosphorylation of the cytosolic substrates, insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2). These two substrates in turn associate with and activate phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase). An excess of growth hormone (GH) is known to produce insulin resistance, but the exact molecular mechanism remains unclear. In the present study, we have examined the levels and phosphorylation status of the insulin receptor and its substrate IRS-1, as well as the association between this substrate and PI 3-kinase, in the liver and muscle of rats chronically treated with GH. The levels of insulin receptor in the liver or muscle were similar in both the GH-treated and non-treated rats. Insulin-stimulated receptor autophosphorylation, as determined by immunoblotting with an antiphosphotyrosine antibody, did not change in the liver, but was reduced by $56 \pm 5\%$ ($p < 0.001$) in the muscle of rats treated with GH. In contrast, IRS-1 protein levels decreased to $40 \pm 6\%$ ($p < 0.001$) in the liver of GH-treated rats, but not in muscle. In samples previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and blotted with antiphosphotyrosine antibody, there was a decrease in insulin stimulated IRS-1 phosphorylation levels to $67 \pm 11\%$ ($p < 0.05$) and $64 \pm 9\%$ ($p < 0.01$) in the liver and muscle of GH treated rats, respectively. The insulin-stimulated IRS-1 association with PI 3-kinase decreased to $45 \pm 5\%$ ($p < 0.001$) in the liver and to $63 \pm 10\%$ ($p < 0.05$) in the muscle of rats treated with GH. Concomitantly, there was a decrease to $75 \pm 4\%$ ($p < 0.001$) in the level of hepatic PI 3-kinase. While there was no change in the hepatic and muscle IRS-2 concentrations, the tyrosine phosphorylation of this substrate after insulin stimulation was reduced to $43 \pm 4\%$ ($p < 0,001$) and $73 \pm 8\%$ ($p < 0,05$) in the liver and muscle of GH treated rats, respectively. The association of IRS-2 with PI 3-kinase decreased to $47 \pm 10\%$ ($p < 0,05$) in the liver and to $68 \pm 11\%$ ($p < 0,05$) in the muscle of GH treated rats. These data suggest that changes in the early steps of insulin signal transduction may have a role in the insulin resistance observed in animals chronically treated with GH.



8. Referências bibliográficas

- ARAKI, E.; LIPES, M.A.; PATTI, M.A.; BRUNING, J.C.; HAAG, B.; JOHSON, R.S.; KAHN, C.R. - Alternative pathway of insulin signaling in mice with target disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, 372:186-190, 1994.
- ARGETSINGER, L.S.; HSU, G.W.; MYERS, M.G.; BILLESTRUP, N.; WHITE, M.F.; CARTER-SU, C. - Growth hormone, interferon- γ , and leukemia inhibitory factor promoted tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1. **J. Biol. Chem.**, 270:14685-14692, 1995.
- BACKER, J.M.; MYERS, M.; SCHOELSON, S.E.; CHIN, D.J.; SUN, X.J.; MIRALPEIX, M.; HU, P.; MARGOLIS, B.; SKOLNIK, E.Y.; SCHLESSINGER, J.; WHITE, M.F. - The phosphatidylinositol 3-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **EMBO J.**, 11: 3469-3479, 1992.
- BARON, V.; GAUTIER, N.; KOMORIYA, A.; HAINAUT, P.; SCIMECA, J-C.; MERVIC, M.; LAVIELLE, S.; DOLAIS-KITABGI, J.; VAN OBBERGHEN, E. - Insulin binding to its receptor induces a conformational change in the receptor C-terminus. **Biochemistry**, 29:4634-4641, 1990.
- BECK, P.; SCHALCH, D.S.; PARKER, M.L.; KIPNIS, D.M.; DAUGHADAY, W.H. - Correlative studies of growth hormone and insulin plasma concentrations with metabolic abnormalities in acromegaly. **J. Lab. Clin. Med.**, 66: 366-379, 1965.
- BISHOP, J.S.R.; STEELE, R.; ALTSZULER, N.; RATHGEB, I.; BJERKNES, C.; BODO, R.C. - Diminished responsiveness to insulin in the growth hormone-treated normal dog. **Am. J. Physiol.**, 212:272-278, 1967.
- BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; VITTORIO, C.; CORGNATI, A.; MUGGEO, M. - Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J. Clin. Endocr. Met.**, 68:374-378, 1989.

