

FRANCINE CAPPA MITTESTAINER

**“AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DA INSULINA: EFEITOS
AGUDOS SOBRE A VIA IKK/I κ B/NF- κ B”**

**CAMPINAS
2011**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

“AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DA INSULINA: EFEITOS AGUDOS SOBRE A VIA IKK/I κ B/NF- κ B”

Francine Cappa Mittestainer

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Ciências. Sob orientação do Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad.

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M698a Mittestainer, Francine Cappa, 1986 -
 Ação anti-inflamatória da insulina: efeitos agudos
 sobre a via IKK/I κ B/NF- κ B. / Francine Cappa Mittestainer.
 -- Campinas, SP: [s.n.], 2011.

 Orientador: Mario José Abdalla Saad
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Insulina. 2. Inflamação. 3. Macrófagos
 peritoneais. I. Saad, Mario José Abdalla. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Anti-inflammatory effect of insulin on the IKK β /I κ B/NF- κ B pathway

Palavra-chave em inglês:

Insulin

Inflammation

Peritoneal macrophages

Área de concentração: Medicina Experimental

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Mario José Abdalla Saad [Orientador]

Lício Augusto Velloso

Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Data da defesa: 23-08-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Francine Cappa Mittestainer

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Mario José Abdalla Saad

Membros:	
Prof(a). Dr(a). Mario José Abdalla Saad -	
Prof(a). Dr(a). Lício Augusto Velloso-	
Prof(a). Dr(a). Carla Roberta de Oliveira Carvalho -	

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/08/2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo e Eliane, meus primeiros “orientadores” nesta vida, à minha irmã Joyce e ao meu namorado Renan.

Que sempre me apoiaram, estiveram presentes e acreditaram em meu potencial, incentivando-me na busca de novas realizações e sendo, neste longo período, as pessoas com quem sempre pude contar.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Mario José Abdalla Saad, pela amizade, orientação e incentivo para a realização desta pesquisa. Sua confiança me proporcionou grandes oportunidades de aprendizado e crescimento profissional.

Ao meu pai, pelos ensinamentos, pelo apoio e incentivo durante toda a minha caminhada.

À minha mãe, pela paciência, carinho e por estar presente em todas as minhas conquistas e sucessos durante esta jornada.

À minha família e aos meus amigos, pelo apoio e pela torcida por acreditarem ser possível a realização do que antes era um sonho e hoje se tornou real.

Ao meu amor, Renan, pela paciência, carinho, apoio, companheirismo e incentivo em todos os momentos nesta importante jornada vencida, e pela compreensão nos momentos em que tive de “abrir mão” do convívio quando o dever e o estudo me chamavam.

As minhas amigas de laboratório Angélica e Kelly pelo companheirismo, pela grande amizade que construímos durante esses anos, pela ajuda e disponibilidade permanente e também pelos longos bate-papos e desabafos, os quais me proporcionaram grandes momentos de aprendizado, entremeados por uma deliciosa descontração.

Aos amigos Dioze, Bruno e Alexandre pela amizade e pela paciência de me ensinarem o imprescindível conhecimento de bancada, já que grande parte era novidade para mim e por estarem sempre disponíveis a me ajudar em todos os experimentos e inclusive os de última hora.

A todos meus amigos e amigas do laboratório pelo auxílio e por contribuírem direta e indiretamente na minha aprendizagem: Natália, Tiago, Eduardo, Rodrigo,

Carol, Carlos, Andréa, Lélia, Prof^a. Patrícia, Gustavo, Marília, Guilherme, Paula, Sandra, Carina.

Ao Sr. Luís Janeri e Sr. Jósimo Pinheiro, funcionários do Laboratório de Investigação Clínica em Resistência à Insulina, pelo apoio técnico excepcional.

A todos aqueles que não foram citados, mas que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 – INTRODUÇÃO	14
Perspectiva histórica da insulina	15
Via de sinalização da insulina e da MAPK.....	16
Sinalização da via inflamatória	19
Influência da via PI3K/Akt para o efeito anti-inflamatório da insulina.....	21
Influência da proteína fosfatase PP2A para o efeito anti-inflamatório da insulina	23
2– OBJETIVOS	25
Objetivo Geral	26
Objetivos Específicos	26
3– CAPÍTULO	27
4– DISCUSSÃO	57
5 – CONCLUSÕES	63
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT/PKB	Proteína quinase B
ERK	Quinase reguladora da sinalização extracelular
GLUT	Transportador de glicose
GRB2	Proteína ligadora do receptor para fator de crescimento
GSK-3	Glicogênio sintase quinase-3
IKK	Complexo quinase de I κ B
IL	Interleucina
IR	Receptor da insulina
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
I κ B	Inibidor de NF- κ B
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativadora por mitogênese
MEK	MAP/ERK quinase
MKP-1	MAP quinase fosfatase-1
NF- κ B	Fator de transcrição <i>nuclear factor kappa B</i>
PI3K	Proteína fosfatidilinositol 3-quinase
Raf	Serina-quinase citoplasmática ativada pelo Ras e ativadora da MAP quinase
SH2	<i>Src-homology 2 domain</i>
Shc	<i>Src-homology 2 domain-containing</i>
SOS	Fator ativador do Ras, com homologia a <i>Son-of-sevenless</i>
Src	Oncogene definido como produto do sarcoma-virus Rous
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via de sinalização PI3K-Akt	18
Figura 2: Via de sinalização MAPK	19
Figura 3: Via de sinalização inflamatória	21

RESUMO

A infusão da insulina durante a inflamação aguda melhora os resultados clínicos, mas o exato mecanismo desse efeito benéfico da insulina ainda não foi bem compreendido. Estudos recentes mostraram que a insulina tem um efeito anti-inflamatório de modo que o hormônio também exibe um efeito inibidor sobre a mediação da transcrição de NF- κ B em células mononucleares. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos agudos da administração de insulina regular sobre a modulação de proteínas da via IKK/I κ B/NF- κ B e das proteínas chave da via de sinalização da insulina em tecido hepático, muscular e adiposo, a expressão de NF- κ B nesses tecidos através de ELISA, o efeito do tratamento com insulina em macrófagos extraídos do peritônio de ratos e a influência dos inibidores da PI3K e MAPK na via inflamatória. Ademais, fizemos um ensaio da proteína fosfatase PP2A usando a imunoprecipitação com anticorpos anti-IKKbeta. Para o experimento, ratos machos adultos Wistar compuseram aleatoriamente 4 grupos diferentes. Três deles foram submetidos à infusão de insulina na veia porta e, então foram estimulados em 1, 3 e 5 minutos, enquanto o outro grupo (0) não foi estimulado com insulina. Em nossos resultados, observamos um aumento da fosforilação de IR, IRS1 e Akt induzida pela insulina nos três tecidos estudados. Em paralelo, houve uma redução na fosforilação de IKK e I κ B após o estímulo da insulina. A ativação de NF- κ B p65 no núcleo das células mostrou a redução na fosforilação do IKK e I κ B no fígado, músculo e tecido adiposo. Na cultura de macrófagos tratada com insulina, após a adição dos inibidores específicos para PI3K e MAPK, observamos um aumento na fosforilação de IKK e I κ B. Nossos resultados também mostraram que após estímulo da insulina houve um aumento na atividade da proteína fosfatase PP2A associada

ao IKK nos três tecidos estudados. Desta forma, podemos sugerir que insulina pode induzir uma interação entre PP2A e IKK, o que resultará em mais desfosforilação de IKK e, assim, uma inibição da atividade da proteína quinase, revelando um potencial mecanismo de ação efeito anti-inflamatório da insulina.

ABSTRACT

Insulin infusion during acute inflammation improves clinical the outcomes but the exact mechanism of this beneficial effect is unclear. Recent studies have suggested that insulin has an anti-inflammatory effect in such a way that this hormone exhibits an inhibitory effect on the mediation of transcription of NF- κ B in mononuclear cells. Thus, the aim of this study was to investigate the acute effects of regular insulin administration in modulation of IKK/I κ B/NF- κ B pathway and insulin signaling pathway (IR, IRS1 and Akt) and the DNA binding of NF- κ B p65 in liver, muscle and adipose tissue of rats and also analyze the effect of treatment with insulin on macrophages of rats and the influence of PI3K and MAPK inhibitors on pathway. And finally, we analyze a phosphatase assay by using an immunoprecipitation with anti-IKKbeta antibody and PP2A phosphatase assay. For the experiment, male adult Wistar rats were divided in 4 groups. Three of them were submitted to insulin injection in the portal vein and were stimulated for 1, 3 and 5 minutes and the other group (0) was not stimulated (saline). In our results, we observed an increase in insulin-induced phosphorylation of IR, IRS1 and Akt during insulin injection in the three tissues studied. In parallel, there was a reduction in the phosphorylation of IKK and I κ B after insulin stimulation. The DNA binding of NF- κ B p65 in the cell nucleus showed a reduction of the IKK and I κ B phosphorylation after insulin injection in liver, muscle and adipose tissue. In macrophages culture of treated with insulin and when added the specific inhibitor for PI3K and MAPK we observed an increased on phosphorylation of IKK and I κ B. Our results also showed that after insulin stimulus there was an increase in PP2A phosphatase activity associated with IKK in the three tissues studied. Thus, we can suggest that insulin might induce an interaction

between PP2A and IKK, which will result in more IKK dephosphorylation and thus an inhibition of this protein kinase activity, showed a possible anti-inflammatory effect of insulin.

1 - INTRODUÇÃO

Perspectiva histórica da insulina

Desde a descoberta da insulina em 1921 muito esforço tem sido dedicado ao entendimento dos mecanismos moleculares da ação deste hormônio. Este é o principal regulador de glicemia em mamíferos, pois age estimulando a captação de glicose nos tecidos muscular e adiposo, além de inibir a neoglicogênese no tecido hepático. Modifica, também, a expressão ou atividade de uma série de enzimas e sistemas de transporte (Bergman RN, 1997). A insulina também promove o armazenamento de substratos no tecido adiposo, fígado e músculo através da estimulação da lipogênese e da síntese de glicogênio e proteína, além de inibir a lipólise, glicogenólise e a degradação de proteínas (Kahn, 2001).

A insulina é o hormônio anabólico mais conhecido e é essencial para a manutenção da homeostase de glicose, do crescimento e diferenciação celular. Este hormônio é um polipeptídeo produzido pela célula β do pâncreas, tendo uma função crucial na regulação do metabolismo energético (Issad e Combettes-Souverain, 1998). Além dessas ações metabólicas e de crescimento, a insulina tem também efeitos anti-inflamatórios (Dandona 2007). No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais a insulina exerce os efeitos anti-inflamatórios não estão completamente esclarecidos.

Estudos recentes mostraram que a insulina possui mecanismos benéficos em doenças agudas, tais como a ação contra a hiperglicemia e os efeitos cardioprotetores, neuroprotetores e antiapoptóticos. No entanto, existem outros mecanismos da ação da insulina que ainda não foram bem esclarecidos, a exemplo

da sua ação anti-trombótica, antioxidante, vasodilatadora e inibidora plaquetária, além do seu efeito anti-inflamatório (Dandona et al., 2001).

Neste contexto, Van den Berghe publicou uma revisão onde resume os resultados obtidos após dois grandes estudos com pacientes criticamente doentes da Unidade de Terapia Intensiva, demonstrando que a manutenção da normoglicemia através da terapia insulínica intensiva previne a morbidade e reduz a mortalidade nestes pacientes. Além disso, mostrou também que a administração da insulina contribui para o efeito anti-inflamatório e conseqüente diminuição da incidência de sepse nesses pacientes (Van den Berghe et al, 2009). Estas importantes constatações suscitaram mais ainda indagações e, portanto, estudos mais aprofundados serão necessários no intuito de esclarecer os efeitos metabólicos da insulina em nível celular e molecular.

