



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

TESE DE DOUTORADO

**Efeitos do Tiopental Sódico, do Pentobarbital Sódico e do Éter
Dietílico nas Vias da Sinalização da Insulina em Ratos**

Adilson Roberto Cardoso

Campinas – SP
2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA**

**Efeitos do Tiopental Sódico, do Pentobarbital Sódico e do Éter
Dietílico nas Vias da Sinalização da Insulina em Ratos**

Autor: Adilson Roberto Cardoso

Orientador: Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira

**Tese apresentada à Comissão de Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP para
obtenção do título de Doutor em Clínica Médica,
área de concentração: Clínica Médica**

**Campinas – SP
Outubro / 2004**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	11 UNICAMP C179
V	EX
TOMBO BC/	63701
PROC.	16.00086-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	10-5/05
Nº CPD	

Bib id 349755

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

C179e Cardoso, Adilson Roberto
 Efeito do tiopental sódico, do pentobarbital sódico e do éter
 dietílico nas vias da sinalização da insulina em ratos / Adilson
 Roberto Cardoso. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

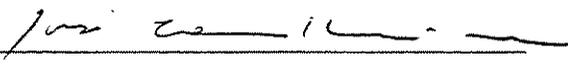
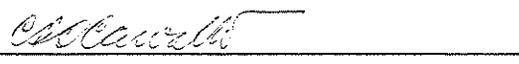
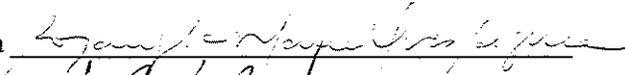
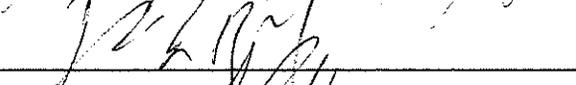
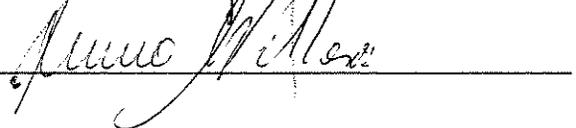
 Orientador : José Barreto Campello Carvalheira
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Ciências Médicas.

 1. Anestesia. 2. Anestésicos. 3. Metabolismo. 4. Glicose. 5.
 Resistência à insulina. 6. Diabetes. I. José Barreto Campello
 Carvalheira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalho

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). José Barreto Campello Carvalho 
2. Prof(a). Dr(a). Carla Roberta Oliveira Carvalho 
3. Prof(a). Dr(a). Rosângela Maria Neves Bezerra 
4. Prof(a). Dr(a). Sigisfredo Luis Brenelli 
5. Prof(a). Dr(a). Lício Augusto Velloso 

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

Data: 07/10/2004

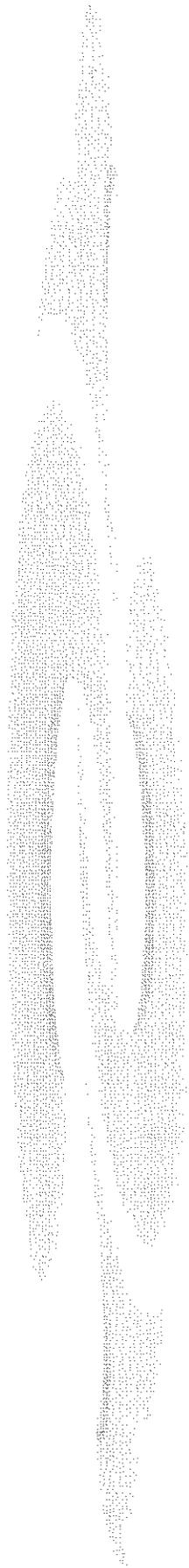
200509538

Dedicatória

**Dedico este trabalho aos meus
pais, ao meu filho e aos meus
amigos.**

Agradecimentos

Agradeço a todos que colaboraram para a realização deste trabalho e me ajudaram a cumprir esta etapa da minha vida, em particular aos integrantes do laboratório de biologia molecular.



SUMÁRIO

1. RESUMO	xix
2. INTRODUÇÃO	27
1. Tiopental sódico	38
2. Pentobarbital sódico	40
3. Éter dietílico	43
3. OBJETIVOS	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
5. RESULTADOS	58
1. Effect of Thiopental, Pentobarbital and Diethyl Ether on Early Steps of Insulin Action in Liver and Muscle of the Intact Rat	59
Abstract	60
Introduction	61
Material and Methods	63
Results	67
Discussion	70
References	72
Table	75
Figures	76
Figure Legends	78
6. DISCUSSÃO	79
7. SUMMARY	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

Lista de abreviaturas

- AGL - Ácidos graxos livres
- ATP - Trifosfato de adenosina
- Akt - Serina/treonina quinase
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- ERK - Quinase da família das MAPK
- Gab-1 - Proteína que se associa ao Grb2
- GABA - Ácido gama-aminobutírico
- GDP - Difosfato de guanosina
- GLUT - Proteína transportadora de glicose
- Grb2 - Proteína ligante do receptor para fator de crescimento
- GTP - Trifosfato de guanosina
- IGF-1 - Fator de crescimento *insulina-like*
- JAK2 - *Janus kinase 2*
- IR - Receptor de insulina
- IRS - Substrato do receptor de insulina
- kDa - Quilodalton
- K_{it} - Constante de desaparecimento da glicose
- MAPK - Proteína quinase ativadora da mitose
- PDK - Quinase ativada por fosfoinosítídeos
- PEPCK - Fosfoenol piruvato carboxiquinase
- PH - Domínio com homologia à plecstrina
- PI 3-quinase - Fosfatidilinositol 3-quinase
- PKC - Proteína quinase C

PTP1B - Fosfotirosina fosfatase 1B

Ras - Oncogene com participação na regulação do metabolismo celular

RNA - Ácido ribonucléico

SH2 - Homólogo 2 do Src

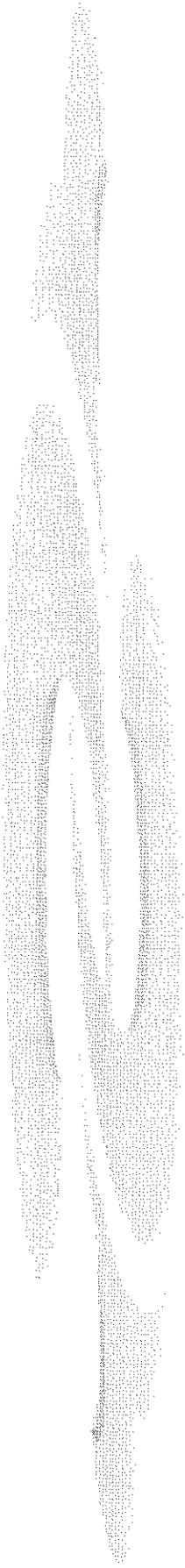
SH3 - Homólogo 3 do Src

Shc - Substrato do receptor de insulina

SHP2 - Proteína tirosina fosfatase.

Src - Oncogene identificado no sarcoma

TTI - Teste de tolerância à insulina



1. RESUMO

A insulina é um hormônio anabólico com efeitos metabólicos potentes. Os eventos que ocorrem após a ligação da insulina ao seu receptor são específicos e estritamente regulados. Definir as etapas que levam à especificidade deste sinal representa um desafio para as pesquisas bioquímicas. Todavia, podem resultar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para pacientes que sofrem de estados de resistência à insulina, inclusive o *diabetes mellitus* tipo 2.

O receptor de insulina pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento que têm atividade tirosina-quinase intrínseca. Após a ligação da insulina, o receptor sofre autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina. Isto resulta na ativação da quinase do receptor e conseqüente fosforilação em tirosina de uma família de substratos do receptor de insulina (IRSs). De forma similar a outros fatores de crescimento, a insulina usa fosforilação e interações proteína-proteína como ferramentas essenciais para transmitir o sinal em direção ao efeito celular final, tais como translocação de vesículas contendo transportadores de glicose (GLUT4) do *pool* intracelular para a membrana plasmática, ativação da síntese de glicogênio e de proteínas e transcrição de genes específicos.

Um grande número de estudos tem investigado as vias de transmissão do sinal da insulina em modelos animais, utilizando ratos anestesiados. Nesses estudos, diferentes tipos de anestésicos tem sido utilizados, entre os quais o tiopental sódico, o pentobarbital sódico e o éter dietílico.

Durante uma anestesia de longa duração com tiopental, há relatos de diminuição do glicogênio hepático e de significativa elevação dos níveis plasmáticos de glicose, ácido láctico e aminoácidos, de forma que o tiopental tem sido alvo de inúmeros estudos na tentativa de identificar os mecanismos envolvidos na gênese da hiperglicemia. Em testes

orais e intravenosos uma pronunciada intolerância à glicose foi observada em diversas espécies animais, quando o tiopental foi utilizado como anestésico. Vários estudos com ilhotas pancreáticas isoladas indicam que essa intolerância ocorre devido a um defeito na secreção de insulina, que se manifesta principalmente frente a altas concentrações de glicose. Isso ocorreria em função da ação inibitória direta do tiopental sobre os canais de potássio. Desta forma, quando ilhotas pancreáticas são expostas a altas concentrações de glicose, não se observa a resposta secretória característica.

Na anestesia com pentobarbital, a maioria dos autores refere discreta ou nenhuma modulação do metabolismo da glicose, porém, há relatos de uma inibição do transporte facilitativo mediado por GLUT-1, o que deve interferir na captação cerebral de glicose, independente dos níveis plasmáticos.

O éter provoca aumento da atividade do sistema nervoso simpático, com liberação de adrenalina, semelhante a uma reação de *stress*, produzindo glicogenólise hepática e muscular, aumentando acentuadamente a glicemia. Entretanto, a literatura apresenta dados controversos, que mostram que durante a anestesia com éter as concentrações de glicogênio hepático e muscular são semelhantes às aquelas observadas quando os animais são decapitados.

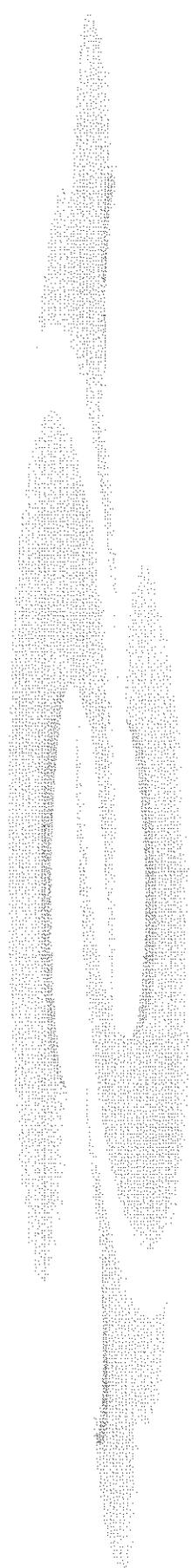
A elucidação desses achados laboratoriais depende da caracterização dos efeitos diretos desses anestésicos sobre os mecanismos moleculares da sinalização da insulina, que ainda são desconhecidos.

No presente estudo, foi investigado o efeito do tiopental sódico, do pentobarbital sódico e do éter dietílico na taxa de desaparecimento da glicose, na fosforilação do IR, IRS-1 e IRS-2, na associação dos IRSs com a PI 3-quinase e na ativação da Akt e do ERK

(MAPK) no fígado e no músculo de ratos. A determinação dos níveis de fosforilação do IR, IRS-1 e IRS-2, assim como a quantificação da associação das proteínas IRSs com a PI 3-quinase e a ativação da Akt e do ERK (MAPK) foram realizadas através de imunoprecipitação com anticorpos específicos, seguidos de *immunoblotting*.

Os níveis plasmáticos de glicose foram mais altos nos animais anestesiados com éter dietílico. A insulina estimulou a fosforilação em tirosina do IR, IRS-1 e IRS-2, a associação desses substratos com a PI 3-quinase e a ativação da Akt e da ERK (MAPK), de modo semelhante nos 3 grupos avaliados, tanto no fígado como no músculo.

Em resumo, os dados do presente estudo mostram que em modelos animais de avaliação da sinalização insulínica, quando a anestesia geral se faz necessária, o tiopental, o pentobarbital e o éter podem ser empregados, mas os riscos potenciais de incêndio e explosões e a reação de *stress* característica da anestesia com o éter, colocam os dois agentes barbitúricos como opções mais seguras.



2. INTRODUÇÃO

A insulina é um hormônio potente, com ação metabólica e promotora do crescimento, que atua no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, bem como modulando a síntese de RNA e DNA em praticamente todas as células de mamíferos. A insulina age através da modificação da expressão ou da atividade de uma série de enzimas e sistemas. É o principal hormônio controlador dos níveis sanguíneos de glicose, promovendo sua captação e metabolismo nos tecidos muscular e adiposo, e inibindo a neoglicogênese no tecido hepático (SALTIEL & KAHN 2001).

Como outros hormônios, a insulina não apresenta capacidade intrínseca para modificar funções celulares; exerce seu efeito através da ligação a um receptor específico, uma glicoproteína presente na membrana celular (FREYCHET *et al.*, 1971; CUATRECASAS 1972). O receptor de insulina (IR) está virtualmente presente em todos os tecidos de animais vertebrados, embora as concentrações variem de aproximadamente 40 receptores por célula em eritrócitos circulantes a mais de 200.000 em adipócitos e hepatócitos (GINSBERG *et al.*, 1977). O IR é uma estrutura tetramérica composta de duas subunidades α , cada uma ligada a uma subunidade β . Pontes dissulfeto fazem as ligações inter e intra-subunidades, resultando na estrutura final β - α - α - β (MASSAGUE *et al.*, 1981; KASUGA *et al.*, 1982a). As subunidades α são exclusivamente extracelulares, contêm o sítio de ligação da insulina e, cada uma, tem peso molecular de 135.000, enquanto as subunidades β são proteínas transmembrana, cada uma com peso molecular de 95.000 e são responsáveis pela transmissão do sinal insulínico (KASUGA *et al.*, 1982a; KASUGA *et al.*, 1982b).

Com a demonstração em 1982, de que a subunidade β do IR possui atividade quinase intrínseca, a qual é ativada pela ligação da insulina à subunidade α , obteve-se

grande avanço na compreensão dos mecanismos de transmissão do sinal insulínico. Sabe-se hoje, que o IR é uma enzima da família das tirosina-quinases, que comporta-se funcionalmente como uma enzima alostérica, com uma subunidade α regulatória e uma subunidade β catalítica (KASUGA *et al.*, 1982b; KASUGA *et al.*, 1982c). Quando a insulina se liga à subunidade α , ocorre uma alteração na conformação do receptor e a atividade quinase na subunidade β é estimulada (HERRERA & ROSEN 1986; WHITE *et al.*, 1988b; PERLMAN *et al.*, 1989). Este fato determina a transferência de grupos fosfato do ATP para vários aminoácidos tirosina da subunidade β do receptor, promovendo a fosforilação de substratos protéicos intracelulares.

O primeiro e mais estudado substrato do receptor de insulina é uma proteína de aproximadamente 185 kDa, denominada inicialmente pp185, pela sua mobilidade eletroforética (WHITE *et al.*, 1985). Em células transfectadas com o receptor de insulina humano há um marcante aumento da fosforilação desta pp185, coincidente com um aumento da ação insulínica (SUN *et al.*, 1991a). A fosforilação desta proteína está diminuída em células que expressam receptores com mutações nos sítios de ligação do ATP e sítios catalíticos, de maneira proporcional à redução da ativação da capacidade quinase do receptor (WILDEN *et al.*, 1992). Evidências adicionais da função da pp185, vieram através de achados inesperados, com mutações *in vitro* no aminoácido tirosina da posição 972 do IR. Nesta situação o receptor apresenta ligação normal à insulina, com total ativação da capacidade tirosina-quinase *in vitro*, porém, quando transfectado em células, este receptor mutante não é capaz de fosforilar a pp185 e é incapaz de transmitir o sinal insulínico (WHITE *et al.*, 1988a).