- CARPENTER, C.L. & CANTLEY, L.C. - Phosphoinositide kinases. **Biochem.**, 29:11147-11156, 1990.
- CARVALHO, C.R.O.; BRENELLI, S.L.; SILVA, A.C.; NUNES, A.L.B.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.A. - Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. **Endocrinology**, 137:151-159, 1996.
- CATALIOTO, R.M.; ALHAUD, G.; NEGREL, R. - Diacylglycerol production induced by growth hormone in OB 1771 preadipocytes arise from phosphatidilcholine breakdown. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 173:840-846, 1990.
- CHEATAM, B. & KAHN, C.R. - Insulin action and the insulin signaling network. **Endocr. Rev.**, 16:117-141, 1995.
- CHEATHAM, B.; VLAHOS, C.J.; CHEATHAM, L.; WANG, L.; BLENIS, J.; KAHN, C.R. - Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. **Mol. Cel. Biol.**, 14: 4902-4911, 1994.
- CHOU, C.K.; DULL, T.J.; RUSSEL, D.S.; GHERZI, R.; LEWOHL, D.; ULLRICH, A.; ROSEN, O.M. - Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. **J. Biol. Chem.**, 262:1842-1847, 1987.
- CLARKE, J.F.; YOUNG, P.W.; YONEZAWA, K.; KASUGA, M.; HOLMAN, G.D. - Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. **Biochem. J.**, 300:631-635, 1994.

- CROSS, D.A.; ALESSI, D.R.; VANDENHEED, J.R.; MACDOWELL, H.E.; HUNDAL, H.S.; COHEN, P. - The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. **Biochem. J.**, 303:21-26, 1994.
- DAUGHDAY, W. H. - The adenohipophysis. In: WILSON, J.D. & FOSTER, D.W. (eds) - **Textbook of endocrinology**. WB Saunders Company, Philadelphia London Toronto, p 605, 1992.
- EBINA, Y.; ARAKI, E.; TAIRA, M.; SHIMADA, F.; MORI, M.; CRAIK, C.S.; SIDDLE, K.; PIERCE, S.B.; ROTH, R.A.; RUTTER, W.J. - Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 84:704-708, 1987.
- ELLIS, L.; CLAUSER, E.; MORGAN, D.O.; EDERY, M.; ROTH, R.A.; RUTTER, W.J. - Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. **Cell**, 45:721-732, 1986.
- FEHLMAN, M.; PEYRON, M.; SAMSON, M.; VAN OBBERGHEN, E.; BRANDENBURG, D.; BROSSETE, N. - Molecular association between major histocompatibility complex class I antigens and insulin receptors in mouse liver membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82:8634-8637, 1985.
- FELIG, P. & BERGMAN, M. - Integrated physiology of carbohydrate metabolism. In: RIFKIN, H. & PORTE, D. (eds) - **Ellenberg and Rifkin's diabetes mellitus**. 4th ed. New York: Elsevier, 1990.