A via de sinalização da PI3K-Akt e MAPK

Para que sejam compreendidos os mecanismos moleculares da ação insulínica é necessário inicialmente descrever como este hormônio transmite seu sinal no meio intracelular desde seu receptor até os efetores finais. Sabe-se que para a insulina desempenhar suas funções, a ativação de seu receptor e substratos deve ocorrer através da fosforilação em resíduos de tirosina, desencadeando uma cascata de sinalização que leva à ativação das vias da PI3K e MAPK (Saltiel and Kahn 2001; Sesti, Federici et al. 2001).

A sinalização intracelular da insulina em tecidos insulino-sensíveis (fígado, tecido adiposo e músculo esquelético) inicia-se com a ligação do hormônio a um receptor específico de membrana, o receptor de insulina (IR). O IR é uma proteína heterotetramérica com atividade tirosina-quinase, composta por duas subunidades α extra-celulares, onde se localiza o sítio de ligação da insulina, e duas subunidades β intracelulares, que abarcam o sítio catalítico. A ligação da insulina às subunidades α leva à mudança conformacional nas subunidades β e conseqüente auto-fosforilação, o que ativa sua capacidade tirosina quinase (Patti e Khan, 1998).

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos intracelulares, entre eles os substratos do receptor da insulina (IRS1-2) e Shc (Src homology collagen) (Saltiel AR, Kahn CR et al., 2001, Saad MJ et al., 1996, Velloso LA et al., 1998). A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia à Src 2 (SH2). Dentre estas, destaca-se a PI3-K (fosfatidil inositol 3 quinase). Esta proteína é importante na regulação da mitogênese, na diferenciação celular e no transporte de glicose estimulado pela insulina. Atualmente, a PI3-K é uma molécula intracelular considerada essencial para o transporte de glicose. A proteína-alvo da PI3K conhecida é a Akt (ou PKB) cujos efeitos são a captação de glicose via translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática, síntese protéica e de glicogênio. A Akt fosforilada e ativada tem a capacidade de fosforilar proteínas que regulam a síntese de lipídios (Kitamura *et al.*, 1999), glicogênio (Burgering e Coffey, 1995; Cross *et al.*, 1995), sobrevivência celular (Datta *et al.*, 1999) e síntese de proteínas (Alessi *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 1998) (Figura 1).

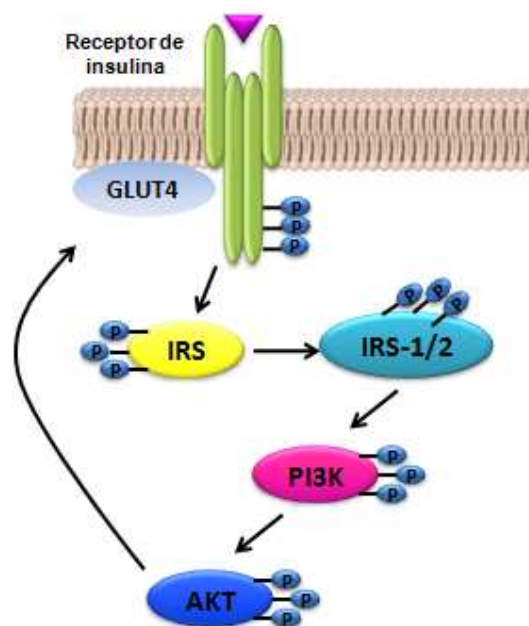


Figura 1: Via de sinalização PI3K-Akt.

Semelhante a outros fatores de crescimento, a insulina também estimula a MAP quinase (mitogen-activated protein kinase). 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 à SOS, proteína que troca GDP por GTP da Ras, ativando-a. Uma vez ativada, Ras estimula uma cascata em serina quinase através da ativação da via Ras-Raf-MEK-ERK o que leva à proliferação e diferenciação celulares (Boulton *et al.*,1991) (Figura 2).

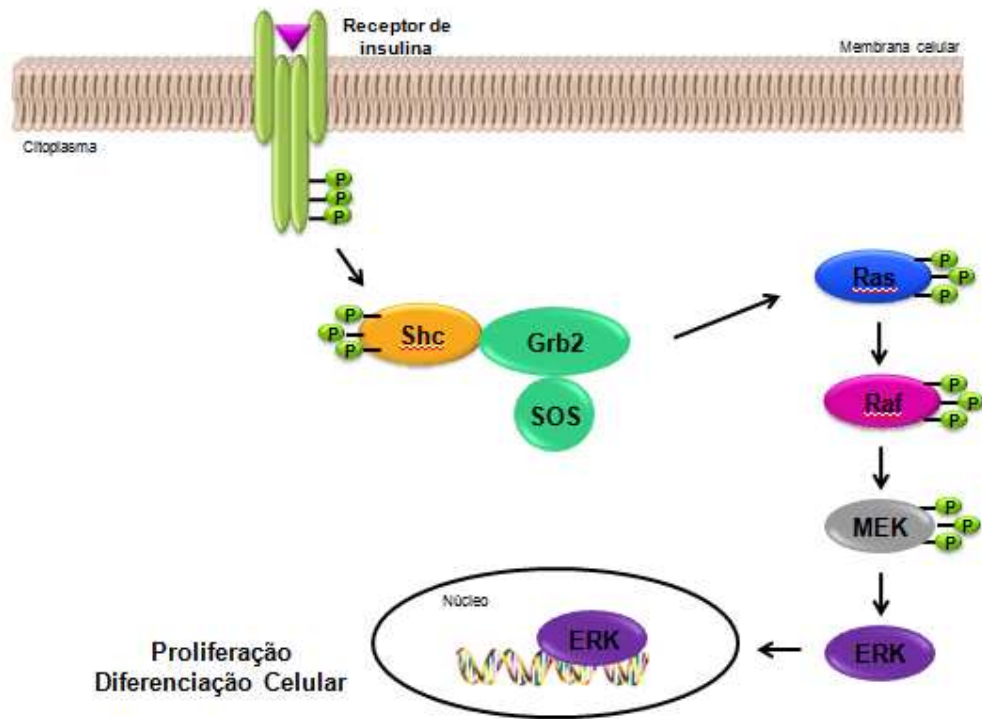


Figura 2: Via de sinalização MAPK

Sinalização da via inflamatória

As citocinas pró-inflamatórias, quando se ligam aos seus respectivos receptores específicos de membrana, promovem como mecanismos moleculares o desencadeamento da ativação de proteínas serina quinases, tais como a IKK.

A proteína IKK leva à fosforilação em resíduos de serina do receptor de insulina (IR) e de proteínas da família dos substratos do receptor de insulina (IRS), incluindo IRS-1 e 2, reduzindo a capacidade dos últimos de se associarem ao

receptor e, portanto, prejudicando a transdução do sinal desencadeada pelo hormônio (Hotamisligil, Peraldi et al. 1996; Paz, Hemi et al. 1997; Aguirre, Werner et al. 2002).

Por sua vez, a ativação do complexo IKK (constituído pelas proteínas IKK α , IKK β e IKK γ) pode agir sobre a via de sinalização da insulina por, no mínimo, duas maneiras. A primeira decorre da fosforilação inibitória em Ser³⁰⁷ do IRS-1, como descrito anteriormente, e a segunda da ativação de vias inflamatórias através da degradação de I κ B e liberação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo celular (Beg, Finco et al. 1993; Palombella, Conner et al. 1998). Como já se sabe, o NF- κ B (fator de transcrição) é um regulador fundamental da inflamação e da imunidade, atuando através do controle da expressão de importantes genes imunoregulatórios, incluindo TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Frode-Saleh and Calixto 2000; Shoelson, Lee et al. 2006).

A ativação e a atividade do NF- κ B são rigorosamente controladas por uma série de mecanismos endógenos que limitam a excessiva e prolongada produção de mediadores pró-inflamatórios, que podem causar dano tecidual durante a resposta inflamatória.

Quando não estimulado, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. A fosforilação do inibidor I κ B em serina induz a sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma, deixando o NF- κ B livre para migrar ao núcleo e ligar-se aos promotores de genes que possuem sítios de ligação e, posteriormente,

regular as seqüências de genes codificadores de citocinas, quimiocinas e reguladores de apoptose (Hayden et al., 2004) (Figura 3).

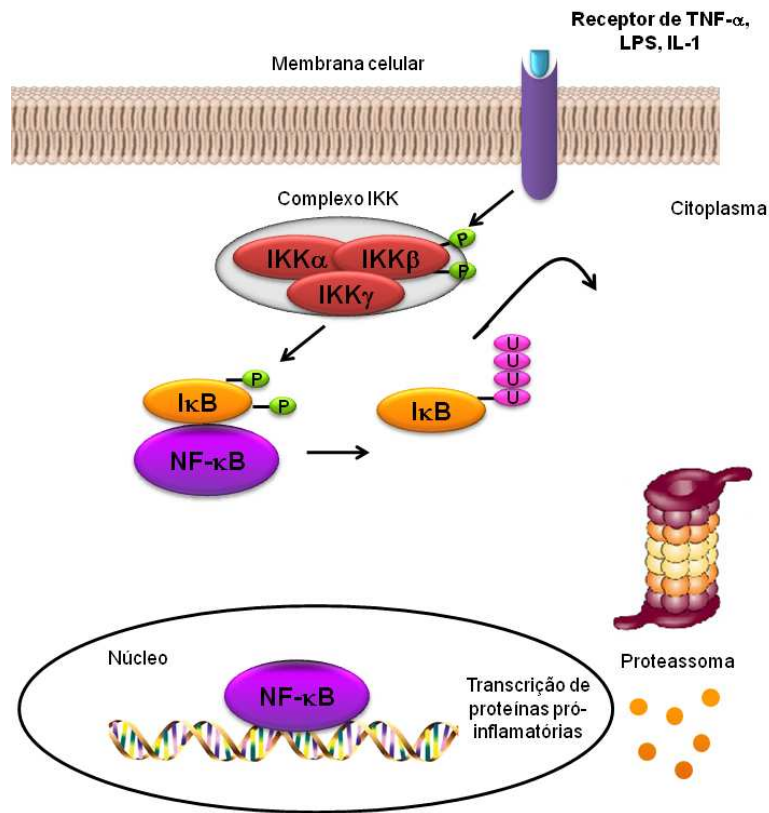


Figura 3: Via de sinalização inflamatória

Influência da via PI3K/Akt para o efeito anti-inflamatório da insulina

Os mecanismos moleculares pelos quais a insulina reduz diretamente a inflamação ainda não foram completamente elucidados. Está bem estabelecido que a insulina ativa a sinalização do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (Akt) em vários tipos celulares (Taniguchi et al., 2006). Assim, Linda Kidd e

colaboradores (Kidd et al., 2008) demonstraram que esta via regula negativamente a sinalização da produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por LPS em células monocíticas. Além disso, a ativação da PI3K aumentou a sobrevivência de ratos endotoxêmicos, enquanto a sua inibição acarretou o efeito contrário (Schabbauer et al, 2004. ; Williams et al, 2004). Adicionalmente, estudos sugerem que os efeitos protetores da insulina em modelos de endotoxemia podem ser mediados por ativação da via PI3K/AKT.

Pesquisas demonstraram que a insulina aumentou a expressão da proteína fosfatase quinase mitógeno-ativada (MKP-1) de uma maneira dependente de PI3K (Desbois-Mouthon et al, 2000. ; Takehara et al, 2000), e esta fosfatase regula negativamente a produção de IL-6 e TNF- α em camundongos endotoxêmicos (Chi et al., 2006). Um outro estudo mostrou que a insulina e um inibidor da enzima glicogênio sintase quinase 3 β (GSK-3) tinham semelhantes efeitos anti-inflamatórios em ratos com sepse e que com a fosforilação da Akt houve uma inativação na atividade de GSK-3, aumentando a atividade do fator de transcrição NF- κ B (Dugo et al., 2006, Guha e Mackman, 2002 ; Martin et al, 2005).