No início da década de 90 a pp185 foi clonada e denominada substrato 1 do receptor de insulina ou IRS-1 (SUN *et al.*, 1991a). O DNA complementar (cDNA) do IRS-1 codifica uma proteína de 1235 aminoácidos com diversas características interessantes. É uma proteína de localização exclusivamente citoplasmática, não apresentando porção transmembrana. Há uma seqüência de aminoácidos compatível com a seqüência de ligação para nucleotídeos (ATP ou GTP), embora não haja nenhuma homologia com proteínas quinases conhecidas. Ainda em relação à homologia de seqüências de aminoácidos, há múltiplos sítios de fosforilação em serina, treonina e tirosina. Dos 22 sítios potenciais de fosforilação em tirosina, 10 sítios mantêm a seqüência YMXM, onde Y é o aminoácido tirosina, M é o aminoácido metionina e X corresponde a qualquer aminoácido. Três apresentam a seqüência YXXM, e um tem a seqüência EYYE, onde E é o aminoácido glutamina. A seqüência de aminoácidos YMXM não existe no receptor de insulina, porém tem sido observada em várias outras proteínas tirosina-quinases. Nestas proteínas, a seqüência YMXM está envolvida em interações não covalentes com moléculas sinalizadoras. Estas moléculas sinalizadoras são caracterizadas pela presença de seqüências de aminoácidos, denominadas SH2 (homologia 2 ao Src) que se ligam às seqüências YMXM, quando o aminoácido tirosina está fosforilado (SHOELSON *et al.*, 1992).

Através de estudos *in vivo*, em cultura de células e em sistemas reconstituídos *in vitro*, o IRS-1 fosforilado associa-se à enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase), ativando-a (BACKER *et al.*, 1992a; FOLLI *et al.*, 1992a). Demonstrou-se que esta associação e ativação também ocorrem em 2 importantes tecidos insulino-sensíveis de ratos, fígado e músculo, quando utilizou-se concentrações fisiológicas de insulina (FOLLI *et al.*, 1992a; SAAD *et al.*, 1993b).

A enzima PI 3-quinase possui duas subunidades, uma catalítica de 110 kDa e outra regulatória de 85 kDa, que contêm duas porções SH2 e uma SH3 (CARPENTER & CANTLEY 1990). A ligação e ativação descritas envolvem as tirosinas fosforiladas do IRS-1, próximas das metioninas nas seqüências 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. Embora a subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase seja fosforilada após estímulo com outros fatores de crescimento, o mesmo parece não ocorrer após estímulo com insulina. Ao invés disso, a ativação parece advir como consequência da associação do IRS-1 à PI 3-quinase.

Vários estudos sugerem que a PI 3-quinase, associada e ativada pelo IRS-1, está relacionada com muitos efeitos metabólicos da ação da insulina. Promove a ativação do transportador de glicose (GLUT) com conseqüente aumento do transporte de glicose nos tecidos muscular (TSAKIRIDIS *et al.*, 1995) e adiposo (CLARKE *et al.*, 1994). Ativa a síntese de glicogênio e o controle do crescimento celular na maioria dos tecidos (TSAKIRIDIS *et al.*, 1995), e inibe a fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima chave para o processo de gliconeogênese (CHEATHAM & KAHN 1995).

Além da PI 3-quinase, pelo menos 3 outras proteínas com porção SH2 associam-se ao IRS-1: SHP2, Grb2 e Nck. A proteína SHP2 é uma fosfotirosina fosfatase que contém duas porções SH2, e parece ter importância no crescimento celular e na auto-regulação do sinal gerado pela insulina. A Grb2 é uma pequena proteína citoplasmática que contém duas porções SH3 e uma SH2 que se liga à tirosina 895 do IRS-1, agindo como molécula adaptadora, que compõe um complexo ativador da proteína Ras, ativadora das MAP-quinases (proteínas de ativação da mitogênese). A Nck é uma proteína adaptadora com 3

porções SH3 e uma SH2, que une o IRS-1 às vias de crescimento celular (CHEATHAM & KAHN 1995). Estas associações, potencialmente, podem ter um importante papel no crescimento celular.

Em camundongos transgênicos (knockout) sem IRS-1, os efeitos metabólicos da insulina parecem ser parcialmente compensados por um outro substrato do receptor de insulina, que é uma proteína rapidamente fosforilada em tirosina após o estímulo insulínico, que migra em SDS-PAGE um pouco mais alto que o IRS-1. Demonstrou-se que este outro substrato tem características idênticas à proteína 4PS, que é também um substrato do receptor de IL-4. Através da purificação da proteína 4PS em células FDC-P2, foi possível a clonagem de um cDNA que codifica para uma proteína com várias características estruturais e funcionais semelhantes ao IRS-1, que foi denominada substrato 2 do receptor de insulina ou IRS-2 (ARAKI *et al.*, 1994b; TAMEMOTO *et al.*, 1994; SUN *et al.*, 1995a).

O IRS-2 apresenta uma porção aminoterminal contendo um sítio homólogo ao da PH, um domínio de união às fosfatases altamente conservado e uma porção carboxiterminal com várias seqüências de fosforilação em tirosina, pouco conservadas quando comparadas às do IRS-1. Nos camundongos transgênicos sem IRS-1, o IRS-2 foi encontrado em células hematopoiéticas, no músculo esquelético, nos pulmões, no cérebro, no fígado, nos rins, no coração e no baço, sugerindo que o IRS-2 possa ser um substrato alternativo do IR (SUN *et al.*, 1995a).

A leitura da seqüência genômica do IRS-2 revelou uma proteína com 1324 aminoácidos, incluindo 3 resíduos na porção C-terminal que não tinham sido descritos previamente (SUN *et al.*, 1997). O IRS-2 migra conjuntamente com o IRS-1 durante a corrida eletroforética do SDS-PAGE, apresentando aproximadamente 35% de identidade na

região C-terminal com o IRS-1, principalmente nos sítios potenciais de fosforilação (SUN *et al.*, 1997). Juntos, o IRS-1 e o IRS-2 formam uma família de proteínas com capacidade multipotencial de transmissão do sinal insulínico, que se unem às proteínas que contêm domínios SH2 (homologia 2 ao Src). De maneira similar ao IRS-1, o IRS-2 também se liga e ativa a PI 3-quinase e o Grb2.

O IRS-2 parece adquirir importância em camundongos transgênicos, com ausência de IRS-1 (IRS-1^{-/-}). Nestes animais, o tecido hepático apresenta fosforilação do IRS-2 em tirosina, e mantém uma resposta significativa à insulina e ao IGF-1. Em contraste, o músculo esquelético não apresenta esse aumento compensatório da fosforilação do IRS-2 e os animais desenvolvem resistência à insulina. Foi demonstrado que durante a diferenciação dos fibroblastos 3T3-L1 em adipócitos, ocorre um aumento dos níveis de fosforilação do IRS-1, mas não do IRS-2, sugerindo que estas proteínas possuem mecanismos distintos de regulação, podendo inclusive mediar o sinal insulínico de maneiras diferentes (SUN *et al.*, 1997).

Resultados de estudo onde foram utilizados camundongos transgênicos sem IRS-2 (IRS-2^{-/-}), demonstraram que a ausência do gene para o IRS-2 alterava a sinalização da insulina no nível periférico e no desenvolvimento das células β pancreáticas, manifestando progressivamente o fenótipo de camundongos com *diabetes mellitus* tipo 2. Desde o nascimento, estes animais apresentavam resistência periférica à insulina e deficiência das células β pancreáticas, entretanto, ocorria um aumento compensatório da secreção de insulina por várias semanas. O subsequente aumento da falência das células β pancreáticas e da resistência periférica à insulina, levaram a uma hiperglicemia de jejum sem cetose, que é a característica mais comum do *diabetes mellitus* tipo 2 no homem.

Este estudo também evidenciou potenciais diferenças fisiológicas entre o IRS-1 e o IRS-2. Os camundongos IRS-2^{-/-} apresentaram marcadas anormalidades na homeostase da glicose, mas mínimos defeitos relacionados ao crescimento, situação oposta aos camundongos IRS-1^{-/-}. Portanto, o IRS-1 e o IRS-2 não podem ser intercambiados na estimulação das vias mitogênicas estimuladas pelo IGF-1, como foi sugerido previamente em estudos realizados *in vitro* (BRUNING *et al.*, 1997), nem na regulação metabólica estimulada pela insulina.

Estudo da atividade da PI 3-quinase em tecidos muscular e hepático, demonstrou que os diferentes IRSs não apresentavam os mesmos padrões de associação, indicando o IRS-2 como regulador mais crítico *in vivo* da via de sinalização da insulina (WITHERS *et al.*, 1998b).

Recentemente, demonstrou-se que a Akt, uma serina treonina-quinase com peso molecular de 57 kDa, participa da transmissão do sinal da PI 3-quinase e está relacionada ao transporte de glicose após o estímulo com insulina. A Akt é uma proteína com N-terminal, que contém um sítio SH2, atualmente redefinido como sítio homólogo da *pleckstrina* (PH), um sítio catalítico e um sítio C-terminal. Apesar da Akt apresentar potencial oncogênico, sua função e regulação normais não eram conhecidas, até ser clonada e relacionada como um intermediário distal no processo de ativação da PI 3-quinase. Esta ativação foi baseada em duas observações: a ativação do fator de crescimento induzido pela Akt pode ser completamente bloqueada pela adição de *wortmannin* (inibidor da PI 3-quinase); mutações dos receptores dos fatores de crescimento que inibem a ativação da PI 3-quinase, também inibem a Akt (COFFER *et al.*, 1998). Estes dados sugerem que a ativação da PI 3-quinase ou seus produtos participam como os principais fatores reguladores da ativação da Akt. Porém, podem existir vários outros mecanismos

alternativos que são utilizados por estímulos específicos, tais como choque térmico, hiperosmolaridade, hipoxemia, fator de crescimento neural e interleucinas (COFFER *et al.*, 1998).

A expressão da forma constitutivamente ativa da Akt é suficiente para promover a translocação do GLUT4 e aumentar o transporte de glicose nas células adipócitas 3T3-L1 (KOHN *et al.*, 1996a; TANTI *et al.*, 1997). Portanto, essa proteína desempenha um papel importante na via de sinalização da insulina, relacionada com o transporte de glicose.

Semelhante a outros fatores de crescimento, a insulina estimula a *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Essa via inicia-se com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a proteína Grb2 (PAEZ-ESPINOSA *et al.*, 1999). A Grb2 está constitutivamente associada a SOS, proteína que troca GDP por GTP da Ras, ativando-a. A ativação da Ras requer a participação da SHP2. Uma vez ativada, a Ras estimula a fosforilação em serina da cascata da MAPK que leva à proliferação e diferenciação celular (BOULTON *et al.*, 1991). O bloqueio farmacológico dessa via previne a ação da insulina no crescimento celular, mas não tem efeito nas ações metabólicas do hormônio (LAZAR *et al.*, 1995).

A ação insulínica envolve uma cascata de interações covalentes e não covalentes, centralizadas num primeiro nível no IRS-1 e no IRS-2. A ligação da insulina ao seu receptor na superfície celular, determina a fosforilação do IRS-1 e do IRS-2. Estes servem como proteínas ancoradoras para várias enzimas intracelulares e adaptadores moleculares. Tais ligações determinam múltiplos sinais na cascata da ação insulínica. Como resultado, o IRS-1 e o IRS-2 são pontos importantes nas vias de ação insulínica, que contribuem para determinar a multiplicidade dos efeitos biológicos finais. Portanto, o estudo da regulação

destes substratos no fígado e no músculo, de modelos animais de resistência à insulina, pode contribuir para a compreensão de mecanismos moleculares pós-receptores de alteração da sensibilidade a este hormônio. Neste sentido, nos últimos anos, foram demonstradas alterações nestas etapas iniciais da ação insulínica em tecidos insulino-sensíveis, dos seguintes modelos animais de resistência à insulina: ratos com hipertensão espontânea-SHR (KAHN & SAAD 1992), ratos tratados cronicamente com dexametasona (SAAD *et al.*, 1993b), ratos tratados com GH (THIRONE *et al.*, 1997), ratos tratados agudamente com adrenalina (THIRONE *et al.*, 1998), ratos tratados agudamente com glucagon (SAAD *et al.*, 1995), ratas grávidas (SAAD *et al.*, 1997) e ratos sépticos (NUNES *et al.*, 2001).

Portanto, o efeito basal e após o estímulo com insulina, no metabolismo da glicose, tem sido extensivamente estudado em ratos. Esses estudos para mensuração da sinalização insulínica são usualmente realizados com fragmentos de fígado e músculo (FOLLI *et al.*, 1992b; SAAD *et al.*, 1993a; CARVALHO *et al.*, 1996; KIDO *et al.*, 2000), retirados de animais submetidos à anestesia geral. Os anestésicos mais frequentemente utilizados são os barbitúricos e o éter dietílico. Os primeiros têm efeito depressor da atividade simpática, levando a alterações da frequência cardíaca, da fração de ejeção e da resistência vascular sistêmica (BAUM *et al.*, 1985; LANG *et al.*, 1987; WIXSON *et al.*, 1987), assim como redução da temperatura corporal (BAUM *et al.*, 1985; WIXSON *et al.*, 1987). O segundo apresenta efeito característico de reação de *stress*, com liberação de hormônios catabólicos, tais como catecolaminas, GH e cortisol (THURMON *et al.*, 1996). Apesar do uso de ratos anestesiados em diversos estudos, os efeitos dos anestésicos nas vias de sinalização da insulina não são conhecidos. Na presente investigação, três diferentes agentes anestésicos comumente utilizados em anestesia de animais experimentais foram avaliados. As

principais características desses fármacos e seus efeitos sobre o metabolismo de carboidratos estão descritos a seguir.

TIOPENTAL SÓDICO

Foi o primeiro tiobarbiturato a ganhar popularidade como agente anestésico em animais. Apresenta-se como um pó amarelo cristalino, que é instável em solução aquosa ou quando é exposto ao ar atmosférico. Por essa razão, é armazenado em recipientes lacrados, misturado com carbonato de sódio. É usualmente diluído em água destilada ou solução salina, numa concentração de 2,5%. Essa solução deve ser armazenada em geladeira, entre 5 e 6°C, para retardar a deterioração. Com o passar do tempo essa solução torna-se turva, há uma precipitação de cristais e uma progressiva perda da atividade, porém, sem aumento da toxicidade da droga.

Em ratos, a dose de tiopental preconizada para uso por via intraperitoneal é de 40 mg/kg (WHITE & FIELD 1987). No início o tiopental produz uma grande depressão do centro respiratório, com diminuição tanto da frequência respiratória como do volume corrente. Cinco minutos após sua administração, há aumento da frequência cardíaca, da pressão na aorta, da resistência vascular periférica, da pressão sistólica do ventrículo esquerdo e da pressão diastólica final.

O tiopental é um barbitúrico de ação ultra-curta, em função de sua rápida redistribuição. A redução da concentração no plasma, nos músculos e nas vísceras é acompanhada de aumento da concentração no tecido adiposo. Por outro lado, uma quantidade apreciável é metabolizada pelo fígado e isso contribui para uma precoce e rápida redução da concentração arterial. Doses repetidas de tiopental têm efeito cumulativo, podendo prolongar o tempo de anestesia.

Durante uma anestesia de longa duração com tiopental, há relatos de diminuição do glicogênio hepático e de significativa elevação dos níveis plasmáticos de glicose, ácido

lático e aminoácidos, de forma que o tiopental tem sido alvo de inúmeros estudos na tentativa de identificar os mecanismos envolvidos na gênese da hiperglicemia. Em testes orais e intravenosos uma pronunciada intolerância à glicose foi observada em diversas espécies animais, quando o tiopental foi utilizado como anestésico (HSU & HEMBROUGH 1982; TOSO *et al.*, 1993). Estudos com ilhotas pancreáticas isoladas indicam que essa intolerância ocorre devido a um defeito na secreção de insulina, que se manifesta principalmente na presença de altas concentrações de glicose. Isso ocorreria, de acordo com Gonçalves e colaboradores (GONCALVES *et al.*, 1986), em função da ação inibitória direta do tiopental sobre os canais de potássio das células β pancreáticas. Desta forma, quando ilhotas pancreáticas são expostas a altas concentrações de glicose, não se observa a resposta secretória característica. Também em animais intactos, Toso e colaboradores detectaram defeito secretório da ilhota, induzido por anestesia com tiopental (TOSO *et al.*, 1993).

