

CRISTINA ALBA LALLI

**EFEITO DA ROSIGLITAZONA E DA LOVASTATINA
NA RESISTÊNCIA INSULÍNICA DA
DIETA HIPERLIPÍDICA**

CAMPINAS

Unicamp

2007

CRISTINA ALBA LALLI

**EFEITO DA ROSIGLITAZONA E DA LOVASTATINA
NA RESISTÊNCIA INSULÍNICA DA
DIETA HIPERLIPÍDICA**

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

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO JOSE ABDALLA SAAD

CAMPINAS

Unicamp

2007

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

L155e Lalli, Cristina Alba
Efeito da rosiglitazona e da lovastatina na resistência insulínica da
dieta hiperlipídica. / Cristina Alba Lalli. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

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

1. Diabetes. 2. Insulina. 3. Dieta hiperlipídica. 4.
Resistência a insulina. I. Saad, Mario Jose Abdalla. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

**Título em inglês : Effects of rosiglitazone and lovastatin in insulin
resistance of high-fat fed rats**

Keywords: . Diabetes
. Insulin
. High-fat diet
. Insulin resistance

Área de concentração : Clínica médica

Titulação: Doutorado em Clínica médica

**Banca examinadora: Prof^o. Dr^o. Mario José Abdalla Saad
Prof^a. Dr^a. Regina Célia Mello Santiago Moisés
Prof^o. Dr^o. Antonio Carlos Boschero
Prof^a. Dr^a. Lígia Vera Montalli da Assumpção
Prof^o. Dr^o. Jose Barreto Campello Carvalheira**

Data da defesa: 07-12-2007

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

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

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) .Regina Célia Mello Santiago Moises

2. Prof(a). Dr(a). Antonio Carlos Boschero

3. Prof(a). Dr(a). Lígia Vera Montalli da Assumpção

4. Prof(a). Dr(a). José Barreto Campello Carvalheira

5. Prof. (a). Dr(a). Mário José Abdalla Saad

Regina Célia Mello Santiago Moises

Boschero

Lígia V. Montalli da Assumpção

José Barreto Campello Carvalheira

Mário José Abdalla Saad

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

Data: 07/12/2007

DEDICATÓRIA

...estimar, tanto quanto a meus pais, aquele que me ensinou esta arte...

Juramento de Hipócrates

Dedico esse trabalho ao Professor Ronan José Vieira, que tem sido meu mestre na árdua e sempre prazerosa arte de ser médico e a todos aqueles que em algum momento deste caminho me presentearam com seu saber.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mario Jose Abdalla Saad por sua orientação generosa e talentosa, pelo companheirismo e dedicação.

Ao amigo Prof. Dr. Lício Augusto Velloso por todo apoio, incentivo e confiança.

Ao amigo Sr. Luís Janeri por sua inestimável colaboração e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular: José Rodrigo Pauli, Patrícia Oliveira Prada, Dennys Esper Cintra e Eduardo Rochette Ropelle por sua imensa ajuda na realização de experimentos.

Aos amigos e colegas de turma, Gil Guerra Jr. e Andrea Trevas Maciel Guerra por seu apoio e incentivo.

À amiga Prof. Dra. Maria Tereza Matias Baptista pela fundamental participação em minha formação e pela amizade.

Ao grupo da Disciplina de Emergência Dra. Maria Estela Fornazieri, Dr. Paulo Roberto de Madureira, Dr. Luís Cláudio Martins, Dr. Marcelo Nardi Pedro e Maria Augusta Albino, pelo companheirismo e apoio.

A todo o grupo da Comissão de Apoio Didático, Científico e Computacional, em especial os Srs. Emilton Barbosa de Oliveira, Alexandro Vieira Jacob e Wagner José da Silva por sua infinita disponibilidade, paciência e competência.

Ao meu irmão Marcos e sua família: Pedro, Gabriel, David e Stefânia por tudo.

Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa.

João Guimarães Rosa

	PÁG.
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
1- INTRODUÇÃO	18
1.1- Sinalização insulínica	19
1.2- Dieta hiperlipídica	23
1.3- Tiazolidinedionas	24
1.4- Estatinas	25
2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
2.1- Estudo da rosiglitazona	30
2.2- Estudo da lovastatina	30
2.2.1- Via da PI3K.....	30
2.2.2- Vias de regulação.....	30
3- MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1- Materiais	32
3.2- Animais	32
3.2.1- Estudo da rosiglitazona.....	33
3.2.2- Estudo da lovastatina.....	33
3.3- Métodos	34
3.3.1- Extração de tecidos e imunoprecipitação.....	34
3.3.2- Análise de proteínas por <i>immunoblotting</i>	35
3.3.3- Teste de tolerância à insulina.....	36

3.3.4- Dosagem de glicose.....	36
3.3.5- Dosagem de insulina.....	36
3.4- Análise estatística.....	37
4- RESULTADOS.....	38
4.1- Rosiglitazona.....	39
4.1.1- Teste de tolerância à insulina.....	39
4.1.2- Tecido hepático.....	40
4.1.3- Tecido muscular.....	42
4.2- Lovastatina.....	44
4.2.1- Caracterização dos animais.....	44
4.2.1.1- Peso.....	44
4.2.1.2- Dosagem de insulina.....	44
4.2.1.3- Teste de tolerância à insulina.....	45
4.2.2- Vias de sinalização em tecido hepático.....	46
4.2.2.1- Estudo da via da PI3K.....	46
4.2.2.2- Estudo das vias de regulação.....	50
4.2.3- Vias de sinalização em tecido muscular.....	52
4.2.3.1- Estudo da via da PI3K.....	52
4.2.3.2- Estudo das vias de regulação.....	56
5- DISCUSSÃO.....	58
6- CONCLUSÕES.....	66
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
8- ANEXOS.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT/PKB: proteína quinase B

aPKC - *atypical protein kinase C*: proteína quinase C atípica

APS: *adapter protein with Pleckstrin homology and Src homology 2*

c-Jun: proto-oncogene

CAP: *Cbl associated protein*

Cbl: *Casitas b-lineage lymphoma*

C3G: *guanyl nucleotide-exchange protein*

2DG: *2-deoxy-D-[1-14C] glucose*

DHL: dieta hiperlipídica

DM 2: diabetes melito tipo 2

FPP: farnesilpirofosfato

Fyn: *cytoplasmic tyrosine kinase*

Gab-1: *Grb2 associated binder-1*

GDP: guanina difosfato

GLUT4: *glucose transporter-4*: transportador de glucose 4

Grb: *growth-factor-receptor bound protein*

Grb10: *growth-factor-receptor bound protein 10*

GSK-3: *glycogen synthase kinase*

GTP: guanina trifosfato

GTPases: guanina trifosfato fosfatase

HMGCoA: hidroximetilglutaril coenzima A

HMGR: 3-hidroximetilglutaril coenzima A redutase

HOMA-IR: *homeostasis model assessment of insulin resistance*

IGF-1: *insulin growth factor 1*

I κ B α : *inhibitor of nuclear factor-kB*

IKK β : *I κ B kinase complex*

IL-1 β : Interleucina-1 β

IR: receptor de insulina

IRS: *insulin-receptor substrate*: substrato do receptor de insulina

JNK: *c-jun N-terminal kinase*

K_{itt}: constante de decaimento da glicose

MAPK - *mitogen – activated protein kinase*: proteína quinase ativadora do mitogênio

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

NF- κ B - *nuclear factor- κ B*: fator nuclear κ B

PCR: proteína C reativa

PDK 1: *phosphoinositide-dependent kinase 1*

PH: *pleckstrin homology*

PI3K - *phosphatidylinositol 3- kinase*: fosfatidilinositol 3-quinase

PKC: proteína quinase C

PPAR- γ : *peroxisome proliferator-activated receptor- γ*

PTB: *phosphotyrosine (pY)-binding*

PtdIns(3,4,5)P₃: fosfatidilinositol 3-fosfato

PTPase: proteína tirosina fosfatase

PTP1B: proteína tirosina fosfatase B1

SH2: *Src-homology-2*

SH3: *Src-homology-3*

SHP2: *phosphotyrosine phosphatase*

SOCS1: *suppressor of cytokine signalling-1*

SOCS3: *suppressor of cytokine signalling-3*

Src: oncogene

TZD: Tiazolidinedionas ou glitazonas

TNF: *tumor necrosis factor*

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Composição das dietas padrão e hiperlipídica.....	32
Tabela 2- Características dos animais.....	44

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Teste de tolerância à insulina.....	39
Figura 2- Sinalização insulínica em tecido hepático.....	41
Figura 3- Sinalização insulínica em tecido muscular.....	43
Figura 4- Teste de tolerância à insulina.....	45
Figura 5- Estudo dos efeitos da lovastatina sobre a via da PI3K em tecido hepático.....	47
Figura 6- Estudo dos efeitos da lovastatina sobre a via da PI3K em tecido hepático.....	49
Figura 7- Estudo das vias de regulação em tecido hepático.....	51
Figura 8- Estudo dos efeitos da lovastatina sobre a via da PI3K em tecido muscular.....	53
Figura 9- Estudo dos efeitos da lovastatina sobre a via da PI3K em tecido muscular.....	55
Figura 10- Estudo das vias de regulação em tecido muscular.....	57

RESUMO

A insulina é o principal hormônio anabólico, que atua através da ativação de transportadores, regulação de enzimas e expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na captação e armazenamento de substratos. Para exercer suas ações, a insulina emprega duas vias principais de sinalização intracelular: a via da PI 3-quinase e a via da MAPK. A regulação da ação do hormônio se faz por meio de vários mecanismos. O modelo animal de dieta hiperlipídica apresenta alterações metabólicas e de sinalização semelhantes aos encontrados na resistência insulínica de humanos com obesidade induzida por dieta. O objetivo de nosso trabalho foi estudar em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, etapas da sinalização insulínica e também algumas vias de regulação da sinalização, após o uso de duas drogas: a rosiglitazona, uma tiazolidinediona usada para o tratamento do diabetes melito tipo 2 como sensibilizadora de insulina e a lovastatina, droga inibidora da HMGCoA redutase, que diminui a síntese de colesterol, mas que também tem apresentado efeito de aumentar a sensibilidade à insulina, tanto em modelos animais como em humanos. Ratos alimentados com dieta hiperlipídica por quatro semanas e tratados na última semana com as drogas, isoladamente, foram submetidos à extração de tecidos hepático e muscular e os fragmentos obtidos foram submetidos à análise de concentração protéica ou de grau de fosforilação de proteínas através de técnicas de imunoprecipitação e *immunoblotting*. A sensibilidade à insulina foi avaliada pelo teste de tolerância à insulina e cálculo da constante de decaimento da glicose (K_{itt}). No estudo da rosiglitazona, foi observada diminuição significativa da sensibilidade à insulina expressa por diminuição no K_{itt} , nos animais que receberam a dieta e recuperação da sensibilidade após o uso da droga. A fosforilação do IRS-1, associação do substrato com a enzima PI3K e a ativação da Akt no tecido hepático e muscular também se mostraram diminuídas pela dieta e recuperadas com o uso da rosiglitazona. O estudo da lovastatina demonstrou efeito positivo da droga sobre a sensibilidade insulínica, revertendo a resistência induzida pela dieta hiperlipídica, expressa por valor de K_{itt} semelhante ao dos animais controle. Na via de sinalização da PI3K: fosforilação do IR e do IRS-1, associação do IRS-1 à PI3k e ativação da Akt, tanto no tecido hepático como muscular, a lovastatina reverteu as alterações da dieta, com recuperação a valores semelhantes aos do grupo controle. Também nas vias de regulação, a dieta induziu maior fosforilação do IR em serina, maior fosforilação do IRS-1 em serina³⁰⁷, maior atividade da JNK e da proteína fosfatase PTP1B e menor ativação do I κ B, efeitos

que podem explicar a resistência desse modelo. A lovastatina reverteu todas essas alterações. Concluindo, a rosiglitazona reverteu as alterações causadas pela dieta hiperlipídica sobre as etapas iniciais da sinalização insulínica na via da PI3K. A lovastatina recuperou as alterações induzidas pela dieta hiperlipídica na transmissão do sinal insulínico, agindo sobre as vias de regulação da sinalização: ação da PTP1B, fosforilação do IR e do IRS-1 em serina induzidos pela JNK e PTP1B e ativação da via inflamatória.

ABSTRACT

Insulin is the major anabolic hormone and acts through transporter activation, enzymes regulation and gene expression. This hormone uses two main signaling pathways: the PI3K pathway, involved in its metabolic effects and the MAPK pathway, responsible for cell growth and differentiation. There are many mechanisms of regulation of insulin signaling. The use of a high-fat diet is a known model of insulin resistance with metabolic and signaling changes similar to those of human insulin resistance syndrome observed in diet induced obesity. Rosiglitazone is an agent of the class of thiazolidinediones, insulin-sensitizing agents whose effects are mainly due to the activation of PPAR γ and are used to treat type 2 diabetes. Lovastatin is one of a class of a class of cholesterol synthesis inhibitors; recent studies have shown that this agent might have relevant effects on insulin resistance in both animal models and humans. The aim of this study was to evaluate the effects of two different drugs independently, rosiglitazone and lovastatin, on insulin signaling in liver and muscle of rats fed on a high-fat diet. We used four week old male Wistar rats, fed on a high-fat diet during four weeks and treated with rosiglitazone or lovastatin during the last week, compared to rats fed on standard chow. Fragments of liver and muscle tissues were extracted from anesthetized animals and protein concentrations and phosphorylation degree were studied through immunoprecipitation and immunoblotting techniques. Insulin sensitivity was evaluated by insulin tolerance test and calculation of the disappearance rate constant (K_{it}). We observed that high-fat fed diet rats presented a significant decrease in K_{it} compared to control rats. The animals that were fed with the high-fat diet and were treated with either one of the drugs presented a reversal of this effect. In the study of rosiglitazone, the high-fat model demonstrated a decrease in the IRS-1 phosphorylation, IRS-1/PI3K association and activation of Akt and rosiglitazone administration resulted in the reversion of all the effects in liver and muscle. In addition to the effect on insulin sensitivity, the use of lovastatin was also associated with an increase in insulin-induced IR tyrosine phosphorylation and, in parallel, a decrease in IR serine phosphorylation and association with PTP1B. Our data also show that lovastatin treatment was associated with an increase in the insulin-stimulated IR/IRS-1/PI3K/Akt pathway in the liver and muscle of high-fat fed rats, in parallel with a decrease in the inflammatory pathway (JNK and IKK β /I κ B/NF κ B) related to insulin resistance. In conclusion, rosiglitazone and lovastatin improved the alterations in insulin signaling pathways presented by the high-fat model of insulin resistance.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Sinalização insulínica

Insulina é o principal hormônio anabólico, cuja ação é fundamental para o desenvolvimento e crescimento dos tecidos e manutenção da homeostase de glicose.

Suas ações incluem ativação de transportadores, regulação da atividade de várias enzimas e da expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na captação e armazenamento de substratos.

Para exercer suas inúmeras ações, a insulina emprega duas vias metabólicas distintas: a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) – AKT/proteína quinase B, que é responsável pela maioria das ações metabólicas do hormônio e a via da proteína quinase ativadora do mitogênio (MAPK) que regula a expressão de vários genes e interage com a via da PI3K no controle do crescimento e diferenciação celular (Avruch, 1998).

A via da PI3K/Akt inicia-se com a ligação da insulina ao seu receptor trans-membrana (IR). Este é composto por duas subunidades α e duas subunidades β , que funcionam como enzimas alostéricas em que as subunidades α inibem a atividade quinase das subunidades β . Quando a insulina se liga às subunidades α , ocorre uma alteração conformacional na molécula, aumentando sua atividade quinase e levando à autofosforilação do receptor em resíduos de tirosina (Saad et al., 1993; Patti e Kahn, 1998). Essa reação desencadeia a fosforilação de várias proteínas intracelulares, entre elas os substratos do receptor de insulina (IRS), Gab-1, p60dok, Cbl, APS e Shc (Pessin e Saltiel, 2000). Os resíduos de tirosina fosforilados nessas proteínas agem como sítios de ligação para proteínas que contêm domínios SH2 (*Src-homology-2*), sendo essas proteínas, tanto moléculas adaptadoras, tais como a subunidade regulatória p85 da PI3K e Grb2, ou enzimas, como a fosfotirosina fosfatase (SHP2) e a tirosina-quinase citoplasmática Fyn. A ligação de substratos a essas proteínas com domínios SH2 pode regular a atividade ou modificar a localização intracelular desses substratos (Saltiel e Kahn, 2001).

A família dos IRSs inclui diferentes substratos que apresentam alto grau de homologia. Os IRS-1 e 2 são os mais importantes no metabolismo da glicose. Estudos com a técnica de *knockout* têm demonstrado que as ações desses substratos são complementares

na sinalização da insulina e do IGF-1. Camundongos *knockout* para IRS-1 apresentam retardo do crescimento intra-útero e pós-natal, resistência insulínica em tecidos periféricos e tolerância diminuída à glicose (Tamemoto et al., 1994; Araki et al., 1994). Já a linhagem *knockout* para IRS-2 apresenta resistência insulínica nos tecidos periféricos e fígado e diminuição da massa de célula β , o que resulta no desenvolvimento de diabetes tipo 2 nesses animais (Withers et al., 1998).

A PI3K possui duas porções, a p85, chamada reguladora e a p110, catalítica. A ligação dos resíduos de tirosina fosforilados das proteínas IRS aos domínios SH2 da fração reguladora da enzima, leva à sua ativação, resultando na transmissão de múltiplos sinais. Dentre estes, ocorre a catalisação da fosforilação do fosfoinositol na posição 3, gerando fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns^(3,4,5)P₃) que, por sua vez, liga-se ao domínio PH de uma variedade de moléculas sinalizadoras, alterando suas atividades ou localização intracelular (Lietzke et al., 2000). A PI3K também apresenta atividade serina-quinase, podendo ambas as subunidades ligar-se a outras proteínas sinalizadoras, atuando no sinal insulínico de forma independente ao PtdIns^(3,4,5)P₃ (Kessler et al., 2001).

O fosfatidilinositol 3-fosfato regula três classes de moléculas sinalizadoras: as AGC de serina/treonina quinase (Peterson e Schreiber, 1999), a família das proteínas trocadoras de nucleotídeos guanina da família Rho das GTPases (Mackay e Hall, 1998) e a famílias TEC tirosina quinases (Ziegler et al., 1993). A PI3K também é responsável por uma das vias de ativação da mTOR/FRAP e deve estar envolvida na regulação da fosfolipase D, que leva à hidrólise da fosfatidilcolina e aumento no diacilglicerol e ácido fosfatídico (Saltiel e Kahn, 2001).