A via PI3K-Akt regula negativamente muitas quinases, incluindo Raf-1 e glicogênio sintase quinase (GSK)-3 β , que medeiam a indução de genes inflamatórios (Rommel C et.al. 1999, Zimmermann S, 1999). Sabe-se que a Akt induz uma fosforilação em serina no domínio CR2 N-terminal de Raf-1, o que aumenta sua associação com a proteína 14-3-3-3, dificultando a acessibilidade do domínio quinase de Raf-1 que é necessária para sua ativação (Morrison D. K, 1997).

Considerando o imenso campo de investigação que o hormônio propicia e com todos os dados publicados até o momento, pode-se estabelecer as bases para novos estudos relacionados com o efeito anti-inflamatório da insulina, sobretudo na investigação dos mecanismos moleculares das vias metabólicas em questão. Tivemos por objetivo, portanto, avaliar os mecanismos moleculares da atuação e resposta da insulina responsáveis pelo efeito anti-inflamatório que é de grande interesse devido as suas conseqüências fisiológicas.

Influência da proteína fosfatase PP2A para o efeito anti-inflamatório da insulina

A proteína fosfatase 2 (PP2) é responsável pela principal atividade das serina/treonina fosfatases, desempenhando vários papéis na regulação da função celular. Essa proteína fosfatase consiste de uma enzima dimérica composta por duas subunidades catalíticas A e C e uma subunidade regulatória B (Janssens e Goris et al., 2001).

Embora uma série de estudos relatem sobre os mecanismos que levam à ativação de IKK, pouco se sabe sobre os fatores através dos quais as fosfatases conseguem regular negativamente sua atividade. Estudos anteriores sugerem que as proteínas fosfatases PP2A e PP2B podem regular negativamente a via de NF- κ B (Yang et al., 2001; Fu et al., 2003).

Outros estudos também relatam evidências de que PP2A pode se associar com o complexo IKK resultando na desfosforilação do IKK β e na redução em sua atividade quinase diminuindo assim a atividade de NF- κ B (Sun et al., 1995).

Desta forma, Dong e seus colaboradores (Dong et al., 2010) sugeriram que a proteína G β L interage com as proteínas PP2A e PP6, e, ao interagir com a proteína fosfatase na qual não se ligam diretamente ao IKK β , medeia a associação com IKK β . Assim, esses autores propõem que a proteína G β L desempenhe uma função de regulador negativo da sinalização de NF- κ B, pois recrutam a proteína fosfatase para o complexo IKK.

2- OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral:

Investigar os efeitos agudos da administração de insulina na modulação de proteínas da via IKK/I κ B/NF- κ B e das proteínas chave da via de sinalização da insulina em tecido hepático, muscular e adiposo, o efeito do tratamento com insulina em macrófagos extraídos do peritônio de ratos e a influência dos inibidores da PI3K e MAPK na via inflamatória. E investigar Influência da proteína fosfatase PP2A para o efeito anti-inflamatório da insulina.

2.2 - Objetivos específicos:

- Investigar o efeito agudo da infusão da insulina nos tempos 1, 3 e 5 minutos na expressão de IKK e na expressão e fosforilação do I κ B em fígado, músculo e tecido adiposo.
- Investigar o efeito agudo da infusão da insulina na atividade do NF- κ B em fígado, músculo e tecido adiposo de ratos.
- Investigar o efeito do tratamento com insulina (dose) nos tempos 5, 10, 20, 30 minutos e 1, 2, 4, 8, 12, 24 horas em macrófagos extraídos do peritônio de ratos, para verificar a expressão de IKK e a expressão e fosforilação do I κ B.
- Investigar o efeito de bloqueador da via PI3K (LY294002) e da MAPK (PD98059) em macrófagos estimulados com insulina.
- Investigar o efeito da insulina sob a atividade da proteína fosfatase PP2A associada à proteína IKK β .

3 – CAPÍTULO

Anti-inflammatory effect of insulin on the IKK β /I κ B/NF- κ B pathway.

Francine C. Mittestainer, Angélica C. Pereira, Bruno M. Carvalho, Kelly L. Calisto, Alexandre G. Oliveira, Dioze Guadagnini, Marília M. Dias, José B. C. Carvalheira, Mario J. A. Saad

Department of Internal Medicine, State University of Campinas, 13081-970, Campinas, SP, Brazil.

Please address correspondence to: Mario J. A. Saad, M.D., Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brazil, 13081-970

ABSTRACT

Insulin infusion during acute inflammation improves clinical outcomes but the exact mechanism of this beneficial effect of insulin is unclear. Recent studies have suggested that insulin has an anti-inflammatory effect in such a way that this hormone exhibits an inhibitory effect on the mediation of transcription of NF- κ B in mononuclear cells. Thus, the aim of this study was to investigate the acute effects of regular insulin administration in modulation of IKK/I κ B/NF- κ B pathway and the DNA binding of NF- κ B p65 in liver, muscle and adipose tissue of rats and also analyze the this effect of insulin associated with the influence of PI3K and MAPK inhibitors, on macrophages of rats. Finally, we analyzed a phosphatase activity by using an immunoprecipitation with anti-IKKbeta antibody and PP2A phosphatase assay. For the experiment, male adult Wistar rats were randomly divided in 4 different groups. Three of them were submitted to insulin injection in the portal vein and were stimulated for 0, 1, 3 and 5 minutes and the other group (control) was not stimulated (saline). In our results, we observed an increase in insulin-induced phosphorylation of IR, IRS1 and Akt after insulin infusion in the three tissues studied. In parallel, there was a reduction in the phosphorylation of IKK and I κ B after insulin stimulation. The DNA binding of NF- κ B p65 in the cell nucleus showed a reduction, in accordance with the reduction of the IKK and I κ B phosphorylation after insulin injection in liver, muscle and adipose tissue. In macrophage culture treated with insulin and when added the specific inhibitor for PI3K and MAPK we observed an increased on phosphorylation of IKK and I κ B. Our results also showed that after insulin stimulus there was an increase in PP2A phosphatase activity associated with IKK in the three tissues studied. Thus, we can suggest that insulin might induce an interaction between PP2A and IKK, which will result in more IKK dephosphorylation and thus an inhibition of this protein kinase activity, indicating a possible molecular mechanism for the anti-inflammatory effect of insulin.

INTRODUCTION

Since its discovery in 1921, insulin has been considered a key hormone for regulating the control of metabolism and the maintenance of normoglycaemia and normolipidaemia (1, 2). In the past decade, insulin has also been shown to exert unexpected and non-metabolic effects (1). Thus, much effort has been dedicated to understanding the molecular mechanisms of action of this hormone.

Recent studies have shown that insulin has beneficial effects in acute illness known as the action of reduction of hypoglycemia and as cardioprotective, neuroprotective and antiapoptotic. But there are other mechanisms of action of insulin that have not been well studied as anti-thrombotic action, antioxidant activity, vasodilator and platelet inhibitor and anti-inflammatory effect (3). Several studies show that the anti-inflammatory effects of insulin occur after short-term administration of the hormone (4, 5). However, the molecular mechanism by which insulin exerts anti-inflammatory effects is not completely understood.

The insulin receptor (IR) is a protein with endogenous tyrosine kinase activity that, following activation by insulin, undergoes rapid autophosphorylation and subsequently phosphorylates intracellular protein substrates, including IRS-1 and IRS-2 (6). After stimulation by insulin, IRS-1 and -2 associate with several proteins, including phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (7, 8, 9). Downstream to PI3K the serine threonine kinase, Akt, is activated playing a pivotal role in the regulation of various biological processes, including apoptosis, proliferation, differentiation, and intermediary metabolism (10, 11).

Similar to other growth factors, insulin also stimulates MAP kinase (mitogen activated protein kinase). This pathway begins with phosphorylation of IRS1 protein and/or Shc, which interact with the protein Grb2 (12). The Grb2 is

constitutively associated with SOS, a protein that exchanges GDP for GTP of the Ras activating it. Once activated, Ras stimulates a serine kinase cascade through the activation of the Ras-Raf-MEK-ERK leading to cell proliferation and differentiation (13).

It is known that insulin activates the PI3k-Akt pathway, and that this pathway accounts for most of the metabolic. Moreover, studies reported that the PI3K-Akt pathway has been shown to regulate negatively NF- κ B and the expression of inflammatory genes (14).

Currently data on the anti-inflammatory effect are dependent upon its suppression of innate immune mechanisms and the suppression of the transcription factor NF- κ B and the genes regulated by this protein (1), including the production of inflammatory cytokines such as TNF- α , macrophage migration-inhibitory factor and the generation of superoxide. (7, 8)

Thus, the aim of this study was to investigate the acute effects of regular insulin administration on the modulation of IKK/I κ B/NF- κ B pathway and the DNA binding of NF- κ B p65 in liver, muscle and adipose tissue of rats and also analyze this effect of insulin associated with the influence of PI3K and MAPK inhibitors, on macrophages of rats. Finally, we analyzed a phosphatase activity by using an immunoprecipitation with anti-IKKbeta antibody and PP2A phosphatase assay.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animal Care

All experiments were approved by the Ethics Committee at the University of Campinas, CEEA/Unicamp. Male Wistar (8 wks old) were maintained in a room with 12-hour day/night cycles and room temperature of 21°C, with free access to water and food. Wistar rats were randomly divided into 4 groups.

Materials

Male Wistar rats were obtained from University of Campinas, São Paulo. Rats were bred under specific pathogen-free conditions at the Central Breeding Center of University of Campinas (Brazil). All antibodies were from Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA), except anti-Akt, anti-phospho-Akt and anti- α -tubulin which were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Human recombinant insulin was from Eli Lilly and Co. (Indianapolis, IN).

Tissue Extraction and Immunoblotting

To examine the acute effects of insulin, food was withdrawn 12–14 hours before the tissue extraction and rats were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium thiopental. The abdominal cavity was opened and afterwards regular insulin (Eli Lilly 10^{-6} mol/L⁻¹) was injected in portal vein. Rats in the “0” group were not stimulated with insulin. After the stimulation time (1, 3 and 5 minutes), liver, muscle and adipose tissue were extracted and were homogenized immediately in extraction buffer, as described elsewhere (15) while the other part of the tissue was stored in liquid nitrogen for subsequent extraction of nuclear protein. Samples of total protein were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting, as previously described (16, 17)

and we could quantify the expression and phosphorylation of the main proteins of insulin pathway and the inflammatory pathway. Samples of nuclear protein were analyzed by ELISA and we could quantify the activation the DNA binding of NF- κ B p65 in liver, muscle and adipose tissue of rats.

Measurement of Glucose

Tail blood glucose level was determined using a glucometer (Medisense optium Xceed).

Extraction of nuclear protein

Fragments of liver, muscle and adipose tissue were stored in liquid nitrogen. The tissues were macerated and Buffer A (Hepes 10mM pH 7,9, KCl 10mM, MgCl 1,5mM, DTT 1mM, Ortovanadato 1mM, PMSF 1mM, Aprotinina 10 μ g/ml) was added. Afterwards, the tissues were homogenized and centrifuged at 2.000g for 10 min at 4°C. The pellet was re-suspended with Buffer A and subjected to another 2.000g centrifugation for 10 min at 4°C. After that, the supernatant was discarded and the pellet re-suspended with Buffer B (Hepes 20mM pH 7,9, KCl 10mM, NaCl 0,42M, DTT 1mM, Ortovanadato 1mM, Glicerol 20%, Aprotinina 10 μ g/ml). The samples were centrifuged at 15.000g for 40 min at 4°C for subsequent extraction of nuclear protein. The supernatant (nuclear protein) was used to determine the protein concentration by the Biuret method photolorimetric

Determination of NF- κ B activation

NF- κ B p65 activation was determined in nuclear extracts from muscle, liver and adipose tissue by ELISA (89858; Pierce Biotechnology), according to the recommendations of the manufacturer.

Macrophages isolation and stimulation

Male Wistar rats were sacrificed by CO₂ and afterwards the peritoneum was exposed. It was injected 20 mL of sterile PBS (Phosphate buffered saline, pH 7.4) in the peritoneal cavity and massaged for 10 seconds to promote detachment of cells from the inner wall of the peritoneal cavity. The fluid containing macrophages was aspirated from the peritoneum and plated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum). The macrophages were treated with insulin at a concentration of 10⁻⁹M for 5, 10, 20, 30 minutes and 1, 2, 4, 8, 12, 24 hours and were maintained at 37 °C and 5% atm CO₂. After the period of incubation with insulin, the plates were washed twice with PBS to remove the culture medium.