PENTOBARBITAL SÓDICO

O pentobarbital sódico começou a ser utilizado como agente anestésico para cães e gatos no início da década de 30. Sua utilização passou a ser bastante difundida, tornando-se uma alternativa à anestesia inalatória com o éter dietílico. O pentobarbital sódico é um oxibarbítúrico, cuja diferença estrutural com o tiopental é um átomo de oxigênio ligado ao carbono 2, ao invés de um átomo de enxofre o que lhe confere uma duração de ação um pouco mais longa. O pentobarbital tem sido o mais popular barbitúrico utilizado em anestesia para todas as espécies de roedores, em função da sua disponibilidade, baixo custo e fácil manejo, por não ser irritante quando administrado por via intraperitoneal e pela rápida indução da anestesia.

O pentobarbital se apresenta como um pó branco ou grânulos cristalinos. É solúvel em água ou álcool. As preparações comerciais consistem de misturas racêmicas do medicamento. A administração de subdoses anestésicas é freqüentemente associada com sinais clínicos de estimulação do sistema nervoso central (SNC) e excitação pré-anestésica. Seu isômero (+) causa um breve período de hiperexcitabilidade antes da depressão do SNC, enquanto seu isômero (-) promove uma suave e progressiva hipnose.

Estudos do mecanismo de ação dessa droga têm revelado que a mesma deprime a excitabilidade neuronal de várias maneiras e esses efeitos depressivos parecem ser causados primariamente pelo isômero (-), através de um mecanismo que envolve o aumento da condutância ao cloro (Cl⁻). É provável que os efeitos do isômero (-) do pentobarbital sejam mediados através da ativação dos receptores GABA, promovendo a abertura de canais iônicos GABA-ativados por um período mais longo do que quando esses receptores são ativados pelo GABA (BARASH 1996).

Após uma única dose intravenosa dessa droga, há uma diminuição da pressão arterial, o débito cardíaco é variável, enquanto a resistência vascular periférica aumenta. A dose e a técnica de administração são os maiores fatores na variação da resposta ao pentobarbital (THURMON *et al.*, 1996). Na administração intraperitoneal, o pico de concentração sanguíneo é alcançado mais lentamente que o da administração intravenosa, e a porção da droga absorvida pelo sistema portal está sujeita a uma destruição precoce pelo fígado.

Como a ação analgésica do pentobarbital é pequena em roedores, doses necessárias para promover plano cirúrgico de anestesia são acompanhadas de progressivo declínio das pressões arteriais média, sistólica e diastólica e da frequência cardíaca. Há uma diminuição do volume corrente, da frequência respiratória e do volume minuto, assim como da resistência e da complacência pulmonares (THURMON *et al.*, 1996; KHON *et al.*, 1997).

A eliminação do pentobarbital depende totalmente da sua biotransformação pelo fígado. A insuficiência renal não altera sua farmacocinética, no entanto, a sensibilidade à ação dessa droga pode estar aumentada pela uremia. Este fenômeno é causado, provavelmente, pela diminuição da capacidade das proteínas plasmáticas de se ligarem às drogas ácidas.

A injeção intraperitoneal é comumente utilizada em animais de laboratório, pois essa via requer pouca habilidade e não resulta em lesões ou sinais de dor quando drogas irritantes são administradas. No rato, a administração deve ser feita no quadrante inferior esquerdo do abdome, com o animal contido em posição de hiperextensão da cabeça. Deve-se ter cuidado para que a injeção seja realizada na cavidade peritoneal, e não na parede abdominal ou no subcutâneo (THURMON *et al.*, 1996).

A dose preconizada por via intraperitoneal é de 40-60 mg/kg (FIELD *et al.*, 1993). Nessas doses, a anestesia cirúrgica completa instala-se entre 5 e 15 minutos e será efetiva por, aproximadamente, 30 a 45 min de acordo com a espécie animal. Portanto, este agente é indicado para procedimentos de longa duração. A completa recuperação ocorre em 6 a 18 h, e durante o despertar de uma anestesia com pentobarbital, o animal apresenta tremores, choro, movimentos involuntários, aumento da frequência respiratória, seguidos de recuperação dos reflexos e habilidade para ficar em pé. Como a recuperação anestésica com esse agente é bastante lenta, os sinais de despertar citados podem ser tão exagerados que o animal pode se ferir (THURMON *et al.*, 1996).

Os efeitos metabólicos do pentobarbital não são marcantes. Há indícios de que nos primeiros 30 a 60 minutos de anestesia ocorra uma redução dos níveis séricos de glicocorticóides, com retorno aos níveis normais em anestésias mais prolongadas (ILLERA *et al.*, 2000). Com relação ao metabolismo da glicose, a maior parte dos autores refere discreta ou nenhuma modulação pela anestesia com esse agente. Illera (ILLERA *et al.*, 2000) e Taylor (TAYLOR 1998) não encontraram alteração significativa dos níveis plasmáticos de glicose em animais anestesiados com pentobarbital. Stephenson e colaboradores (STEPHENSON *et al.*, 2000), entretanto, relatam uma inibição do transporte facilitativo de glicose por GLUT-1, o que deve interferir com a captação cerebral de glicose, independente dos níveis plasmáticos. Nenhum estudo até o momento avaliou o efeito do pentobarbital sobre os mecanismos moleculares da sinalização da insulina.

ÉTER DIETÍLICO

O éter dietílico, descoberto em 1546 por Valerius Cordus, denominado inicialmente *oleum vitrioli dulce* ou vitriolo doce, foi utilizado pela primeira vez como agente anestésico em 1842 por Crawford Williamson Long, mas essas experiências não foram publicadas. Em 1846, William Thomas Green Morton foi o responsável pela famosa demonstração, no Massachusetts General Hospital, das propriedades anestésicas desse agente (BARASH, 1996).

Este composto resulta da desidratação do álcool pelo ácido sulfúrico em temperatura abaixo de 140°C. É um líquido incolor, volátil, com ponto de ebulição de 36,5°C. À temperatura ambiente (20°C), tem uma pressão de vapor de aproximadamente 425mmHg.

O éter dietílico é um líquido altamente combustível que se inflama espontaneamente a uma temperatura de 154°C, mas a presença de peróxidos pode diminuir o seu ponto de ignição para 100°C. No ar ambiente uma faísca elétrica pode inflamá-lo, produzindo uma chama azul claro, quase invisível à luz do dia. Na presença de concentrações maiores de oxigênio pode produzir explosões de conseqüências devastadoras.

A decomposição do éter dietílico, que é favorecida pela luz, calor e contato com o ar, resulta em várias substâncias, sendo as duas mais importantes o aldeído acético e o peróxido de éter, às quais é atribuída uma suspeita não confirmada de toxicidade no homem. Com a finalidade de reduzir a velocidade de decomposição o éter dietílico deve ser armazenado em locais frescos, em recipientes fechados e escuros.

Em função do seu alto coeficiente de solubilidade sangue/gás (12,1) (EGER et al., 1963), apresenta tempo de indução e de recuperação anestésicas relativamente longos. Já a

sua solubilidade em lipídios é baixa, com coeficiente de solubilidade óleo/gás de 65, o que caracteriza uma baixa potência anestésica. A maior parte da droga (85-90%) é eliminada sem modificação pelos pulmões, e o restante pela pele, secreções orgânicas e urina.

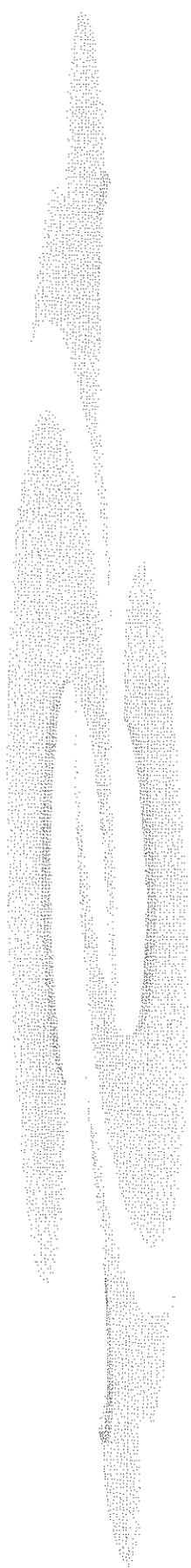
Em concentrações anestésicas é irritante para a mucosa das vias respiratórias, produzindo um aumento das secreções brônquicas, fato este que também pode prolongar o tempo de indução da anestesia.

O aumento da atividade do sistema nervoso simpático, sob a forma de liberação de noradrenalina, associado a um bloqueio do sistema nervoso parassimpático, durante a anestesia com éter dietílico, compensa parcialmente a sua ação depressora direta sobre o miocárdio. Também em função do aumento da atividade do sistema nervoso simpático, há liberação de adrenalina, produzindo glicogenólise no fígado e nos músculos, aumentando acentuadamente a glicemia (WINDER *et al.*, 1983; WYLIE & CHURCHILL-DAVIDSON, 2001; YOSHIMURA *et al.*, 1971). A literatura apresenta dados controversos, que demonstraram que os efeitos da anestesia com éter na concentração de glicogênio hepático e muscular são semelhantes àsquelas observadas quando os animais são decapitados e que o equilíbrio ácido - base durante a anestesia com éter é mais próximo do observado no rato não anestesiado (MERIN *et al.*, 1971).

O éter dietílico tornou-se o primeiro anestésico de uso rotineiro para pesquisa em animais de laboratório. Seu baixo custo e a simplicidade dos métodos de administração (aquários de vidros ou tubos contendo algodão embebido) tornam a anestesia com esse agente bastante atrativa. O recipiente de vidro utilizado para anestésiar o rato deve ser, no mínimo, quatro vezes maior que o tamanho do animal. Pesquisadores reconhecem que o éter dietílico produz uma estabilidade anestésica, com grande margem de segurança,

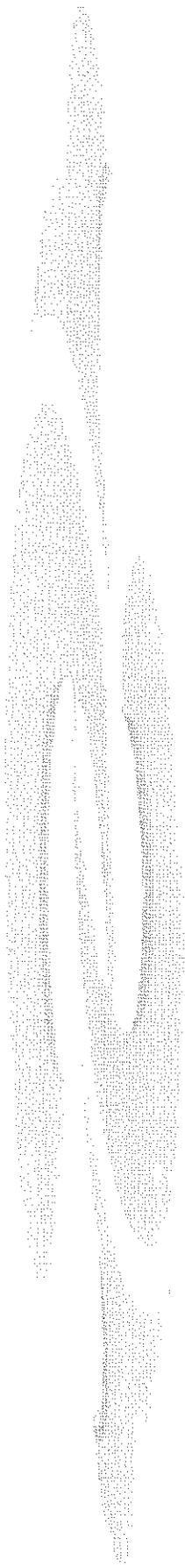
podendo a anestesia ser revertida de maneira previsível (KHON *et al.*, 1997). Entretanto, esse agente é explosivo em concentrações próximas ao limite requerido para produzir anestesia, e isso pode ocorrer inclusive durante a fase de recuperação anestésica. Até os corpos de animais, após a eutanásia, continuam exalando éter dietílico por um longo período, podendo ser responsáveis por explosões (KHON *et al.*, 1997). Por esses motivos, após recomendações de vários Comitês de Segurança Institucionais, o Instituto de Pesquisa em Animais de Laboratório dos Estados Unidos da América estabeleceu em 1996, um “Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório”, induzindo a substituição do éter dietílico por outros agentes anestésicos de menor risco e maior potência (KHON *et al.*, 1997).

Portanto, agentes anestésicos comumente utilizados em anestesia experimental podem interferir de forma variada na homeostase da glicose. A caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos na sinalização da insulina, em animais submetidos à anestesia cirúrgica experimental, pode contribuir para que se compreendam como os diferentes fármacos modulam a captação e o metabolismo da glicose, e pode ajudar na escolha do agente anestésico apropriado, nas mais variadas situações clínicas ou experimentais.



3. OBJETIVOS

1. Investigar o efeito do tiopental sódico, do pentobarbital sódico e do éter dietílico nas proteínas envolvidas na sinalização da insulina no fígado e no músculo de ratos Wistar.



4. MATERIAIS E MÉTODOS

REAGENTES E MATERIAIS

Os reagentes e aparelhos utilizados para eletroforese de gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE) e eletrotransferência foram da Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Tri(hidroximetil)-aminometano (Trisma-base), fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF), aprotinina, ditioneitol (DTT), Triton X-100, Tween 20 e glicerol foram da Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo, USA). Proteína A-Sepharose 6 MB foi da Pharmacia (Uppsala, Sweden); [¹²⁵I]proteína A foi da Amersham (Aylesbury, UK) e a membrana de nitrocelulose (BA85, 0.2mm) foi da Schleicher & Schuell (Keene, NH, USA). O tiopental sódico foi da Abbott Laboratories (North Chicago, Illinois, USA), o pentobarbital sódico foi da Fontoveter – Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (Itapira, SP, Brasil) e o éter dietílico foi da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Insulina recombinante humana (Humulin R) foi da Eli Lilly Co. (Indianapolis, Ind, USA). Anticorpos policlonais anti-IR, anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-pERK e o anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina foram da Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA, USA), o anticorpo monoclonal anti-PI 3-quinase foi da Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY, USA) e o anticorpo anti-pAkt foi da Cell Signaling Technology (Beverly, MA).

Solução tampão de extração (extrato total e imunoprecipitação)

Utilizada para a extração das proteínas celulares dos tecidos estudados. Contém: Triton X-100 1%, Trisma-base (pH 7,4) 100mM, pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 10mM, PSMF 2mM (diluído em álcool etílico) e aprotinina 0,1mg/ml. Esta solução deve ser mantida a 4°C. O ortovanadato, PMSF e a aprotinina devem ser acrescentados no momento da extração.

Solução tampão de Laemmli (5X)

Utilizada para a aplicação do material extraído, no gel de poliacrilamida. Contém: Azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio (pH 7,0) 1M, glicerol 50% e SDS 10%.

Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado

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

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

Utilizada para a manufatura do SDS-PAGE, gel de resolução. Contém: EDTA 4mM, SDS 2% e Trisma-base 750mM. Este tampão deve ter seu pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

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

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

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

Empregada para a realização da eletroforese no SDS-PAGE. No momento da utilização deve ser diluída 1:4. Contém: Trisma-base 200mM, glicina 1,52M, EDTA 7,18mM e SDS 0,4%.

Solução tampão para transferência

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

Solução Basal

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

Solução bloqueadora

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

Solução para anticorpos

Solução contendo os anticorpos específicos que reagem com as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal.

Os anticorpos utilizados foram os seguintes, nas diluições indicadas: anticorpo anti-fosfotirosina, diluído 1:200; anticorpos anti-IR, anti-IRS-1 e anti-IRS-2, diluídos cada um 1:100; anticorpos anti-PI 3-quinase, anti-pAkt e anti-pERK, diluídos 1:2000.

Solução com [¹²⁵I] Proteína A

Contém a proteína A com ¹²⁵I para a marcação dos anticorpos específicos, prestando-se à visualização em auto-radiografia. Contém 0,1% de leite desnatado, dissolvido em solução basal, com 2μCi de [¹²⁵I]Proteína A (30μCi/μg).

Procedimentos com os animais para a extração das proteínas teciduais

Este protocolo de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Campinas.

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade albina) da linhagem *Wistar-Hannover*, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, Campinas-SP, com 8 semanas de idade e peso entre 180 e 200g. Após o desmame, os animais foram alimentados com ração para ratos Labina, marca Purina, que contém 0,3 a 0,5g de sódio/100g de ração (85% do sódio na forma de cloreto de sódio) e 0,75g de potássio/100g de ração. Portanto, quantidades superiores ao nível mínimo recomendado para se promover crescimento e reprodução dos animais (REEVES *et al.*, 1993).