- FINEBERG, S.E.; MERIMEE, T.J.; RABINOWITZ, D.; EDGAR, P.J. - Insulin secretion in acromegaly. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 30:288-292, 1970.
- FLORKE, R.R.; KLEIN, H.W.; REINAUER, H. - Structural requirements for signal transduction of the insulin receptor. **Eur. J. Biochem.**, 191:473-482, 1990.
- FOLLI, F.; SAAD, M.J.A.; BACKER, J.M.; KAHN, C.R. - Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and association with insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of the intact rat. **J. Biol. Chem.**, 267:22171-22177, 1992.
- FOLLI, F.; SAAD, M.J.A.; BACKER, J.M.; KAHN, C.R. - Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin resistance and insulin-deficient Diabetes Mellitus. **J. Clin. Invest.**, 92:1287-1794, 1993.
- FOSS, M.C.; SAAD, M.J.A.; PACCOLA, G.M.G.F.; PAULA, F.J.A.; PICCINATO, C.E.; MOREIRA, A.C. - Peripheral glucose metabolism in acromegaly. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 72:1048-1053, 1991.
- GIORGETTI, S.; BALLOTTI, R.; KOWALSKI-CHAUVEL, A.; TARTARE, S.; VAN OBBERGHEN, E. - The insulin and insulin-like growth factor-1 receptor substrate IRS-1 associates with and activates phosphatidylinositol 3-kinase in vitro. **J. Biol. Chem.**, 268:7358-7364, 1993.
- GIORGINO, F.; ALMAHFOUZ, A.; GOODYEAR, L.J.; SMITH, R.J. - Glucocorticoid regulation of insulin receptor and substrate IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle *in vivo*. **J. Clin. Invest.**, 91: 2020-2030, 1993.
- GOREN, H.J.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. - Separate domains of the insulin receptor contain sites of autophosphorylation and tyrosine kinase activity. **Biochemistry**, 26:2374-2381, 1987.

- HADARI, Y.R.; TZAHAR, E.; NADIV, O.; ROTHENBERG, P.; ROBERTS, C.T.J.; LEROITH, D.; YARDEN, Y.; ZICK, Y. - Insulin and insulinomimetic agents induce activation of phosphatidylinositol 3'-kinase upon its association with pp185 (IRS-1) in intact rat liver. **J. Biol. Chem.**, 267:17483-17486, 1992.
- HANSEN, I. & TSALIKIAN, E. - Insulin resistance in acromegaly: defects in both hepatic and extrahepatic insulin action. **Am. J. Physiol.**, 250: E269-E273, 1986.
- HARA, K.; YONEZAWA, K.; SAKAUE, H.; ANDO, A.; KOTON, K.; KITAMURA, T.; KITAMURA, Y.; UEDA, H.; STEPHENS, L.; JACKSON, T.R.; HAWKINS, P.T.; DHAND, R.; CLARK, A.E.; HOLMAN, G.D.; WATERFIELD, M.D.; KASUGA, M. - Phosphoinositide 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for ras activation in CHO cells. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, 91:7415-7419, 1994.
- HARUTA, M.T; MORRIS, A.J.; ROSE, D.W.; NELSON, J.G.; MUECKLER, M.; OLEFSKY, J.M. - Insulin stimulated GLUT4 translocation is mediated by a divergent intracellular signaling pathway. **J. Biol. Chem.**, 270:27991-27994, 1995.
- HOUSSAY, B.A. & BIOSATTI, A. - Action diabetogen de extrait antehypophysaire. **C.R.Soc.Biol.(Paris)**, 11: 479-486, 1932.
- KAHN, C.R. - Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. **Diabetes**, 43:1066-1084, 1994.
- KAHN, C.R. - The molecular mechanism of insulin action. **Ann. Rev. Med.**, 36:429-451, 1985.
- KAHN, C.R.; GOLDFINE, I.D.; NEVILLE, D.M.; DE MEYTS, P. - Alterations in insulin binding induced by changes "in vivo" in the levels of glucocorticoids and growth hormone. **Endocrinology**, 103:1054-1056, 1978.