Dentre as proteínas AGC, a melhor caracterizada é a PDK 1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*), que é uma serina-quinase e fosforila duas classes de proteínas serina/treonina-quinase: a Akt/PKB (Alessi et al., 1997; Brozinick e Birnbaum 1998) e a proteína quinase C atípica (aPKC), isoforma ζ e λ (PKC- ζ e $-\lambda$) (Farese, 2002).

A Akt possui domínio PH, interagindo diretamente com o PtdIns^(3,4,5)P₃, o que promove sua ativação. Ambas as proteínas, Akt e aPKC são importantes para o transporte de glicose através da mobilização das vesículas de GLUT4 para a membrana celular, no

tecido muscular e adiposo (Standaert et al., 1997; Shepherd e Khan, 1999; Czech e Corvera, 1999). Por outro lado, apenas a Akt é importante no estímulo à síntese de glicogênio nos tecidos muscular, adiposo e hepático e à diminuição da gliconeogênese, diminuindo a produção hepática de glicose (Cross et al., 1995; Michael et al., 2000).

Uma segunda via envolvida na captação da glicose estimulada pela insulina é a via da fosforilação do proto-oncogene Cbl (Ribon e Saltiel, 1997). Na maioria dos tecidos sensíveis à insulina, Cbl está associado com a proteína adaptadora CAP, que se liga às seqüências ricas em prolina da Cbl através de seu domínio carboxi-terminal SH3 (Ribon et al., 1998a). A CAP também é expressa em tecidos insulino-sensíveis e encontra-se induzida durante a diferenciação dos adipócitos, sendo que sua expressão é aumentada por agonistas dos PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*) sensibilizadores de insulina (Ribon et al., 1998b). Após a fosforilação da Cbl, o complexo Cbl/CAP dissocia-se do IR e se desloca para uma fração da membrana celular que é caveolin-enriquecida/Triton insolúvel (Mastick et al., 1995). A translocação do Cbl recruta a proteína adaptadora CrkII através de lipídeos via interação do domínio SH2 da CrkII com a Cbl fosforilada. A CrkII também forma um complexo constitutivo com a C3G. Uma vez translocada através de lipídeos, C3G aproxima-se da proteína G TC10 e catalisa a transformação de GTP em GDP, resultando em sua ativação (Chiang et al., 2001). Uma vez ativada, a TC10 promove um segundo sinal para a translocação do GLUT4 (Watson et al., 2001).

O controle das etapas iniciais da sinalização insulínica (fosforilação em tirosina do IR e das proteínas IRS) pode ser feito através de três mecanismos: fosforilação do receptor e dos substratos em serina, regulação negativa feita por proteínas tirosina fosfatase, e *downregulation* induzida por ligantes.

A fosforilação do IR e das proteínas IRS em resíduos de serina diminui a fosforilação em tirosina, agindo como um *feedback* negativo (Hotamisligil et al., 1996). Um importante mecanismo desse processo é constituído pela fosforilação da serina 307 (Ser³⁰⁷) das proteínas IRS pela JNK (quinase que ativa o c-Jun) (Lee et al., 2003).

A JNK é uma proteína membro da família da MAPK (Davis, 1999; Weston et al., 2002) e sua via de sinalização é ativada por estímulos extracelulares de estresse, como TNF- α (Hirosumi et al., 2002), IL-1 β (Ip e Davis, 1998; Nikulina et al., 2003), ambas citocinas pró-inflamatórias, ativando fatores de transcrição, como, por exemplo, a c-Jun.

Em relação à homeostase da glicose, a JNK participa de vários mecanismos. Em estudo, comparando camundongos selvagens e com deficiência de JNK e que apresentavam obesidade induzida por dieta, observou-se aumento da atividade da JNK na obesidade e melhora da sensibilidade à insulina nos animais com ausência da proteína (Hirosumi et al., 2002). Da mesma forma, a administração de inibidores da JNK, melhora a sinalização insulínica nos tecidos periféricos (Kaneto et al., 2004). A JNK também está envolvida na perda de células- β pancreáticas induzida pela interleucina-1 β (IL-1 β) (Ammendrup et al., 2000) e o tratamento com inibidores da JNK revertem esse efeito, reduzindo a apoptose induzida pela IL-1 β e preservando a massa de células β (Bonny et al., 2001).

A Ser³⁰⁷ localiza-se próximo ao domínio de ligação da fosfotirosina (PTB) do IRS-1 e sua fosforilação inibe a interação do domínio PTB com o motivo NPEY do receptor de insulina ativado. Dessa forma, a fosforilação do IRS em serina pode ser uma causa de resistência insulínica (Aguirre et al., 2002).

Além de seu papel como um mecanismo inibitório, a via de fosforilação em serina atua como em elo com outras vias envolvidas na resistência insulínica. As proteínas com atividade quinase envolvidas nesse processo incluem: PI3K, Akt, (GSK)-3 e mTOR (*mammalian target of rapamycin*).

Outra importante enzima envolvida na atenuação do sinal insulínico é a proteína quinase C (PKC) e a quinase inibidora do fator nuclear kB (IKK) (Yuan et al., 2001; Kim et al., 2001).

As proteínas SOCS1 e SOCS3 (Ueki et al., 2004), a Grb10 e a PC1 (*plasma-cell-membrane glycoprotein-1*) regulam negativamente a função do IR, bloqueando sua ligação com os IRS ou modificando sua atividade quinase.

As proteínas SOCS têm sido encontradas em maior atividade em situações de resistência insulínica, como na obesidade, podendo participar da fisiopatologia do diabetes melito tipo 2 (Emanuelli et al., 2001).

Outro mecanismo de atenuação da transmissão do sinal insulínico é o das proteínas tirosina fosfatases (PTPase) que catalisam a desfosforilação do receptor e de seus substratos. Várias PTPases têm sido identificadas, mas especial atenção tem sido dada à fosfatase citoplasmática PTP1B. Camundongos desenvolvidos pela técnica de *knockout* para a enzima PTP1B apresentam aumento na fosforilação do IR e das proteínas IRS em músculo, aumentando a sensibilidade à insulina. Esses animais também são resistentes à obesidade induzida por dieta, sugerindo que o cérebro possa ser um importante sítio de ação (Elchebly et al., 1999).

1.2- Dieta hiperlipídica

O modelo de animal alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) tem sido utilizado para o estudo dos mecanismos de resistência insulínica, uma vez que mimetiza o estado encontrado na obesidade induzida por dieta em humanos (Chopra et al., 2002). Em modelos animais, a dieta hiperlipídica está associada à resistência à insulina tecido específica, caracterizada por menor sensibilidade ao hormônio em tecido hepático, músculo e hipotálamo. Em tecido adiposo branco, com apenas um mês de uso da dieta, observa-se maior sensibilidade insulínica, evidenciada pela maior captação de glicose durante o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, usando-se 2-deoxi-D-[1-14C] glicose (2DG) (Prada et al., 2005). Nesses animais é encontrada maior expressão do CAP e Cbl, aumento na fosforilação em tirosina da Cbl induzida pela insulina, aumento na associação da CAP/Cbl e na fosforilação em tirosina da C3G, demonstrando maior ativação dessa via (Prada et al., 2006).

Outro mecanismo envolvido na resistência insulínica induzida por DHL é a ativação da via pró-inflamatória do IKK β / I κ B/NF κ B (Itai et al., 2002; Schoelson et al., 2003; Cai et al., 2005). IKK β é uma serina quinase cuja ativação estimula a fosforilação do inibidor do κ B (I κ B), que, por sua vez, é uma proteína citoplasmática que inibe a

translocação do fator nuclear κ B (NF κ B). O NF κ B é uma família de fatores de transcrição que funcionam como homo ou heterodímeros na regulação da expressão de genes pró-inflamatórios, imunomoduladores e antiapoptóticos (Ghosh e Karin, 2002). Após sua fosforilação, I κ B é degradado no proteosoma, liberando NF κ B para o núcleo e ativando expressão gênica.

1.3- Tiazolidinedionas

Várias classes de drogas têm sido estudadas quanto à sua ação nos mecanismos de resistência insulínica. As tiazolidinedionas ou glitazonas (TZD) são drogas sensibilizadoras de insulina utilizadas no tratamento do diabetes tipo 2. Suas ações metabólicas incluem: diminuição das concentrações de glicose, insulina, triglicérides e ácidos graxos livres, sendo esses efeitos observados tanto em modelos animais de resistência insulínica como em indivíduos com diabetes tipo 2 (Diamant e Heime, 2003). Essas drogas são agonistas dos receptores PPAR γ que, por sua vez, são essenciais para a diferenciação e proliferação de adipócitos, assim como para a captação e armazenamento de ácidos graxos (Ahmed et al., 2007).

Os exatos mecanismos moleculares através dos quais as TZDs atuam no metabolismo da glicose ainda têm sido matéria de estudo. Um dos alvos de ação das TZD é a fosforilação do IRS-1 em Ser³⁰⁷. Ratos obesos da linhagem Zucker, apresentam aumento na fosforilação do IRS-1 em Ser³⁰⁷, diminuição da fosforilação em tirosina do IRS-1 e, conseqüentemente, diminuição da ativação da Akt. Tratamento com rosiglitazona reverteu esse efeito, diminuiu a hiperfosforilação e ativação da JNK e da p38 MAPK, assim como normalizou os níveis de ácidos graxos apresentados por esses animais, sugerindo que a diminuição da fosforilação em Ser³⁰⁷ pode ser um dos mecanismos da ação sensibilizadora das TZDs (Jiang et al., 2004).

Outra ação apresentada pelas TZDs consiste na reversão das alterações induzidas pelo TNF α na sinalização insulínica, restaurando a fosforilação em tirosina do IRS-1 tanto *in vitro* como em pacientes com diabetes melito tipo 2 (DM2) (Iwata et al., 2001; Miyazaki et al., 2003)

Em relação ao transporte da glicose, as glitazonas induzem aumento do transporte de glicose para o interior das células de tecido adiposo e muscular, sem aumento da concentração de GLUT4 (Weinstein et al., 1993; Kanoh et al., 2000; Standaert et al., 2002).

Outro aspecto importante na fisiopatologia do DM2 consiste na disfunção progressiva das células β causadas pela resistência crônica à insulina. As TZDs apresentam papel protetor sobre as células β , através de diversos efeitos: menor demanda de secreção de insulina, (Guerre-Millo et al., 2001; Leiter, 2005), efeito direto sobre as células (Ogawa et al., 1999) e inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias (Moller e Berger, 2003). Ainda que as TZDs possam apresentar efeitos independentes da ativação dos PPAR γ , os estudos indicam que esses receptores medeiam a maioria das ações dessas drogas, o que é evidenciado pela correlação entre a potência clínica de cada membro da classe com sua capacidade de ligação ao receptor (Willson et al., 1996).

Recente estudo demonstrou que várias ações das TZDs dependentes da ativação do PPAR γ são mediadas pela inibição da via de sinalização da JNK: o uso de rosiglitazona inibe a ativação da via da JNK estimulada pelo TNF α em cultura de adipócitos 3T3-L1, inibe a ativação da via da JNK induzida pela IL-1 β em células β e restaura a fosforilação do IRS-1 em camundongos *ob/ob* hiperglicêmicos (Días-Delfin et al., 2007).

1.4- Estatinas

Além das drogas que atuam no metabolismo da glicose e que são usadas no tratamento do DM2, outras classes farmacológicas têm apresentado efeito positivo sobre a resistência à insulina, reduzindo a progressão de síndrome metabólica para diabetes, entre elas as estatinas. Essa classe inclui substâncias inibidoras da 3-hidróxi-metilglutaril coenzima A redutase (HMGR) que atuam diminuindo a síntese do colesterol, sendo utilizadas para o tratamento das dislipidemias desde sua descoberta, na década de 70 (Endo et al., 1976; Istvan e Deisenhofer, 2001).

A síntese do colesterol ocorre a partir da condensação de três moléculas de acetato, resultando na formação de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA). A seguir, a enzima HMGR promove a redução irreversível da HMG-CoA a mevalonato, sendo essa, portanto, a etapa limitante da síntese do colesterol. O mevalonato será o precursor do farnesilpirofosfato (FPP). A fusão de duas moléculas de FPP e sua posterior conformação em anel dará origem ao colesterol.

No entanto, o FPP é também precursor de outras vias metabólicas, entre elas a modificação pós-translacional e localização na membrana celular de proteínas tais como a p21Ras (Hangcock et al., 1989). A localização do p21 Ras na membrana celular favorecerá sua ativação por fatores de crescimento, entre eles a insulina (Manne et al., 1990; Schaber et al., 1990; Jhun et al., 1994). A “farnesilação” do p21Ras é catalisada por uma enzima, a farnesiltransferase (Ftase) (Casey et al., 1989)

Recentes estudos têm demonstrado que outra ação da via da MAPK consiste na ativação e fosforilação da Ftase (Goldstone e Draznin, 1996). Assim, além de seu efeito inibindo a síntese do colesterol, as estatinas apresentam também efeito antimitogênico que pode inibir o crescimento de tumores, através da inibição da via do mevalonato (Ortiz et al., 1995). Além de sua ação sobre o metabolismo lipídico, estudos vêm demonstrando ação benéfica também sobre o metabolismo da glicose, diminuindo a resistência insulínica tanto em modelos animais como em humanos.

Foi demonstrado em cultura de células que superexpressam o receptor de insulina (HIRcB *cells*), que a adição de lovastatina ao meio resultou na diminuição da ativação da MAPK induzida pela insulina e na porcentagem de p21Ras ligado ao farnesil. Esses efeitos foram acompanhados pela diminuição da fosforilação em tirosina do receptor induzida pela insulina e foram prevenidos pelo tratamento do meio com mevalonato, demonstrando que os efeitos da droga eram conseqüentes à inibição da via de síntese de colesterol (Xu et al., 1996). Portanto, tais efeitos sugerem um possível papel na melhora da via metabólica da insulina.

Em 2001, Freeman e colaboradores avaliaram o desenvolvimento de diabetes melito em homens com idade entre 45 e 64 anos seguidos pelo *West of Scotland Coronary Prevention Stud* (WOSCOPS) e observaram que, em um total de 5.974 indivíduos acompanhados durante cinco anos, 139 tornaram-se diabéticos. Dentre os fatores estudados, os autores constataram que o uso de pravastatina diminuiu em 30% ($p=0.042$) o risco de desenvolver a doença (Freeman et al., 2001). A partir daí, foram estudados os efeitos de vários membros da classe das estatinas no metabolismo de glicose e na resistência insulínica.

Suzuki e colaboradores investigaram os efeitos da atorvastatina em camundongos KK/A que constituem um modelo animal de DM2 e observaram que os animais tratados com a estatina, quando comparados aos controles, apresentaram diminuição significativa no nível das frações de colesterol não HDL e, após o teste de tolerância à glicose, menor aumento da glicose aos 30 minutos do teste, diminuição das concentrações de insulina antes e 30 e 60 minutos após a sobrecarga e diminuição no índice de resistência insulínica. Os autores sugeriram que a melhora no metabolismo da glicose causada pela atorvastatina foi conseqüente à melhora na resistência à insulina (Suzuki et al., 2005).

Outro estudo em ratos Zucker magros e obesos, tratados com duas doses diferentes de atorvastatina e comparados a animais tratados com veículo, demonstrou melhora dose-dependente na sensibilidade à insulina tanto nos ratos Zucker magros como obesos. A dose mais alta da droga (atorvastatina 50mg/kg/dia) também resultou em aumento da captação de 2-deoxiglicose (2-DOG) pelo tecido muscular nos ratos magros. Da mesma forma, a fosforilação de Akt/PKB estimulada pela insulina no tecido muscular também aumentou significativamente nos animais tratados com a dose mais elevada da atorvastatina (50mg/kg/dia) (Wong et al., 2006).

O efeito da pravastatina sobre o metabolismo da glicose foi estudado em indivíduos recebendo 10mg/dia da droga e que foram submetidos a uma refeição rica em carboidratos antes e ao final de um ano de tratamento com a droga. Os autores avaliaram antes e após o tratamento a resistência insulínica através do HOMA-IR, área sobre a curva das dosagens de insulina, dosagens de peptídeo C e glicose plasmática. Os autores

observaram que, após o tratamento, não houve diferença entre os parâmetros em jejum e duas horas após a refeição, mas no tempo de 60 minutos houve diferença significativa nos indivíduos tratados, sugerindo que a droga, ao lado de seu efeito sobre o metabolismo lipídico, exerceria efeito sobre o metabolismo da glicose (Okada et al., 2005).

2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O trabalho foi constituído de suas partes com objetivos específicos:

- 2.1-** Investigar os efeitos da rosiglitazona sobre as etapas iniciais da sinalização insulínica em ratos alimentados com dieta hiperlipídica por período curto (quatro semanas).

- 2.2-** Investigar os efeitos da lovastatina em ratos alimentados com dieta hiperlipídica por período curto (quatro semanas):
 - 2.2.1- Sobre a via da PI3K.
 - 2.2.2- Sobre vias reguladoras do sinal insulínico.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Materiais

Os anticorpos antifosfotirosina (α PY), anti-RI (α IR), anti-IRS-1, anti-Akt1/2 e anti-pJNK foram fornecidos por Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA); o anticorpo anti-pAkt foi originário de Cell Signaling Technology (Beverly, MA); o anticorpo anti-PI3-K e anti-fosfo-IRS-1^{ser307} foi obtido de Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY). Insulina regular humana recombinante (Humulin® R) foi obtida de Elli Lilly Co. Reagentes rotineiramente utilizados foram obtidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), enquanto a [¹²⁵I]-Protein A específica foi fornecida por Amersham (Amersham Biosciences Group, Little Chalfont, UK).

3.2- Animais

Os procedimentos experimentais foram realizados, utilizando-se ratos machos da linhagem Wistar, com quatro a seis semanas de vida, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas. Foram utilizadas duas dietas diferentes: dieta padrão, normalmente utilizada para esses animais e dieta hiperlipídica, cujo conteúdo lipídico é obtido de gordura de porco. A Tabela 1 contém a composição de cada dieta.

Tabela 1- Composição das dietas

COMPONENTE	DIETA PADRÃO	DIETA HIPERLIPÍDICA
Carboidratos	70kcal%	35kcal%
Proteínas	20kcal%	20kcal%
Lipídeos	10kcal%	45kcal% (gordura de porco)

3.2.1- Para o estudo dos efeitos da rosiglitazona, os animais foram divididos em três grupos:

- ◆ Grupo C: alimentados com dieta padrão;
- ◆ Grupo DHL: alimentados com a dieta hiperlipídica;
- ◆ Grupo rosiglitazona (R): alimentados com a dieta hiperlipídica e tratados com a rosiglitazona.