Os animais foram recebidos do biotério uma semana antes de cada experimento, foram acomodados em gaiolas plásticas contendo cada uma no máximo 5 espécimes e mantidos em condições de fotoperíodo (12 horas de luz/escuro), com ração e água fornecidos *ad libitum*. Os experimentos foram realizados no período da manhã e antes de cada experimento, os animais permaneceram em jejum noturno por um período de 12 horas.

Os animais foram distribuídos em 3 grupos, segundo o anestésico utilizado: (1) animais anestesiados com tiopental sódico na dose de 40mg/Kg de peso corporal, por via intraperitoneal; (2) animais anestesiados com pentobarbital sódico 40-60mg/Kg de peso corporal, por via intraperitoneal e (3) animais anestesiados com éter dietílico, por via inalatória. A anestesia dos animais deste grupo foi induzida em campânula de vidro com volume de 2 litros, previamente saturada com vapor de éter, através de um chumaço de algodão embebido com 6ml do anestésico. Os animais permaneceram nesse recipiente o tempo necessário para se estabelecer padrão respiratório regular e imobilidade, sendo posteriormente transferidos para um sistema de manutenção, composto por uma seringa descartável de 20ml com um chumaço de algodão embebido com 2ml do anestésico, simulando uma máscara facial.

Aproximadamente 15 minutos após a administração dos anestésicos por via intraperitoneal ou após o início da fase de manutenção da anestesia inalatória, tendo sido confirmada a abolição dos reflexos corneano e de retirada da pata ao estímulo doloroso (pinçamento), foi realizada laparotomia mediana com exposição da veia porta. A ampliação da incisão permitiu o acesso ao músculo gastrocnêmio da pata traseira esquerda.

Em todos os grupos foram estudados animais estimulados (+) ou não (-) com insulina regular, através de injeção na veia porta de 0,5ml de solução salina 0,9%, contendo ou não 60µg desse hormônio.

Aos 30 e 90 segundos após a injeção de insulina regular ou de solução salina, foram retirados, respectivamente, um fragmento de fígado e um de músculo gastrocnêmio, cada um com cerca de 0,5cm³, que foram imediatamente homogeneizados em solução tampão de extração, mantida em banho de gelo a 4°C, com Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35,

Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA) em rotação máxima, durante 30 segundos. Os tecidos extraídos e homogeneizados foram centrifugados a 15.000 rpm, a 4°C por 45 minutos, para a remoção do material insolúvel. O sobrenadante foi utilizado para extrato total ou para imunoprecipitação com os anticorpos anti-IR, anti-IRS-1 e anti-IRS-2. As amostras foram estocadas em tampão de Laemmli, contendo 100 mM de DTT em uma proporção de 5:1, até a fase seguinte. Outra pequena porção do sobrenadante foi utilizada para quantificação da concentração protéica de cada amostra, através do método de biureto.

Immunoblotting

Para o estudo do extrato total, 200µg de cada amostra foram aplicados no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 2mm de espessura, balizado por marcador de alto peso molecular da *Bio Rad*, composto por miosina (205 kDa), β-galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina - BSA (85 kDa) e ovalbumina (49.5 kDa). Realizou-se a eletroforese em cuba de minigel da *Bio Rad*, com solução tampão previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido inicialmente a 25 volts, até alcançar a linha demarcada pela fase de empilhamento e depois a 120 volts por mais 2 horas, até o final do gel de resolução. A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência do minigel da *Bio Rad*, que foi mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas, como o descrito por Towbin (TOWBIN *et al.*, 1979) exceto pela adição de SDS 0,02% à solução tampão de transferência, para facilitar a remoção de proteínas de alto peso molecular.

Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução bloqueadora à temperatura ambiente, por 2 horas, e posteriormente lavadas com solução basal por 3 sessões de 10 minutos. A seguir, foram incubadas com solução contendo o anticorpo anti-fosfotirosina, por 4 horas à temperatura ambiente, e novamente lavadas com solução basal, e então incubadas com a [I^{125}]Proteína A, por 2 horas. O excesso de [I^{125}]Proteína A foi lavado com solução basal e então as membranas foram expostas ao filme de RX (Eastman Kodak, Rochester, NY) com intensificador (Cronex Lightning Plus intensifying screens - DuPont, Wilmington, DE). O cassete foi mantido à temperatura de -80°C e, em média, após 12 a 48 horas, o filme foi revelado de forma convencional.

As bandas identificadas nas auto-radiografias foram analisadas quantitativamente utilizando-se o *software* Scion Image.

Imunoprecipitação

Alíquotas do sobrenadante de cada amostra foram utilizadas em experimentos de imunoprecipitação com anticorpos anti-IR, anti-IRS-1 e anti-IRS-2. Os volumes das amostras foram normalizados por concentração protéica e os volumes de cada anticorpo aplicado foi fixo ($10\mu\text{l}$ /amostra). As amostras foram incubadas a 4°C por 14-16 horas. A seguir foram acrescentados $50\mu\text{l}$ de Proteína A-Shepharose 6MB, e as amostras foram mantidas em agitação contínua a 4°C por 2 horas, para precipitação do complexo proteína-anticorpo. Ao final desse período as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o complexo precipitado foi lavado por 3 vezes com tampão específico.

As proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de Laemmli (LAEMMLI 1970), contendo 100mM de DTT, aquecidas em água fervente por 4 minutos, e então submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 6%. O procedimento segue as etapas já descritas anteriormente para o *immunoblotting*. Nestes experimentos de imunoprecipitação, os anticorpos utilizados para incubar as membranas foram o anti-fosfotirosina, o anti-PI 3-quinase, o anti-pAkt e o anti-pERK.

Dosagem de glicose plasmática

A determinação da glicose plasmática foi realizada através de método enzimático colorimétrico, segundo Trinder (TRINDER 1969) (Glicose E enzimática, Reactoclin) (REED *et al.*, 1972; LOTT & TURNER 1975) e os resultados expressos em mg/dl.

Avaliação da ação da insulina com o teste de tolerância à insulina curto (TTI)

Os animais foram submetidos ao teste endovenoso de tolerância à insulina. Os testes foram realizados pela manhã, após jejum noturno de 12 horas. Os animais foram anestesiados, em seguida tiveram coletada pequena amostra de sangue por secção da cauda e receberam 60 µg de insulina regular na veia peniana. A partir de então, houve coleta seriada de amostras de sangue aos 4, 8, 12 e 16 minutos após a administração da insulina. Estas amostras foram desproteinizadas em ácido tricloroacético, e após centrifugação, foram determinadas as glicemias pelo método descrito acima.

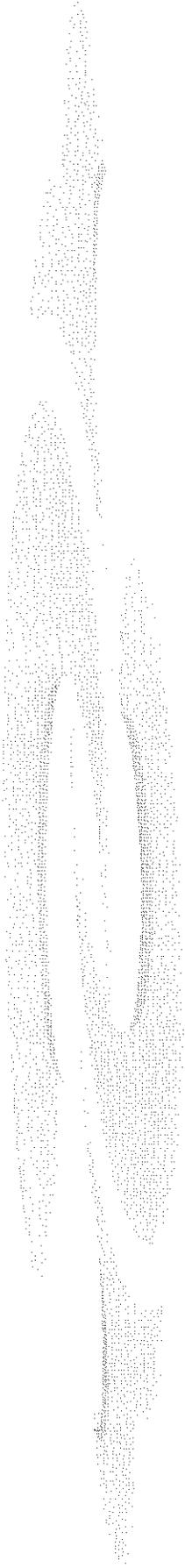
A velocidade de desaparecimento da glicose (K_{it}) foi calculada pela fórmula $\ln 2/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose (BONORA *et al.*, 1989).

Dosagem da insulina plasmática

Para a dosagem da insulina, utilizou-se técnica de radioimunoensaio, empregando-se o método do duplo anticorpo para insulina e os resultados expressos em ng/ml.

Análise estatística

Os experimentos foram sempre realizados, possibilitando o estudo de todos os grupos de animais em paralelo. Para análise estatística dos resultados, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA One Way) com correção de Bonferroni, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), sendo os resultados expressos como média \pm erro padrão da média ($X \pm$ E.P.M.).



6. RESULTADOS

Effect of Thiopental, Pentobarbital and Diethyl Ether on Early Steps of Insulin Action in Liver and Muscle of the Intact Rat

Adilson R. Cardoso¹, Mário J. A. Saad², José B. C. Carvalheira²

¹ Departamento de Anestesiologia, FCM, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

² Departamento de Clínica Médica, FCM, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Short running title: Effect of anaesthesia on insulin signaling

Please address correspondence to: José B. C. Carvalheira, M.D., Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brazil, 13081-970, Fax: +55 19 37888950, e-mail: carvalheirajbc@uol.com.br

Abstract

A large number of experimental studies have investigated insulin signaling in rats. In these studies different anaesthetics have been used to anaesthetize rats. However, the direct effects of anaesthetics on the regulation of the early steps of insulin action are not known. In the present study, we investigated the effect of thiopental, pentobarbital and diethyl ether on the plasma glucose disappearance rate, IR, IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation, IRSs association with PI 3-kinase, Akt and Erk phosphorylation, in liver and muscle of rats. Fasting plasma glucose levels were higher in animals anaesthetized with ether. No differences in plasma glucose disappearance rates were observed, however. Insulin-induced IR, IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation, association of these substrates with PI 3-kinase and Akt and ERK phosphorylation were similar in the three groups of animals in both tissues. These data suggest that both thiopental and pentobarbital may be used in studies where changes in insulin signaling are being measured and where adequate general anaesthesia is required.

Keywords:

Pentobarbital/*pharmacology; Ether, Ethyl/*pharmacology; Thiopental/*pharmacology;
SignalTransduction/*physiology; Phosphoproteins/*metabolism

Basal and insulin-stimulated glucose metabolism have now been extensively studied in intact rats. These studies are often performed in an anaesthetized preparation to eliminate the influence of environmental factors. In these studies, different anaesthetics have been used to anaesthetize rats and fragments of liver and muscle were excised and their insulin signaling measured ¹⁻⁴. Barbiturates are the most widely used anaesthetic with established effects on lowering sympathetic nervous system (SNS) activity, thus altering hemodynamic parameters such as heart rate, stroke index, blood pressure, and total cardiac output ⁵⁻⁷ and lowering core body temperature ^{5,7}. Despite the use of anaesthetized rats in many studies, there is still some uncertainty concerning the precise effects of anaesthesia on *in vivo* insulin action.

During the past decade, many of the proteins involved in insulin action have been defined at the molecular level. The insulin receptor is a protein tyrosine kinase which, when activated by insulin binding, undergoes rapid autophosphorylation and phosphorylates intracellular protein substrates, including insulin receptor substrates (IRSs – IRS-1 and IRS-2 are the most important) ⁸⁻¹⁰ and Shc ¹¹. Following tyrosine phosphorylation, the IRSs act as docking proteins for several Src homology 2 domain-containing proteins, including phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), Grb2, SHP2, Nck and Fyn ^{1,2,12-14}. Downstream to PI 3-kinase there is activation of a serine/threonine kinase, Akt ¹⁵. In contrast, downstream to Grb2 there is activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), which is important in the regulation of gene expression and cell growth ¹⁶⁻¹⁸.

The effects of different anaesthetics on the regulation of the early steps of insulin action are not known. In the present study, we investigated the effect of sodium thiopental, sodium pentobarbital and diethyl ether on IR, IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation

and association with PI 3-kinase, Akt and ERK phosphorylation in the liver and muscle of rats stimulated with insulin. We chose to compare these two anaesthetic with ether, since previous studies have shown that 1) the effects of ether anaesthesia on liver and skeletal muscle glycogen concentrations are similar to decapitation, cervical dislocation ¹⁹⁻²¹ and 2) the arterial blood gas and acid-bases status of the rat during ether anaesthesia most closely resembles that of the rat in the unanaesthetized state ¹⁹.

Materials and Methods

Materials

Reagents for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDSPAGE) and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Tris, phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), aprotinin, dithiothreitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, glycerol and bovine serum albumin (BSA, fraction V) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA). Protein A-Sepharose 6 MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden), [¹²⁵I]Protein A was from Amersham (Aylesbury, UK) and nitrocellulose paper (BA85, 0.2 mm) was from Schleicher & Shuell (Keene, N.H., USA). Thiopental sodium was from Abbott Laboratories (North Chicago, Illinois, USA), Pentobarbital sodium was from Fontoveter - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (SP, Brazil) and Diethyl ether was from Vetec Química Fina (RJ, Brazil). Human recombinant insulin (Humulin R) was from Eli Lilly Co. (Indianapolis, Ind., USA). Anti-PI 3-kinase antiserum was from Upstate Biotechnology Incorporated (Lake Placid, NY, USA). Anti-IR, anti-IRS1, anti-IRS2, anti-pAkt, anti-pErk and Monoclonal antiphosphotyrosine antibody were from Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-pAkt antibody were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA).

Anaesthesia, animal tissue extracts and immunoblotting

The University of Campinas Ethical Committee approved all experiments involving animals. Male Wistar rats (200-230g) were housed with access to standard rodent chow and water *ad libitum*. Food was withdrawn 12 h before the experiments. The rats were anaesthetized with thiopental sodium (40-50 mg/kg, intraperitoneal) or pentobarbital sodium (40-60 mg/kg, intraperitoneal) or diethyl ether (an anaesthesia chamber was utilized as the induction method of delivering volatile anaesthetic agent to the rats); the ether was

volatilized by placing it on cotton balls in the bottom of the jar. The maintenance of anaesthesia was achieved with a face mask made from a disposable syringe). After 15 min, as soon as anaesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes, the abdominal cavity was opened, the portal vein exposed, and 0.5 ml of saline (0.9% NaCl) with or without 10^{-5} M insulin was injected. Thirty seconds later, the liver was removed, minced coarsely and homogenized immediately in approximately 10 volumes of solubilization buffer maintained at 4°C, using a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA) operated at maximum speed (Setting 10) for 30 s. The extraction buffer was composed of 1% Triton X-100, 100mM Tris (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF and 0.1 mg of aprotinin/ml. Approximately 90s after insulin injection, hind limb muscle was excised and homogenized, as described for the liver. Both extracts were centrifuged (15 000 rpm) in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA, USA) at 4°C for 45 min to remove insoluble material. The supernatant of these tissues was used for immunoprecipitation with anti-IR, anti-IRS-1 and anti-IRS-2 antibodies and Protein A Sepharose 6 MB or used for total extracts. The samples were treated with Laemmli sample buffer containing 100 mM DTT and heated in a boiling-water bath for 4 min. For total extracts, similar aliquots (200 µg of protein) were subjected to SDS-PAGE (6% bis-crylamide) in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus (Mini-Protean). Molecular weight standards were myosin (194 KDa), β-galactosidase (116 KDa), bovine serum albumin (85 KDa) and ovalbumin (49.5 KDa).

Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 2 h at 20 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean) as described by Towbin *et al.*²² except for the addition of 0.02% SDS to the transfer buffer to enhance the

elution of high molecular mass proteins. Non-specific protein binding to the nitrocellulose was reduced by pre-incubating the filter overnight at 4°C in blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blot was incubated with antiphosphotyrosine (1 µg/ml) or anti-PI 3-Kinase (1:1500) antibodies, diluted in blocking buffer (0.3% bovine serum albumin instead of non-fat dry milk) overnight at 4°C and washed for 60 min with the blocking buffer without milk. The blots were then incubated with 2 µCi of [¹²⁵I]Protein A (30 µCi / µg) in 10 ml of blocking buffer for 2 h at room temperature and then washed again for 2 h as described above. [¹²⁵I]Protein A bound to the antiphosphotyrosine and anti-peptide antibodies were detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film with Cronex Lightning Plus intensifying screens at -80°C for 48-72 h. Quantitative analysis of the blots was performed using Scion Image software.