- KAHN, C.R. & SAAD, M.A.J. - Alterations in insulin receptor and substrate phosphorylation in hypertensive rats. **Ann. Rev. Med.**, 3:S69-S77, 1992.
- KAPPELER, R.; CHEN, X.S.; YOAKIM, M.; SCHAFFHAUSEN, B.S.; BACKER, J.M.; WHITE, M.F.; CANTLEY, L.C.; RUDERMAN, N.B. - Mutations in the juxtamembrane region of the insulin receptor impair activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. **Mol. Endocrinol.**, 5:769-777, 1991.
- KASUGA, M.; HEDO, J.A.; YAMADA, K.M.; KAHN, C.R. - The structure of insulin receptor and its subunits. **J. Biol. Chem.**, 257:10392-10399, 1982a.
- KASUGA, M.; KARLSSON, F.A.; KAHN, C.R. - Insulin stimulates the phosphorylation of the 95000-dalton subunit of its own receptor. **Science**, 215:185-187, 1982b.
- KASUGA, M.; ZICK, Y.; BLITHE, D.L.; KARLSSON, F.A.; HARING, H.U.; KAHN, C.R. - Insulin stimulation of phosphorylation of the β subunit of the insulin receptor formation of both phosphoserine and phosphotyrosine. **J. Biol. Chem.**, 257:9891-9894, 1982c.
- KATHURIA, S.; HARTMAN, S.; GRUNFELD, C.; RAMACHAN, J.; FUJITA-YAMAGUCHI, Y. - Differential sensitivity of two function of the insulin receptor to the associated proteolysis: Kinase action and hormone binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83:8570-8574, 1986.
- KELLY, K.L. & RUDERMAN, N. - Insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase. Association with a 185kDa tyrosine-phosphorylated protein (IRS-1) and localization in a low density membrane vesicle. **J. Biol. Chem.**, 268:4391-4398, 1993.
- KOVACINA, K.S. & ROTH, R.A. - Identification of SHC as a substrate of the insulin receptor kinase distinct from the GAP-associated 62kDa tyrosine phosphoprotein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 192:1303-1311, 1993.

- KUHNE, M.R.; PAWSON, T.; LIENHARD, G.E.; FENG, G.S. - The insulin receptor substrate-1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. **J. Biol. Chem.**, 268:11479-11481, 1993.
- LAEMMLI, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (Lond)**, 227:680-685, 1970.
- LAVAN, B.E.; KUHNÉ, M.R.; GARNER, C.W.; ANDERSON, D.; REEDIJK, M.; PAWSON, T.; LIENHARD, G.E. - The association of insulin-elicited phosphotyrosine proteins with src homology 2 domains. **J. Biol. Chem.**, 267:11631-11636, 1992.
- LAVAN, B.E. & LIENHARD, G.E. - The insulin-elicited 60 kDa phosphotyrosine protein in rat adipocytes is associated with phosphatidylinositol 3-kinase. **J. Biol. Chem.**, 268:5921-5928, 1993.
- LIN, S-H. & GUIDOTTI, G. - Cloning and expression of a cDNA coding for a rat liver plasma membrane ecto-ATPase. **J. Biol. Chem.**, 264:14408-14414, 1989.
- LIPSON, K.E.; YAMADA, K.; KOLHATKAR, A.A.; DONNER, D.B. - Relationship between the affinity and proteolysis of the insulin receptor. Evidence that higher affinity receptors are preferentially degraded. **J. Biol. Chem.**, 261:10833-10838, 1986.
- MAEGAWA, H.; OLEFSKY, J.M.; THIES, S.; BOYD, D.; ULLRICH, A.; MCCLAIN, M.A. - Insulin receptor with defective tyrosine kinase inhibit normal receptor function at the level of substrate phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, 261:16597-16603, 1988.
- MALOFF, B.L.; LEVINE, J.H.; LOCKWOOD, D.H. - Direct effects of growth hormone on insulin action in rat adipose tissue maintained *in vitro*. **Endocrinology**, 107:538-544, 1980.

- MOLLER, D.E. & FLIER, J.S. - Insulin resistance- mechanisms, syndromes, and implications. **N. Engl. J. Med.**, 325:938-948, 1991.
- MORGAN, H.E.; RAGEN, D.M.; HENDERSON, M.H.; SAWTER, T.K.; PARK, C.R. - Effects of hypophysectomy, adrenalectomy, growth hormone, hydrocortisone and insulin and glucose transport and phosphorylation in the perfused rat heart. **J. Biol. Chem.**, 236:2162-2168, 1961.
- MUGGEO, M.; BAR, R.S.; ROTH, J.; KAHN, C.R. ; GORDEN, P. - The insulin resistance of acromegaly: Evidence for two alterations in the insulin receptor on circulating monocytes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 48:931-940, 1979.
- MYERS, M.G. & WHITE, M.F. - New frontiers in insulin receptor substrate signaling. **Trends. Endocrinol. Metab.**, 6:209-215, 1995.
- MYERS. M.G. & WHITE, M.F. - Insulin signal transduction and the IRS proteins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 36:615-658, 1996.
- NABARRO, J.D.N. - Acromegaly. **Clin. Endocrinol.**, 26: 481-512, 1991.
- OKADA, T.; KAWANO, Y.; SAHIIHARA, T.; HAZEKI, O.; UI, M. - Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. **J. Biol. Chem.**, 269:3568-3573, 1994.
- PAWSON, T. - Protein modulates and signaling networks. **Nature**, 373:573-580, 1995.
- PERLMAN, R.; BOTTARO, D.P.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. - Conformational changes in the alpha- and beta-subunits of the insulin receptor identified by anti-peptide antibodies. **J. Biol. Chem.**, 264:8946-8950, 1989.