Os animais dos três grupos foram mantidos em regime de sono-vigília, em gaiolas com três animais e com ingestão hídrica *ad libitum*, cada grupo tendo sido alimentado com sua respectiva dieta por um período de quatro semanas. Os três grupos apresentavam a mesma média de peso corporal no início do experimento. Durante a última semana cada grupo recebeu o seguinte tratamento:

- ◆ Grupo C: administração diária, noturna, de 10ml de veículo (solução de NaCl 0,9%) através de sonda gástrica;
- ◆ Grupo DHL: administração diária, noturna, de 10ml de veículo (solução de NaCl 0,9%) através de sonda gástrica;
- ◆ Grupo R: administração de rosiglitazona na dose de 3mg/kg de peso corporal, diluída em 10ml de veículo, através de sonda gástrica.

A dieta foi retirada 12 horas antes do início do experimento e uma hora antes da realização do experimento, cada animal recebeu uma última dose da droga ou do veículo através de sonda gástrica.

3.2.2- Para o estudo dos efeitos da lovastatina, os animais foram divididos em três grupos:

- ◆ Grupo C: alimentados com a dieta padrão;
- ◆ Grupo DHL: alimentados com a dieta hiperlipídica;
- ◆ Grupo L: alimentados com a dieta hiperlipídica e tratados com a lovastatina.

Os animais dos três grupos foram mantidos em regime de sono-vigília, em gaiolas com três animais e com ingestão hídrica *ad libitum*, cada grupo tendo sido alimentado com sua respectiva dieta por um período de quatro semanas. Os três grupos apresentavam a mesma média de peso corporal no início do experimento. Durante a última semana cada grupo recebeu o seguinte tratamento:

- ◆ Grupo C: administração diária, noturna, de 10ml de veículo (solução de NaCl 0,9%) através de sonda gástrica;
- ◆ Grupo HFD: administração diária, noturna, de 10ml de veículo (solução de NaCl 0,9%) através de sonda gástrica;
- ◆ Grupo L: administração de lovastatina na dose de 6mg/kg de peso corporal, diluída em 10ml de veículo, também através de sonda gástrica.

Doze horas antes do procedimento a dieta era retirada e os animais recebiam a última administração de veículo ou de droga uma hora antes do experimento ser iniciado.

Antes de cada experimento, os animais eram anestesiados com tiopental sódico, na dose de 25mg por quilo de peso corporal, por via intraperitoneal, e eram utilizados para os procedimentos, assim que o estado anestesiado era garantido pela perda dos reflexos de retirada da pata e corneano.

3.3- Métodos

3.3.1- Extração de tecidos e imunoprecipitação

Após a anestesia, os animais eram colocados em decúbito dorsal e procedia-se à abertura da cavidade abdominal e identificação e exposição da veia cava, onde era injetado: 0.5ml de solução salina ou insulina regular (Humulin® R Elli Lilly Co) na dose de 6µg. Em seguida, eram extraídos fragmentos de fígado e músculo a 30 e 90 segundos após a injeção, respectivamente. Os fragmentos eram cortados e homogeneizados imediatamente em um tampão de extração (1% Triton-X 100, 100 mM Tris, pH 7,4, contendo 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 10 mM de vanadato de sódio, 2 mM PMSF e 0.1 MG de aprotinina/ml) a 4 °C com um Polytron PTA 20S

Generator (*Brinkmann Instruments* modelo PT 10/35) operado a velocidade máxima por 30 segundos.

Os extratos eram então centrifugados a 15.000 rpm, a 4°C, em uma centrífuga Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA) por 45 minutos, para remoção de material insolúvel. Após esse processo, alíquotas do sobrenadante, contendo 2.0 MG de proteína desses tecidos eram usadas para imunoprecipitação com 10µl de anticorpos policlonais: anti-αRI, αIRS-1, anti-Akt (Cell Signaling Technology, MA), anti-phospho-[Thr183]-JNK, anti-phospho-IRS-1^{ser307} e anti-IκBα. Os imunocomplexos eram então precipitados com Proteína A Sepharose 6 MB ou Proteína A/G plus e submetidos a *blotting* com anticorpo anti-fosfotirosina (αPy), anti-RI, anti-IRS-1, anti-p85/PI3 kinase.

3.3.2- Análise de proteínas por *immunoblotting*

As proteínas precipitadas e/ou os extratos de tecido total eram tratados com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970), contendo 100 mM de ditiotreitol e aquecidos em banho com água fervente por 5 minutos, após o que eram submetidas à SDS-PAGE em placa de gel em aparato miniatura Bio-Rad (Mini-Protean). Para avaliação dos extratos totais, 250 µg de proteínas eram submetidas ao SDS-PAGE. Eletrotransferência de proteínas do gel para membrana de nitrocelulose era realizada durante 120 minutos a 120 V em um aparato Bio-Rad Mini-Protean de transferência, segundo técnica descrita por Towbin e colaboradores (Towbin et al., 1979). Com o objetivo de reduzir ligação não específica de proteínas à nitrocelulose, as membranas eram pré-incubadas por duas horas em tampão bloqueador (5% de leite em pó desnatado, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.02% Tween 20). As membranas de nitrocelulose eram então incubadas com os anticorpos específicos a 4° C, durante a noite e a seguir com 2mCi[¹²⁵I]-proteína A (30µCi/µg). Os resultados eram visualizados por auto-radiografias com filme KodaK XAR *preflashed*. A intensidade de cada banda, correspondente a determinada proteína era quantificada através de densitometria óptica. (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA; model GS300).

3.3.3- Teste de tolerância à insulina

Para a avaliação da sensibilidade à insulina foi realizado teste intravenoso de tolerância à insulina (IVITT) conforme se segue: após os animais terem sido anestesiados, como descrito para a retirada de tecidos (administração de 25mg/kg de peso corporal de tiopental sódico por via intraperitoneal), eram coletados 40 µl de sangue de suas caudas e administrado 1U/kg de peso corporal de insulina por via intravenosa. A seguir, amostras de sangue eram coletadas nos tempos 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção e encaminhadas para dosagem de glicose plasmática através do método da glicose-oxidase. A partir desses resultados era calculada a constante de decaimento da glicose (Kitt) usando-se a seguinte fórmula: $K_{itt} = 0.693/(t_{1/2})$. O $t_{1/2}$ da glicose plasmática, por sua vez, é calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima, durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de (Bonora et al., 1989).

3.3.4- Dosagem de glicose

As concentrações de glicose para o cálculo do K_{itt} foram determinadas pelo método enzimático da glicose-oxidase.

3.3.5- Dosagem de insulina

A concentração de insulina plasmática foi determinada por radioimunoensaio juntando-se 0,1mL de cada amostra (em duplicata) a 0,2mL de solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina marcada com ^{125}I (Iodo (^{125}I)) em tampão fosfato, pH 7,4 acrescido de NaCl 0,9% e albumina 0,5%. Foram preparados controles com apenas 0,2mL do tampão fosfato contendo insulina marcada (^{125}I) para avaliação da radiação máxima e com 0,2 mL do tampão fosfato contendo insulina marcada (^{125}I) e 0,1ml de tampão fosfato para determinar possíveis interferências no ensaio pelos componentes do tampão. Como zero da curva padrão, utilizou-se controle com 0,2mL de solução tampão fosfato contendo insulina marcada com ^{125}I e anticorpo anti-insulina e 0,1mL de tampão fosfato.

3.4- Análise estatística

Todos os grupos de animais foram estudados em paralelo. As comparações entre os diferentes grupos foram feitas através do teste t de Student para amostras não pareadas. Os resultados são expressos como unidades arbitrárias, representando a Média \pm SEM (erro padrão) da variação percentual em relação ao controle, que foi de 100% em todas as ocasiões. Foi adotado o nível de significância: $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Rosiglitazona

No estudo dos efeitos da rosiglitazona sobre as etapas iniciais da sinalização insulínica, os resultados encontrados foram:

4.1.1- Teste de tolerância à insulina

Os animais alimentados com a dieta hiperlipídica apresentaram K_{itt} significativamente menor do que os animais do grupo controle, caracterizando menor sensibilidade à insulina neste grupo (C: $4,3 \pm 0,6$ vs. DHL: $1,7 \pm 0,4$; $p < 0,05$). O uso da rosiglitazona reverteu esse resultado, tendo o grupo apresentado K_{itt} semelhante ao do grupo controle (C: $4,3 \pm 0,6$ vs. R: $3,5 \pm 0,5$) (Figura 1).

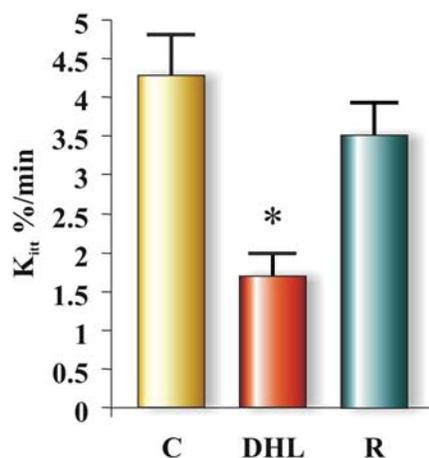


Figura 1-Teste de tolerância à insulina. Os três grupos: C, DHL e R foram submetidos ao teste de tolerância à insulina intravenosa, conforme descrito em Materiais e métodos. Amostras de sangue foram coletadas da cauda dos animais anestesiados nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção de 1U/kg de peso de insulina regular. As concentrações de glicose foram medidas através do método da glicose-oxidase e a taxa de decaimento da glicose (K_{itt}) foi calculada. Observou-se que os ratos alimentados com a dieta hiperlipídica apresentaram menor sensibilidade à insulina que o grupo controle, como evidenciado pelo K_{itt} (C: $4,3 \pm 0,6$ %/min vs. DHL: $1,7 \pm 0,4$ %/min; $p < 0,05$) e o uso da rosiglitazona aumentou a sensibilidade ao hormônio (K_{itt} L: $3,5 \pm 0,5$ %/min vs. DHL: $1,7 \pm 0,4$ %/min; $p < 0,05$).

4.1.2- Tecido hepático

Foi observada diminuição significativa na fosforilação do IRS-1 estimulada pela insulina nos ratos alimentados com a dieta hiperlipídica (DHL) comparada com os animais controle (C), tendo este efeito sido revertido nos animais alimentados com a dieta e tratados com a rosiglitazona (R) (C: $100\pm 9\%$ vs. DHL: $81\pm 22\%$ vs. R: $119\pm 18\%$; $p < 0,05$) (Figura 2A). A análise da associação do IRS-1 com a PI3-quinase demonstrou comportamento semelhante ao observado anteriormente, com diminuição dessa associação nos animais que utilizaram a dieta hiperlipídica e recuperação após o uso da droga (C: $100\pm 12\%$ vs. DHL: $66\pm 27\%$ vs. R: $105\pm 35\%$; $p < 0,05$) (Figura 2B). A fosforilação da enzima Akt induzida pela insulina também decresceu nos ratos alimentados com a dieta experimental comparados aos que usaram a dieta padrão e, da mesma forma, o tratamento com a droga normalizou a fosforilação do Akt em nível semelhante ao do controle (C: $100\pm 7\%$ vs. DHL: $38\pm 4\%$ vs. R: $82\pm 10\%$ $p < 0,05$) (Figura 2C).

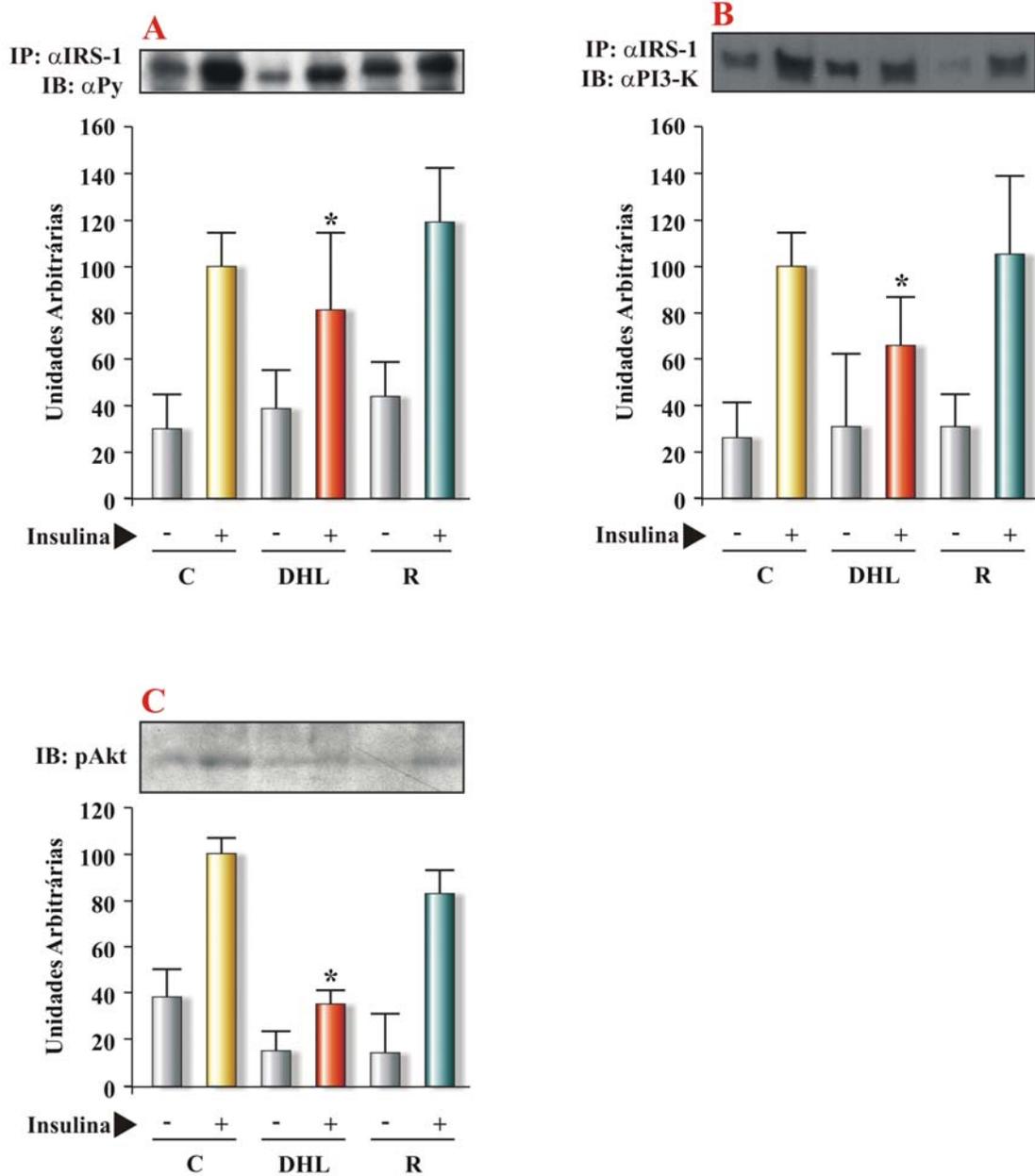


Figura 2- Sinalização insulínica em tecido hepático de animais controle (C), animais alimentados com dieta hiperlipídica durante quatro semanas (DHL) e animais alimentados com a dieta hiperlipídica pelo mesmo tempo e tratados com rosiglitazona durante a última semana (R). Nos animais que receberam infusão de insulina (+), as amostras de tecido eram retiradas 30 segundos após a injeção. Figura 2A: imunoprecipitação (IP) com anticorpo anti-IRS-1 e *immunoblotting* (IB) com anticorpo anti- α PY. (C: $100 \pm 9\%$ vs. DHL: $81 \pm 22\%$ vs. R: $119 \pm 18\%$; * $p < 0,05$). Figura 2B: IP com anti-IRS-1 e IB com anti-PI3K (C: $100 \pm 12\%$ vs. DHL: $66 \pm 27\%$ vs. R: $105 \pm 35\%$; * $p < 0,05$). Figura 2C: IB com anti-pAkt (C: $100 \pm 7\%$ vs. DHL: $38 \pm 4\%$ vs. R: $82 \pm 10\%$, * $p < 0,05$).

4.1.3- Tecido muscular

Em tecido muscular, observamos decréscimo estatisticamente significativo na fosforilação do IRS-1 estimulado pela insulina nos ratos alimentados com a dieta hiperlipídica (DHL) comparados aos animais do grupo controle (C) e este efeito foi modificado, com valores semelhantes aos normais no grupo que recebeu a droga (R) (C: $100 \pm 14\%$ vs. DHL: $59 \pm 16\%$ vs. R: $117 \pm 23\%$; $p < 0,05$) (Figura 3A). De forma semelhante ao encontrado no tecido hepático, a associação IRS-1/PI3-quinase no grupo alimentado com a dieta hiperlipídica (DHL) foi significativamente menor do que a do grupo controle (C) e o uso da rosiglitazona (R) reverteu esse resultado a valores semelhantes aos do grupo controle (C: $100 \pm 2\%$ vs. DHL: $48 \pm 8\%$ vs. R: $93 \pm 7\%$; $p < 0,05$) (Figura 3B). Da mesma forma, a fosforilação da Akt induzida pela insulina, apresentou resultados semelhantes (C: $100 \pm 10\%$ vs. DHL: $45 \pm 8\%$, vs. R: $82 \pm 12\%$; $p < 0,05$) (Figura 3C).