Other Methods

Plasma glucose concentrations were determined by the glucose oxidase method. Plasma insulin levels were measured by double-antibody radioimmunoassay (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA). Some animals in both groups also underwent an intravenous insulin tolerance test (0.5 ml of 10⁻⁵ M insulin, injected into the tail vein) and 8 samples for blood glucose determination were collected from the tail at 0 (basal), 4, 8, 12 and 16 min after insulin injection. Thereafter, the rate constant for plasma glucose disappearance (Kitt) was calculated from the formula $0.693/t^{1/2}$. The plasma glucose $t^{1/2}$ was calculated from the slope of the least square analysis of the plasma glucose concentration during the linear phase of decline.

Statistical analysis

Comparisons among the groups were made using a one-way analysis of variance with a Bonferroni correction for multiple comparisons. The level of significance employed was $p < 0.05$. All results are expressed as mean \pm SEM.

Results

Animal characteristics

Table 1 summarizes the basal plasma glucose, serum insulin levels and glucose disappearance rate during an intravenous insulin tolerance test (K_{itt}) in the three groups. All experiments were performed, including blood collection, 15 minutes after anaesthesia induction. Fasting plasma glucose concentrations were higher in rats anaesthetized with ether compared to rats anaesthetized with thiopental and pentobarbital ($p < 0.05$). Plasma glucose concentrations in rats anaesthetized with pentobarbital were similar to those of thiopental anaesthetized rats. Fasting serum insulin levels were similar in the three groups.

In order to demonstrate the effect of these three anaesthetics on insulin sensitivity, the animals were submitted to an insulin tolerance test in the three groups. The glucose disappearance rate during this test was similar in the three groups.

The effect of thiopental, pentobarbital and ether on early steps of insulin action in rat liver

In samples previously immunoprecipitated with anti-insulin receptor antibody and blotted with antiphosphotyrosine antibody insulin-induced insulin receptor tyrosine phosphorylation was similar in the three groups of rats (Fig. 1A).

To better define the levels of IRS-1 and IRS-2 phosphorylation, we performed Western blot analysis of tyrosyl-phosphorylated proteins in anti-IRS-1 and anti-IRS-2 immunoprecipitated before and after insulin stimulation in all groups of animals. Figures 1B and 1D show that the levels of insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation were similar in rats anaesthetized with thiopental, pentobarbital or ether.

Association of the 85 kDa subunit of PI 3-kinase with IRS-1 and IRS-2 were examined by incubating the same blot with antibodies to this subunit (Fig. 1C, 1E). As expected, in all groups of animals, a band of 85 kDa was present in the IRS-1 and IRS-2 immunoprecipitated after exposure to insulin.

Using antibodies against serine-phosphorylated Akt, the levels of Akt phosphorylation were examined in liver after insulin stimulation. As shown in Figure 1F, insulin-stimulated serine phosphorylation of Akt equally in the liver of rats that received different anaesthetics.

Using antibodies against tyrosine-phosphorylated ERK-1/2, the levels of ERK-1/2 phosphorylation were examined in liver after insulin stimulation. As shown in Figure 1G, insulin stimulated tyrosine phosphorylation of ERK-1/2 equally in the liver of rats that received different anaesthetics.

The effect of thiopental, pentobarbital and ether on early steps of insulin action in rat muscle

In order to investigate the effect of different anaesthetics in insulin-induced insulin receptor tyrosine phosphorylation in muscle, samples from rats anaesthetized with thiopental, pentobarbital or ether, were extracted, homogenized and immunoprecipitated with anti-insulin receptor antibody and then immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody. The results demonstrated that insulin-induced insulin receptor tyrosine phosphorylation was similar in the three groups of rats (Fig. 2A).

In samples from muscle previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 and IRS-2 antibodies and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody, insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation were similar in all groups of rats (Fig. 2B, 2D).

Previous studies suggested that there is a relatively stable and high affinity interaction between IRS-1, IRS-2 and the 85 kDa subunit of PI 3-kinase, such that both proteins are co-precipitated by antibodies to each protein. In samples from muscle previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 and anti-IRS-2 antibodies, and immunoblotted with antibodies directed against the 85 kDa subunit of PI 3-kinase, there was little or no detectable PI 3-kinase immunoreactivity in the basal state in the three groups (Fig. 2C, 2E). After stimulation with insulin, a band consistent with the expected molecular weight of the regulatory subunit of PI 3-kinase (85 kDa) was present in anti-IRS-1 and IRS-2 immunoprecipitated of muscle from all groups of animals. This observation is consistent with the existence of a stable complex between IRS-1/2 and PI 3-kinase. When we compared the bands from samples that were stimulated with insulin, PI 3-kinase/IRS-1 and PI 3-Kinase/IRS-2 associations were paralleled with tyrosine phosphorylation bands of the latter, and were similar in the three groups of animals (Fig. 2D, 2E).

Using antibodies against serine-phosphorylated Akt, the levels of Akt phosphorylation were examined in muscle after insulin stimulation. As shown in Figure 2F, insulin stimulated serine phosphorylation of Akt equally in the muscle of the different anaesthetics.

Using antibodies against tyrosine-phosphorylated ERK-1/2, the levels of ERK-1/2 phosphorylation were examined in muscle after insulin stimulation. As shown in Figure 2G, insulin stimulated tyrosine phosphorylation of ERK-1/2 equally in the muscle of the different anaesthetics.

Discussion

The major aim of the present investigation was to determine whether the administration of pentobarbital or thiopental would be acceptable anaesthetics in studies examining tissue insulin signaling. To accomplish this aim, we investigated IR, IRS-1 and IRS-2 phosphorylation and association with PI 3-kinase, as well as Akt and ERK-1/2 phosphorylation in the liver and muscle of rats submitted to three different anaesthetics.

Our results indicate that the glucose disappearance rate was similar in animals anaesthetized with thiopental, pentobarbital or ether. In addition, insulin-induced IR, IRSs, Akt and ERK phosphorylation was similar in the three groups, both in liver and muscle, and did not depend on the anaesthetic that was used.

The regulation of the early steps of insulin action after hormone binding may have an important role in insulin sensitivity. Insulin increases glucose uptake into cells, partly through the translocation of GLUT4 from intracellular compartments to the plasma membrane in muscle and adipose tissue²³. Distinct experimental approaches have led to the conclusion that PI 3-kinase is necessary for insulin-stimulated GLUT4 translocation²⁴⁻²⁶. Other studies have also presented evidence to demonstrate a correlation between PI 3-kinase activity and glycogen metabolism^{27,28}. Thus, it is reasonable to speculate that the IRS-1/PI 3-kinase pathway may be linked to the activation of glucose transport in muscle and glycogen synthesis in liver and muscle. In this regard, the similar glucose disappearance rate in the three anaesthetic groups parallels the early steps of insulin signaling.

As is the case for other growth factors, insulin stimulates ERK. Activated ERK can translocate into the nucleus, initiating a transcriptional programme that leads to cellular proliferation or differentiation²⁹. In this respect our results showed that thiopental and

pentobarbital did not alter the effect of insulin on ERK tyrosine phosphorylation when compared to ether anaesthesia. Another interesting finding in our study is the increase in fasting plasma glucose in animals anaesthetized with ether, without alterations in insulin sensitivity. The fasting plasma glucose is influenced by glucose utilization in an insulin dependent and independent manner, but is mainly regulated by hepatic glucose output^{30,31}. The early steps in insulin action, mainly IRS-1 and -2/PI 3-kinase association, may contribute to inhibit glucose production by the liver, but the three anaesthetics have the same influence on the regulation of these steps. It is possible that, in animals that received ether, an increase in hepatic glucose output, by glycogenolysis or gluconeogenesis, regulated without the influence of the early steps in insulin action, may explain the increase in fasting plasma glucose levels. The mechanisms whereby ether induces the above mentioned alterations are unknown but may be related to the hormonal milieu. An increase in circulating hormones such as cortisol, growth hormone and epinephrine, which act as antagonists of insulin, may contribute to the elevation in plasma glucose levels in these animals.

In summary, data from the present study support the contention that both thiopental and pentobarbital can be used in investigations where changes in insulin signaling are being measured and general anaesthesia is required.

References

1. Folli F, Saad MJ, Backer JM, Kahn CR. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *J Biol Chem* 1992;**267**(31):22171-7.
2. Saad MJ, Folli F, Kahn JA, Kahn CR. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone- treated rats. *J Clin Invest* 1993;**92**(4):2065-72.
3. Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* 1996;**137**(1):151-9.
4. Kido Y, Burks DJ, Withers D, et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest* 2000;**105**(2):199-205.
5. Baum D, Halter JB, Taborsky GJ, Jr., Porte D, Jr. Pentobarbital effects on plasma catecholamines: temperature, heart rate, and blood pressure. *Am J Physiol* 1985;**248**(1 Pt):E95-100.
6. Lang CH, Bagby GJ, Hargrove DM, Hyde PM, Spitzer JJ. Alterations in glucose kinetics induced by pentobarbital anesthesia. *Am J Physiol* 1987;**253**(6 Pt 1):E657-63.
7. Wixson SK, White WJ, Hughes HC, Jr., Lang CM, Marshall WK. The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on arterial blood pH, blood gases, mean arterial blood pressure and heart rate in adult male rats. *Lab Anim Sci* 1987;**37**(6):736-42.
8. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991;**352**(6330):73-7.
9. Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 1995;**377**(6545):173-7.
10. Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulintreated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 1997;**272**(17):11439-43.
11. Kovacina KS, Roth RA. Identification of SHC as a substrate of the insulin receptor kinase distinct from the GAP-associated 62 kDa tyrosine phosphoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;**192**(3):1303-11.
12. Skolnik EY, Lee CH, Batzer A, et al. The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine- phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *Embo J* 1993;**12**(5):1929-36.
13. Kuhne MR, Pawson T, Lienhard GE, Feng GS. The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *J Biol Chem* 1993;**268**(16):11479-81.
14. Yamauchi K, Milarski KL, Saltiel AR, Pessin JE. Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**(3):664-8.

15. Brozinick JT, Jr., Birnbaum MJ. Insulin, but not contraction, activates Akt/PKB in isolated rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 1998;**273**(24):14679-82.
16. Sale EM, Atkinson PG, Sale GJ. Requirement of MAP kinase for differentiation of fibroblasts to adipocytes, for insulin activation of p90 S6 kinase and for insulin or serum stimulation of DNA synthesis. *Embo J* 1995;**14**(4):674-84.
17. Jhun BH, Haruta T, Meinkoth JL, et al. Signal transduction pathways leading to insulin-induced early gene induction. *Biochemistry* 1995;**34**(25):7996-8004.
18. Kim SJ, Kahn CR. Insulin regulation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), mitogen-activated protein kinase and casein kinase in the cell nucleus: a possible role in the regulation of gene expression. *Biochem J* 1997;**323**(Pt 3):621-7.
19. Fregosi RF, Dempsey JA. Anesthetic effects on [H⁺]a and muscle metabolites at rest and following exercise. *Respir Physiol* 1986;**65**(1):85-98.
20. Winder WW, Fuller EO, Conlee RK. Adrenal hormones and liver cAMP in exercising rats--different modes of anesthesia. *J Appl Physiol* 1983;**55**(5):1634-6.
21. Musch TI, Warfel BS, Moore RL, Larach DR. Anesthetic effects on liver and muscle glycogen concentrations: rest and postexercise. *J Appl Physiol* 1989;**66**(6):2895-900.
22. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;**76**(9):4350-4.
23. Stephens JM, Pilch PF. The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT4, the major insulin-responsive glucose transporter. *Endocr Rev* 1995;**16**(4):529-46.
24. Hara K, Yonezawa K, Sakae H, et al. 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;**91**(16):7415-9.
25. Okada T, Kawano Y, Sakakibara 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* 1994;**269**(5):3568-3.
26. Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 1994;**14**(7):4902-11.
27. Cross DA, Alessi DR, Vandenhede JR, McDowell HE, Hundal HS, 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* 1994;**303** (Pt 1):21-6.
28. Welsh GI, Foulstone EJ, Young SW, Tavaré JM, Proud CG. Wortmannin inhibits the effects of insulin and serum on the activities of glycogen synthase kinase-3 and mitogen-activated protein kinase. *Biochem J* 1994;**303** (Pt 1):15-20.

29. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991;**65**(4):663-75.

30. Yoshimura N, Kodama K, Yoshitake J. Carbohydrate metabolism and insulin release during ether and halothane anaesthesia. *Br J Anaesth* 1971;**43**(11):1022-6.

31. Merin RG, Samuelson PN, Schalch DS. Major inhalation anesthetics and carbohydrate metabolism. *Anesth Analg* 1971;**50**(4):625-37.

Table 1

Characteristics of the animals studied

<i>Groups</i>	<i>Plasma glucose</i> (mg/dl)	<i>Serum Insulin</i> (ng/ml)	<i>Kitt</i> (%/min)
Tiopental	79 ± 3 (22)	2.08 ± 0.23 (13)	4.08 ± 0.20 (14)
Pentobarbital	81 ± 2 (22)	2.67 ± 0.15 (12)	3.84 ± 0.14 (14)
Ether	90 ± 3 (24)*	2.15 ± 0.21 (13)	3.90 ± 0.26 (14)

The data are represented as the mean ± S.E.M. of the number of animals shown in parentheses.

* $p < 0,05$ vs. thiopental and pentobarbital treated rats by factorial One-Way Analysis of Variance with a Bonferroni correction.