The next experiment was to add specific inhibitors for PI3K and MAPK, PD98059 and LY294002 respectively, in macrophages culture treated with insulin. First the inhibitors were added to macrophages culture and after 15 minutes the macrophages were treated with insulin at a concentration of 10⁻⁹M for 30 minutes.

PP2A phosphatase assay.

Liver, muscle and adipose tissue of rats were homogenized in phosphatase extraction buffer containing 20mM Imidazole-HCl, 2mM EDTA, 2 mM EGTA, pH 7.0, with 10 µg/ml each of aprotinin, leupeptin, 1 mM benzamidine and 1mM PMSF. The samples were centrifuged at 11.000 RPM for 20 minutes and supernatants

immunoprecipitated with anti-PP2A-C subunit and anti-IKK β overnight at 4°C on constant agitation. Then, protein A agarose was added to immunoprecipitate for immunocomplexes formation for 2 hours at 4°C on agitation and washed 3 times. Then, 10 minutes incubation at 30°C with the threonine phosphopeptide (K-R-Pt-I-R-R), malachite green solution was added and color developed within 15 minutes at room temperature was detected by spectrophotometry, according to the manufacturer's instructions (PP2A Immunoprecipitation Phosphatase Assay kit; Millipore, St. Charles, MO, USA).

Statistical Analysis

Data are expressed as means $\pm$ SEM and the number of independent experiments is indicated. The results of blots are presented as direct comparisons of bands or spots in autoradiographs and quantified by optical densitometry (UN-SCAN-IT gel). For statistical analysis, the groups were compared using a 2-way ANOVA with the Bonferroni test for post hoc comparisons. The level of significance adopted was $p < 0.05$.

RESULTS

Physiologic parameter.

Figure 1 shows blood glucose levels of rats before and after insulin stimulation. Blood glucose levels showed mild decrease from 80mg/dL at baseline to 75mg/dL at 5 minutes, showing that during this time hypoglycemia was not detected.

Effect of insulin on IR, IRS-1 and Akt phosphorylation in liver, muscle and adipose tissue of the intact rat.

To determine the effect of insulin administration (single dose) in insulin signaling in insulin sensitive tissues, we studied the spectrum of activation of key proteins related to the insulin signaling pathway. In a time-course experiment we found that insulin receptor phosphorylation IR- β , IRS1 tyrosine phosphorylation, and Akt serine phosphorylation reached a peak at 5 min post-injection in skeletal muscle, liver and adipose tissue, showing that the pathway is maximally activated at this time (Figure 2 -C).

Effect of insulin on IKK β and I κ B phosphorylation in insulin sensitive tissues of the intact rat.

To determine if at the molecular level insulin promoted an anti-inflammatory effect, we studied the expression and activity of key proteins involved in inflammatory pathway such as IKK and I κ B. The results showed that, in muscle and adipose tissue there was a significant reduction in the phosphorylation of IKK at 5 minutes compared to basal levels. This reduction in liver occurred up to 3 minutes after stimulation by insulin. Phosphorylation of I κ B in muscle was different from that observed in liver and adipose tissue since there was a significant reduction at 5

minutes in liver and adipose tissue while in muscle this reduction was not statistically significant (Figure 3 A-C).

Effect of time course of insulin on activation of the transcription factor binding assay of NF- κ B p65 nuclear extracts.

We measured the NF- κ B nuclear subunit p65 activation after insulin administration and found a significant decrease in the DNA binding of nuclear p65 in liver at 3 minutes and at 5 minutes, although the effect was more evident at 3 minutes. In muscle and adipose tissue, there was a clear decrease in expression levels of NF- κ B at all times investigated after insulin infusion (Figure 4 A-C).

Effect of insulin on inflammatory pathway in macrophages extracted from peritoneum of rats.

Besides the results obtained in vivo, we also investigated the effect of insulin stimulation on inflammatory pathway in macrophages culture. The advantage of this experiment is that we can plan a longer time-course, avoiding the hypoglycemia problem as in animal model. Thus, we analyzed the key proteins involved in the inflammatory pathway, and in addition we investigated the influence of PI3K-Akt or MAPK pathway in the anti-inflammatory effect of insulin. Thus, we treated macrophages with insulin and used a specific inhibitor of PI3K and MAPK, LY294002 and PD98059 respectively, to understand the molecular mechanism of this insulin effect. In the time-course experiment, the phosphorylation of IKK was significantly reduced at 30 minutes, and this reduction was maintained until at 8 hours. The phosphorylation of I κ B α also was reduced in a similar time-course of IKK β . The

expression of I κ B, as expected showed an increase in the first minutes and this increase was maintained for 24 hours (Figure 5 A-C).

Next, we investigate in macrophages the influence of PI3K and MAPK inhibitors, LY294002 and PD98059 respectively on the effect of insulin on IKK β phosphorylation and in I κ B expression. The results showed that both inhibitors reversed the effect of insulin, indicating that insulin reduced IKK and I κ B activation through both the PI3K-Akt pathway and the MAPK pathway (Figure 5D).

Effects of PP2A on IKK dephosphorylation

To understand the effect of insulin in reducing the inflammatory pathway, mainly at the level of IKK β phosphorylation, we performed a phosphatase assay by using an immunoprecipitation with anti-IKK β antibody and PP2A phosphatase assay to investigate whether this phosphatase is involved in the dephosphorylation of IKK β . Our results showed that after insulin stimulus there was an increase in PP2A phosphatase activity associated with IKK in the three tissues studied. Thus, these results showed that there was an increased dephosphorylation of IKK and consequent reduction in protein activity due to an increase in PP2A activity (Figure 6 A-C).

DISCUSSION

Whereas the metabolic effects of insulin are well characterized at cellular and molecular levels, other insulin actions, such as the anti-inflammatory effects, are only marginally investigated. The results of the present study demonstrated that acute infusion of insulin reduces IKK β phosphorylation and inhibit NF- κ B activity in liver, muscle and adipose tissue of rats.

Most of the studies that investigated the anti-inflammatory effect of insulin were performed in cell culture, with monocytes or macrophages. This may not reflect the real effect of the hormone in vivo on the intact animal. The method that we used in the present study, infusion of insulin in the intact animal and the investigation of insulin signaling pathway and the inflammatory pathway in tissue extracts, allowed us to study the molecular mechanism by which insulin has anti-inflammatory effects in tissues in vivo. It is important to mention that one problem with this model might be the hypoglycemia which resulted in secretion of contra regulatory hormones as catecholamines and glucocorticoids, that can influence insulin and inflammatory signaling pathways. To overcome this problem our investigation was restricted to the first five minutes after insulin infusion, when the insulin signaling is completely activated, but the hypoglycemic effect was not yet established, as demonstrated.

Regulation of pro-inflammatory gene expression in a biological system is a balance between positive and negative signal transduction pathway (18). Besides its central action in glucose and lipid metabolism, insulin has been described to possess important anti-inflammatory effects but the molecular mechanisms that account for these effects were not completely known. It is well established that insulin activates the PI3k-Akt pathway, and that this pathway accounts for most of the metabolic

effects of the hormone (19). However the role of PI3k-Akt as an anti-inflammatory pathway is controversial.

The PI3k-Akt pathway has been shown to regulate negatively NF- κ B and the expression of inflammatory genes. The use of an inhibitor of PI3k (wortmannin) enhanced LPS-induced nitric oxide synthase in murine peritoneal macrophages (20), and activation of PI3k-Akt suppressed LPS-induced gene expression (21). Induction of nitric-oxide synthase in C6 glial cells and rat primary astrocytes was also regulated negatively by activation of PI3k (22, 23). In endothelial cells the PI3k-Akt pathway limited activation of p38MAPK pathway and TF gene expression (24). In the same line, Guha and Mackman (25) demonstrated in monocytic cells that inhibition of PI3k-Akt pathway enhances LPS-induced activation of the MAPK (ERK1/2, JNK and p38) and the downstream targets. In addition, inhibition of PI3k-Akt pathway enhanced LPS-induced nuclear translocation of NF- κ B and prevented Akt-dependent inactivation of glycogen synthase kinase β (GSK3 β), which increased the transcriptional activity of p65. Furthermore, activation of PI3K enhanced survival, whereas inhibition of PI3K reduced survival of endotoxemic mice (26,27). Taken together, these studies suggest that the protective effects of insulin in endotoxemia models may be mediated by activation of the PI3K/Akt pathway (19).

In contrast to studies showing that PI3k-Akt pathway negatively regulates expression of inflammatory genes in macrophages, other studies demonstrated that PI3k-Akt pathway positively regulated NF- κ B-dependent gene expression in cell culture via phosphorylation and increased transactivation activity of p65 (28). Overexpression of a constitutively active form of Akt also increased NF- κ B-

dependent gene expression in 3T3 fibroblasts via the activation of I κ B kinase and the p38 MAPK (19).

The discrepancies between the studies to the anti-inflammatory effects of PI3k-Akt pathway may reflect the type of the cell investigated, and most important, the stimulus that activated this pathway. Our data showing that insulin in parallel activated the PI3k-Akt pathway and reduced the activity of IKK β /I κ B/NF- κ B pathway indicate an important molecular mechanism to the anti-inflammatory effect of the hormone in liver, muscle and adipose tissue of intact animal.

Our data also showed that the anti-inflammatory effect of insulin was observed in macrophages. Moreover, in these cells it was possible to identify that the effect of insulin seems to be prolonged. It is important to mention that in intact animal it is difficult to investigate the time-course of insulin on inflammatory pathway, because the hypoglycemia induced by insulin activates counter-regulatory hormones as catecholamines, glucagon, GH and cortisol that might have an effect in this pathway (29). Additionally, our result shows that both insulin signaling pathway, PI3k-Akt and MAPK pathways are involved in this insulin effect, because the blockade of one of these pathways resulted in inactivation of insulin effect.

Finally, we also investigated the mechanism by which insulin may potentially deactivates IKK β . It is well established that dephosphorylation of a protein kinase is a key mechanism to inhibit its function. Protein phosphatase regulation of IKK activity has been demonstrated by several groups (30, 31). In vitro experiments using purified proteins have shown that PP2A inhibits the catalytic activity of IKKs by dephosphorylating serine residues in the kinase domain (32). Several studies have implicated a negative regulatory role for PP2A in signal-dependent activation of IKK and NF- κ B (33, 34, 35, 36 37). Delhase et al. (34) showed that PP2A inactivates

purified IKK in vitro. Furthermore, several studies (38,39,40,41 42) have revealed that prolonged cell treatment (>45 min) with the PP2A inhibitor okadaic acid leads to NF- κ B activation in some cell types (43).

Our data showed that in the insulin sensitive tissues the PP2A phosphatase activity associated with IKK was increased after insulin stimulation. We can thus suggest that insulin might induce an interaction between PP2A and IKK, which will result in more IKK dephosphorylation and thus an inhibition of this protein kinase activity.

The molecular interaction between IKK and PP2A has deserved attention more recently. Dong et al (44) suggested that G protein β -like (G β L) interacts with PP2A and PP6, other members of the same phosphatase family. By interacting with protein phosphatases, which do not directly bind to IKK β , G β L mediates the association of phosphatases with IKK β . Overexpression of protein phosphatases inhibited TNF κ -induced activation of NF- κ B signaling, which is an effect similar to that of G β L overexpression. Down-regulation of G β L by small interfering RNA diminished the inhibitory effect of phosphatases, resulting in restoration of NF- κ B signaling. Thus, these authors propose that G β L functions as a negative regulator of NF- κ B signaling by recruiting protein phosphatases to the IKK complex. The effect of insulin in the modulation of G β L, deserves further exploration, because it can contribute to explain dual effect of insulin, activating PI3K-Akt and MAPK and deactivating IKK/I κ B/NF- κ B pathway.