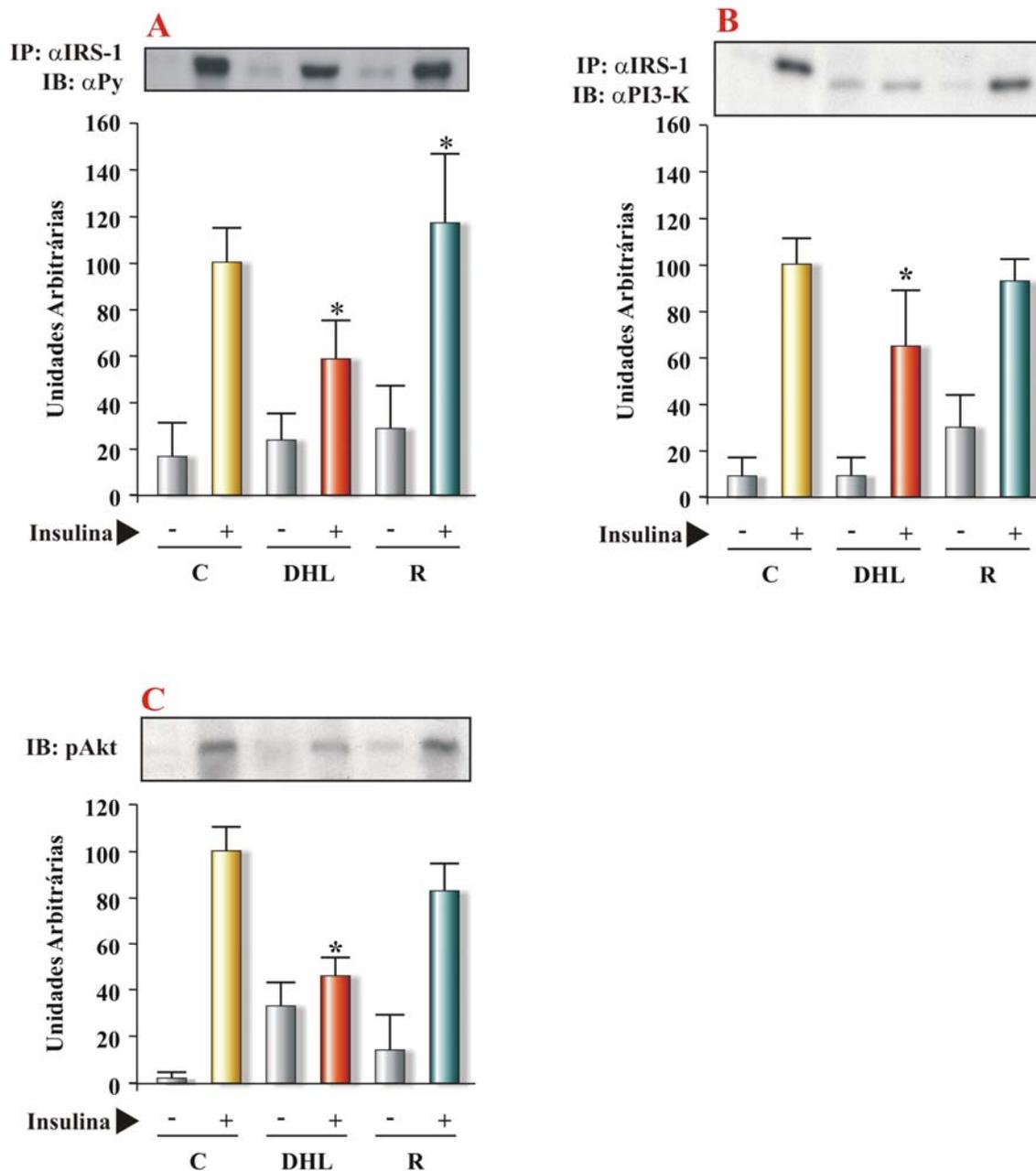


Figura 3- Sinalização insulínica em tecido muscular de animais controle (C), animais alimentados com dieta hiperlipídica durante quatro semanas (DHL) e animais alimentados com a dieta hiperlipídica pelo mesmo tempo e tratados com rosiglitazona durante a última semana (R). Nos animais que receberam infusão de insulina (+), as amostras de tecido eram retiradas 90 segundos após a injeção. Figura 3A: IP: anti-IRS-1, IB: anti- α Py (C: $100 \pm 14\%$ vs. DHL: $59 \pm 16\%$ vs. R: $117 \pm 23\%$; * $p < 0,05$). Figura 3B: IP: anti-IRS-1, IB: anti-PI3K (C: $100 \pm 2\%$ vs. DHL: $48 \pm 8\%$ vs. R: $93 \pm 7\%$; * $p < 0,05$). Figura 3C: IB anti-pAKT (C: $100 \pm 10\%$ vs. DHL: $45 \pm 8\%$, vs. R: $82 \pm 12\%$; * $p < 0,05$).

4.2- Lovastatina

4.2.1- Características dos animais

4.2.1.1- Peso

Os ratos alimentados com a dieta hiperlipídica apresentaram média de peso ao final do período de quatro semanas superior à média apresentada pelo grupo controle (C: 347 ± 12 g x DHL: 412 ± 5 g; $p < 0,05$). O grupo alimentado com a dieta e tratado com a lovastatina também apresentou peso superior ao do grupo controle, mas sem diferença significativa com o grupo que recebeu apenas a dieta (C: 347 ± 12 g vs. L: 426 ± 20 g; $p < 0,05$) (Tabela 2).

4.2.1.2- Insulina

Os níveis plasmáticos de insulina dos animais tratados com a dieta hiperlipídica foram significativamente superiores aos apresentados pelo grupo controle (C: $2,22 \pm 0,12$ ng/ml vs. DHL: $3,76 \pm 0,24$ ng/mL; $p < 0,05$). No entanto, o grupo alimentado com a dieta hiperlipídica e que foi tratado com a lovastatina apresentou nível plasmático de insulina menor do que o do grupo apenas alimentado com a dieta e semelhante ao apresentado pelo grupo controle (DHL: $3,76 \pm 0,24$ ng/mL vs. L: $2,68 \pm 0,08$ ng/mL; $p < 0,05$). A Tabela 2 apresenta esses resultados.

Tabela 2- Características dos animais: peso (g) e concentração plasmática de insulina (ng/ml) dos três grupos C, DHL e L, expressos em Média \pm EM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

	C	DHL	L
Peso (g)	347 ± 12	$412 \pm 5^*$	$426 \pm 20^*$
Insulina (ng/ml)	$2,22 \pm 0,12$	$3,76 \pm 0,24^*$	$2,68 \pm 0,08$

4.2.1.3- Teste de tolerância à insulina

O grupo de ratos alimentado com a dieta hiperlipídica mostrou-se mais resistente à insulina do que o grupo controle, como pode ser observado pelos valores da constante de decaimento da glicose obtida pelo teste de tolerância à insulina (K_{itt}) (C: $4,3 \pm 0,6$ %/min vs. DHL: $1,7 \pm 0,4$ %/min; $p < 0,05$). O tratamento com a lovastatina aumentou a sensibilidade ao hormônio, tendo esse grupo apresentado K_{itt} semelhante à do grupo que foi alimentado com a dieta padrão (C: $4,3 \pm 0,6$ %/min vs. L: $3,3 \pm 0,5$ %/min; $P > 0,05$), mas diferente estatisticamente do grupo da dieta hiperlipídica (DHL: $1,7 \pm 0,4$ %/min vs. L: $3,3 \pm 0,5$ %/min; $p < 0,05$) (Figura 4).

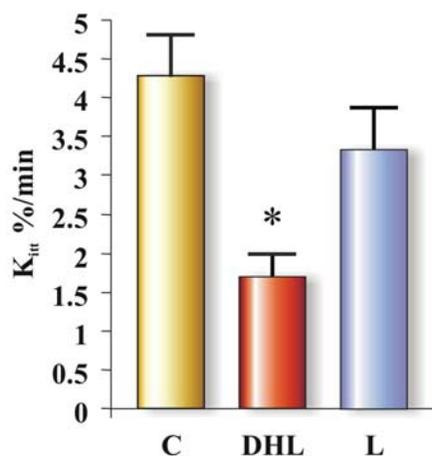


Figura 4- Teste de tolerância à insulina. Os três grupos: C, DHL e L foram submetidos ao teste de tolerância à insulina intravenosa, conforme descrito em Materiais e métodos. Amostras de sangue foram coletadas da cauda dos animais anestesiados nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção de 1U/kg de peso de insulina regular. As concentrações de glicose foram medidas através do método da glicose-oxidase e a taxa de decaimento da glicose (K_{itt}) foi calculada. Observou-se que os ratos alimentados com a dieta hiperlipídica apresentaram menor sensibilidade à insulina que o grupo controle, como evidenciado pelo K_{itt} (C: $4,3 \pm 0,6$ %/min vs. DHL: $1,7 \pm 0,4$ %/min; $p < 0,05$) e o uso da lovastatina aumentou a sensibilidade ao hormônio (K_{itt} L: $3,3 \pm 0,5$ %/min vs. DHL: $1,7 \pm 0,4$ %/min; $*p < 0,05$).

4.2.2- Vias de sinalização em tecido hepático

4.2.2.1- Estudo dos efeitos sobre a via da PI3K

Não houve nenhuma diferença entre os três grupos, no que se refere à concentração do receptor de insulina (Figura 5A). O grau de fosforilação do IR em resíduos tirosina estimulada pela insulina no grupo DHL diminuiu à metade em relação ao grupo controle (C: $100\pm 4\%$ vs. DHL: $48\pm 5\%$, $p < 0,001$). Já no grupo L, a fosforilação do IR foi semelhante ao controle, demonstrando que o efeito da dieta foi anulado pela droga (DHL: $48\pm 5\%$ vs. L: $101\pm 9\%$, $p < 0,001$) (Figura 5B).

A análise da fosforilação em serina do IR mostrou que a dieta induziu maior fosforilação do receptor nesse resíduo em comparação com o controle (C: $100\pm 10\%$ vs. DHL: $157\pm 8\%$, $p < 0,05$). O uso da lovastatina reverteu esse efeito (DHL: $157\pm 8\%$ vs. L: $112\pm 4\%$, $p < 0,05$) (Figura 5C). Comportamento semelhante foi observado na enzima PTP1B (C: $100\pm 12\%$ vs. DHL: $140\pm 8\%$, $p < 0,05$; DHL: $140\pm 8\%$ vs. L: $95\pm 10\%$, $p < 0,05$) (Figura 5D).

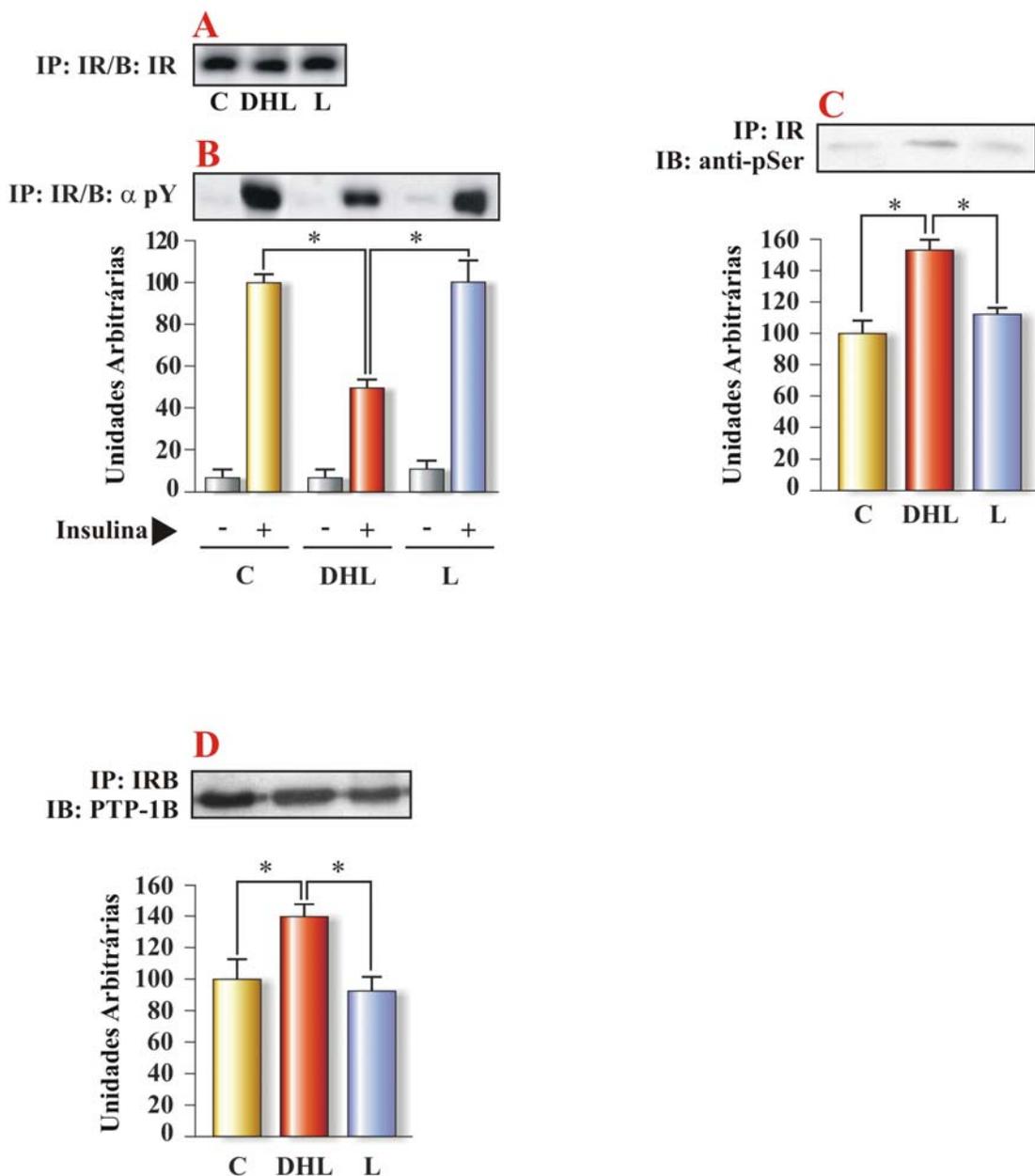


Figura 5- Estudo dos efeitos da lovastatina sobre a via da PI3K em tecido hepático. Figura 5A: IR: anti-IR, IB: anti-IR, não houve diferença na concentração do IR entre os três grupos. Figura 5B: IP: anti-IR, IB: anti- α PY, foi encontrada diferença entre o grupo DHL em relação ao C e entre o primeiro e o grupo L (C: $100 \pm 4\%$ vs. DHL: $48 \pm 5\%$ vs. L: $101 \pm 9\%$, $*p < 0,001$). Figura 5C: IP: anti-IR, IB: anti-pSer, o grupo DHL apresentou fosforilação de IR em serina maior do que os grupos C e L ((C: $100 \pm 10\%$ vs. DHL: $157 \pm 8\%$ vs. L: $112 \pm 4\%$, $*p < 0,05$). Figura 5D: IB: PTP!B: a dieta hiperlipídica induziu maior expressão da enzima, normalizada após o uso da droga (C: $100 \pm 12\%$ vs. DHL: $140 \pm 8\%$, $*p < 0,05$; DHL: $140 \pm 8\%$ vs. L: $95 \pm 10\%$, $*p < 0,05$).

Em relação aos níveis da proteína IRS-1 no tecido hepático dos três grupos, não foram observadas diferenças significativas (Figura 6A). No entanto, quando se estudou a fosforilação induzida pela insulina desse substrato, observamos diminuição no grupo DHL, ainda que a diferença não tenha atingido significância estatística (C: $100 \pm 3\%$ vs. DHL: $76 \pm 7\%$). O uso da lovastatina resultou em aumento na fosforilação induzida pela insulina do IRS-1, em grau discretamente superior aos do controle e estatisticamente diferente do grau de fosforilação dos animais apenas alimentados com a dieta (DHL: $76 \pm 7\%$ vs. L: $112 \pm 14\%$, $p < 0,05$) (Figura 6B).

A associação IRS-1/PI3-quinase apresentou comportamento semelhante entre os grupos controle e alimentados com a dieta (C: $100 \pm 0,5\%$ vs. DHL: $40 \pm 4\%$, $p < 0,001$) e após o uso da droga (DHL: $40 \pm 4\%$, vs. L: $121 \pm 4\%$, $p < 0,001$) (Figura 6C).

Os níveis protéicos de Akt também não foram diferentes entre os grupos (Figura 6D), mas os animais DHL apresentaram menor fosforilação em serina estimulada pela insulina da Akt do que os animais controle, com reversão dessa diferença, quando tratados com a droga (C: $100 \pm 5\%$ vs. DHL: $70 \pm 2\%$, $p < 0,001$; DHL: $70 \pm 2\%$ vs. L: $95 \pm 5\%$, $p < 0,001$) (Figura 6E).

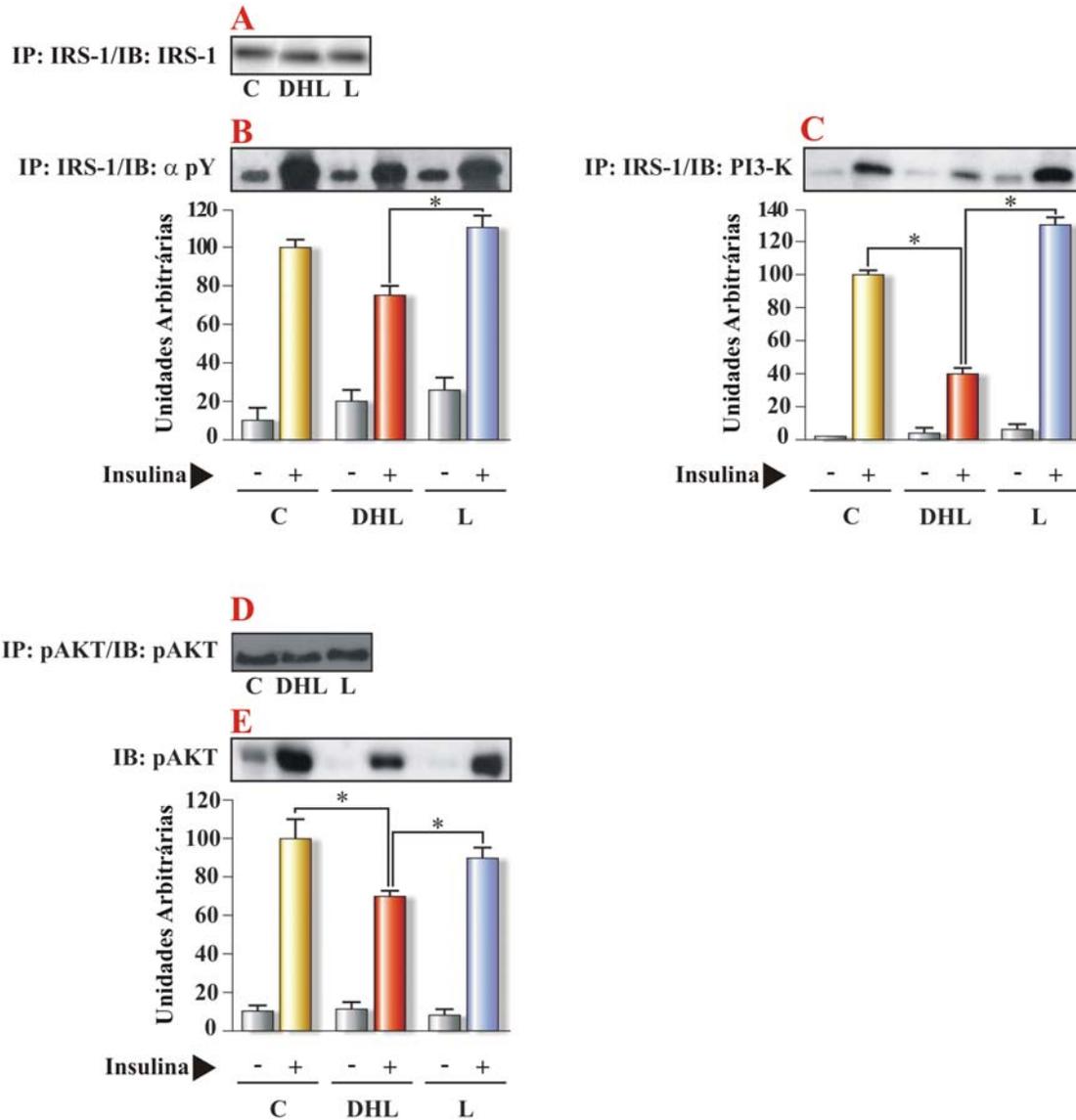


Figura 6- Estudo dos efeitos da lovastatina sobre a via da PI3K em tecido hepático. Figura 6A: IP: anti-IRS-1, IB: anti-IRS-1, não foi observada diferença na concentração da proteína IRS-1 entre os três grupos. Figura 6B: IP: anti-IRS-1, IB: anti- α PY, a fosforilação do IRS-1 apresentou-se diminuída no grupo DHL, ainda que a valores não estatisticamente significativos (C: $100 \pm 3\%$ vs. DHL: $76 \pm 7\%$), mas o grupo L apresentou aumento significativo da fosforilação (DHL: $76 \pm 7\%$ vs. L: $112 \pm 14\%$, $*p < 0,05$). Figura 6C: IP: anti-IRS-1, IB: anti-PI3K, comportamento semelhante ao anterior foi observado, mas com significância estatística (C: $100 \pm 0,5\%$ vs. DHL: $40 \pm 4\%$ vs. L: $121 \pm 4\%$, $*p < 0,001$). Figura 6D: IP: anti-pAkt, a concentração de pAkt nos três grupos foi semelhante. Figura 6E: IB: anti-pAkt, a ativação da enzima apresentou comportamento semelhante ao da PI3K (C: $100 \pm 5\%$ vs. DHL: $70 \pm 2\%$ vs. L: $95 \pm 5\%$, $*p < 0,001$).