Fig. 1

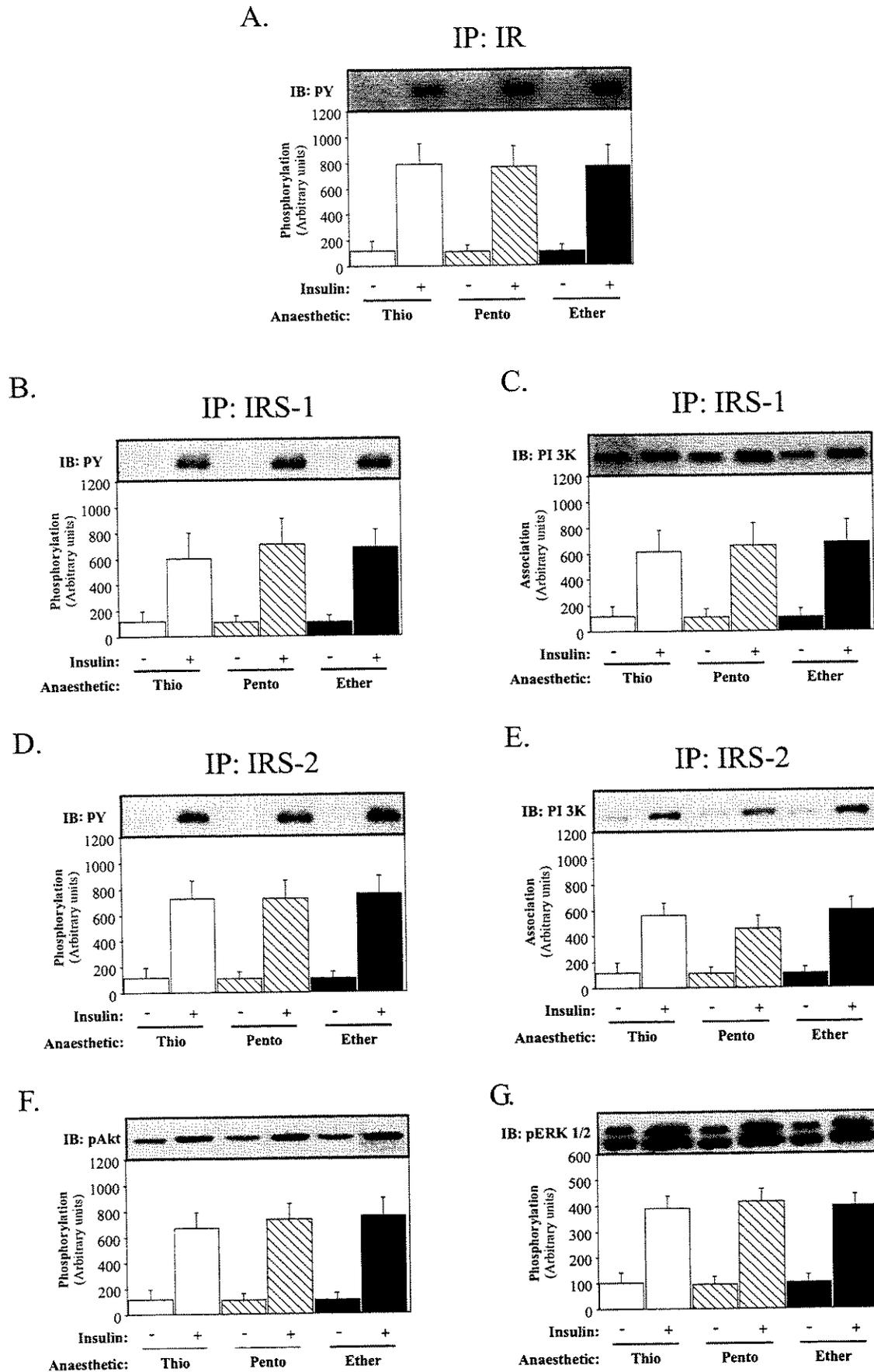


Fig. 2

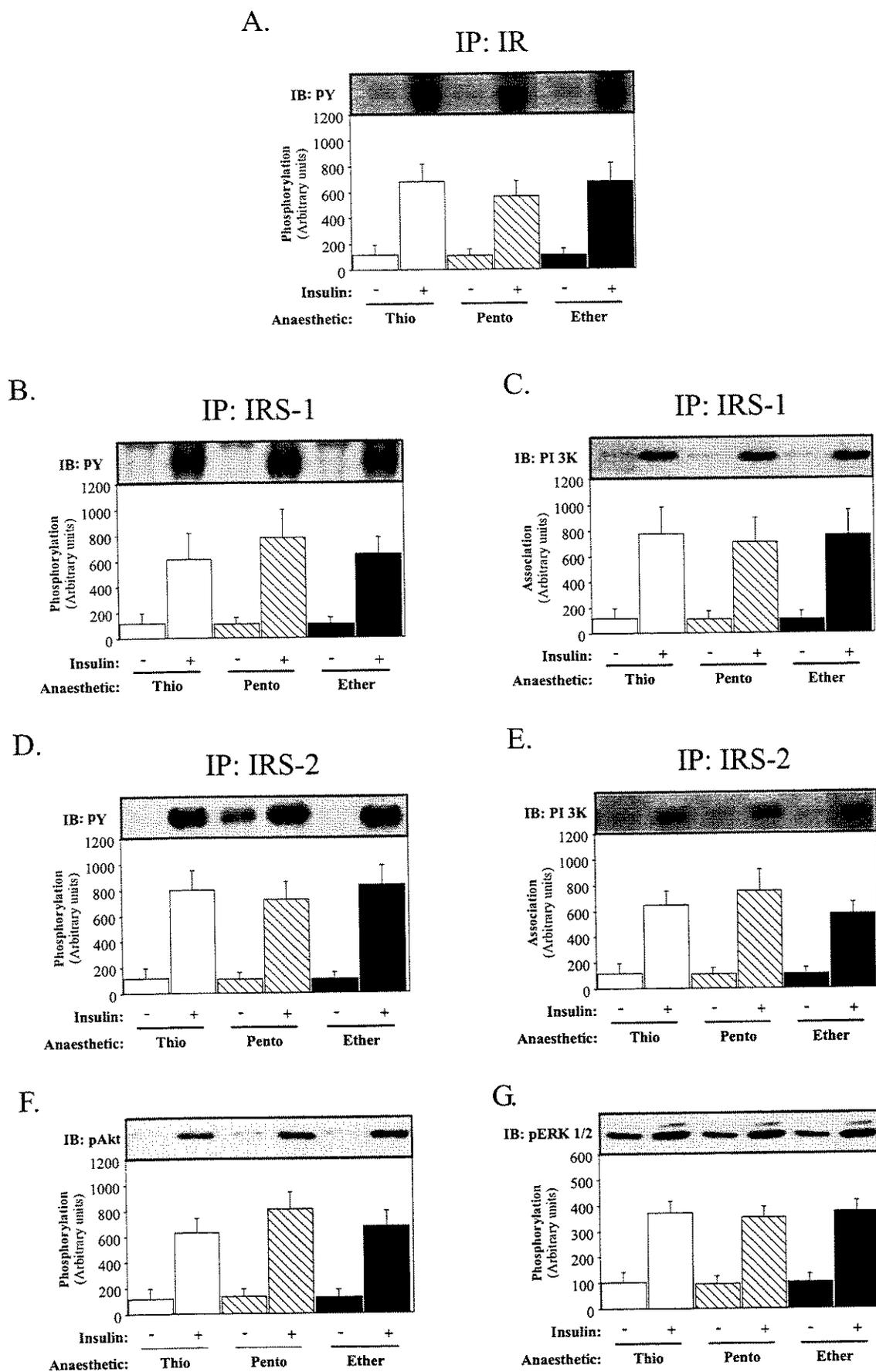
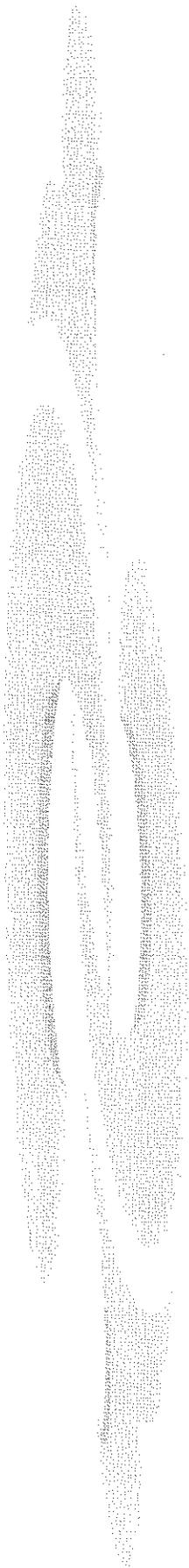


Figure legends

FIGURE 1- Insulin signaling in liver of thiopental, pentobarbital and diethyl ether anaesthetized-rats. Liver extracts from rats injected with saline (-) or insulin (+) were prepared as described in material and methods. Tissue extracts were immunoprecipitated with anti-IR antibody and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody (A). Tissue extracts were also immunoprecipitated with anti-IRS-1 and anti-IRS-2 antibodies and immunoblotted with anti-phosphotyrosine (B and D) or anti-PI 3-kinase antibodies (C and E). Whole tissue extracts were immunoblotted with anti-phospho Akt (F), and anti-phospho ERK1/2 (G). The results of scanning densitometry (n=10) were expressed as arbitrary units. Columns and bars represent the mean \pm SEM.

FIGURE 2- Insulin signaling in muscle of thiopental, pentobarbital and diethyl ether anaesthetized-rats. Muscle extracts from rats injected with saline (-) or insulin (+) were prepared as described in material and methods. Tissue extracts were immunoprecipitated with anti-IR antibody and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody (A). Tissue extracts were also immunoprecipitated with anti-IRS-1 and anti-IRS-2 antibodies and immunoblotted with anti-phosphotyrosine (B and D) or anti-PI 3-kinase antibodies (C and E). Whole tissue extracts were immunoblotted with anti-phospho Akt (F), and anti-phospho ERK1/2 (G). The results of scanning densitometry (n=10) were expressed as arbitrary units. Columns and bars represent the mean \pm SEM.



5. DISCUSSÃO

Nos estudos anteriores com animais, que procuraram investigar a fisiologia molecular do receptor de insulina, os receptores eram parcialmente purificados e a atividade quinase era determinada *in vitro*, utilizando-se substratos exógenos, como as histonas (ROTHENBERG *et al.*, 1991). 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 e remoção do receptor da membrana plasmática, onde interações com outros componentes celulares podem influenciar a atividade do receptor (FEHLMANN *et al.*, 1985). Além disso, diferenças importantes na atividade quinase do receptor podem manifestar-se *in vitro*, dependendo do substrato exógeno utilizado (ROTHENBERG *et al.*, 1991).

Os métodos utilizados neste estudo, isto é, 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* não são sujeitos a essas complicações. Além disso, a utilização de anticorpos específicos anti-IR, anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-fosfotirosina, anti-PI 3-quinase, anti-pAkt e anti-pERK permitiram a avaliação de algumas etapas da sinalização da insulina após sua ligação no receptor.

Utilizando essa metodologia, estudamos algumas etapas da ação insulínica em tecidos muscular e hepático de animais que receberam diferentes anestésicos: tiopental sódico, pentobarbital sódico e éter dietílico, com o objetivo de investigar o efeito direto desses anestésicos na transmissão do sinal insulínico em tecidos metabolicamente ativos, com grande importância na homeostase da glicose.

Paralelamente, tentamos determinar se o tiopental e o pentobarbital podem ser aceitos como anestésicos nesse modelo animal de avaliação da sinalização da insulina em substituição ao éter, em função de suas características farmacológicas desfavoráveis, como reação de *stress*, poluição ambiental e os potenciais riscos de incêndio e explosões.

Nossos resultados demonstraram que a velocidade de desaparecimento da glicose durante o TTI foi similar nos três grupos de animais, sugerindo que a reação de *stress* induzida pelo éter dietílico não teve efeito, pelo menos no tempo estudado, sobre a sensibilidade à insulina desses animais. É importante destacar que no nosso estudo, com animais anestesiados, os resultados do TTI foram similares aos encontrados em outros experimentos com animais que não receberam anestesia, o que sugere que no tempo avaliado a anestesia com esses três anestésicos não teve influência na sensibilidade desses animais à insulina.

A glicemia basal, no entanto, foi mais elevada no grupo que recebeu éter dietílico. Estes resultados sugerem que a glicemia basal nos animais anestesiados teve um controle independente da sensibilidade à insulina. É provável que a reação de *stress* induzida pelo éter dietílico tenha elevado os níveis de hormônios que estimulam a produção hepática de glicose, aumentando a glicemia. Nesse caso, é possível que essa elevação hormonal, no período avaliado, tenha sido suficiente para aumentar a produção hepática de glicose, sem modular a sensibilidade à insulina.

A figura 3 mostra um esquema simplificado das etapas de sinalização intracelular, desde a ligação da insulina ao seu receptor até a ativação do transporte de glicose. A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β , que atua como uma enzima alostérica, na qual a

subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β . A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase, promovendo alteração conformacional e autofosforilação, que aumentam ainda mais a atividade quinase do receptor (PATTI & KAHN 1998). Os nossos estudos demonstraram que o uso de anestésicos barbitúricos não modificou a capacidade de autofosforilação do receptor de insulina quando comparados à anestesia com éter dietílico.

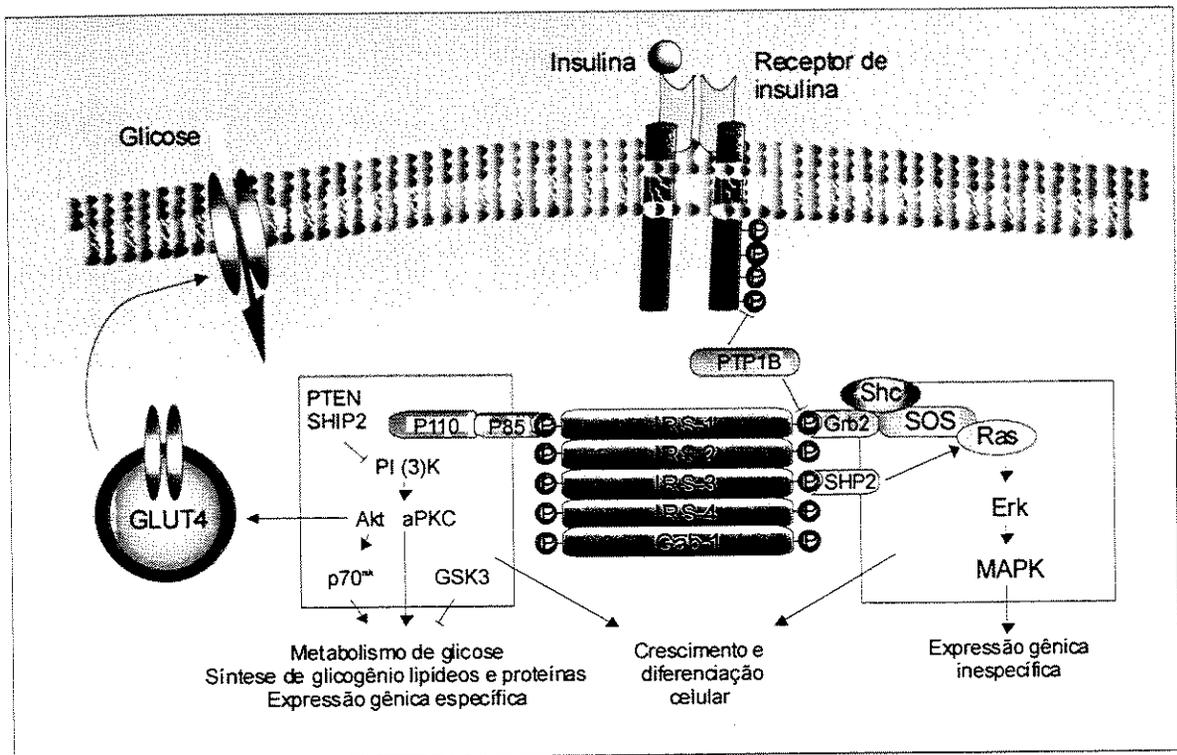


Figura 3. Vias de sinalização da insulina.

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em tirosina. Atualmente, dez substratos do receptor de insulina já foram identificados. Quatro desses pertencem à família das proteínas IRSs (WHITE 1998). Outros substratos incluem

Shc, Gab-1, p60^{dok}, Cbl, JAK2 e APS (SAAD *et al.*, 1996; PESSIN & SALTIEL 2000; CARVALHEIRA *et al.*, 2001). A fosforilação em tirosina das proteínas IRSs cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia 2 ao Src (SH2). Dentre estas se destaca a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase). As funções fisiológicas do IRS-1/2 foram recentemente estabelecidas através da produção de camundongos sem os genes que codificam o IRS-1 e o IRS-2 (camundongos *knockout* para IRS-1 e IRS-2). O camundongo que não expressa IRS-1 apresenta resistência à insulina e retardo de crescimento, mas não é hiperglicêmico (ARAKI *et al.*, 1994a). Foi demonstrado que o IRS-2 poderia compensar parcialmente a ausência de IRS-1, o que explicaria o fenótipo de resistência à insulina sem hiperglicemia do camundongo *knockout* de IRS-1. O camundongo que não expressa o IRS-2 foi recentemente gerado (WITHERS *et al.*, 1998a) e apresenta um fenótipo diferente do camundongo sem IRS-1. Apresenta hiperglicemia acentuada, devido a diversas anormalidades na ação da insulina nos tecidos periféricos e a falência da atividade secretória das células β , acompanhada de redução significativa da massa de células β pancreáticas. Os nossos estudos demonstraram que o uso de anestésicos barbitúricos não alterou os efeitos da insulina na fosforilação do IRS-1 e IRS-2 quando comparados à anestesia com éter dietílico.

O receptor de insulina, além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em serina, o que atenua a transmissão do sinal através da diminuição da capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina após estímulo com insulina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996). Essas fosforilações inibitórias causam *feedback* negativo na sinalização insulínica e podem provocar resistência à insulina (CARVALHEIRA *et al.*, 2002). Estudos recentes indicam que a resistência à insulina induzida pela obesidade pode ser decorrente da ativação seqüencial da proteína quinase C (PKC) e da quinase inibidora

do fator nuclear κ B (IK κ B), entretanto os detalhes dessa via de sinalização ainda não são claros (KIM *et al.*, 2001; YUAN *et al.*, 2001).