- QUON, M.J.; BUTTE, A.J.; ZARNOWSKI, M.J.; SESTI, G.; CUSHMAN, S.W.; TAYLOR, S.I. - Insulin receptor substrate 1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4 translocation in transfected rat adipose cells. **J. Biol. Chem.**, 269: 27920-27924, 1995.
- RICE, K.M. & GARNER, G.R. - Correlation of the insulin receptor substrate-1 with insulin-responsive deoxyglucose transport in 3T3-L1 adipocytes. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 198: 523-530, 1994.
- RICE, K.M.; MARILYN, A.; TURNBOW, M.A.; GARNER, C. - Insulin stimulates the degradation of IRS-1 in 3T3-L1 adipocytes. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, 190:961-967, 1993.
- RIZZA, R.A.; MANDARINO, L.J.; GERICH, J.E. - Effects of growth hormone on insulin action in man. Mechanisms of insulin resistance, impaired suppression of glucose production, and impaired stimulation of glucose utilization. **Diabetes**, 31:663-669, 1982.
- ROSEN, O.M. - After insulin binds. **Science**, 237:1452-1458, 1987.
- ROTHENBERG, P.L.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. - The insulin receptor tyrosine kinase. In: CUTRECASA, P. & JACOBS, S. (eds) - **Handbook of Experimental Pharmacology**, Vol 92. Berlin: Springer-verlag, 209-243, 1990.
- SAAD, M.J.A. - Molecular mechanisms of insulin resistance. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, 27:941-957, 1994.
- SAAD, M.J.A.; ARAKI, E.; MIRALPEIX, M.; ROTHENBERG, P.L.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. - Regulation of insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, 90:1839-1849, 1992.

- SAAD, M.J.A.; FOLLI, F.; ARAKI, E.; HASHIMOTO, N.; CSERMELY, P.; KAHN, C.R.
- Regulation of insulin receptor IRS-1 and PI 3-kinase in 3T3-F442A adipocytes.
Effects of differentiation, insulin and dexamethasone. **Mol. Endocrinol.**, 8:545-
557,1994.
- SAAD, M.J.A.; FOLLI, F.; KAHN, J.A.; KAHN, C.R. - Modulation of insulin receptor,
insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and
muscle of dexametasone treated rats. **J. Clin. Invest.**, 92:2065-2072, 1993.
- SAAD, M.J.A.; HARTMANN, L.G.C.; CARVALHO, D.S.; GALORO, C.A.O.;
BRENELLI, S.L.; CARVALHO, C.R.O. - Modulation of early steps in insulin action
in the liver and muscle of epinephrine treated rats. **Endocrine**, 3:755-759, 1995a.
- SAAD, M.J.A.; HARTMANN, L.G.C.; CARVALHO, D.S.; GALORO, C.A.O.;
BRENELLI, S.L.; CARVALHO, C.R.O. - Effect of glucagon on insulin receptor
substrate-1 (IRS-1) phosphorylation and association with phosphatidylinositol
3-kinase (PI 3-kinase). **FEBS letters**, 370:131-134, 1995b.
- SAAD, M.J.A.; PIMENTA, W.P.; PACCOLA, G.M.; PICCINATO, C.E.; MOREIRA,
A.C.; FOSS, M.C. - Effect of glucose ingestion on peripheral glucose metabolism in
normal man. **Diabetes & Met.**, 15:5-10, 1989.
- SAAD, M.J.A.; VELLOSO, L.A.; CARVALHO, C.R.O. - Angiotensin II induces tyrosine
phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and its association with
phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. **Biochem J.**, 310:741-744, 1996.
- SANCHES-MARGALET, V.; GOLDFINE, I.D.; VLAHOS, C.J.; SUNG, C.K. - Role of
phosphatidylinositol 3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor LY
294002. **Biochem.Biophys.Res.Comm.**, 204:446-452, 1994.
- SCHENKER, E. & KOHANSKI, R.A. - Conformational states of the insulin receptor.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 157:140-145, 1988.