4.2.2.2- Estudo das vias de regulação

O consumo da dieta rica em lipídeos aumentou significativamente o nível de phospho-IRS-1^{ser307} comparado ao controle e o tratamento com a droga resultou em valores similares aos do grupo controle (C: $100 \pm 5\%$ vs. DHL: $171 \pm 20\%$, $p < 0,001$; DHL vs. L: $113 \pm 12\%$, $p < 0,001$) (Figura 7A). De forma semelhante, a dieta causou aumento nos níveis de fosforilação da JNK em treonina (pJNK), efeito que não foi observado no grupo alimentado com a dieta e tratado com a lovastatina (C: $100 \pm 7\%$ vs. DHL: $162 \pm 3\%$, $p < 0,001$; DHL: $162 \pm 3\%$ vs. L: $141 \pm 3\%$, $p < 0,01$) (Figura 7C).

Em relação ao I κ B α , foi observada diminuição da proteína, sugerindo maior ativação do IKK β efeito que não foi encontrado após o uso da droga (C: $100 \pm 6\%$ vs. DHL: $44 \pm 4\%$ vs. L: $67 \pm 2\%$, $*p < 0,05$) (Figura 7C). A figura D representa a concentração de actina nos três grupos como controle de concentração protéica (Figura 7D).

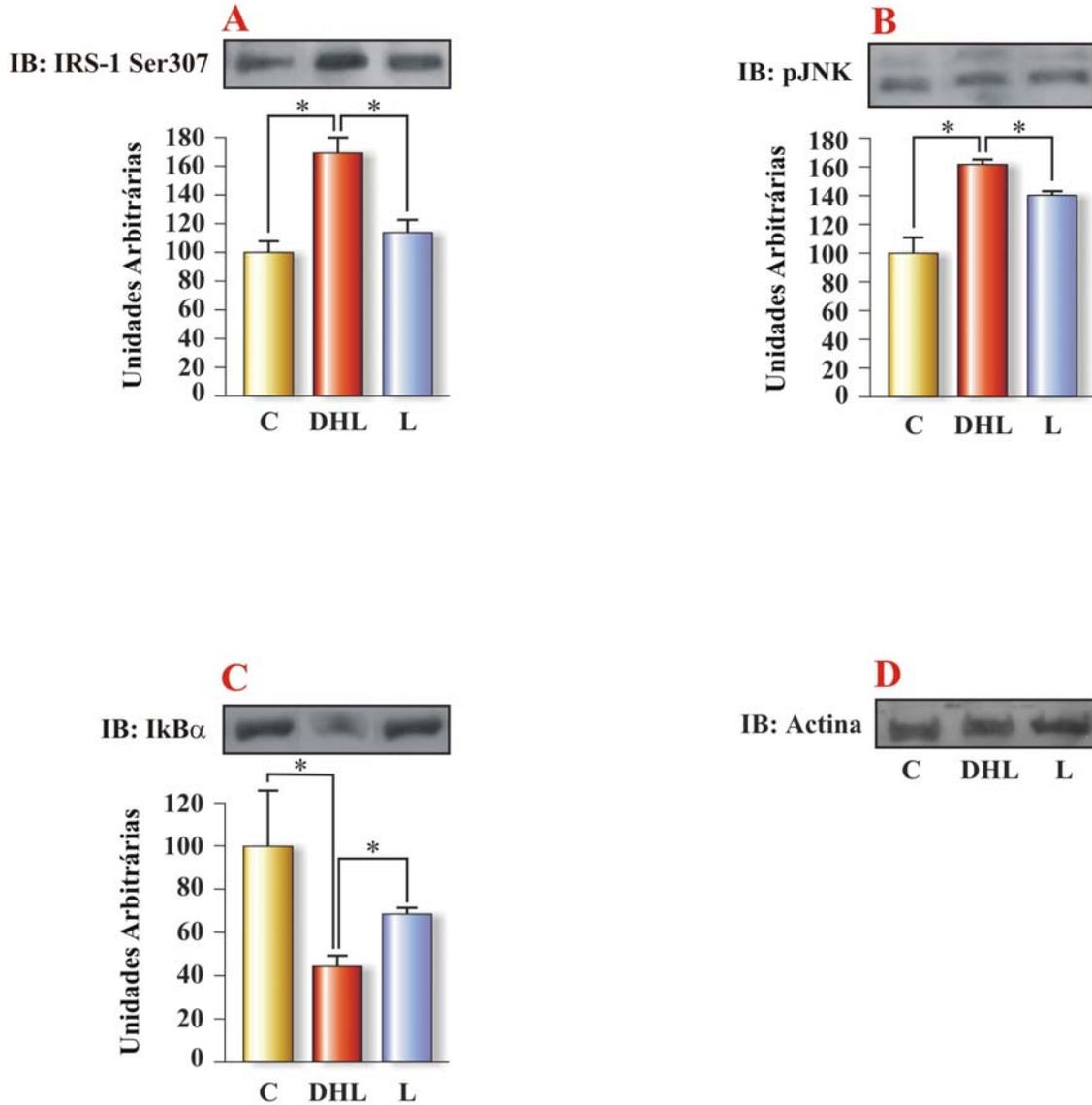


Figura 7- Avaliação das vias de regulação em tecido hepático. Figura 7A: IB: anti-IRS-1^{Ser307}, no grupo DHL, a fosforilação do IRS-1 em serina foi maior do que nos grupos C e L (C: 100 ± 5% vs. DHL: 171 ± 20% vs. L: 113 ± 12%, *p<0,001). Figura 7B: IB: anti-pJNK, o grupo DHL apresentou maior fosforilação da enzima do que o grupo C e o grupo L apresentou diminuição da pJNK em relação ao DHL (C: 100±7% vs. DHL: 162±3% vs. L: 141± 3%, *p<0,01). Figura 7C: IB: IκBα, o grupo DHL apresentou diminuição do IκBα comparado tanto ao C como ao L (C: 100 ± 6% vs. DHL: 44 ± 4% vs. L: 67± 2%, *p<0,05). Figura 7D: não houve diferença na concentração de actina nos três grupos.

4.2.3- Vias de sinalização em tecido muscular

4.2.3.1- Estudo dos efeitos sobre a via da PI3K

Em tecido muscular não foi encontrada nenhuma diferença entre as concentrações protéicas do receptor de insulina nos três grupos estudados (Figura 8A). Apesar da diminuição de aproximadamente 25% da fosforilação em tirosina estimulada pela insulina do receptor nos animais DHL, essa diferença não teve significado estatístico (C: $100 \pm 17\%$; DHL: $76 \pm 4\%$; L: $129 \pm 23\%$) (Figura. 8B). No entanto, a fosforilação do IR em serina aumentou nos animais alimentados com a dieta hiperlipídica e esta diferença foi suprimida pelo uso da droga (C: $100 \pm 8\%$ vs. DHL: $155 \pm 8\%$ vs. L: $116 \pm 5\%$, $p < 0,05$) (Figura 8C).

O comportamento da enzima PTP1B mostrou-se semelhante ao descrito para a fosforilação em serina do IR com aumento nos animais DHL e níveis sem diferença entre os controles e o grupo tratado com a lovastatina (C: $100 \pm 10\%$ vs. DHL: $140 \pm 8\%$, $p < 0,05$; DHL: $140 \pm 8\%$ vs. L: $105 \pm 8\%$, $p < 0,05$); (Figura 8D).

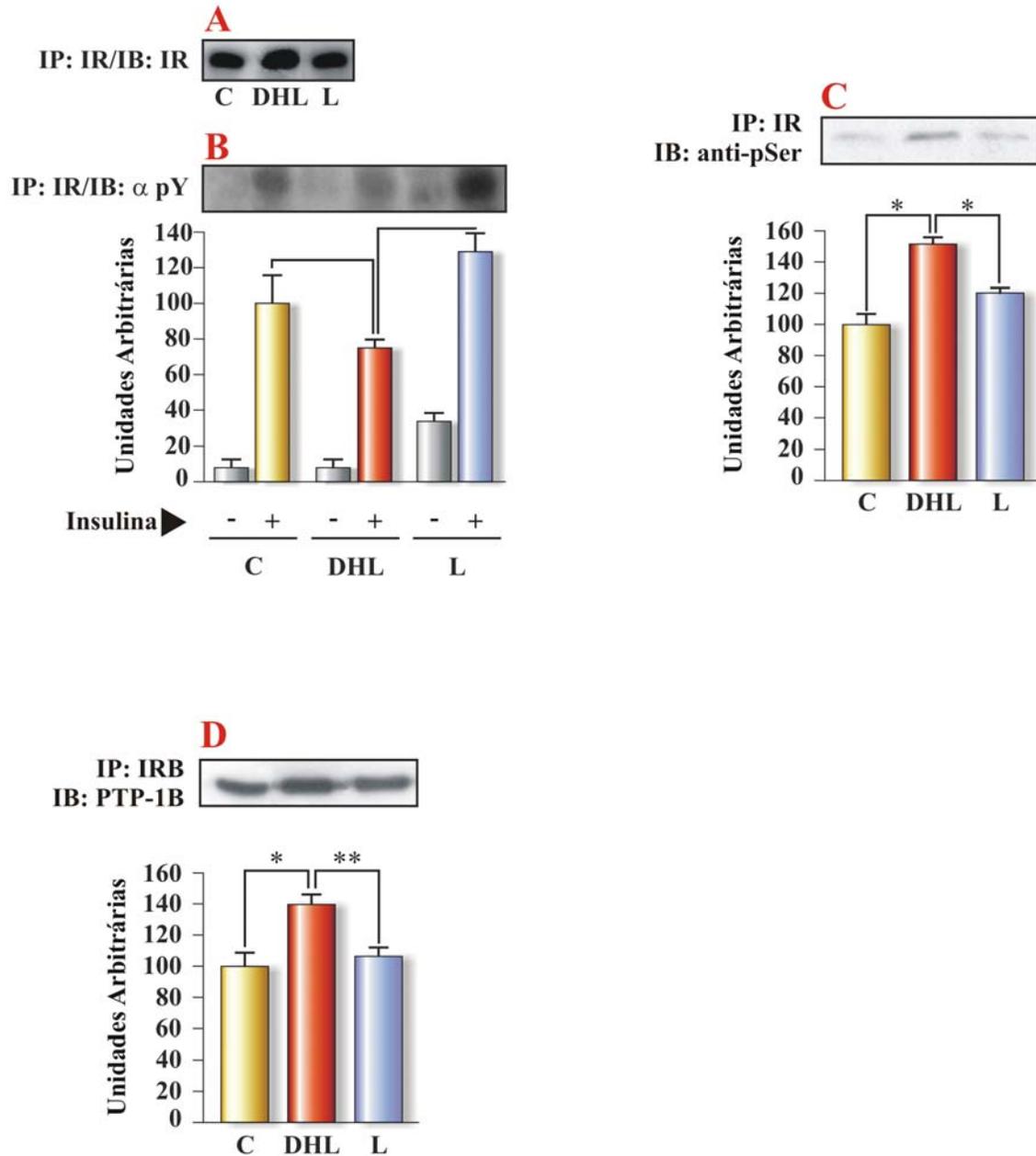


Figura 8- Estudo dos efeitos da lovastatina sobre a via da PI3K em tecido muscular. Figura 8A: IR: anti-IR, IB: anti-IR, não houve diferença na concentração do IR entre os três grupos. Figura 8B: IP: anti-IR, IB: anti- α PY, o grau de fosforilação do IR mostrou-se diminuído no grupo DHL comparado tanto ao grupo C como L, mas sem significância estatística (C: $100 \pm 17\%$; DHL: $76 \pm 4\%$; L: $129 \pm 23\%$). Figura 8C: IP: anti-IR, IB: anti-pSer, a fosforilação em serina do IR no grupo DHL mostrou-se elevada, com valores próximos ao C no grupo L (C: $100 \pm 8\%$ vs. DHL: $155 \pm 8\%$ vs. L: $116 \pm 5\%$, $*p < 0,05$). Figura 8D: IB: PTP1B, o grupo DHL apresentou maior atividade da PTP1B comparado aos grupos C e L (C: $100 \pm 10\%$ vs. DHL: $140 \pm 8\%$ vs. L: $105 \pm 8\%$, $*p < 0,05$).

Em relação à concentração do IRS-1, não foi observada nenhuma diferença, contudo, a fosforilação do IRS-1 em resíduos de tirosina estimulada pela insulina foi menor no grupo DHL comparado ao controle e o tratamento com a estatina preveniu tal efeito da dieta (C: $100 \pm 5\%$ vs. DHL: $51 \pm 7\%$, $p < 0,001$; DHL vs. L: $151 \pm 3\%$, $p < 0,001$) (Figuras 9A e B).

O mesmo comportamento foi observado na associação IRS-1 com a enzima PI3K (C: $100 \pm 1\%$ vs. DHL: $54 \pm 20\%$, $p < 0,001$; DHL vs. L: $179 \pm 11\%$, $p < 0,001$) (Figura 9C).

A concentração protéica da Akt foi semelhante nos três grupos, mas sua fosforilação em serina, após o estímulo insulínico, mostrou-se menor no grupo DHL comparada ao controle e, da mesma forma, a lovastatina reverteu essa alteração (C: $100 \pm 2\%$ vs. DHL: $64 \pm 2\%$, $p < 0,001$; DHL vs. L: $116 \pm 7\%$, $p < 0,001$) (Figuras 9D e E).

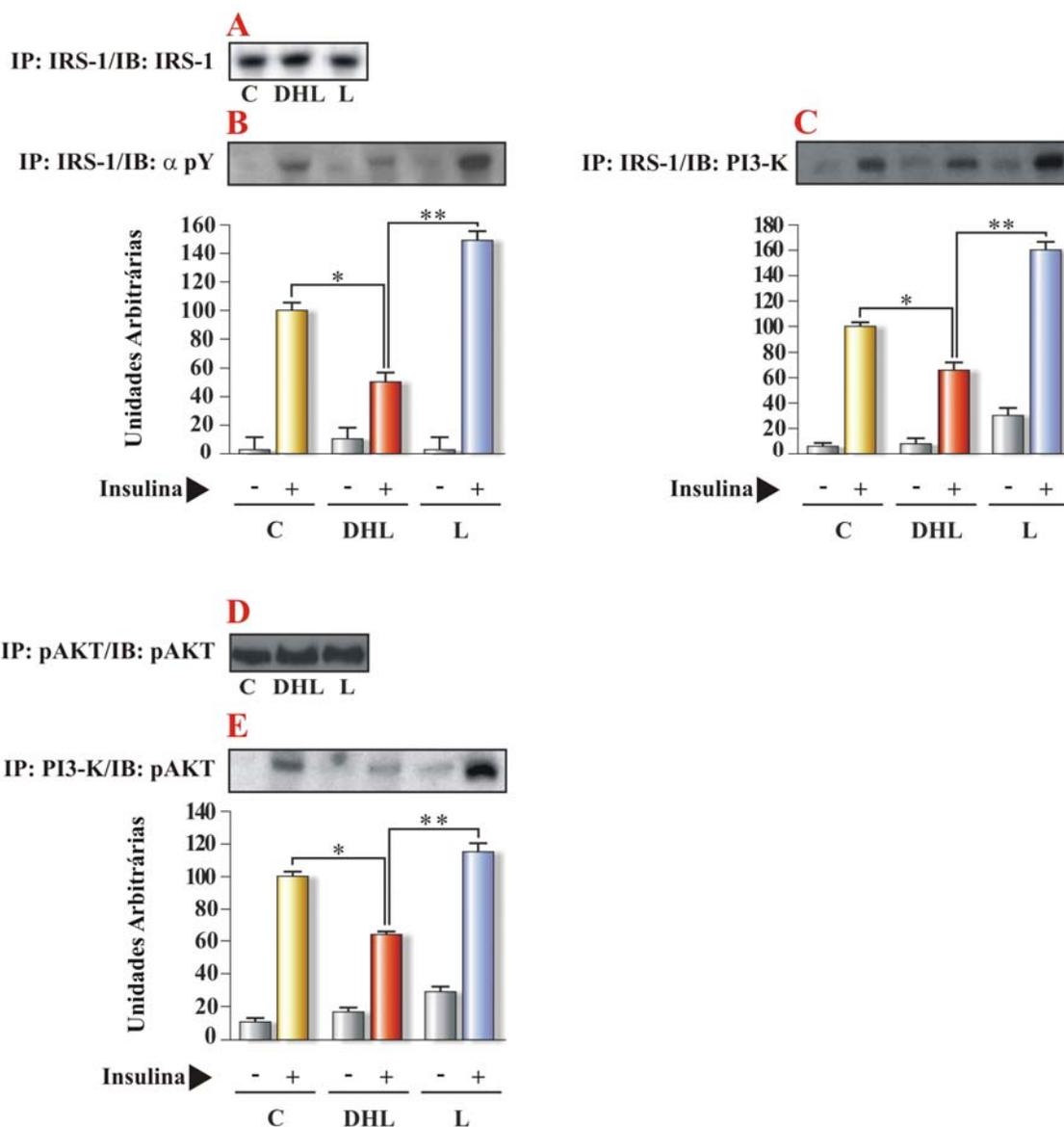


Figura 9- Estudo dos efeitos da lovastatina sobre a via da PI3K em tecido muscular. Figura 9A: IP: anti-IRS-1, IB: anti-IRS-1, não foi observada diferença na concentração da proteína IRS-1 entre os três grupos. Figura 9B: IP: anti-IRS-1, IB: anti- α PY, assim como em tecido hepático, o grau de fosforilação do IRS-1 foi diminuído no grupo DHL e se mostrou aumentado no grupo L (C: $100 \pm 5\%$ vs. DHL: $51 \pm 7\%$ vs. L: $151 \pm 3\%$, $*p < 0,00$). Figura 9C: IP: anti-IRS-1, IB: anti-PI3K, a associação do substrato com a PI3K acompanhou o comportamento anterior, com diminuição no grupo DHL e recuperação no grupo L (C: $100 \pm 1\%$ vs. DHL: $54 \pm 20\%$ vs. L: $179 \pm 11\%$, $*p < 0,001$). Figura 9D: IP: anti-pAkt, a concentração de pAkt nos três grupos foi semelhante. Figura 9E: IB: anti-pAkt, a ativação da enzima mostrou-se diminuída no grupo da dieta e normalizada com a droga (C: $100 \pm 2\%$ vs. DHL: $64 \pm 2\%$ vs. L: $116 \pm 7\%$, $*p < 0,001$).