A ação da insulina também é atenuada por proteínas fosfatases de tirosina, que catalisam a rápida desfosforilação do receptor de insulina e de seus substratos. Várias proteínas fosfatases de tirosina foram identificadas, dentre essas se destaca a PTP1B. Camundongos *knockouts* para PTP1B têm aumento da fosforilação em tirosina do receptor de insulina e das proteínas IRSs no músculo, conseqüentemente apresentam aumento da sensibilidade à insulina (ELCHEBLY *et al.*, 1999). Como não observamos alterações das etapas iniciais da sinalização insulínica é razoável que se especule que o tiopental, o pentobarbital e o éter não alteram as vias que bloqueiam a sinalização insulínica.

A PI 3-quinase é importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose estimulado pela insulina (FOLLI *et al.*, 1992b; SAAD *et al.*, 1992; SAAD *et al.*, 1993a; SHEPHERD *et al.*, 1995). A PI 3-quinase foi originalmente identificada como um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A ligação dos sítios YMXM e YXXM (onde Y = tirosina, M = metionina e X = qualquer aminoácido) fosforilados das proteínas IRSs ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI 3-quinase ativa o domínio catalítico associado (BACKER *et al.*, 1992b). A enzima catalisa fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol 3 fosfato, fosfatidilinositol 3,4 difosfato e fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (LIETZKE *et al.*, 2000).

Atualmente, a PI 3-quinase é a única molécula intracelular considerada essencial para o transporte de glicose (CZECH & CORVERA 1999). As proteínas alvo conhecidas dessa enzima são a Akt e as isoformas atípicas da aPKC (ζ e λ), porém a função destas

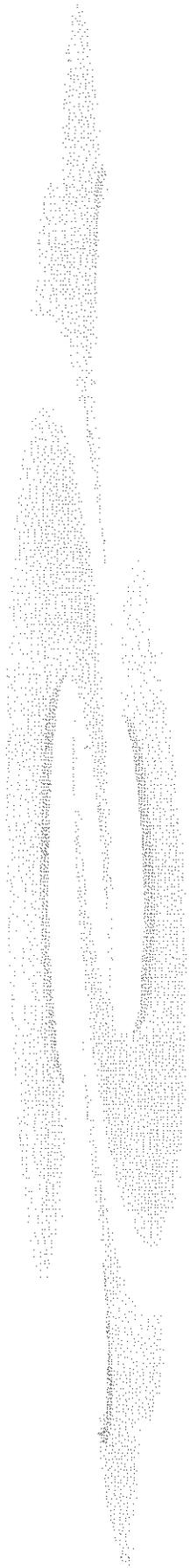
proteínas no transporte de glicose ainda não está bem estabelecida (KOHN *et al.*, 1996b; BANDYOPADHYAY *et al.*, 1997; KITAMURA *et al.*, 1998; KOTANI *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 1999). Os nossos estudos demonstraram que o uso de anestésicos barbitúricos não modificou os efeitos da insulina na via PI 3-quinase / Akt quando comparados à anestesia com éter dietílico.

Como a via IRSs / PI 3-quinase / Akt é essencial para a homeostase da glicose, tanto por estimular a captação pelo músculo como por inibir a produção hepática, podemos sugerir que a equidade dos resultados da metabolização de glicose durante o TTI, provavelmente, é consequência de ativações similares dessa via pela insulina, independente do anestésico utilizado.

Semelhante a outros fatores de crescimento, a insulina estimula a *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Uma vez ativada, a cascata da MAPK leva à proliferação e diferenciação celular (BOULTON *et al.*, 1991). Os nossos resultados também não mostraram alterações dos efeitos da insulina na fosforilação da MAPK.

Neste estudo, os 3 anestésicos se mostraram adequados para a avaliação molecular da sinalização da insulina. No entanto, o éter apresenta como desvantagens a poluição ambiental, os riscos potenciais de incêndios e explosões e as reações de *stress* características da anestesia com esse agente, demonstradas neste estudo pelo significativo aumento da glicemia basal.

Em resumo, os dados do presente estudo mostram que em modelos animais de avaliação da sinalização insulínica, quando a anestesia geral se faz necessária, o tiopental sódico e o pentobarbital sódico podem ser empregados em substituição ao éter dietílico.



6. SUMMARY

Insulin is an anabolic hormone with powerful metabolic effects. The events after insulin binds to its receptor are highly regulated and specific. Defining the key steps that lead to the specificity in insulin signaling presents a major challenge to biochemical research, but the outcome should offer new therapeutic approaches for treatment of patients suffering from insulin-resistant states, including type 2 *diabetes mellitus*. The insulin receptor belongs to the large family of growth factor receptors with intrinsic tyrosine kinase activity. Following insulin binding, the receptor undergoes autophosphorylation on multiple tyrosine residues. This results in activation of the receptor kinase and tyrosine phosphorylation of a family of insulin receptor substrate (IRS) proteins. Like other growth factors, insulin uses phosphorylation and the resultant protein–protein interactions as essential tools to transmit and compartmentalize its signal. These intracellular protein–protein interactions are pivotal in transmitting the signal from the receptor to the final cellular effect, such as translocation of vesicles containing GLUT4 glucose transporters from the intracellular pool to the plasma membrane, activation of glycogen or protein synthesis, and initiation of specific gene transcription.

A large number of experimental studies have investigated the insulin signaling in rats. In these studies different anesthetics have been used to anesthetize rats, however the effects of anesthetics on the regulation of the early steps of insulin action are not known. In the present study we have investigated the effect of thiopental, pentobarbital and ether on plasma glucose disappearance rate, IR, IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation and association with PI 3-kinase, in liver and muscle of rats. Determination of insulin stimulated phosphorylation of IR, IRS-1 and IRS-2, IRSs association with PI 3-kinase and activation of Akt and MAPK was performed by immunoprecipitation with specific antibodies followed by immunoblotting. Fasting plasma glucose levels were higher in

animals anesthetized with ether, while glucose disappearance rate was lower in animals that received pentobarbital. Insulin-induced IR, IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation, association of these substrates with PI 3-kinase and activation of Akt and MAPK was similar in the three groups of animals in both tissues. These results suggest that the alterations observed in plasma glucose in animals treated with ether, and in glucose disappearance rate in animals treated with pentobarbital may be related to steps distal to IRS-1 and IRS-2/PI 3-kinase association, since the early steps in insulin signal transduction were similar in the three groups of animals. Thus the data from the present study support the contention that both thiopental and pentobarbital can be used in investigations where changes in insulin signaling are being measured and general anesthesia is required.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAKI, E., M. A. LIPES, M. E. PATTI, J. C. BRUNING, B. HAAG, 3RD, R. S. JOHNSON and C. R. KAHN (1994a). "Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene." *Nature* **372**(6502): 186-90.
- ARAKI, E., M. A. LIPES, M. E. PATTI, J. C. BRUNING, B. HAAG, 3RD, R. S. JOHNSON and C. R. KAHN (1994b). "Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene." *Nature* **372**(6502): 186-90.
- BACKER, J. M., M. G. MYERS, JR., S. E. SHOELSON, D. J. CHIN, X. J. SUN, M. MIRALPEIX, P. HU, B. MARGOLIS, E. Y. SKOLNIK, J. SCHLESSINGER and ET AL. (1992a). "Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation." *Embo J* **11**(9): 3469-79.
- BACKER, J. M., M. G. MYERS, JR., S. E. SHOELSON, D. J. CHIN, X. J. SUN, M. MIRALPEIX, P. HU, B. MARGOLIS, E. Y. SKOLNIK, J. SCHLESSINGER and ET AL. (1992b). "Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation." *Embo J* **11**(9): 3469-79.
- BANDYOPADHYAY, G., M. L. STANDAERT, L. ZHAO, B. YU, A. AVIGNON, L. GALLOWAY, P. KARNAM, J. MOSCAT and R. V. FARESE (1997). "Activation of protein kinase C (alpha, beta, and zeta) by insulin in 3T3/L1 cells. Transfection studies suggest a role for PKC-zeta in glucose transport." *J Biol Chem* **272**(4): 2551-8.
- BARASH, P. G. (1997). *Clinical anesthesia*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- BAUM, D., J. B. HALTER, G. J. TABORSKY, JR. and D. PORTE, JR. (1985). "Pentobarbital effects on plasma catecholamines, temperature, heart rate, and blood pressure." *Am J Physiol* **248**(1 Pt 1): E95-100.
- BONORA, E., P. MOGHETTI, C. ZANCANARO, M. CIGOLINI, M. QUERENA, V. CACCIATORI, A. CORGNATI and M. MUGGEO (1989). "Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies." *J Clin Endocrinol Metab* **68**(2): 374-8.
- BOULTON, T. G., S. H. NYE, D. J. ROBBINS, N. Y. IP, E. RADZIEJEWSKA, S. D. MORGENBESSER, R. A. DEPINHO, N. PANAYOTATOS, M. H. COBB and G. D. YANCOPOULOS (1991). "ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF." *Cell* **65**(4): 663-75.
- BROZINICK, J. T., JR. and M. J. BIRNBAUM (1998). "Insulin, but not contraction, activates Akt/PKB in isolated rat skeletal muscle." *J Biol Chem* **273**(24): 14679-82.
- BRUNING, J. C., J. WINNAY, B. CHEATHAM and C. R. KAHN (1997). "Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells." *Mol Cell Biol* **17**(3): 1513-21.
- CARPENTER, C. L. and L. C. CANTLEY (1990). "Phosphoinositide kinases." *Biochemistry* **29**(51): 11147-56.
- CARVALHEIRA, J. B., E. B. RIBEIRO, G. R. B., M. M. TELLES, L. A. VELLOSO, J. A. GONTIJO and M. J. SAAD (2002). "Characterization of selective insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats'." *Diabetes* **51**: A41.
- CARVALHEIRA, J. B., R. M. SILOTO, I. IGNACCHITTI, S. L. BRENELLI, C. R. CARVALHO, A. LEITE, L. A. VELLOSO, J. A. GONTIJO and M. J. SAAD (2001). "Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus." *FEBS Lett* **500**(3): 119-24.
- CARVALHO, C. R., S. L. BRENELLI, A. C. SILVA, A. L. NUNES, L. A. VELLOSO and M. J. SAAD (1996). "Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-

- 1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats." Endocrinology **137**(1): 151-9.
- CHEATHAM, B. and C. R. KAHN (1995). "Insulin action and the insulin signaling network." Endocr Rev **16**(2): 117-42.
- CHEATHAM, B., C. J. VLAHOS, L. CHEATHAM, L. WANG, J. BLENIS and C. R. KAHN (1994). "Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation." Mol Cell Biol **14**(7): 4902-11.
- CLARKE, J. F., P. W. YOUNG, K. YONEZAWA, M. KASUGA and G. D. HOLMAN (1994). "Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin." Biochem J **300** (Pt 3): 631-5.
- COFFER, P. J., J. JIN and J. R. WOODGETT (1998). "Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation." Biochem J **335** (Pt 1): 1-13.
- CROSS, D. A., D. R. ALESSI, J. R. VANDENHEEDE, H. E. MCDOWELL, H. S. HUNDAL and P. COHEN (1994). "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** (Pt 1): 21-6.
- CUATRECASAS, P. (1972). "The insulin receptor." Diabetes **21**(2 Suppl): 396-402.
- CZECH, M. P. and S. CORVERA (1999). "Signaling mechanisms that regulate glucose transport." J Biol Chem **274**(4): 1865-8.
- EGER, E. I., R. SHARGEL and G. MERKEL (1963). "Solubility of diethyl ether in water, blood and oil." Anesthesiology **24**: 676.
- ELCHEBLY, M., P. PAYETTE, E. MICHALISZYN, W. CROMLISH, S. COLLINS, A. L. LOY, D. NORMANDIN, A. CHENG, J. HIMMS-HAGEN, C. C. CHAN, C. RAMACHANDRAN, M. J. GRESSER, M. L. TREMBLAY and B. P. KENNEDY (1999). "Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene." Science **283**(5407): 1544-8.
- FEHLMANN, M., J. F. PEYRON, M. SAMSON, E. VAN OBERGHEN, D. BRANDENBURG and N. BROSSETTE (1985). "Molecular association between major histocompatibility complex class I antigens and insulin receptors in mouse liver membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(24): 8634-7.
- FIELD, K. J., W. J. WHITE and C. M. LANG (1993). "Anaesthetics effects of chloral hydrate, pentobarbitone and urethane in adult male rats." Lab Anim **27**: 258.
- FOLLI, F., M. J. SAAD, J. M. BACKER and C. R. KAHN (1992a). "Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat." J Biol Chem **267**(31): 22171-7.
- FOLLI, F., M. J. SAAD, J. M. BACKER and C. R. KAHN (1992b). "Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat." J Biol Chem **267**(31): 22171-7.
- FREGOSI, R. F. and J. A. DEMPSEY (1986). "Anesthetic effects on [H⁺]a and muscle metabolites at rest and following exercise." Respir Physiol **65**(1): 85-98.
- FREYCHET, P., J. ROTH and D. M. NEVILLE, JR. (1971). "Insulin receptors in the liver: specific binding of (125 I)insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(8): 1833-7.

- GINSBERG, B. H., C. R. KAHN and J. ROTH (1977). "The insulin receptor of the turkey erythrocyte: similarity to mammalian insulin receptors." Endocrinology **100**(1): 82-90.
- GONCALVES, A. A., O. DIAS, F. LANGONE, L. C. REIS and A. C. BOSCHERO (1986). "Thiopental inhibits K⁺ permeability of rat and mouse pancreatic beta-cells." Eur J Pharmacol **125**(1): 119-25.
- HARA, K., K. YONEZAWA, H. SAKAUE, A. ANDO, K. KOTANI, T. KITAMURA, Y. KITAMURA, H. UEDA, L. STEPHENS, T. R. JACKSON and ET AL. (1994). "1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7415-9.
- HERRERA, R. and O. M. ROSEN (1986). "Autophosphorylation of the insulin receptor in vitro. Designation of phosphorylation sites and correlation with receptor kinase activation." J Biol Chem **261**(26): 11980-5.
- HOTAMISLIGIL, G. S., P. PERALDI, A. BUDAVARI, R. ELLIS, M. F. WHITE and B. M. SPIEGELMAN (1996). "IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance." Science **271**(5249): 665-8.
- HSU, W. H. and F. B. HEMBROUGH (1982). "Intravenous glucose tolerance test in cats: influenced by acetylpromazine, ketamine, morphine, thiopental, and xylazine." Am J Vet Res **43**(11): 2060-1.
- ILLERA, J. C., A. GONZALEZ GIL, G. SILVAN and M. ILLERA (2000). "The effects of different anaesthetic treatments on the adreno-cortical functions and glucose levels in NZW rabbits." J Physiol Biochem **56**(4): 329-36.
- JHUN, B. H., T. HARUTA, J. L. MEINKOTH, W. LEITNER, B. DRAZNIN, A. R. SALTIEL, L. PANG, T. SASAOKA and J. M. OLEFSKY (1995). "Signal transduction pathways leading to insulin-induced early gene induction." Biochemistry **34**(25): 7996-8004.
- KAHN, C. R. and M. J. SAAD (1992). "Alterations in insulin receptor and substrate phosphorylation in hypertensive rats." J Am Soc Nephrol **3**(4 Suppl): S69-77.
- KASUGA, M., J. A. HEDO, K. M. YAMADA and C. R. KAHN (1982a). "The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor." J Biol Chem **257**(17): 10392-9.
- KASUGA, M., F. A. KARLSSON and C. R. KAHN (1982b). "Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor." Science **215**(4529): 185-7.
- KASUGA, M., Y. ZICK, D. L. BLITH, F. A. KARLSSON, H. U. HARING and C. R. KAHN (1982c). "Insulin stimulation of phosphorylation of the beta subunit of the insulin receptor. Formation of both phosphoserine and phosphotyrosine." J Biol Chem **257**(17): 9891-4.
- KIDO, Y., D. J. BURKS, D. WITHERS, J. C. BRUNING, C. R. KAHN, M. F. WHITE and D. ACCILI (2000). "Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2." J Clin Invest **105**(2): 199-205.
- KIM, J. K., Y. J. KIM, J. J. FILLMORE, Y. CHEN, I. MOORE, J. LEE, M. YUAN, Z. W. LI, M. KARIN, P. PERRET, S. E. SHOELSON and G. I. SHULMAN (2001). "Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate." J Clin Invest **108**(3): 437-46.
- KIM, S. J. and C. R. KAHN (1997). "Insulin regulation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), mitogen-activated protein kinase and casein kinase in the cell