In summary, we report evidence indicating that the acute infusion of insulin in intact animal activated PI3K-Akt pathway and reduced IKK/I κ B/NF- κ B in liver, muscle and adipose tissue. Similarly, in macrophages culture we found that insulin also reduced the activation of IKK by both PI3K and MAPK pathways. Our results showed

that after insulin stimulation the phosphatase protein PP2A binds to IKK and may induce dephosphorylation and decrease activity of this protein in the tissues studied.

REFERENCES

1. Paresh Dandona, Ajay Chaudhuri, Priya Mohanty and Husam Ghanim “Anti-inflammatory effects of insulin” - Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 2007.
2. L. Pirola, A. M. Johnston, Van Obberghen - Modulation of insulin action Diabetologia, 2004
3. Paresh Dandona, Ajay Chaudhuri, Husam Ghanim, Priya Mohanty. Insulin as an Anti-Inflammatory and Antiatherogenic Modulator. Journal of the American College of Cardiology, 2009
4. Ghanim H, Korzeniewski K, Sia CL et al (2010) Suppressive effect of insulin infusion on chemokines and chemokine receptors. Diabetes Care 33:1103–1108
5. Albacker T, Carvalho G, Schricker T, Lachapelle K (2008) Highdose insulin therapy attenuates systemic inflammatory response in coronary artery bypass grafting patients. Ann Thorac Surg 86:20–27
6. Cheatham B , Kahn CR . Insulin action and the insulin signaling network., Endocr Rev. 1995; 16 (2) :117-42.
7. Folli F , MJ Saad , JM Backer , 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.
8. 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;92:2065–2072.
9. Williamson D, Gallagher P, Harber M, Hollon C, Trappe S. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. J Physiol.2003;547:977–987.
10. Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. Curr Opin Cell Biol. 1998;10:262–267.

11. Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann KM, McCarthy J, Chen H, Qiu Y. Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 2001;276:31858–31862.
12. Páez-EV Espinosa, Rocha EM, Velloso LA, Boschero AC, Saad MJ. “Insulin-induced tyrosine phosphorylation of Shc in liver, muscle and adipose tissue of insulin resistant rats”. *Mol Cell Endocrinol* . 156 (1-2):121-9. 1999
13. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, et al. “ERKs: a family of protein-ser- ine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF”. *Cell.*;65:663-75, 1991.
14. Parque Y. C. ,Lee C. H. , Kang H. S. , Chung H. T. , Kim H. D. Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, enhances LPS-induced NO production from murine peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 240 : 692 – 696, (1997).
15. Thirone AC, Carvalheira JB, Hirata AE, Velloso LA, Saad MJ. Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance. *Endocrinology* 145, p. 281-293, 1994
16. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JB, de Oliveira MG, Velloso LA, Curi R, Saad MJ. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* 54, p.959-967, 2005
17. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araujo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, p. 1986-1998, 2007
18. Steinemann, S., Ulevitch, R. J., and Mackman, N. Role of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein/CD14 pathway in LPS induction of tissue factor expression in monocytic cells. (1994) *Arterioscler. Thromb.*14, 1202–1209
19. Linda B. Kidd, Gernot A. Schabbaauer, James P. Luyendyk, Todd D. Holscher, Rachel E. Tilley, Michael Tencati, and Nigel Mackman. Insulin Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B (Akt) Pathway Reduces

- Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Mice. *J Pharmacol And Experiml Therapeutics* 326:348–353, 2008.
20. Parque Y. C. ,Lee C. H. , Kang H. S. , Chung H. T. , Kim H. D. Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, enhances LPS-induced NO production from murine peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240 : 692 – 696, (1997).
 21. Alessi D. R. ,James S. R. ,Downes C. P. ,Holmes A. B. ,Gaffney P. R. ,Reese C. B., Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol.* 7 : 261 – 269, 1997
 22. Pahan K. ,Raymond J. R. ,Singh I. Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Induces Nitric-oxide Synthase in Lipopolysaccharide- or Cytokine-stimulated C6 Glial Cells* *J. Biol. Chem.* 274 : 7528 – 7536, 1999.
 23. Pahan K. ,Liu X. ,Madeira C. ,Raymond Expression of a constitutively active form of phosphatidylinositol 3-kinase inhibits the induction of nitric oxide synthase in human astrocytes.*J. R. FEBS Lett.* 472: 203 -207, 2000.
 24. Blum S. ,Issbrhker K. ,Willuweit A. ,Hehlhans S. ,Lucerna M. ,Mechtcheriakova D.,Walsh K. ,von der Ahe D. ,Hofer E. ,Clauss M. An Inhibitory Role of the Phosphatidylinositol 3-Kinase-signaling Pathway in Vascular Endothelial Growth Factor-induced Tissue Factor Expression. *J. Biol. . Chem* 276 :33428 – 33434, 2001 .
 25. Guha M and Mackman N. The phosphatidylinositol 3-kinase-akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem* 277:32124–32132, 2002.
 26. Schabbauer G, Tencati M, Pedersen B, Pawlinski R, and Mackman N. PI3KAkt pathway suppresses coagulation and inflammation in endotoxemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1963–1969, 2004.
 27. Williams DL, Li C, Ha T, Ozment-Skelton T, Kalbfleisch JH, Preiszner J, Brooks L, Breuel K, and Schweitzer JB. Modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway alters innate resistance to polymicrobial sepsis. *J Immunol* 172:449–456, 2004.

28. Thomas K.W., Monik M. M., Stabler J.M., Yarovsky T., Carter A.B., Hunninghake G.W. Respiratory Syncytial Virus Inhibits Apoptosis and Induces NF- κ B Activity through a Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* 277 : 492 – 50, 2002 .
29. Brotman DJ , Girod JP . The metabolic syndrome: a tug-of-war with no winner. *Cleve Clin J Med* 2002 69 (12) :990-4.
30. Madrid L. V. , Mayo M. W. , Reuther J. Y. , Baldwin A. S., Jr. Akt Stimulates the Transactivation Potential of the RelA/p65 Subunit of NF- κ B through Utilization of the I κ B Kinase and Activation of the Mitogen-activated Protein Kinase p38 *J. Biol. . Chem* 276 : 18934 – 18940, 2001.
31. Brotman DJ , Girod JP . The metabolic syndrome: a tug-of-war with no winner. *Cleve Clin J Med* 2002 69 (12) :990-4.
32. Johannes Witt, Sandra Barisic, Eva Schumann, Frank Allgöwer, Oliver Sawodny, Thomas Sauter and Dagmar Kulms. Mechanism of PP2A-mediated IKK β dephosphorylation: a systems biological approach. *BMC Systems Biology* 3:71, 2009
33. DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 388, 548–554, 1997
34. Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., and Karin, M. Positive and Negative Regulation of I κ B Kinase Activity Through IKK β Subunit Phosphorylation *Science* 284, 309–313, 1999.
35. Yang, J., Fan, G. H., Wadzinski, B. E., Sakurai, H., and Richmond, A. Protein Phosphatase 2A Interacts with and Directly Dephosphorylates RelA *J. Biol.Chem.* 276, 47828–47833, 2001.
36. Sontag, E., Sontag, J. M., and Garcia, A. Protein phosphatase 2A is a critical regulator of protein kinase C ζ signaling targeted by SV40 small t to promote cell growth and NF- κ B activation. *EMBO J.* 16, 5662–5671, 1997
37. Fu, D. X., Kuo, Y. L., Liu, B. Y., Jeang, K. T., and Giam, C. Z. Human T-lymphotropic Virus Type I Tax Activates I- κ B Kinase by Inhibiting I- κ B Kinase-associated Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A*) *J. Biol. Chem.* 278, 1487–1493, 2003.

38. Miskolci, V., Castro-Alcaraz, S., Nguyen, P., Vancura, A., Davidson, D., and Vancurova, I. Okadaic acid induces sustained activation of NFkappaB and degradation of the nuclear IkappaBalpha in human neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* 417, 44–52, 2003.
39. Mahboubi, K., Young, W., and Ferreri, N. R. Induction of Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2 by Serine-Threonine Phosphatase Inhibition *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 452–458, 1997
40. Fernandez, P. C., and Dobbelaere, D. A. Ceramide synergizes with phorbol ester or okadaic acid to induce IkappaB degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 63–67, 1999
41. Fujita, M., Goto, K., Yoshida, K., Okamura, H., Morimoto, H., Kito, S., Fukuda, J., and Haneji, T. Okadaic acid stimulates expression of Fas receptor and Fas ligand by activation of nuclear factor kappa-B in human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol.* 40, 199–206, 2004
42. Sun, S. C., Maggirwar, S. B., and Harhaj, E. Activation of NF-B by Phosphatase Inhibitors Involves the Phosphorylation of IB at Phosphatase 2A-sensitive Sites *J. Biol. Chem.* 270, 18347–18351, 1995
43. Morimoto, H., Okamura, H., Yoshida, K., Kitamura, S., and Haneji, T. Okadaic Acid Induces Apoptosis through Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase/Eukaryotic Initiation Factor-2 α Pathway in Human Osteoblastic MG63 Cells. *J. Biochem.(Tokyo)* 136, 433–438, 2004
44. Dong-Joo You, You Lim Kim, Cho Rong Park, Dong-Kyu Kim, Jeonghun Yeom, Cheolju Lee, Curie Ahn, Jae Young Seong and Jong-Ik Hwang. Regulation of IkB Kinase by G β L through recruitment of the Protein Phosphatases *Mol. Cells* 30, 527-532, 2010.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Blood glucose in control rats submitted to insulin injection in the portal vein.

Data are presented as means $\pm$ S.E.M of 8 rats per group.

Figure 2. Effect of a single dose of insulin on phosphorylation of proteins insulin signaling pathway. Representative blots show the tyrosine phosphorylation of IR- β and IRS-1 the serine phosphorylation of Akt and total protein expression of β -actin in liver (A), muscle (B) and adipose tissue (C). Data are presented as means $\pm$ S.E.M of 8 rats per group. IB: immunoblot.

Figure 3. Effect of insulin on IKKbeta and I κ B phosphorylation. Phosphorylation of IKK $\alpha\beta$, total protein expression of IKK α and IKK β , phosphorylation of I κ B α and total protein expression of β -actin in liver (A), muscle (B) and adipose tissue (C). Data are presented as means $\pm$ S.E.M of 8 rats per group. *P < 0.05 vs control group "0". IB: immunoblot.

Figure 4: Transcription factor binding assay of NF- κ B p65 nuclear extracts after insulin administration from liver (A), muscle (B) and adipose tissue (C). Data are presented as means $\pm$ S.E.M of 8 rats per group. *P < 0.05 vs control group.

Figure 5. Effect of insulin on inflammatory pathway in macrophages.

Phosphorylation of IKK $\alpha\beta$, total protein expression of IKK α and IKK β (A), total protein of I κ B α (B), phosphorylation of I κ B α (C) and total protein expression of β -actin. Data are presented as means $\pm$ S.E.M of 8 rats per group. *P < 0.05 vs control group "0". Macrophages were left untreated or stimulated with insulin (10^{-9} M) alone or in combination with inhibitors LY294002 and PD98059. Cytosolic extracts were analyzed for phosphorylation status of IKK $\alpha\beta$, I κ B α , Akt and total protein expression of I κ B α

Figure 6. Effects of PP2A on IKK dephosphorylation. PP2A phosphatase activity in immunoprecipitates with antibodies against IKK β in liver (A) muscle (B) and adipose tissue (C) of rats. Bars represent the means $\pm$ SEM of 6 mice per group. IP: immunoprecipitates. *P < 0.05 vs control group "0".