4.2.3.2- Estudo das vias de regulação

Os níveis de phospho-IRS-1^{ser307} aumentaram significativamente no grupo que foi alimentado com a dieta hiperlipídica comparados aos do grupo controle e, como observado em tecido hepático, essa alteração não se manteve quando foi usada a lovastatina (C: 100±14% vs. DHL: 137±7%, p<0,001; DHL vs. L: 110±12%, p<0,05) (Figura 10A).

Da mesma forma, a fosfo-[Thr183]-JNK apresentou-se aumentada no grupo DHL em relação ao controle e a droga reverteu esse aumento (C: 100±6% vs. DHL 172±2%, p<0,001; DHL vs. L: 138±2%, p<0,001, C vs. L p<0,01) (Figura 10B).

Também no tecido muscular, a IκBα mostrou-se diminuída no grupo da dieta e o tratamento com a lovastatina preveniu esse efeito, de forma similar ao visto para as outras proteínas (C: 100±7% vs. DHL: 72±6%, p<0.05; DHL vs. L: 97±3%, p<0.01) (Figura 10C). A figura D representa a concentração de actina nos três grupos como controle de concentração protéica (Figura 10D).

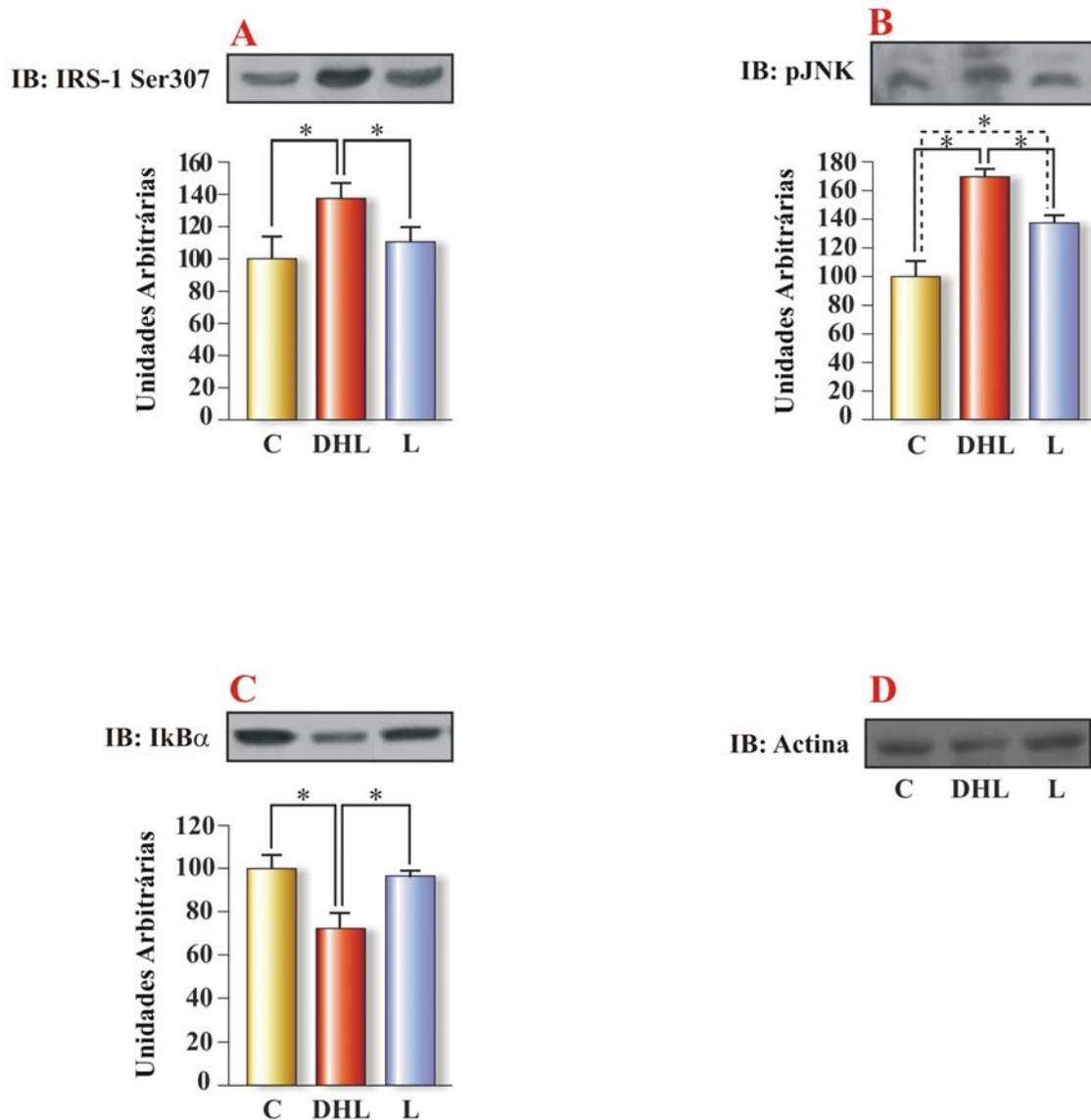


Figura 10- Avaliação das vias de regulação em tecido muscular. Figura 10A: IB: anti-IRS-1^{Ser307}, a fosforilação do IRS-1 em resíduo serina foi superior no grupo DHL, tanto em relação ao grupo C como L (C: 100±14% vs. DHL: 137±7 vs. L: 110±12%, *p<0,05). Figura 10B: IB: anti-pJNK, houve aumento significativo da pJNK no grupo DHL, com diminuição no grupo L (C: 100±6% vs. DHL 172±2 vs. L: 138±2%, *p<0,001), também houve diferença significativa na comparação dos grupos C e L (**p<0,01). Figura 10C: IB: IκBα, o grupo DHL apresentou diminuição da IB: IκBα, comparado ao grupo C (C: 100±7% vs. DHL: 72±6%, p<0.05) e, quando tratados com a lovastatina, essa alteração não foi encontrada (DHL vs. L: 97±3%, p<0.01). Figura 10D: não houve diferença na concentração de actina nos três grupos.

5- DISCUSSÃO

A síndrome de resistência à insulina é caracterizada por defeito primário na ação do hormônio, em diferentes grupos celulares, associado ao aumento compensatório da secreção de insulina. A combinação de resistência insulínica e hiperinsulinemia resulta em alterações metabólicas que levarão a várias doenças: diabetes melito tipo 2, obesidade, dislipidemia, hipertensão arterial, doença arterial coronariana, além de distúrbios do sono e disfunção ovariana. Juntas, essas doenças são determinantes importantes de mortalidade e apresentam prevalência crescente na população.

A transmissão do sinal da insulina é desencadeada pela sua ligação ao receptor, levando a uma rede de reações que resultarão na resposta final ao estímulo hormonal. Em nível molecular, a resistência insulínica pode ser resultado de defeitos em várias dessas etapas: diminuição da concentração ou da atividade quinase do IR, diminuição da concentração ou fosforilação dos IRS 1 e 2, diminuição da atividade da PI3K, menor translocação do GLUT-4 e diminuição da atividade de enzimas intracelulares (Pessin e Saltiel, 2000). Já a via da MAPK não está diminuída na resistência insulínica e no diabetes tipo 2 (Cusi et al., 2000), podendo ser esta a justificativa para os efeitos deletérios da hiperinsulinemia no crescimento celular e na vasculatura (Saltiel e Kahn, 2001).

A compreensão das alterações das diferentes etapas da sinalização, assim como dos seus fatores causais é fundamental para a procura de alvos terapêuticos. Para isso, vários modelos animais de resistência têm sido desenvolvidos com o intuito de mimetizar a síndrome manifesta em humanos. Dentre esses, um dos mais estudados é o modelo da dieta hiperlipídica que guarda similaridade com a obesidade induzida por dieta em humanos, tanto nas alterações metabólicas quanto nas alterações moleculares (Chopra et al., 2002).

Em nosso trabalho, utilizamos esse modelo para o estudo de duas drogas com mecanismos de ação diferentes. Nossos resultados confirmaram achados anteriores com diminuição significativa da sensibilidade à insulina nos animais alimentados com a dieta hiperlipídica, mesmo por período curto, evidenciada no teste de tolerância à insulina. O uso de ambas as drogas preveniu esse efeito da dieta, com valores de K_{it} semelhantes aos do grupo controle. Um outro aspecto que confirma a resistência é a concentração aumentada de insulina plasmática observada no grupo DHL e que foi normalizada com o uso da lovastatina.

As tiazolidinedionas ou glitazonas (TZD) foram desenvolvidas empiricamente a partir de modelos animais de resistência insulínica. Posteriormente à sua descoberta, em meados da década de 90 e já em uso como sensibilizadores de insulina, seu mecanismo de ação como agonistas dos PPAR γ foi identificado. Suas ações incluem: aumento da sensibilidade à insulina e redução dos níveis plasmáticos de glicose e insulina, tanto em modelos animais de diabetes tipo 2, como em humanos (Chaiken et al., 1995; Grossman e Lessem, 1997). Os estudos demonstraram que as TZDs induzem expressão gênica em adipócitos (Kletzien et al., 1992) e aumentam sua diferenciação em cultura de células (Ibrahimi et al., 1994). Ainda que diferentes drogas da classe das TZDS possam apresentar efeitos independentes da ativação do PPAR γ , a pioglitazona, por exemplo, aumenta a expressão do gene aP2 de forma independente do receptor (Harris e Kletzien, 1994), foi demonstrado que a capacidade que cada droga da classe tem de diminuir as concentrações de glicose está relacionada à sua capacidade de ligação ao PPAR γ (Willson et al., 1996). Os receptores PPAR γ são amplamente expressos em tecido adiposo, mas também em fígado e músculo, além de outros tecidos (Mukherjee et al., 1997).

Em nosso estudo, demonstramos o efeito da rosiglitazona de aumentar a fosforilação do IR, do IRS-1, assim como de sua associação com a PI3K e ativação da Akt em dois tecidos insulino-sensíveis, o tecido hepático e o muscular, em animais alimentados com a dieta hiperlipídica por um período curto. Um estudo em ratos Zucker obesos demonstrou que a administração de rosiglitazona potencializou a fosforilação da Akt em treonina em músculo, tecido adiposo e fígado, associado à maior fosforilação em tirosina da subunidade β do IR e do IRS-1 e fosforilação em serina da Akt (Jiang et al., 2002). Ainda que nessa etapa do trabalho não tenhamos avaliado o papel da JNK, sabemos que, no modelo da DHL ocorre aumento na fosforilação da JNK e que um dos mecanismos propostos para a atuação das TZD inclui inibição da ativação da via da JNK estimulada pelo TNF- α e IL-1 β (Días-Delfin et al., 2007).

Outras ações envolvidas na homeostase da glicose descritas para os PPAR γ são: estímulo à expressão de genes determinantes da síntese de GLUT-4, CAP, glucoquinase e de proteínas desacopladoras, UCP2 e UCP 3 (Nagy et al., 1998). Também foram descritas ações sob o controle da inflamação como a inibição da ativação de macrófagos e inibição

da secreção de citocinas como o TNF- α (Ye et al., 2004), o que, como vimos, está relacionado ao mecanismo de resistência insulínica.

No entanto, no decorrer de sua utilização clínica, diferentes drogas da classe das TZDs têm apresentado efeitos indesejáveis graves. A troglitazona, primeira delas a ser usada para tratamento do diabetes tipo 2 a partir de 1997, teve sua utilização clínica suspensa em meados de 2000, em função de hepatotoxicidade grave, insuficiência hepática e óbito associados à sua utilização (Kohlroser et al., 2000).

A associação de ambas as TZDs atualmente em uso terapêutico (rosiglitazona e pioglitazona) com retenção de fluido e aumento da incidência de insuficiência cardíaca em indivíduos diabéticos do tipo 2 tem sido relatada como um efeito de classe (Lago et al., 2007). Ainda que o mecanismo fisiopatológico desse efeito não esteja totalmente esclarecido, recente estudo demonstrou que a amilorida e a espironolactona podem induzir diurese em indivíduos em uso de rosiglitazona e com retenção líquida (Karalliede et al., 2006) e este resultado é consistente com o achado de maior atividade de agonistas do PPAR γ nos ductos coletores distais (Zhang et al., 2005). Em função desse efeito, em 2003, a *American Heart Association* e *American Diabetes Association* (AHAADA) publicaram em conjunto um consenso sobre a utilização das TZDs em pacientes com insuficiência cardíaca ou com risco de desenvolver a doença (Nesto et al., 2003).

Mais recentemente, uma metanálise que avaliou estudos que abordavam os efeitos cardiovasculares da rosiglitazona observou associação entre o uso da droga e aumento do risco de infarto do miocárdio e morte de causa cardiovascular (Nissen e Wolski, 2007). Por outro lado a pioglitazona tem sido referida como tendo efeito protetor sobre o risco de doença isquêmica coronariana (Lincoff et al., 2007).

Assim, a despeito de seu reconhecido efeito no metabolismo da glicose, resultado de ações benéficas em vários aspectos do controle da homeostase do substrato, o mecanismo de ação das TZDs ainda não é totalmente esclarecido e dada a grande quantidade de genes que podem ser ativados pelos receptores PPAR γ e a mecanismos ainda

desconhecidos e independentes dos receptores, a utilização clínica dessas drogas deve ser baseada em critérios estritos na avaliação do risco-benefício.

Um caminho bastante diverso foi trilhado pela classe farmacológica das estatinas. A primeira droga da classe, a mevastatina, foi desenvolvida no início da década de 70, a partir do *Penicillium citrinium* para o tratamento da hipercolesterolemia (Endo et al., 1976). No decorrer de sua utilização, outras ações, independentes da redução dos níveis de colesterol foram sendo observadas. Dentre esses achados, são de fundamental interesse o efeito antiinflamatório e de melhora da sensibilidade à insulina (Schönbeck e Libby, 2004).

Um dos mecanismos relacionados à resistência insulínica induzida pela DHL é a maior ativação da via pró-inflamatória IKK/I κ B/NF κ B (Schoelson et al., 2003; Cai et al., 2005). Estudos clínicos e experimentais sugerem fortemente que as estatinas apresentam efeito antiinflamatório. O fígado é seu principal sítio de ação, especialmente na inibição da síntese do colesterol. Mas o tecido hepático é também fonte de produção de mediadores pró-inflamatórios e a diminuição da expressão desses mediadores poderia ser um importante mecanismo de ação antiinflamatória dessas drogas (Arnaud et al., 2005). A síntese de colesterol é um processo complexo que gera isoprenóides tais como o farnesilpirofosfato (FPP) e geranylgeranylpirofosfato (GGPP) que funcionam como lípidos de ligação para uma variedade de moléculas sinalizadoras como a Ras e as proteínas *Ras-like*, Rho, Rac, Rab, Rap e Ral (Van Aelst e D'Souza-Schorey, 1997; Liao e Laufs, 2005). A Ras está associada com proliferação celular, a Rac com geração de espécies reativas de oxigênio e Rho com ativação da via pró-inflamatória (Cross et al., 1995; Liao e Laufs, 2005). A translocação da Ras para a membrana celular é necessária para sua atividade e depende de farnesilação, ao contrário da Rho que necessita de geranylgeranilação. Ambas, Ras e Rho podem induzir a atividade do NF κ B por um mecanismo que leva à fosforilação do I κ B e o acúmulo do NF κ B no núcleo da célula (Perona et al., 1997; Montaner et al., 1999). Estudos têm demonstrado que as estatinas limitam o acúmulo nuclear do NF κ B e sua ligação ao DNA, provavelmente através do aumento na expressão do I κ B (Wagner et al., 2002; Dichtl et al., 2003). Além disso, as

estatinas também apresentam a propriedade de reduzir a expressão da c-jun, indicando um possível efeito na atividade da JNK (Dichtl et al., 2003).

Nossos dados, mostrando que a lovastatina reduziu a ativação da IKK/I κ B/NF κ B e JNK no fígado e músculo de ratos alimentados com DHL, indicam um possível mecanismo para a ação antiinflamatória da droga.