- SKOLNIK, E.Y.; BATZER, A.; LI, N.; LEE, C.H.; LOWENSTEIN, E.; MOHAMMADI, M.; MARGOLIS, B.; SCHLESSINGER, J. - The function of GRB2 in linking the insulin receptor to ras signaling pathways. **Science**, 260:1953-1955, 1993.
- SÖNKSEN, O.H.; GREENWOOD, F.C.; ELLIS, J.P.; LOWY, C.; RUTHERFORD, A.; NABARRO, J.D.N. - Changes on carbohydrate tolerance in acromegaly with progress of the disease and in response to treatment. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 27:1418-1430, 1967.
- SOUZA, S.C.; FRICK, G.P.; YIP, R.; LOBO, R.B.; TAI, L-R.; GOODMAN, H.M. - Growth hormone stimulates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. **J. Biol. Chem.**, 269:30085-30088, 1994.
- STEPHENS, J.M. & PILCH, P.F. - The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT4, the major insulin-responsive glucose transporter. **Endocr. Rev.**, 16:529-546, 1995.
- SUN, X.J.; CRIMMINS, D.L.; MYERS, M.G.; MIRALPEIX, M.; WHITE, M.F. - Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. **Mol. Cell Biol.**, 13:7418-7428, 1993.
- SUN, X.J.; MIRALPEIX, M.; MYERS, M.G.; GLASHEEN, J.E.M, BACKER, J.M.; KAHN, C.R.; WHITE, M.F. - Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. **J. Biol. Chem.**, 267: 22662-22672, 1992.
- SUN, X.J.; WANG, L.M.; ZHANG, Y.; YENUSH, L.; MYERS, M.G.; GLASHEEN, E.; LANE, W.S.; PLERCE, J.H.; WHITE, M.F. - Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. **Nature**, 337:173177, 1995.
- TAKAYAMA, S.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. - Phorbol ester induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. **J. Biol. Chem.**, 263:3440-3447, 1988.

- TAMEMOTO, H.; KADOWAKI, T.; TOBE, K.; YAGI, T.; SAKURA, H.; HAYAKAWA, T.; TERAUCH, Y.; UEKI, K.; KABURAG, Y.; SATOH, S.; SEKCHARA, H.; YOSHIOKA, S.; HORLKOSI, H.; FURUTA, Y.; IKAWA, Y.; KASUGA, M.; YAZAKI, Y.; AIZAWA, S. - Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. **Nature**, 372:182-186, 1994.
- TANTI, J-F.; GREMEAUX, T.; VAN OBERGHEEN, E.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. - Insulin receptor substrate-1 is phosphorylated by serine kinase activity of phosphatidylinositol 3-kinase. **Biochem. J.**, 304:17-21, 1994.
- TOWBIN, H.; SRAEHLIN, J.; GORDON, J. - Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA**, 76:4350-4354, 1979.
- TRIMBLE, E.R.; ATKINSON, A.B.; BUCHANAN, K.D.; HADDEN, D.R. - Plasma glucagon and insulin concentrations in acromegaly. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 51:626-631, 1980.
- WANG, L.M.; MYERS, M.G.J.R.; SUN, X.J.; AARONSON, S.A.; WHITE, M.F.; PIERCE, J.H. - IRS-1: essential for insulin and IL-4-stimulated mitogenesis in hematopoietic cells. **Science**, 261:1591-1594, 1993.
- WAUGH, S.M. & PILCH, P.F. - Insulin binding changes of the interface region between alphasubunits of the insulin receptor. **Biochemistry**, 28:2722-2727, 1989.
- WEAVER, J.U.; MONSON, J.P.; NOONAN, K.; JOHN, W.G.; EDWARDS, A.; EVANS, K.A.; CUNNINGHAM, J. - The effect of low dose recombinant human growth hormone replacement on regional fat distribution, insulin sensitivity, and cardiovascular risk factors in hypopituitary adults. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 80:153-159, 1995.