- nucleus: a possible role in the regulation of gene expression." Biochem J **323**(Pt 3): 621-7.
- KIM, Y. B., S. E. NIKOULINA, T. P. CIARALDI, R. R. HENRY and B. B. KAHN (1999). "Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes." J Clin Invest **104**(6): 733-41.
- KITAMURA, T., W. OGAWA, H. SAKAUE, Y. HINO, S. KURODA, M. TAKATA, M. MATSUMOTO, T. MAEDA, H. KONISHI, U. KIKKAWA and M. KASUGA (1998). "Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport." Mol Cell Biol **18**(7): 3708-17.
- KOHN, A. D., S. A. SUMMERS, M. J. BIRNBAUM and R. A. ROTH (1996a). "Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation." J Biol Chem **271**(49): 31372-8.
- KOHN, A. D., S. A. SUMMERS, M. J. BIRNBAUM and R. A. ROTH (1996b). "Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation." J Biol Chem **271**(49): 31372-8.
- KOHN, D. F., S. K. WIXSON, W. G. WHITE and G. J. BENSON (1997). Anesthesia and analgesia in laboratory rodents. London, Chicago, Academic Press.
- KOTANI, K., W. OGAWA, M. MATSUMOTO, T. KITAMURA, H. SAKAUE, Y. HINO, K. MIYAKE, W. SANO, K. AKIMOTO, S. OHNO and M. KASUGA (1998). "Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes." Mol Cell Biol **18**(12): 6971-82.
- KOVACINA, K. S. and R. A. ROTH (1993). "Identification of SHC as a substrate of the insulin receptor kinase distinct from the GAP-associated 62 kDa tyrosine phosphoprotein." Biochem Biophys Res Commun **192**(3): 1303-11.
- KUHNE, M. R., T. PAWSON, G. E. LIENHARD and G. S. FENG (1993). "The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp." J Biol Chem **268**(16): 11479-81.
- LAEMMLI, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.
- LANG, C. H., G. J. BAGBY, D. M. HARGROVE, P. M. HYDE and J. J. SPITZER (1987). "Alterations in glucose kinetics induced by pentobarbital anesthesia." Am J Physiol **253**(6 Pt 1): E657-63.
- LAVAN, B. E., W. S. LANE and G. E. LIENHARD (1997). "The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family." J Biol Chem **272**(17): 11439-43.
- LAZAR, D. F., R. J. WIESE, M. J. BRADY, C. C. MASTICK, S. B. WATERS, K. YAMAUCHI, J. E. PESSIN, P. CUATRECASAS and A. R. SALTIEL (1995). "Mitogen-activated protein kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin." J Biol Chem **270**(35): 20801-7.
- LIETZKE, S. E., S. BOSE, T. CRONIN, J. KLARLUND, A. CHAWLA, M. P. CZECH and D. G. LAMBRIGHT (2000). "Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains." Mol Cell **6**(2): 385-94.
- LOTT, J. A. and K. TURNER (1975). "Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine." Clin Chem **21**(12): 1754-60.

- MASSAGUE, J., P. F. PILCH and M. P. CZECH (1981). "A unique proteolytic cleavage site on the beta subunit of the insulin receptor." J Biol Chem **256**(7): 3182-90.
- MERIN, R. G., P. N. SAMUELSON and D. S. SCHALCH (1971). "Major inhalation anesthetics and carbohydrate metabolism." Anesth Analg **50**(4): 625-37.
- MUSCH, T. I., B. S. WARFEL, R. L. MOORE and D. R. LARACH (1989). "Anesthetic effects on liver and muscle glycogen concentrations: rest and postexercise." J Appl Physiol **66**(6): 2895-900.
- NUNES, A. L., J. B. CARVALHEIRA, C. R. CARVALHO, S. L. BRENELLI and M. J. SAAD (2001). "Tissue-specific regulation of early steps in insulin action in septic rats." Life Sci **69**(18): 2103-12.
- OKADA, T., Y. KAWANO, T. SAKAKIBARA, O. HAZEKI and M. UI (1994). "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**(5): 3568-73.
- PAEZ-ESPINOSA, E. V., E. M. ROCHA, L. A. VELLOSO, A. C. BOSCHERO and M. J. SAAD (1999). "Insulin-induced tyrosine phosphorylation of Shc in liver, muscle and adipose tissue of insulin resistant rats." Mol Cell Endocrinol **156**(1-2): 121-9.
- PATTI, M. E. and C. R. KAHN (1998). "The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action." J Basic Clin Physiol Pharmacol **9**(2-4): 89-109.
- PERLMAN, R., D. P. BOTTARO, M. F. WHITE and C. R. KAHN (1989). "Conformational changes in the alpha- and beta-subunits of the insulin receptor identified by anti-peptide antibodies." J Biol Chem **264**(15): 8946-50.
- PESSIN, J. E. and A. R. SALTIEL (2000). "Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance." J Clin Invest **106**(2): 165-9.
- REED, A. H., D. C. CANNON, J. W. WINKELMAN, Y. P. BHASIN, R. J. HENRY and V. J. PILEGGI (1972). "Estimation of normal ranges from a controlled sample survey. I. Sex- and age-related influence on the SMA 12-60 screening group of tests." Clin Chem **18**(1): 57-66.
- REEVES, P. G., F. H. NIELSEN and G. C. FAHEY, JR. (1993). "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet." J Nutr **123**(11): 1939-51.
- ROTHENBERG, P. L., W. S. LANE, A. KARASIK, J. BACKER, M. WHITE and C. R. KAHN (1991). "Purification and partial sequence analysis of pp185, the major cellular substrate of the insulin receptor tyrosine kinase." J Biol Chem **266**(13): 8302-11.
- SAAD, M. J., E. ARAKI, M. MIRALPEIX, P. L. ROTHENBERG, M. F. WHITE and C. R. KAHN (1992). "Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance." J Clin Invest **90**(5): 1839-49.
- SAAD, M. J., C. R. CARVALHO, A. C. THIRONE and L. A. VELLOSO (1996). "Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat." J Biol Chem **271**(36): 22100-4.
- SAAD, M. J., F. FOLLI, J. A. KAHN and C. R. KAHN (1993a). "Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone- treated rats." J Clin Invest **92**(4): 2065-72.
- SAAD, M. J., F. FOLLI, J. A. KAHN and C. R. KAHN (1993b). "Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats." J Clin Invest **92**(4): 2065-72.

- SAAD, M. J., L. G. HARTMANN, D. S. DE CARVALHO, C. A. GALORO, S. L. BRENELLI and C. R. CARVALHO (1995). "Effect of glucagon on insulin receptor substrate-1 (IRS-1) phosphorylation and association with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase)." *FEBS Lett* **370**(1-2): 131-4.
- SAAD, M. J., L. MAEDA, S. L. BRENELLI, C. R. CARVALHO, R. S. PAIVA and L. A. VELLOSO (1997). "Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats." *Diabetologia* **40**(2): 179-86.
- SALE, E. M., P. G. ATKINSON and G. J. SALE (1995). "Requirement of MAP kinase for differentiation of fibroblasts to adipocytes, for insulin activation of p90 S6 kinase and for insulin or serum stimulation of DNA synthesis." *Embo J* **14**(4): 674-84.
- SALTIEL, A. R. and C. R. KAHN (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." *Nature* **414**(6865): 799-806.
- SHEPHERD, P. R., B. T. NAVE and K. SIDDLE (1995). "Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase." *Biochem J* **305**(Pt 1): 25-8.
- SHOELSON, S. E., S. CHATTERJEE, M. CHAUDHURI and M. F. WHITE (1992). "YMXM motifs of IRS-1 define substrate specificity of the insulin receptor kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(6): 2027-31.
- SKOLNIK, E. Y., C. H. LEE, A. BATZER, L. M. VICENTINI, M. ZHOU, R. DALY, M. J. MYERS, JR., J. M. BACKER, A. ULLRICH, M. F. WHITE and ET AL. (1993). "The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling." *Embo J* **12**(5): 1929-36.
- STEPHENS, J. M. and P. F. PILCH (1995). "The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT4, the major insulin-responsive glucose transporter." *Endocr Rev* **16**(4): 529-46.
- STEPHENSON, K. N., R. L. CROXEN, A. EL-BARBARY, J. D. FENSTERMACHER and H. C. HASPEL (2000). "Inhibition of glucose transport and direct interactions with type 1 facilitative glucose transporter (GLUT-1) by etomidate, ketamine, and propofol: a comparison with barbiturates." *Biochem Pharmacol* **60**(5): 651-9.
- SUN, X. J., S. PONS, L. M. WANG, Y. ZHANG, L. YENUSH, D. BURKS, M. G. MYERS, JR., E. GLASHEEN, N. G. COPELAND, N. A. JENKINS, J. H. PIERCE and M. F. WHITE (1997). "The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action." *Mol Endocrinol* **11**(2): 251-62.
- SUN, X. J., P. ROTHENBERG, C. R. KAHN, J. M. BACKER, E. ARAKI, P. A. WILDEN, D. A. CAHILL, B. J. GOLDSTEIN and M. F. WHITE (1991a). "Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein." *Nature* **352**(6330): 73-7.
- SUN, X. J., P. ROTHENBERG, C. R. KAHN, J. M. BACKER, E. ARAKI, P. A. WILDEN, D. A. CAHILL, B. J. GOLDSTEIN and M. F. WHITE (1991b). "Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein." *Nature* **352**(6330): 73-7.
- SUN, X. J., L. M. WANG, Y. ZHANG, L. YENUSH, M. G. MYERS, JR., E. GLASHEEN, W. S. LANE, J. H. PIERCE and M. F. WHITE (1995a). "Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling." *Nature* **377**(6545): 173-7.

- SUN, X. J., L. M. WANG, Y. ZHANG, L. YENUSH, M. G. MYERS, JR., E. GLASHEEN, W. S. LANE, J. H. PIERCE and M. F. WHITE (1995b). "Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling." Nature **377**(6545): 173-7.
- TAMEMOTO, H., T. KADOWAKI, K. TOBE, T. YAGI, H. SAKURA, T. HAYAKAWA, Y. TERAUCHI, K. UEKI, Y. KABURAGI, S. SATOH and ET AL. (1994). "Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1." Nature **372**(6502): 182-6.
- TANTI, J. F., S. GRILLO, T. GREMEAUX, P. J. COFFER, E. VAN OBBERGHEN and Y. LE MARCHAND-BRUSTEL (1997). "Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes." Endocrinology **138**(5): 2005-10.
- TAYLOR, P. M. (1998). "Endocrine and metabolic effects of hypotension or halothane inhalation in sheep anaesthetized with pentobarbital." Br J Anaesth **80**(2): 208-12.
- THIRONE, A. C., C. R. CARVALHO, S. L. BRENELLI, L. A. VELLOSO and M. J. SAAD (1997). "Effect of chronic growth hormone treatment on insulin signal transduction in rat tissues." Mol Cell Endocrinol **130**(1-2): 33-42.
- THIRONE, A. C., E. V. PAEZ-ESPINOSA, C. R. CARVALHO and M. J. SAAD (1998). "Regulation of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of Shc and IRS-1 in the muscle of rats: effect of growth hormone and epinephrine." FEBS Lett **421**(3): 191-6.
- THURMON, J. C., W. J. TRANQUILLI and G. J. BENSON. Injectable Anesthetics: 210-40. in: Veterinary Anesthesia. 3rd ed. / edited by THURMON J. C., W. J. TRANQUILLI, G. J. BENSON (1996). Baltimore, Williams & Wilkins.
- TOSO, C. F., R. R. RODRIGUEZ, A. RENAULD, R. C. SVERDLIK and L. M. LINARES (1993). "Blood sugar, serum insulin and serum non-esterified fatty acid levels during thiopentone anaesthesia in dogs." Can J Anaesth **40**(1): 38-45.
- TOWBIN, H., T. STAEHELIN and J. GORDON (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- TRINDER, P. (1969). "Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen." J Clin Pathol **22**(2): 158-61.
- TSAKIRIDIS, T., H. E. MCDOWELL, T. WALKER, C. P. DOWNES, H. S. HUNDAL, M. VRANIC and A. KLIP (1995). "Multiple roles of phosphatidylinositol 3-kinase in regulation of glucose transport, amino acid transport, and glucose transporters in L6 skeletal muscle cells." Endocrinology **136**(10): 4315-22.
- WELSH, G. I., E. J. FOULSTONE, S. W. YOUNG, J. M. TAVARE and C. G. PROUD (1994). "Wortmannin inhibits the effects of insulin and serum on the activities of glycogen synthase kinase-3 and mitogen-activated protein kinase." Biochem J **303** (Pt 1): 15-20.
- WHITE, M. F. (1998). "The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action." Mol Cell Biochem **182**(1-2): 3-11.
- WHITE, M. F., J. N. LIVINGSTON, J. M. BACKER, V. LAURIS, T. J. DULL, A. ULLRICH and C. R. KAHN (1988a). "Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity." Cell **54**(5): 641-9.
- WHITE, M. F., R. MARON and C. R. KAHN (1985). "Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells." Nature **318**(6042): 183-6.
- WHITE, M. F., S. E. SHOELSON, H. KEUTMANN and C. R. KAHN (1988b). "A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor." J Biol Chem **263**(6): 2969-80.

- WHITE, W. J. and K. J. FIELD (1987). "Anesthesia and surgery of laboratory animals." Vet Clin North Am Small Anim Pract **17**(5):989.
- WILDEN, P. A., K. SIDDLE, E. HARING, J. M. BACKER, M. F. WHITE and C. R. KAHN (1992). "The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and anti-receptor antibodies." J Biol Chem **267**(19): 13719-27.
- WINDER, W. W., E. O. FULLER and R. K. CONLEE (1983). "Adrenal hormones and liver cAMP in exercising rats-different modes of anesthesia." J Appl Physiol **55**(5): 1634-6.
- WITHERS, D. J., J. S. GUTIERREZ, H. TOWER, D. J. BURKS, J. M. REN, S. PREVIS, Y. ZHANG, D. BERNAL, S. PONS, G. I. SHULMAN, S. BONNER-WEIR and M. F. WHITE (1998a). "Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice." Nature **391**(6670): 900-4.
- WITHERS, D. J., J. S. GUTIERREZ, H. TOWER, D. J. BURKS, J. M. REN, S. PREVIS, Y. ZHANG, D. BERNAL, S. PONS, G. I. SHULMAN, S. BONNER-WEIR and M. F. WHITE (1998b). "Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice." Nature **391**(6670): 900-4.
- WIXSON, S. K., W. J. WHITE, H. C. HUGHES, JR., C. M. LANG and W. K. MARSHALL (1987). "The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on arterial blood pH, blood gases, mean arterial blood pressure and heart rate in adult male rats." Lab Anim Sci **37**(6): 736-42.
- WYLIE, W. D. and H. C. CHURCHILL-DAVIDSON (2001). Anesthesiologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- YAMAUCHI, K., K. L. MILARSKI, A. R. SALTIEL and J. E. PESSIN (1995). "Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(3): 664-8.
- YOSHIMURA, N., K. KODAMA and J. YOSHITAKE (1971). "Carbohydrate metabolism and insulin release during ether and halothane anaesthesia." Br J Anaesth **43**(11): 1022-6.
- YUAN, M., N. KONSTANTOPOULOS, J. LEE, L. HANSEN, Z. W. LI, M. KARIN and S. E. SHOELSON (2001). "Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta." Science **293**(5535): 1673-7.