FIGURE 1

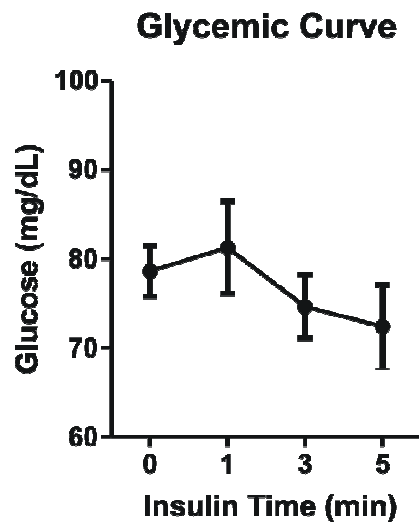


FIGURE 2

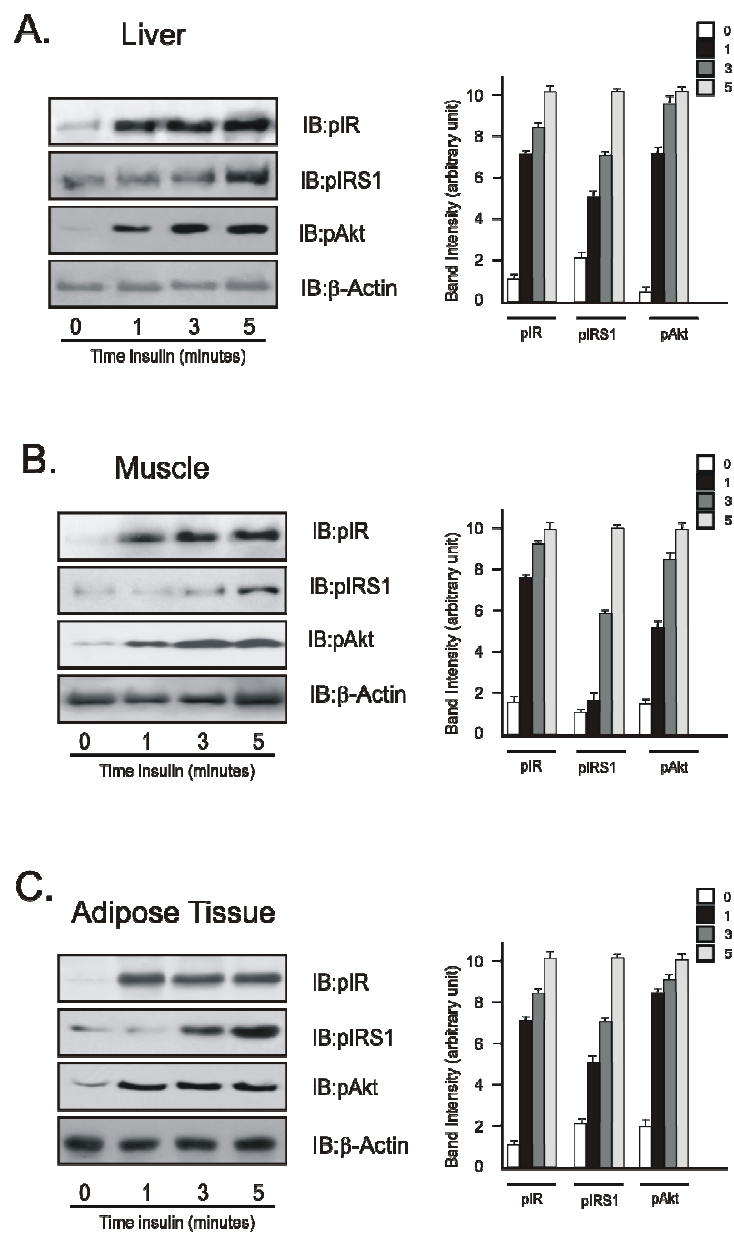


FIGURE 3

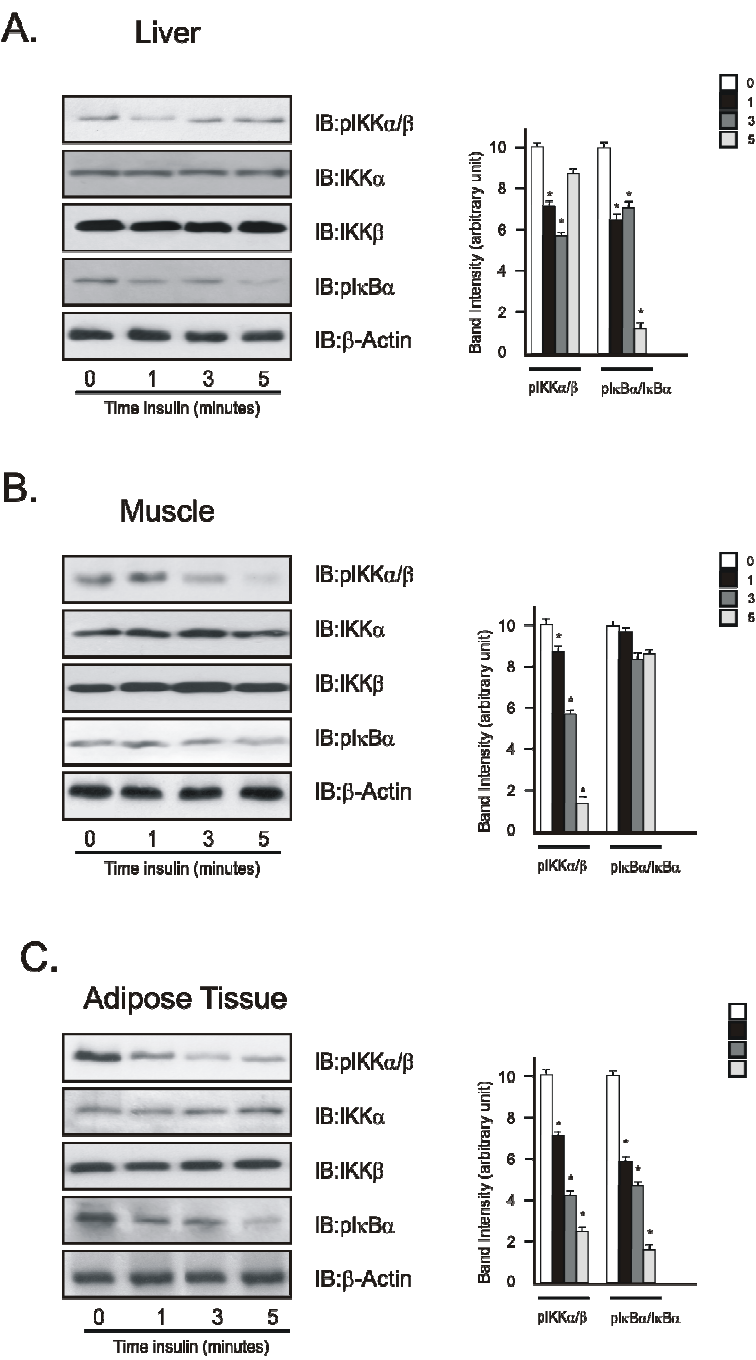


FIGURE 4

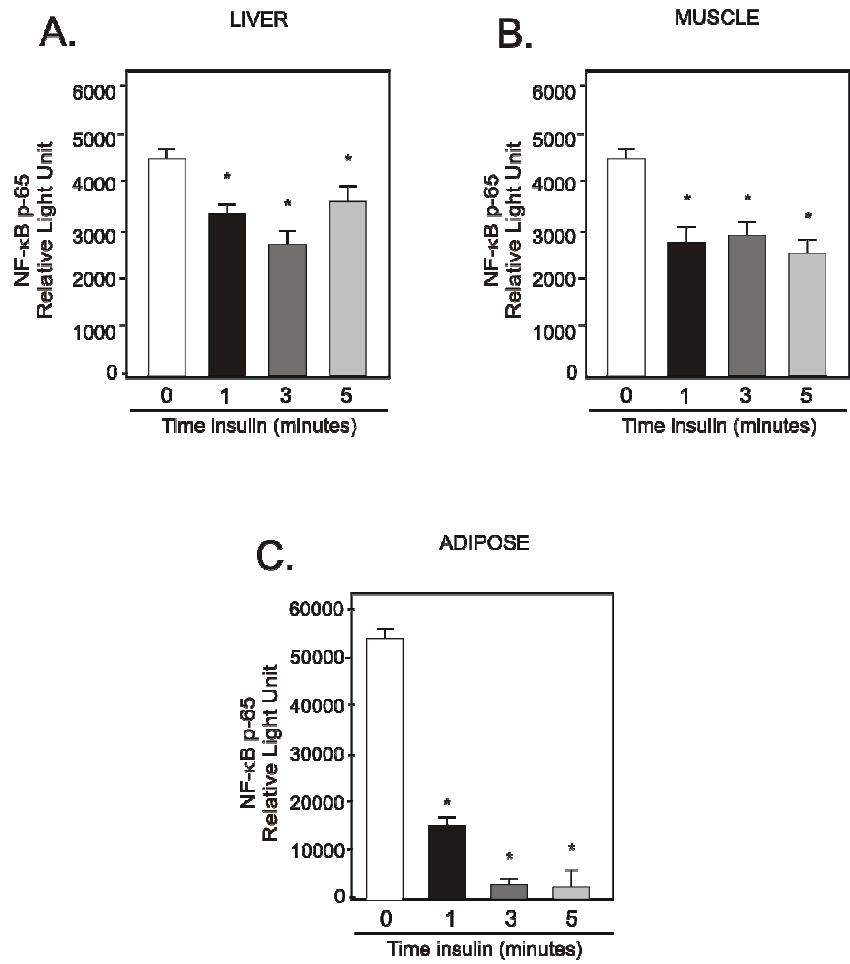


FIGURE 5

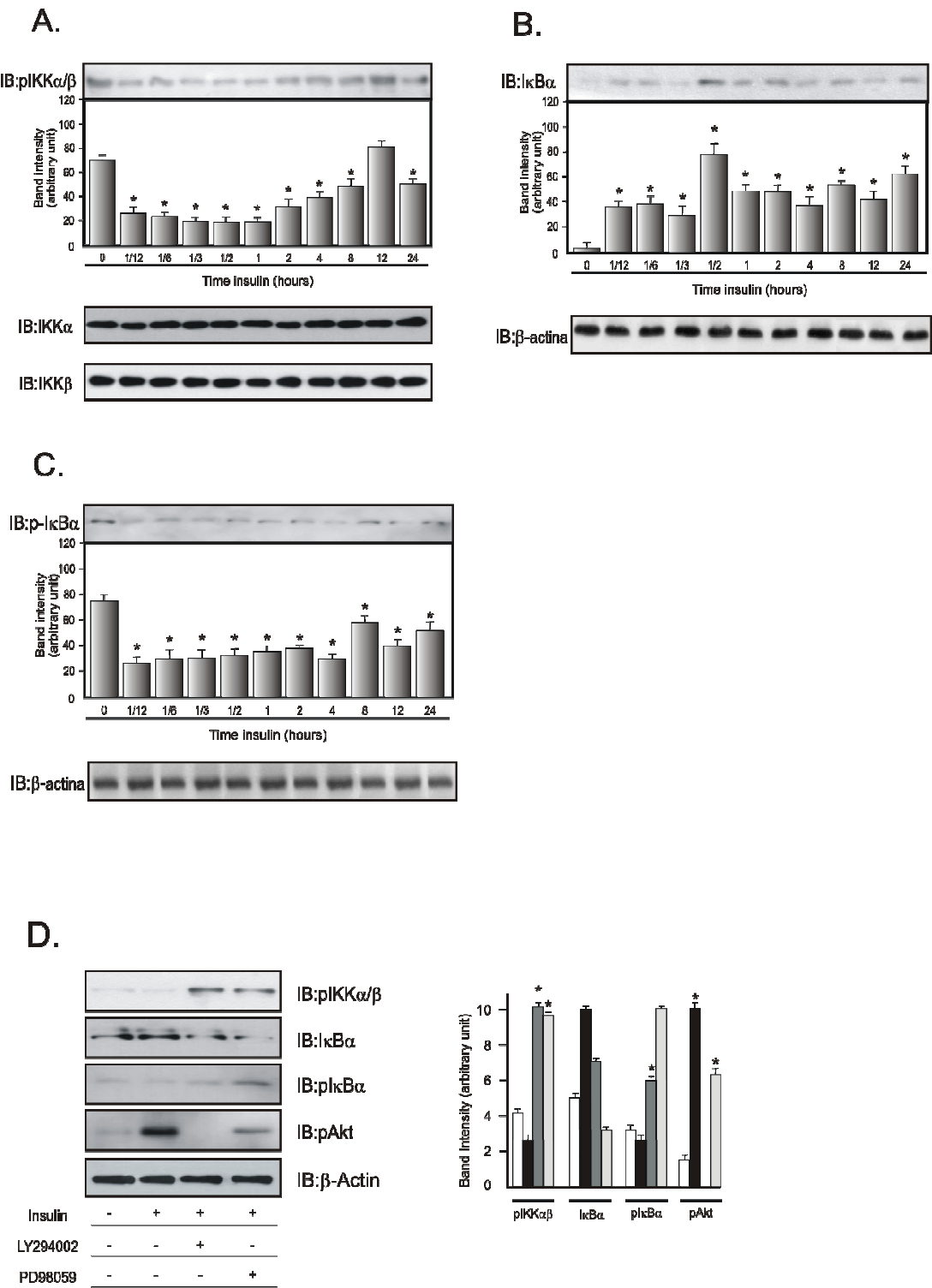
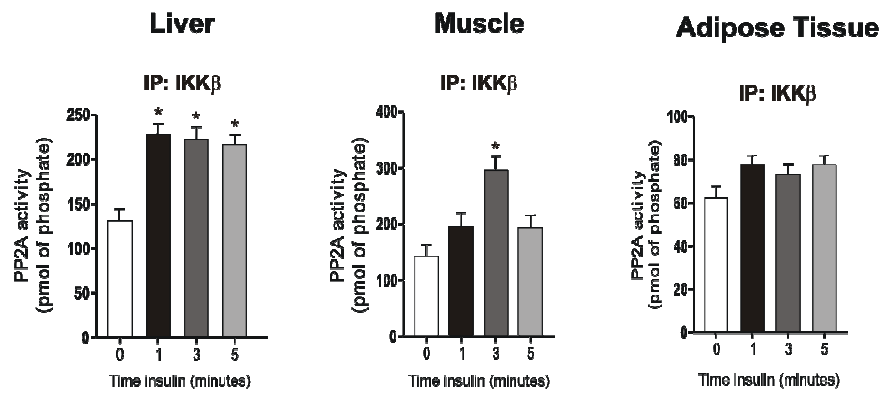