- WELSH, G.I.; FOULSTONE, E.J.; YOUNG, S.W.; TAVARÉ, J.M.; PROUD, C.G. - Wortmannin inhibits the effects of insulin and serum on the activities of glycogen synthase kinase-3 and mitogen-activated protein kinase. **Biochem.J.**, 303:15-21, 1994.
- WHITE, M.F. & KAHN, C.R. - The insulin signaling system. **J. Biol. Chem.**, 269:1-4, 1994.
- WHITE, M.F.; LIVINGSTON, J.N.; BACKER, J.M.; LAURIS, V.; DULL, T.J.; ULLRICH, A.; KAHN, C.R. - Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. **Cell**, 54:641-649, 1988.
- WHITE, M.F.; MARON, R.; KAHN, C.R. - Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr 185,000 protein in intact cells. **Nature**, 318:183-186, 1985.
- WILDEN, P.A. & PESSIN, J.E. - Differential sensitivity of the insulin-receptor kinase to thial and oxidizing agents in the absence and presence of insulin. **Biochem. J.**, 245:325-331, 1987.
- YEH, J.I.; GULVE, E.A.; RAMEH, L.; BIRBAUM, M.J. - The effects of wortmannin on rat skeletal muscle. Dissociation of signaling pathways for insulin- and contraction-activated hexose transport. **J. Biol. Chem.**, 270:2107-2111, 1995.
- YONEZAWA, K.; UEDA, H.; HARA, K.; NISHIDA, K.; ANDO, A.; CHAVANIEU, A.; MATSUBA, H.; SHII, K.; YOKONO, K.; FUKUI, Y.; CALAS, B.; GRIGORESCU, F.; DHAND, R.; GOUT, I.; OTSU, M.; WATERFIELD, M.D.; KASUGA, M. - Insulin-dependent formation of a complex containing an 85 kDa subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and tyrosine-phosphorylated insulin receptor substrate-1. **J. Biol. Chem.**, 267:25958-25966, 1992.
- YOUNG, F.G. - Permanent experimental diabetes produced by pituitary (anterior lobe) injection. **Lancet**, 2: 372-374, 1937.



9. Anexos

ANEXO 1

Características dos animais controles (C) e tratados com hormônio do crescimento (GH).

SEM=desvio padrão. *p<0,05

	Peso g		Glicemia mg/dl		Insulina ng/ml		Kitt %/min	
	C	GH	C	GH	C	GH	C	GH
	145,0	145,0	102	89	0,05	0,14	3,74	1,00
	165,0	167,6	104	114	0,07	0,10	3,70	0,11
	250,0	221,0	101	86	0,06	0,36	4,01	0,05
	135,3	131,4	100	79	0,13	0,11	1,89	4,22
	137,4	148,1	95	93	0,08	0,26	5,75	2,73
	121,9		101	86	0,21	0,16	5,70	4,25
			93	91	0,25	0,38	4,80	
					0,39	0,37		
					0,18	0,36		
						0,25		
						0,57		
						0,53		
						0,49		
n.	6	5	7	7	9	13	7	6
Média	159,01	162,62	99,43	91,14	0,16	0,31	4,23	2,06
SEM	19,08	15,70	1,49	4,17	0,04	0,04	0,51	0,79
p	0,892		0,086		0,02*		0,037*	

ANEXO 2

Figado - Valores obtidos por densitometria óptica, expressos em unidades arbitrárias, comparando-se os ratos tratados com GH aos controles. **IR** (receptor de insulina), **IRS-1** (substrato-1 do receptor de insulina) e **IRS-2** (substrato-2 do receptor de insulina). SEM=desvio padrão. *p<0,05.