Em relação à sensibilidade à insulina, o tratamento com a lovastatina resultou em aumento na velocidade de decaimento da glicose avaliado pelo teste de tolerância à insulina. Essa melhora na sensibilidade foi associada à maior ativação da via IRS-1/PI3K/Akt em fígado e músculo dos animais alimentados com a DHL em paralelo à diminuição da via inflamatória, JNK e IKK/I κ B/NF κ B, que está relacionada à resistência insulínica. Nossos dados demonstraram aumento na sensibilidade à insulina, corroborando os achados de três diferentes estudos em humanos: usando sinvastatina e cerivastatina, e avaliando a ação insulínica através do *clamp* euglicêmico e hiperinsulinêmico e do HOMA, os autores observaram melhora dos parâmetros de sensibilidade à insulina associados à melhora no perfil lipídico (Paolisso et al., 1991; Farrer et al., 1994; Paniagua et al., 2002). Um outro estudo retrospectivo de coorte que avaliou dados do *Saskatchewan Health Databases*, demonstrou que o uso de estatina atrasou em dez meses a necessidade de tratamento com insulina em pacientes com diabetes tipo 2 (Yee et al., 2004). Esses efeitos também foram observados em modelos animais. Em estudo com ratos Zucker magros e obesos, o uso de atorvastatina resultou em melhora da sensibilidade insulínica dose-dependente com aumento da captação de 2-DG em músculo e maior fosforilação da Akt/PKB estimulada pela insulina (Wong et al., 2006).

Em nosso estudo, o aumento da sensibilidade à insulina foi associado com aumento da fosforilação do IR em tirosina, em paralelo à redução da fosforilação do IR em serina e menor associação do IR com a PTP1B em músculo e tecido hepático. Dados anteriores mostraram que a maior fosforilação do IR em serina está associada à menor ativação do receptor induzida pela insulina (Bollag et al., 1986; Rosenzweig et al., 2002); Outro mecanismo que controla a atividade do IR é a atividade da proteína fosfatase PTP1B e maior associação IR/PTP1B tem sido relacionada a situações de resistência insulínica

(Hirata et al., 2003). Dessa forma, a reversão dos efeitos causados pela DHL pela lovastatina, levando à menor fosforilação do IR em serina e menor associação do receptor com a PTP1B pode ser um mecanismo envolvido na melhora da resistência insulínica induzida pela droga.

Nossos dados também mostraram que a lovastatina levou à maior atividade da via IRS-1/PI3K/Akt induzida pela insulina. Esses resultados são consistentes com achados de maior ativação da Akt/PKB induzida por estatina (Kureishi et al, 2000; Contreras et al, 2002), sendo que Kureishi e colaboradores sugeriram que a maior ativação da Akt seria dependente da PI3K (Kureishi et al., 2000). Portanto, nossos resultados de maior ativação pela insulina das etapas anteriores à AKT, tais como a fosforilação do IRS-1 e a associação IRS-1/PI3K, em fígado e músculo de animais alimentados com DHL confirmam esses estudos. Esses efeitos das estatinas devem ter um importante papel na melhora da sensibilidade à insulina, uma vez que essa via tem sido implicada no transporte de glicose em músculo e na síntese de glicogênio em fígado e músculo (Cross et al., 1995; Saltiel e Kahn, 2001).

A fosforilação dos substratos IRS em serina é tida como um dos principais mecanismos de supressão de sua atividade, contribuindo para a resistência insulínica (Saltiel e Kahn, 2001). Uma das quinases que podem aumentar a fosforilação em serina do IRS-1 é a JNK (Prada et al., 2005). Nossos resultados, que mostraram a reversão dos efeitos da DHL em tecido hepático e muscular, com aumento da fosforilação em serina do IRS-1 assim como menor ativação da JNK pela lovastatina, sugerem um outro mecanismo de ação das estatinas.

A relação entre a menor atividade da via da PI3K e a ativação de vias relacionadas com a inflamação causada pela dieta hiperlipídica é evidenciada pela maior atividade da pJNK e pela menor atividade do I κ B α

No entanto, em adição aos mecanismos de resistência insulínica ora descritos, existem outras vias que podem induzir essa alteração como a nitrosilação do IR, IRS-1 e Akt/PKB e outros mecanismos ainda não esclarecidos (Carvalho-Filho et al., 2005:

Pender et al., 2005). Não podemos excluir a possibilidade que a lovastatina possa atuar também através de outros mecanismos em sua ação de melhora da sensibilidade à insulina.

Considerando as evidências anteriormente citadas da ação benéfica das estatinas sobre o metabolismo da glicose e que a síndrome de resistência à insulina também constitui uma situação de maior atividade inflamatória e está estreitamente ligada à doença ateromatosa, podemos sugerir que a ação benéfica das estatinas sobre o metabolismo da glicose pode ter como um de seus mecanismos os seus efeitos sobre a inflamação.

6- CONCLUSÕES

1. Nossos resultados demonstraram que a rosiglitazona reverteu as ações da dieta hiperlipídica sobre as etapas iniciais da transmissão do sinal insulínico na via da PI3K, em fígado e em tecido muscular, podendo ser este um dos mecanismos responsáveis pela melhora da resistência insulínica apresentada pela droga.

2. Nossos resultados demonstraram que a lovastatina recuperou a sensibilidade à insulina, diminuída no modelo da dieta hiperlipídica, revertendo as alterações causadas pela dieta na transmissão do sinal na via da PI3K e diminuindo a ativação de vias de regulação, nos dois tecidos estudados. Esses efeitos sugerem um novo mecanismo da ação benéfica das estatinas sobre a sensibilidade à insulina.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 2002; 277:1531–7.

Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, Devchand P, Francis S, Kadakia M, et al. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J Int Med* 2007; 262:184-98.

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 1997; 7:261–9.

Ammendrup A, Maillard A, Nielsen K, Aabenhus Andersen N, Serup P, Dragsbaek Madsen O, et al. The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2000; 49(9):1468-76.

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag III B, Johnson RS, et al. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994; 372:186–90.

Arnaud C, Burger F, Steffens S, Veillard NR, Nguyen TH, Trono D, et al. Statins reduce interleukin-6–induced C-reactive protein in human hepatocytes: new evidence for direct antiinflammatory effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1231–6.

Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 1998; 182:31–48.

Bollag GE, Roth RA, Beaudoin J, Mochly-Rosen D, Koshland Jr DE. Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:5822–24.

Bonny C, Oberson A, Negri S, Sauser C, Schorderet DF. Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. *Diabetes* 2001; 50(1):77-82.

Bonora P, Moghetti C, Zaccanaro M, Cigolini M, Querena V, Cacciatori A, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68:374-8.

Brozinick Jr JT, Birnbaum MJ. Insulin, but not contraction, activates Akt/PKB in isolated rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 1998; 273:14679-82.

Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005; 11(2):182-90.

Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JB, de Oliveira MG, et al. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* 2005; 54(4):959-67.

Casey PJ, Solski PA, Der CJ, Buss JE. p21Ras is modified by a farnesylisoprenoid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:8323-7.

Chaiken RL, Eckert-Norton M, Pasmantier R, Boden G, Ryan I, Gelfand RA, et al. Metabolic effects of darglitazone, an insulin sensitizer, in NIDDM subjects. *Diabetologia* 1995; 38:1307-12.

Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, et al. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 2001; 410:944-8.

Chopra M, Galbraith S, Darnton-Hill I. A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition. *Bull World Health Organ* 2002; 80: 952-8.

Contreras JL, Smyth CA, Bilbao G, Young CJ, Thompson JA, Eckhoff DE. Simvastatin induces activation of the serine-threonine protein kinase AKT and increases survival of isolated human pancreatic islets. *Transplantation* 2002; 74:1063-9.

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

Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawat T, et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 2000; 105(3):311-20.

Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem* 1999; 274:1865-8.

Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Soc Symp* 1999; 64:1–12.

Diamant M, Heine RJ. Thiazolidinediones in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2003; 63:1373-405.

Días-Delfin J, Morales M, Caelles C. Hypoglycemic action of thiazolidinediones/peroxisome proliferators-activates receptor γ by inhibition of the c-Jun NH₂-terminal kinase pathway. *Diabetes* 2007; 56:1865-71.

Dichtl W, Dulak J, Erick M, Alber HF, Schwarzacher SP, Ares MP, et al. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:58–63.

Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999; 283:1544–8.

Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, et al. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- α in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem* 2001; 276:47944–9.

Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot* 1976; 29:1346–8.

Farese RV. Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283:E1-E11.

Farrer M, Winocour PH, Evans K, Neil HA, Laker MF, Kesteven P, et al. Simvastatin in non-insulin dependent diabetes mellitus: effect on serum lipids, lipoproteins and haemostatic measures. *Diabetes Res Clin Pract* 1994; 23:111–9.

Freeman DJ, Norrie J, Sattar N, Neely DG, Cobbe SM, Ford I, et al. Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 2001; 103:357–62.

Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 2002; 109:S81–S96.

Goldstone, M, Draznin B. Effect of insulin in farnesyltransferase activity in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1996; 271:27585-9.

Grossman SL, Lessem J. Mechanisms and clinical effects of thiazolidinediones. *Expert Opin. Invest. Drugs* 1997; 6:1025-40.

Guerre-Millo M, Rouault C, Poulain P, Andre J, Poitout V, Peters JM, et al. PPAR-[alpha]-null mice are protected from high-fat diet--induced insulin resistance. *Diabetes* 2001; 50(12):2809-14.

Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 1989; 57:1167-77.

Harris PKW, Kletzien RF. Localization of a pioglitazone response element in the adipocyte fatty acid-binding protein gene. *Mol Pharmacol* 1994; 45:439-45.

Hirata AE, Alvarez-Rojas F, Carvalheira JB, Carvalho CR, Dolnikoff MS, Abdalla Saad MJ. Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. *Life Sci* 2003; 73(11):1369-81.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420:333-6.

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

Ibrahimi A, Teboul L, Gaillard D, Amri EZ, Ailhaud G, Young P, et al. Evidence for a common mechanism of action for fatty acids and thiazolidinediones antidiabetic agents on gene expression in preadipose cells. *Mol Pharmacol* 1994; 46:1070-6.

Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK): from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10:205-19.

Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 2001; 292:1160-4.

Itai S, Ruderman NR, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C and I κ B- α . *Diabetes* 2002; 51:2205-11.

Iwata M, Haruta T, Ussui I, Takata Y, Takano A, Uno T, et al. Pioglitazone ameliorates tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance by a mechanism independent of adipogenic activity of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Diabetes* 2001; 50:1083-92.

Jiang G, Dallas-Yang Q, Li Z, Szalkowski D, Liu F, Shen X, et al. Potentiation of insulin signaling in tissues of Zucker obese rats after acute and long term treatment with PPAR γ agonists. *Diabetes* 2002; 51:2412-19.

Jiang G, Dallas-Yang Q, Biswas S, Li Z, Zhang BB. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma), decreases inhibitory serine phosphorylation of IRS1 in vitro and in vivo. *Biochem J* 2004; 377(2):339-46.

Jhun BH, Meinkoth JL, Leitner JW, Draznin B, Olefsky JM. Insulin and insulin-like growth factor-I signal transduction requires p21ras. *J Biol Chem* 1994; 269(8):5699-704.

Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka TA, Matsuhisa M, et al. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med* 2004; 10:1128-32.

Kanoh Y, Bandyopadhyay G, Sajan MP, Standaert ML, Farese RV. Thiazolidinedione treatment enhances insulin effects on protein kinase C-zeta /lambda activation and glucose transport in adipocytes of nondiabetic and Goto-Kakizaki type II diabetic rats. *J Biol Chem* 2000; 275(22):16690-6.

Karalliede J, Buckingham R, Starkie M, Lorand D, Stewart M, Viberti G. The rosiglitazone fluid retention study group. Effects of various diuretic treatments on rosiglitazone-induced fluid retention. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:3482-90.

Kessler A, Uphues I, Ouwens DM, Till M, Eckel J. Diversification of cardiac insulin signaling involves the p85 alpha/beta subunits of phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280:E65-E74.

Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, et al. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 2001; 108:437-46.

Kletzien RF, Clarke SD, Ulrich RG. Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol* 1992; 41:393-8.

Kohlroser J, Mathai J, Reichheld J, Banner BF, Bonkovsky HL. Hepatotoxicity due to troglitazone: report of two cases and review of adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(1):272-6.

Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 2000; 6:1004–10.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680–5.

Lago RM, Singh PP, Nesto RW. Congestive heart failure and cardiovascular death in patients with prediabetes and type 2 diabetes given thiazolidinediones: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Lancet* 2007; 370(9593):1129-36.

Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* 2003; 278: 2896–902.

Leiter LA. Beta-cell preservation: a potential role for thiazolidinediones to improve clinical care in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2005; 22(8):963-72.

Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 89-118

Lietzke SE, Bose S, Cronin T, Klarlund J, Chawla A, Czech MP, et al. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol. Cell* 2000; 6: 385–94.

Lincoff AM, Wolski K, Nicholls SJ, Nissen SE. Pioglitazone and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA*. 2007; 298(10):1180-8.

Mackay DJ, Hall A. Rho GTPases. *J Biol Chem* 1998; 273:20685–8.

Manne V, Roberts D, Tobin A, O'Rourke E, DeVirgilia M, Meyers C, et al. Identification and preliminary characterization of protein-cysteinefarnesyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:7541-5.

Mastick CC, Brady MJ, Saltiel AR. Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin. *J Cell Biol* 1995; 129:1523-31.

Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 2000; 6(1):87-97.

Miyazaki Y, He H, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Rosiglitazone improves downstream insulin receptor signaling in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2003; 52:1943-50.

Moller DE, Berger JP. Role of PPARs in the regulation of obesity-related insulin sensitivity and inflammation. *Int J Obes* 2003; 27(3):S17-21.

Montaner S, Perona R, Saniger L, Lacal JC. Activation of serum response factor by RhoA is mediated by the nuclear factor- κ B and C/EBP transcription factors. *J Biol Chem* 1999; 274:8506-15.

Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR Jr. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR γ 2 versus PPAR γ 1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem* 1997; 272:8071-6.

Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell* 1998; 93: 229-40.

Nesto RW, Bell D, Bonow RO, Fonseca V, Grundy SM, Horton ES, et al. Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a Consensus Statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Circulation* 2003; 108:2941-48.

Nikulina MA, Sandhu N, Shamim Z, Andersen NA, Oberson A, Dupraz P, et al. The JNK binding domain of islet-brain 1 inhibits IL-1 induced JNK activity and apoptosis but not the transcription of key proapoptotic or protective genes in insulin secreting cell lines. *Cytokine* 2003; 24:13–24.

Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med.* 2007; 356(24):2457-71.

Ogawa J, Takahashi S, Fujiwara T, Fukushige J, Hosokawa T, Izumi T, et al. Troglitazone can prevent development of type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin in mice. *Life Sci* 1999; 65(12):1287-96.

Okada K, Maeda N, Kikuchi K, Tatsukawa M, Sawayama Y, Hayashi J. Pravastatin improves insulin resistance in dyslipidemic patients. *J Atheroscler Thromb* 2005; 12:322-9.

Ortiz MB, GOMEZ de Alzaga MB, HAMmarstrom S, Jimenez de Assua L. Mevalonate dependency of the early cell cycle mitogenic response to epidermal growth factor and prostaglandin F2 alpha in Swiss mouse 3T3 cells. *J Cell Physiol* 1995; 162(1):139-46.

Paniagua JA, Lopez-Miranda J, Escribano A, Berral FJ, Marin C, Bravo D, et al. Cerivastatin improves insulin sensitivity and insulin secretion in early-state obese type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51:2596–603.

Paolisso G, Sgambato S, De Riu S, Gambardella A, Verza M, Varricchio M, et al. Simvastatin reduces plasma lipid levels and improves insulin action in elderly, non-insulin dependent diabetics. *Eur J Clin Pharmacol* 1991; 40:27–31.

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

Pender C, Goldfine ID, Kulp JL, Tanner CJ, Maddux BA, MacDonald KG, et al. Analysis of insulin-stimulated insulin receptor activation and glucose transport in cultured skeletal muscle cells from obese subjects. *Metabolism* 2005; 54(5):598-603.

Perona, R, Lopez-Miranda J, Escribano A, Berral FJ, Marin C, Bravo D, et al. Activation of the nuclear factor- κ B by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* 1997; 11:463–75.

Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest* 2000; 106:165–9.

Peterson RT, Schreiber SL. Kinase phosphorylation: keeping it all in the family. *Curr. Biol* 1999; 9:R521–4.

Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, et al. Western diet modulates insulin signaling, JNK activity and IRS-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 2005; 146:1576–87.

Prada PO, Pauli JR, Ropelle ER, Zecchini HG, Carvalheira JB, Velloso LA, et al. Selective modulation of the CAP/Cbl pathway in the adipose tissue of high fat diet treated rats. *FEBS Lett* 2006; 580(20):4889-94.

Ribon V, Herrera R, Kay BK, Saltiel AR. A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain-containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions. *J Biol Chem* 1998a; 273:4073–80.

Ribon V, Johnson JH, Camp HS, Saltiel AR. Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferator activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1998b; 95:14751–6.

Ribon V, Saltiel AR. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 1997; 324:839-45.

Rosenzweig T, Braiman L, Bak A, Alt A, Kuroki T, Sampson SR. Differential effects of tumor necrosis factor- α on protein kinase C isoforms α and Δ mediate inhibition of insulin receptor signaling. *Diabetes* 2002; 51:1921–30.

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; 92:2065–72.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414(6865):799-806.

Schaber MD, O'Hara MB, Garsky VM, Mosser SC, Bergstrom JD, Moores SL, et al. Polyisoprenylation of Ras in vitro by a farnesyl-protein transferase. *J Biol Chem* 1990; 265(25):14701-4.

Schonbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as anti-inflammatory agents? *Circulation* 2004; 109(21S1): II18–II26.

Shepherd PR, Khan BB. Glucose transporters and insulin action. *N Engl J Med* 1999; 341:248-57.

Shoelson SE, Lee J, Yuan M. Inflammation and the IKK β /I κ B/NF κ B axis in obesity and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27(3):S49-S52.

Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV. Protein kinase C- α as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J Biol Chem* 1997; 272:30075–82.

Standaert ML, Kanoh Y, Sajan MP, Bandyopadhyay G, Farese RV. Cbl, IRS-1, and IRS-2 mediate effects of rosiglitazone on PI3K, PKC- λ , and glucose transport in 3T3/L1 adipocytes. *Endocrinology* 2002; 143(5):1705-16.

Suzuki M, Kakuta H, Takahashi A, Shimano H, Tada-lida K, Yokoo T, et al. Effects of atorvastatin on glucose metabolism and insulin resistance in KK/Ay mice. *J Atheroscler Thromb* 2005;12:77-84.

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 1994; 372:182–6.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:350-54.

Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol. Cell Biol* 2004; 24:5434–46.