FIGURE 6



4 - DISCUSSÃO

Em disparidade aos efeitos metabólicos da insulina, que são bem caracterizados em nível celular e molecular, as demais ações da insulina, como os efeitos anti-inflamatórios, apresentam investigações incipientes. Os resultados do presente estudo demonstraram que a infusão aguda de insulina reduz a fosforilação de IKKbeta e inibi a atividade de NF- κ B no fígado, músculo e tecido adiposo de ratos.

A maioria dos trabalhos que investigam o efeito anti-inflamatório da insulina foram realizados em cultura de células, com monócitos e macrófagos. Isto pode não refletir o real efeito do hormônio *in vivo* no animal. Os métodos utilizados no presente estudo, quais sejam a infusão insulínica no animal controle e a investigação da via de sinalização da insulina e da via inflamatória em extratos de tecidos, nos permitiu estudar o mecanismo molecular pelo qual a insulina tem efeitos anti-inflamatórios nos tecidos *in vivo*. É importante mencionar que um problema comumente encontrado neste método de investigação *in vivo* é o possível estado hipoglicêmico aos quais os modelos animais ficam sujeitos no decorrer do experimento, acarretando a secreção de hormônios contra-regulatórios como catecolaminas e glicocorticóides, que podem influenciar nas vias de sinalização da insulina e na inflamatória. Para evitar este contratempo, a nossa investigação foi restrita aos primeiros cinco minutos após a infusão insulínica, período em que a sinalização da insulina é totalmente ativada, mas o efeito hipoglicêmico ainda não foi estabelecido, como demonstrado nas medições.

A regulação da expressão dos genes pró-inflamatórios em um sistema biológico decorre de um equilíbrio entre vias de transdução de sinal positivo e negativo. Além de sua ação central no metabolismo da glicose e lipídios, a insulina tem caracterizada por possuir importantes efeitos anti-inflamatórios, mas os mecanismos moleculares que são responsáveis por esses efeitos ainda não foram

completamente investigados. Está bem estabelecido que a insulina ativa a via PI3K-Akt e que esta via é responsável pela maioria dos efeitos metabólicos do hormônio. No entanto, o papel da PI3K-Akt como uma via anti-inflamatória é controversa.

A via PI3K-Akt é capaz de regular negativamente NF- κ B e a expressão de genes inflamatórios. O uso de um inibidor da PI3K (*wortmannin*) melhorou a síntese de óxido nítrico em macrófagos murinos de peritônio induzida por LPS (Parque et al., 1997) e a ativação de PI3K-Akt suprimiu a expressão do gene induzida por LPS (Alessi, et al., 1997). A indução da síntese de óxido nítrico nas células C6 gliais e em astrócitos primários de ratos também foi regulada negativamente pela ativação de PI3K (Pahan et al., 1999; Pahan et al., 2000). Nas células endoteliais a via PI3K-Akt limitou a ativação da via p38MAPK e a expressão gênica de TF (Blum et al., 2001). Na mesma linha, Guha e Mackman (Guha M. et al., 2002) demonstraram em células monocítica que a inibição da via PI3K-Akt melhora a ativação de MAPK (ERK1/2, JNK e p38) induzida por LPS e os alvos a jusante da via. Além disso, a inibição da via PI3K-Akt melhorou a translocação nuclear, NF- κ B induzida por LPS, e impediu a inativação de glicogênio sintase quinase β (GSK3 β) dependente de Akt, no qual aumentou a atividade transcricional de p65. Também, a ativação da PI3K aumentou a sobrevivência, enquanto que a inibição da PI3K reduziu a sobrevivência dos ratos endotoxêmicos (Schabbauer et al, 2004; Williams et al., 2004). Em resumo, esses estudos sugerem que o efeito protetor da insulina em modelos de endotoxemia pode ser mediado por ativação da via PI3K/AKT.

Em contraste com estudos que mostram que a via PI3K-Akt regula negativamente a expressão de genes inflamatórios em macrófagos, outros estudos demonstraram que a via PI3K-Akt regulou positivamente a expressão gênica de NF-

κ B em cultura de células através da fosforilação e aumentou a atividade de transativação de p65 (Thomas et al., 2002). A superexpressão de uma forma constitutivamente ativa de Akt também aumentou a expressão gênica de NF- κ B em fibroblastos 3T3-L1 através da ativação de I κ B quinase e da MAPK p38 (Madrid et al., 2001).

As discrepâncias entre os estudos dos efeitos anti-inflamatórios da via PI3K-Akt podem ser decorridos do tipo de célula investigada e, mais além, do estímulo que ativou esta via. Nossos dados mostram que a insulina ativou a via PI3K-Akt e, também, reduziu a atividade da via de IKK β /I κ B/NF- κ B, indicando um importante mecanismo molecular para o efeito anti-inflamatório do hormônio no fígado, músculo e tecido adiposo nos animais.

Nossos dados também mostraram que o efeito anti-inflamatório da insulina foi observado em macrófagos. Além disso, nessas células, foi possível identificar que o efeito da insulina parece ser prolongada. É importante mencionar que, no animal controle é difícil investigar o curso temporal da insulina sobre via inflamatória, porque a hipoglicemia induzida pela insulina ativa hormônios contra-regulatórios como catecolaminas, glucagon, GH e cortisol que pode ter um efeito nessa via (Brotman et al., 2002). Assim, nosso resultado mostra que tanto a via de sinalização da insulina quanto as vias de PI3K-Akt MAPK estão envolvidas neste efeito da insulina, porque o bloqueio de uma dessas vias resultou na inativação do efeito da insulina.

Finalmente, nós também investigamos o mecanismo pelo qual a insulina desativa IKK β . É bem estabelecido que a desfosforilação da proteína quinase é um mecanismo essencial para inibir a sua função. A regulação da atividade do IKK por proteínas fosfatases tem sido demonstrado por vários grupos (Kidd et al,

2008; Witt et al., 2009). Em experimentos *in vitro* utilizando proteínas purificadas mostraram que PP2A inibe a atividade catalítica de IKKs por desfosforilação em resíduos de serina no domínio quinase (DiDonato et al., 1997). Diversos estudos têm implicado uma função regulatória negativa para PP2A na ativação de IKK e NF- κ B por sinal dependente (Dalhase et al., 2001; DiDonato et al., 1997; Yang et al., 2001; Sontag et al., 1997; Fu et al., 2003). Dalhase et al (Dalhase and Karin et al., 2001) mostraram que a PP2A inativa IKK purificada *in vitro*. Além disso, vários estudos (Miskolci et al., 2003; Mahboubi et al., 1997; Fernandez et al., 1999; Fujita et al., 2004; Sun et al., 1995) revelaram que o tratamento prolongado em células (> 45 min) com o inibidor ácido ocadaico leva a ativação de NF- κ B em alguns tipos celulares (Morimoto et al., 2004).

Nossos dados mostram que nos tecidos sensíveis à insulina a atividade da fosfatase PP2A associada ao IKK foi aumentada após o estímulo insulínico. Assim, podemos sugerir que a insulina pode induzir uma interação entre PP2A e IKK, a qual irá resultar em mais desfosforilação de IKK e, assim, uma inibição da atividade da proteína quinase.

A interação molecular entre IKK e PP2A tem merecido mais atenção recentemente. Dong e seus colaboradores (Dong et al., 2010) sugeriram que a proteína G β -like (G β L) interage com PP2A, PP6 e outros membros da mesma família da fosfatase. A proteína G β L, ao interagir com a proteína fosfatase, não se ligando diretamente ao IKK β , medeia a associação com IKK β . A superexpressão de proteínas fosfatases inibidas pela ativação da sinalização de NF- κ B induzida por TNF α , possui um efeito semelhante ao da superexpressão G β L. A regulação de G β L pelo microRNA de interferência diminuiu o efeito inibitório das fosfatases, resultando

na restauração da sinalização de NF- κ B. Assim, esses autores propõem que a proteína G β L funcione como um regulador negativo da sinalização de NF- κ B, pois recrutam a proteína fosfatase para o complexo IKK. O efeito da insulina na modulação da G β L merece uma profunda análise, porque pode contribuir para explicar o duplo efeito da insulina, ativando PI3K-Akt e MAPK e desativando a via IKK/I κ B/NF- κ B.

Em resumo, nós obtivemos evidências indicando que a infusão aguda da insulina em animais controles ativou a via PI3K-Akt e reduziu a via IKK/I κ B/NF- κ B no músculo, fígado e tecido adiposo. Da mesma forma, em cultura macrófagos vimos que a insulina também reduziu a ativação da IKK tanto pela via PI3K quanto pela via da MAPK. Nossos resultados mostraram, também, que após o estímulo da insulina a proteína fosfatase PP2A se liga ao IKK e, assim, podem potencialmente induzir a desfosforilação e a diminuição da atividade dessa proteína nos tecidos estudados.

5 – CONCLUSÕES

A administração aguda da insulina ativa a via PI3K-Akt e reduz a atividade da via IKK β /I κ B/NF- κ B indicando um importante mecanismo molecular para o efeito anti-inflamatório do hormônio no fígado, músculo e tecido adiposo nos animais. Da mesma forma, em cultura macrófagos vimos que a insulina também reduziu a ativação da IKK tanto pela via PI3K quanto pela via da MAPK. Assim, a insulina pode induzir uma interação entre a proteína fosfatase PP2A ao IKK, provocando uma desfosforilação e uma diminuição da atividade dessa proteína nos tecidos estudados.