	IR		IRS-1		IRS-2	
	<u>Proteína</u>	<u>Fosforilação</u>	<u>Proteína</u>	<u>Fosforilação</u>	<u>Proteína</u>	<u>Fosforilação</u>
	110,8	136,9	9,6	79,5	105,7	45,8
	97,7	68,3	40,9	69,9	113,4	43,6
	81,5	116,2	43,3	22,5	106,2	41,7
	114,6	36,6	54,6	83,4	97,71	83,9
	98,4	64,9	25,3	79,3	116,8	30,57
	69,3	83,5	40			
	65	76,6	66,8			
	33	91,8	35,7			
	120	69,2				
	244					
	76					
	172					
	101					
n	13	9	8	5	5	5
Média	106,41	82,67	39,52	66,92	107,96	42,7
SEM	14,7	9,87	6,12	11,33	3,32	3,53
p	0,671	0,117	<0,001*	0,043*	0,075	<0,001*

ANEXO 3

Fígado - Valores obtidos por densitometria óptica, expressos em unidades arbitrárias, comparando-se os ratos tratados com GH aos controles. **IRS-1** (substrato-1 do receptor de insulina), **IRS-2** (substrato-2 do receptor de insulina) e **PI 3-K** (PI 3-quinase). SEM=desvio padrão. *p<0,05

	PI3K	PI3K/IRS-1	PI3K/IRS-2
	<u>Proteína</u>	<u>Associação</u>	<u>Associação</u>
	98,6	45	73,59
	85,6	45	34,78
	68,3	50	31,19
	74,8	30	47,8
	63,2	64	
	87,8	37	
	67,5		
	67		
	58,8		
n	9	6	4
Média	74,62	45,17	46,84
SEM	4,41	4,74	9,6
p	<0,001**	<0,001*	0,012*

ANEXO 4

Músculo - Valores obtidos por densitometria óptica, expressos em unidades arbitrárias, comparando-se os ratos tratados com GH aos controles. **IR** (receptor de insulina), **IRS-1** (substrato-1 do receptor de insulina) e **IRS-2** (substrato-2 do receptor de insulina). SEM=desvio padrão. *p<0,05

	IR		IRS-1		IRS-2	
	<u>Proteína</u>	<u>Fosforilação</u>	<u>Proteína</u>	<u>Fosforilação</u>	<u>Proteína</u>	<u>Fosforilação</u>
	86,4	49,7	94,1	68,9	143,8	89,57
	36,1	57,5	110,6	78,4	90,42	53,19
	150,7	18,7	85,9	76,9	145,6	66,82
	123,2	44,4	126,1	49,7	100,78	79,56
	117,8	44,3	63,9	26,3	200,46	
	130,3	48,8	95,1	84,5	123,6	
	108,2		97,1			
	9,6		92,3			
	77,4		76,5			
n	9	6	9	6	6	4
Média	93,3	43,9	93,51	64,12	134,11	72,29
SEM	15,35	5,41	6	9,03	16,08	7,88
p	0,674	<0,001*	0,311*	0,011*	0,087	0,039*

ANEXO 5

Músculo - Valores obtidos por densitometria óptica, expressos em unidades arbitrárias, comparando-se os ratos tratados com GH aos controles. **IRS-1** (substrato-1 do receptor de insulina), **IRS-2** (substrato-2 do receptor de insulina) e **PI 3-K** (PI 3-quinase). SEM=desvio padrão. *p<0,05.

	PI3K	PI3K/IRS-1	PI3K/IRS-2
	<u>Proteína</u>	<u>Associação</u>	<u>Associação</u>
	46,9	79,5	52,18
	108,1	38,3	80,41
	77,3	77,7	100,9
	125,1	55,5	40,81
	102,5		63,29
	119,1		
	57,7		
	225,5		
	97,4		
n	9	4	5
Média	106,57	62,75	67,52
SEM	17,25	9,81	10,6
p	0,713	0,032*	0,037*