Conclusão Geral

Tendo em vista os resultados expostos, concluímos que houve um efeito anti-inflamatório tanto em modelo animal quanto em cultura de células. Isso contribui para explicar os mecanismos moleculares de atuação e resposta à insulina em vias metabólicas, enfatizando, principalmente, a correlação entre a ativação da sinalização da insulina e seu efeito na via inflamatória.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre, V., E. D. Werner, et al. "Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action." **J Biol Chem** 277(2): 1531-1537, 2002.

Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J. "3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vitro". **Curr Biol**; 8:69-81, 1998

Alessi D. R. ,James S. R. ,Downes C. P. ,Holmes A. B. ,Gaffney P. R. ,Reese CB., Cohen P. "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha". **Curr. Biol.** 7:261 – 269, 1997

Beg, A. A., T. S. Finco, et al. "Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation." **Mol Cell Biol** 13(6): 3301-3310, 1993.

Bergman RN. "New concepts in extracellular signaling for insulin action: the single gateway hypothesis". **Recent Prog Horm Res** ;52:359-85, 1997.

Blum S. ,Issbrhker K. ,Willuweit A. ,Hehlhans S. ,Lucerna M. ,Mechtcheriakova D.,Walsh K. ,von der Ahe D. ,Hofer E. ,Clauss M. "An Inhibitory Role of the Phosphatidylinositol 3-Kinase-signaling Pathway in Vascular Endothelial Growth Factor-induced Tissue Factor Expression". **J. Biol. Chem** 276:33428 – 33434, 2001.

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, et al. "ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF". **Cell**.;65:663-75, 1991.

Brotman DJ , Girod JP . "The metabolic syndrome: a tug-of-war with no winner". **Cleve Clin J Med** 69 (12):990-4, 2002.

Burgering BM, Coffey PJ. "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction". **Nature**; 376:599-602, 1995.

Chi H, Barry SP, Roth RJ, Wu JJ, Jones EA, Bennett AM, and Flavell RA Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103:2274–2279, 2006.

Combettes-Souverain M, Issad T. “Molecular basis of insulin action”. **Diabetes & Metabolism (Paris)**; 24:477-89, 1998.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. “Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B”. **Nature** ;378:785-9, 1995.

Dandona, P., Aljada, A., Mohanty, P., Ghanim, H., Hamouda, W., Assian, E., Ahmad, S. “Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect?” **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 86, 3257–3265, 2001.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. “Cellular survival: a play in three Akts”. **Genes Dev** ; 13:2905-27, 1999.

Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., and Karin, M. “Positive and Negative Regulation of IκB Kinase Activity Through IKKβ Subunit Phosphorylation” **Science** 284, 309–313, 1999.

Desbois-Mouthon C, Cadoret A, Blivet-Van Eggelpoel MJ, Bertrand F, Caron M, Atfi A, Cherqui G, and Capeau J. Insulin-mediated cell proliferation and survival involve inhibition of c-Jun N-terminal kinases through a phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase phosphatase-1-dependent pathway. **Endocrinology** 141:922–931, 2000.

DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M. “A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB”. **Nature** 388, 548–554, 1997

Dong-Joo You, You Lim Kim, Cho Rong Park, Dong-Kyu Kim, Jeonghun Yeom, Cheolju Lee, Curie Ahn, Jae Young Seong and Jong-Ik Hwang. "Regulation of I κ B Kinase by G β L through Recruitment of the Protein Phosphatases". **Mol. Cells** 30, 527-532, 2010.

Dugo L, Collin M, Allen DA, Murch O, Foster SJ, Yaqoob MM, and Thiernemann C. Insulin reduces the multiple organ injury and dysfunction caused by coadministration of lipopolysaccharide and peptidoglycan independently of blood glucose:role of glycogen synthase kinase-3 β inhibition. **Crit Care Med** 34:1489– 1496, 2006.

Fernandez, P. C., and Dobbelaere, D. A. "Ceramide synergizes with phorbol ester or okadaic acid to induce I κ B degradation". **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 263, 63–67, 1999

Frode-Saleh, T. S. and J. B. Calixto. "Synergistic antiinflammatory effect of NF- κ B inhibitors and steroidal or non steroidal antiinflammatory drugs in the pleural inflammation induced by carrageenan in mice." **Inflamm Res** 49(7): 330-337, 2000.

Fu, D. X., Kuo, Y. L., Liu, B. Y., Jeang, K. T., and Giam, C. Z. "Human T-lymphotropic Virus Type I Tax Activates I- κ B Kinase by Inhibiting I- κ B Kinase-associated Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A". **J. Biol. Chem.** 278, 1487–1493, 2003.

Fujita, M., Goto, K., Yoshida, K., Okamura, H., Morimoto, H., Kito, S., Fukuda, J., and Haneji, T. "Okadaic acid stimulates expression of Fas receptor and Fas ligand by activation of nuclear factor κ -B in human oral squamous carcinoma cells". **Oral Oncol.** 40, 199–206, 2004

Guha M and Mackman N. "The phosphatidylinositol 3-kinase-akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells". **J Biol Chem** 277:32124–32132, 2002.

Guha M and Mackman N. The phosphatidylinositol 3-kinase-akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. **J Biol Chem** 277:32124–32132, 2002.

Hayden , M., and S. Ghosh. “Signaling to NF- κ B”. **Genes Dev.** 18: 2195-2224, 2004.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. “IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance”. **Science** ; 271:665-8, 1996.

Johannes Witt, Sandra Barisic, Eva Schumann, Frank Allgöwer, Oliver Sawodny, Thomas Sauter and Dagmar Kulms. “Mechanism of PP2A-mediated IKK β dephosphorylation: a systems biological approach”. **BMC Systems Biology** 3:71, 2009

Kytamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, Konishi H, Matsuzaki H, Kikkawa U, Ogawa W, Kasuga M. “Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt”. **Mol Cell Biol**; 9:6286-96, 1999.

Linda B. Kidd, Gernot A. Schabbauer, James P. Luyendyk, Todd D. Holscher, Rachel E. Tilley, Michael Tencati, and Nigel Mackman. “Insulin Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B (Akt) Pathway Reduces Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Mice”. **J Pharmacol And Experimentl Therapeutics** 326:348–353, 2008.

Madrid L. V. ,Mayo M. W. ,Reuther J. Y. ,Baldwin A. S., Jr. “Akt Stimulates the Transactivation Potential of the RelA/p65 Subunit of NF- κ B through Utilization of the I κ B Kinase and Activation of the Mitogen-activated Protein Kinase p38” **J. Biol. . Chem** 276:18934 –18940, 2001.

Mahboubi, K., Young, W., and Ferreri, N. R. "Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by serine-threonine phosphatase inhibition". **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 282, 452–458, 1997

Martin M, Rehani K, Jope RS, and Michalek SM. "Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3". **Nat Immunol**

Miskolci, V., Castro-Alcaraz, S., Nguyen, P., Vancura, A., Davidson, D., and Vancurova, I. "Okadaic acid induces sustained activation of NFkappaB and degradation of the nuclear IkappaBalpha in human neutrophils". **Arch. Biochem. Biophys.** 417, 44–52, 2003.

Morimoto, H., Okamura, H., Yoshida, K., Kitamura, S., and Haneji, T. "Okadaic Acid Induces Apoptosis through Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase/Eukaryotic Initiation Factor-2 α Pathway in Human Osteoblastic MG63 Cells". **J. Biochem.** 136, 433–438, 2004

Morrison D. K., Cutler R. E., Jr. "The complexity of Raf-1 regulation". **Curr. Opin. Biol Cell.** 9: 174 – 179, 1997.

Páez-EV Espinosa, Rocha EM, Velloso LA, Boschero AC, Saad MJ. "Insulin-induced tyrosine phosphorylation of Shc in liver, muscle and adipose tissue of insulin resistant rats". **Mol Cell Endocrinol** . 156 (1-2):121-9. 1999

Pahan K., Liu X., Madeira C., Raymond "Expression of a constitutively active form of phosphatidylinositol 3-kinase inhibits the induction of nitric oxide synthase in human astrocytes". **J. R. FEBS Lett.** 472:203 -207, 2000 .

Pahan K., Raymond J. R., Singh I. "Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Induces Nitric-oxide Synthase in Lipopolysaccharide- or Cytokine-stimulated C6 Glial Cells" **J. Biol. Chem.** 274:7528 – 7536, 1999.

Palombella, V. J., E. M. Conner, et al. "Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis". **Proc Natl Acad Sci USA** 95(26): 15671-15676, 1998.

Parque Y. C. ,Lee C. H. , Kang H. S. , Chung H. T. , Kim H. D. "Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, enhances LPS-induced NO production from murine peritoneal macrophages". **Biochem Biophys. Res. Commun** 240:692 – 696, 1997.

Patti ME, Kahn CR. "The insulin receptor - a critical link in glucose homeostasis and insulin action". **J Basic Clin Physiol Pharmacol**;9:89-109, 1998.

Paz, K., R. Hemi, et al. "A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation." **J Biol Chem** 272(47): 29911-29918, 1997.

Rommel C. ,Clarke B. A. ,Zimmermann S. ,Nunez L. ,Rossman R. ,Reid K.,Moelling K. ,Yancopoulos G. D., Vidro D. J. "Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt". **Ciência** 286 : 173, 1999.

Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA. "Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat". **J Biol Chem**; 271:22100-4, 1996.

Saltiel, A. R. and C. R. Kahn. "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism". **Nature** 414(6865): 799-806, 2001.

Sarah Derde Ilse Vanhorebeek Greet Van den Berghe. "Insulin Treatment in Intensive Care Patients". **Horm Res**;71:2–11, 2009.

Schabbauer G, Tencati M, Pedersen B, Pawlinski R, and Mackman N. "PI3KAkt pathway suppresses coagulation and inflammation in endotoxemic mice". **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 24:1963–1969, 2004.

Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, Roth RA, Lawrence JCJr. "Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by protein kinase B signaling pathway". **Process Natl Acad Sci USA**; 95:7772-7, 1998.

Sesti, G., M. Federici, et al. "Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders." **FASEB J** 15(12): 2099-2111, 2001.

Shoelson, S. E., J. Lee, et al. "Inflammation and insulin resistance." **J Clin Invest** 116(7): 1793-1801, 2006.

Sontag, E., Sontag, J. M., and Garcia, A. "Protein phosphatase 2A is a critical regulator of protein kinase C zeta signaling targeted by SV40 small t to promote cell growth and NF-kappaB activation". **EMBO J.** 16, 5662–5671, 1997

Sun, S. C., Maggirwar, S. B., and Harhaj, E. "Activation of NF-B by Phosphatase Inhibitors Involves the Phosphorylation of IB at Phosphatase 2A-sensitive Sites". **J. Biol. Chem.** 270, 18347–18351, 1995

Takehara N, Kawabe J, Aizawa Y, Hasebe N, and Kikuchi K. "High glucose attenuates insulin-induced mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression in vascular smooth muscle cells". **Biochim Biophys Acta** 1497: 244–252, 2000.

Taniguchi CM, Emanuelli B, and Kahn CR. "Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action". **Nat Rev Mol Cell Biol** 7:85–96, 2006.

Thomas K.W., Monik M. M., Stabler J.M., Yarovinsky T., Carter A.B., Hunninghake G.W. "Respiratory Syncytial Virus Inhibits Apoptosis and Induces NF-κB Activity

through a Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Pathway". **J. Biol. Chem.** 227:492-50, 2002.

Velloso LA, Carvalho CR, Rojas FA, Folli F, Saad MJ. "Insulin signalling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway". **Cardiovasc Res**;40:96-102, 1998.

Williams DL, Li C, Ha T, Ozment-Skelton T, Kalbfleisch JH, Preiszner J, Brooks L, Breuel K, and Schweitzer JB. "Modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway alters innate resistance to polymicrobial sepsis". **J Immunol** 172:449–456, 2004.

Yang, J., Fan, G. H., Wadzinski, B. E., Sakurai, H., and Richmond, A. "Protein Phosphatase 2A Interacts with and Directly Dephosphorylates RelA" **J. Biol.Chem.** 276, 47828–47833, 2001.

Zimmermann S., Moelling K. "Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B)". **Ciência** 286 : 1741, 1999.