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997; 11:2295–322.

Wagner AH, Gebauer M, Guldenzoph B, Hecker M. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase independent inhibition of CD40 expression by atorvastatin in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2002; 22:1784–89.

Watson RT, Shigematsu S, Chiang SH, Mora S, Kanzaki M, Macara IG, et al. Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation. *J Cell Biol* 2001;154: 829-40.

Weinstein SP, Holand A, O'Boyle E, Haber RS. Effects of thiazolidinediones on glucocorticoid-induced insulin resistance and GLUT4 glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Metabolism* 1993; 42(10):1365-9.

Weston CR, Lambright DG, Davis RJ. Signal transduction: MAP kinase signaling specificity. *Science* 2002; 296:2345–7.

Willson TM, Cobb JE, Cowan DJ, Wiethe RW, Correa ID, Prakash SR, et al. The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor γ agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J Med Chem* 1996; 39(3):665- 8.

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391:900–4.

Wong V, Stavar L, Szeto L, Uffelman K, Wang C-H, Fantus G, et al. Atorvastatin induces insulin sensitization in Zucker lean and fatty rats. *Atherosclerosis* 2006; 348-55.

Xu XQ, McGuire TF, Blaskovich MA, Sebt SM, Romero G. Lovastatin inhibits the stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin in HIRcB fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 1996; 26(2):233-7.

Ye P, Fang H, Zhou X, He YL, Liu YX. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor activators on tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal rat cardiac myocytes. *Chin Med Sci J* 2004; 19:243–7.

Yee A, Majumdar SR, Simpson SH, McAlister FA, Tsuyuki RT, Johnson JA. Statin use in Type 2 diabetes mellitus is associated with a delay in starting insulin. *Diabet Med.* 2004; 9:962-7.

Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, et al. Reversal of obesity and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of *Ikkb*. *Science* 2001; 293:1673–7.

Zhang H, Zhang A, Kohan DE, Nelson RD, Gonzalez FJ, Yang T. Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks thiazolidinedione-induced fluid retention. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:9406–11.

Ziegler SF, Bird TA, Schneringer JA, Schooley KA, Baum PR. Molecular cloning and characterization of a novel receptor protein tyrosine kinase from human placenta. *Oncogene* 1993; 8:663–70.

8- ANEXOS

Effect of Rosiglitazone in Insulin Signalling Pathway in High-fat Fed Rats

C.A. Lalli and M.J.A. Saad

Department of Internal Medicine, University of Campinas, Brazil

Summary

Thiazolidinediones (TZD) are insulin-sensitizing agents, which effects are mainly due to the activation of PPAR γ . There are some evidences that TZD have some effect increasing insulin-signaling pathway. High-fat diet is a model of insulin resistance. In this study we evaluated the effect of a TZD, rosiglitazone, in early stages of insulin signaling of rats fed with high-fat diet during 4 weeks. We found that the diet resulted in decreasing of IRS-1 phosphorylation, IRS-1/PI3K association and Akt phosphorylation and the treatment with rosiglitazone reverted those effects.

Introduction

Thiazolidinediones (TZD) as insulin-sensitizing agents have the ability to increase basal and insulin-stimulated glucose transport in adipocytes and skeletal muscle cells without necessarily increasing glucose transporter levels [1-3]. TZDs are ligands of PPAR γ (peroxisome-proliferator-activated receptor gamma), a member of a larger family of the ligand-activated nuclear receptor transcription factors. Whereas it is generally thought that binding and activation of PPAR γ is the predominant mechanism by which TZDs mediate their antidiabetic efficacy, the precise molecular events downstream of PPAR γ activation that are critical for TZDs mediated insulin sensitization in vivo are less clear.

Insulin initiates its metabolic and growth promoting effect by binding to its receptor (IR). The IR is a protein tyrosine kinase which, when activated by insulin binding undergoes rapid autophosphorylation and then phosphorylates a number of intracellular proteins. In the past decade, many of the proteins involved in insulin action have been defined

as intracellular insulin substrates, including insulin receptor substrates (IRSs – IRS-1 and IRS-2 are the most important) [4-6]. Following tyrosine phosphorylation, the IRSs act as docking proteins for several Src homology 2 domain-containing proteins, including phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [7] and others. Downstream to PI3-K there is activation of a serine/threonine kinase, Akt [8]. There are new evidences that TZDs exert their insulin-sensitizing effects, at least partially by increasing insulin signaling. Treatment with TZDs potentiates insulin-stimulated PI3K and Akt activation in cultured cells in vitro [9]. To further our understanding of the mechanism underlying TZDs-mediated insulin sensitization, the present study investigated the effect of rosiglitazone on insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation and Akt activation in liver and muscle of rats fed a high fat diet.

Material and Methods

Male Wistar rats were fed a standard chow (control - C) or high-fat diet (H) containing 59% of saturated fat during four weeks. During the last week the high-fat fed rats were divided in two groups: untreated (H) and treated with daily doses of 3mg/kg body weigh of rosiglitazone (R) or vehicle (saline: 0,9% NaCl) by oral gavage at night. All groups received water ad lib and the food was withdrawn 12h before the experiments. One hour before the procedure the animal received the last dose of the drug or vehicle. The rats were anesthetized with sodium thiopental (25mg/kg, ip). The abdominal cavity was opened and 0,5ml of saline with or without insulin (Humulin R Elli Lylli Co) 6µg was injected in the cava vein. Fragments of liver and soleus muscle were collected at 30 and 90 seconds respectively and submitted to immunoprecipitation (IP) with 10µl of polyclonal antibodies anti-IRS-1 (Santa Cruz Biotechnology, CA). The immune complexes were precipitated with protein A-Sepharose 6MB (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden) and submitted to electrophoresis in SDS-PAGE and electro-transfer of proteins from the gel to nitrocellulose membrane. The nitrocellulose blots were submitted to immunoblotting (IB), incubated overnight at 4°C with antibodies against phosphotyrosine (α Py), the p85-subunit of PI3-kinase (α PI3K, Upstate Biotechnology, NY). Whole tissue extracts are blotted with antibody anti- phospho-Akt (α Akt, Cell Signaling Technology, MA). The blots were incubated with 2mCi [125 I] Protein A (30µCi/µg). [125 I] Protein A bound to the specific antibodies was detected by autoradiograph and bands intensities were quantitated by optical densitometry. The procedures IP and IB were previously described [10].

Results

In liver, we observed that there was a significant decrease in insulin-stimulation IRS-1 tyrosine phosphorylation of high fat fed rats (H) when

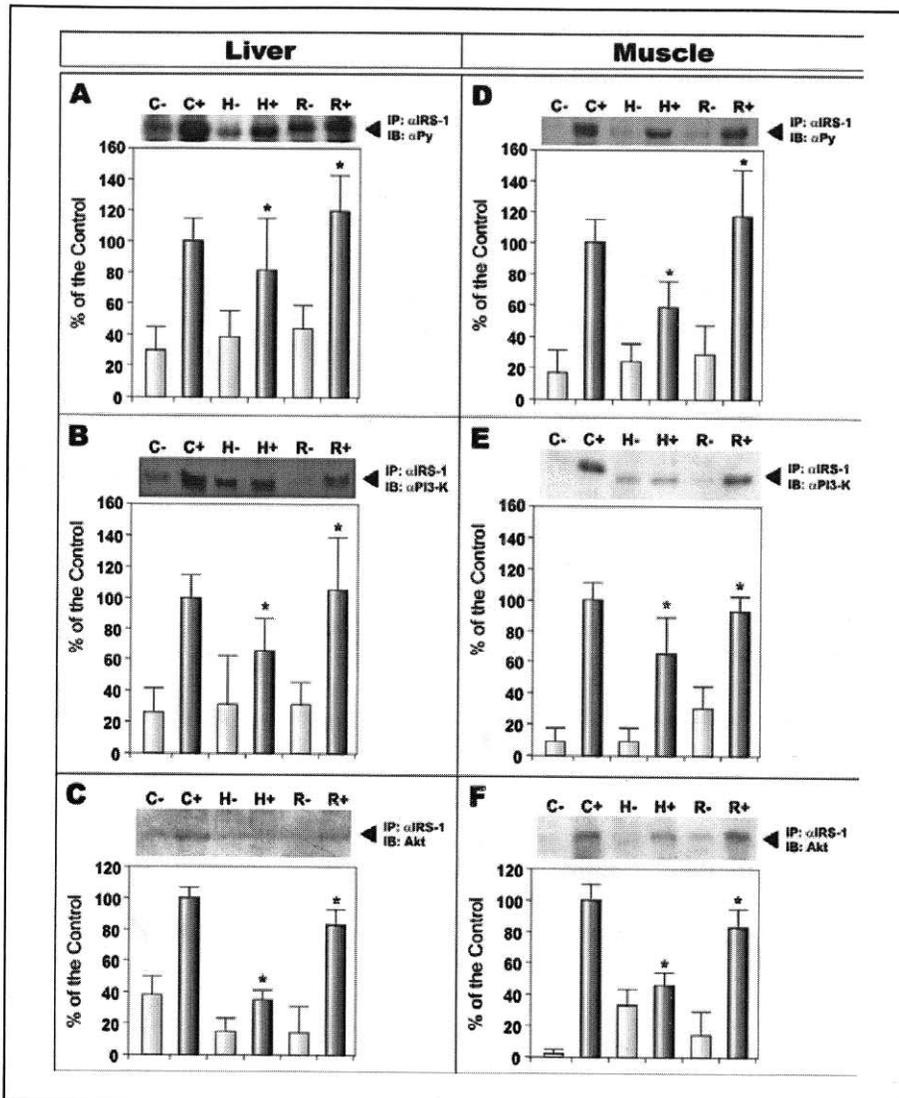


Fig. 1. IRS-1 tyrosine-phosphorylation, IRS-1/PI3K association and Akt phosphorylation after insulin stimulation of rats fed a regular chow as control (C), high-fat diet (H) and high fat diet plus rosiglitazone (R). Fragments of liver had their proteins isolated and submitted to immunoprecipitation (IP) with antibodies anti-IRS-1 and immunoblotting (IB) with α Py (A), IP with anti-IRS-1 and IB with α PI3K (B) and whole tissue extracts were also blotted with α Akt (C). The same procedures were done with muscle fragments which were submitted to IP with IRS-1 and IB with α Py (D), IP with anti-IRS-1 and IB with α PI3K (E) and whole tissue extracts were also blotted with α Akt (F). Scanning densitometry was performed on autoradiograms of 6 experiments. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0,05$.

compared to controls (C) and this effect was reverted after treatment with rosiglitazone (R) (C: $100\pm 9\%$ x H: $81\pm 22\%$ x R: $119\pm 18\%$; $p < 0.05$) (Fig. 1A). When we analyze IRS-1/PI3-kinase association there was a significant decrease in H when compared to controls and rosiglitazone also reversed this result (C: $100\pm 12\%$ x H: $66\pm 27\%$ x R: $105\pm 35\%$; $p < 0.05$) (Fig. 1B). Insulin-induced Akt phosphorylation also decreased significantly in high-fat fed animals when compared to controls and rosiglitazone normalized it (C: $100\pm 7\%$ x H: $38\pm 4\%$ x R: $82\pm 10\%$ $p < 0.05$) (Fig. 1C). In muscle, there was a significant decrease in insulin-stimulation IRS-1 tyrosine phosphorylation of H animals when compared to controls and rosiglitazone also restored it (C: $100\pm 14\%$ x H: $59\pm 16\%$ x R: $117\pm 23\%$; $p < 0.05$) (Fig. 1D). The IRS-1/PI3-kinase association in high-fat fed-rats was significantly lower when compared to controls and there was a reversion to normal after the drug administration (C: $100\pm 2\%$ x H: $48\pm 8\%$ x R: $93\pm 7\%$; $p < 0.05$) (Fig. 1E). Akt phosphorylation in muscle presented the same behavior in H rats compared to controls and after using the drug (C: $100\pm 10\%$ x H: $45\pm 8\%$, x R: $82\pm 12\%$; $p < 0.05$) (Fig 1F).

Conclusion

The results of the present study demonstrated that in an animal model of insulin resistance (H) rosiglitazone administration for one week increases insulin signaling in liver and muscle normalizing the reduced IRS-1 tyrosine phosphorylation and Akt activation.

References

1. KANO, Y, BANDYOPADHWAY, G, SAJAM, MP, STANDAERT, ML, FARESE, RV. Thiazolidinedione treatment enhances insulin effects on protein kinase C-zeta /lambda activation and glucose transport in adipocytes of nondiabetic and Goto-Kakizaki type II diabetic rats. *J Biol Chem.* Jun 2; 275(22): 16690-6 2000.
2. STANDAERT, ML, KANO, Y, SAJAM, MP, BANDYOPADHWAY, G, FARESE, RV. Cbl, IRS-1, and IRS-2 mediate effects of rosiglitazone on PI3K, PKC-lambda, and glucose transport in 3T3/L1 adipocytes. *Endocrinology.* May, 143(5): 1705-1716, 2002.
3. WEINSTEIN, SP, HOLLAND, A, O'BOYLE, E, HABER, RS. Effects of thiazolidinediones on glucocorticoid induced insulin resistance and GLUT4 glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Metabolism.* Oct; 42(10): 1365-1369, 1993.
4. SUN, X J, ROTHENBERG, P, KAHN, CR, BAKER, J M, ARAKI, E, WLDEN, P, A., CAHIL, DA, GOLDSTEIN, BJ, WHITE, M F. Structure of the insulin receptor substrate -1 IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-77, 1991.
5. SUN, XJ, WANG, LM, ZHANG, Y, YEMUSH, L, MYERS, MG Jr, GLASHEEN, E., LANE, W. S., PIERCE, J. H., WHITE, M. F. Role of IRS-

- 2 in insulin and cytokine signaling. *Nature* 377: 173-177 1995.
6. LAVAN, BE, LANE, WS, LIENHARD, GE. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem.* 272: 11439-11443, 1997.
 7. FOLLI, F, SAAD, MJ, BAKER, JM, KAHN, CR. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of intact rat. *J Biol Chem.* 267: 22171-22177, 1992.
 8. BROZINICK, JT Jr, BIRNBAUM, MJ. Insulin, but not contraction, activates Akt/PKB in isolated rat skeletal muscle. *J Biol Chem.* 273: 14679-14682, 1998.
 9. JIANG, G, DALLAS-YANG, Q, LI, Z, SZALKOWSKI, D, LIU, F, SHEN, X, WU, M, ZHOU, G, DOEBBER, T, BERGER, J, MOLLER, DE, ZHANG, BB. Potentiation of insulin signaling in tissues of Zucker obese rats after acute and long term treatment with PPAR γ agonists. *Diabetes* 51: 2412-2419, 2002.
 10. 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 Chem Invest.* Oct; 92(4): 2065-2072 1993.

Statin modulates insulin signaling and insulin resistance in liver and muscle of rats fed a high-fat diet

Cristina Alba Lalli, José Rodrigo Pauli, Patrícia Oliveira Prada, Dennys Esper Cintra, Eduardo Rochette Ropelle, Lício Augusto Velloso, Mario José Abdalla Saad*

Departamento de Clínica Médica, FCM, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) 13081-970 Campinas, SP, Brazil

Received 16 February 2007; accepted 12 July 2007

Abstract

Recent studies have shown that statins might have relevant effects on insulin resistance in animal models and in humans. However, the molecular mechanisms that account for this improvement in insulin sensitivity are not well established. The aim of the present study was to investigate the effect of a statin on insulin sensitivity and insulin signaling in liver and muscle of rats fed on a high-fat diet (HFD) for 4 weeks, treated or not with lovastatin during the last week. Our data show that treatment with lovastatin results in a marked improvement in insulin sensitivity characterized by an increase in glucose disappearance rate during the insulin tolerance test. This increase in insulin sensitivity was associated with an increase in insulin-induced insulin receptor (IR) tyrosine phosphorylation and, in parallel, a decrease in IR serine phosphorylation and association with PTP1B. Our data also show that lovastatin treatment was associated with an increase in insulin-stimulated insulin receptor substrate (IRS) 1/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in the liver and muscle of HFD-fed rats in parallel with a decrease in the inflammatory pathway (c-jun N-terminal kinase and I kappa β kinase (IKK β)/inhibitor of κ B/nuclear factor κ B) related to insulin resistance. In summary, statin treatment improves insulin sensitivity in HFD-fed rats by reversing the decrease in the insulin-stimulated IRS-1/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in liver and muscle. The effect of statins on insulin action is further supported by our findings that HFD rats treated with statin show a reduction in IRS-1 serine phosphorylation, I kappa kinase (IKK)/inhibitor of κ B/nuclear factor κ B pathway, and c-jun N-terminal kinase activity, associated with an improvement in insulin action. Overall, these results provide important new insight into the mechanism of statin action in insulin sensitivity.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Insulin uses 2 main signaling pathways, the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT/protein kinase B (PKB) pathway, which is responsible for most of the metabolic actions of the hormone, and the Ras–mitogen-activated protein kinase pathway, which regulates expression of some genes and cooperates with the PI3K pathway to control cell growth and differentiation [1]. The (PI3K)-AKT pathway initiates when the insulin receptor (IR) undergoes autophosphorylation after insulin binding and phosphorylates a number of intracellular proteins including IR substrate proteins (IRSs; IRS-1 and IRS-2 are the most important) [2]. After tyrosine phosphorylation, IRS-1 and IRS-2 bind

and activate the PI3K [2,3]. Downstream to PI3K, activation of a serine/threonine kinase (Akt) occurs, which in turn stimulates glucose transport in the muscle and adipose tissue, stimulates glycogen synthesis in the liver and muscle, and stimulates lipogenesis in the adipose tissue [4]. Therefore, the PI3K/Akt pathway has an important role in the metabolic effects of insulin.

An important mechanism that may contribute to the dysregulation of the insulin-signaling pathway includes serine 307 (Ser³⁰⁷) phosphorylation of IRS proteins by c-jun N-terminal kinase (JNK) [5]. The JNK is a member of the mitogen-activated protein kinase family [6,7] and can be activated by tumor necrosis factor α [8] and interleukin 1 β [9,10], both proinflammatory cytokines. Serine 307 is located next to the phosphotyrosine (pY)-binding domain in IRS-1, and its phosphorylation inhibits the interaction of the pY-binding domain with the phosphorylated NPEY motif in the activated IR, causing insulin resistance [11].

* Corresponding author. Department of Internal Medicine, FCM-UNICAMP, 13081-970 Campinas SP, Brazil. Fax: +55 19 3521 8950.

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

Furthermore, JNK might serve as a feedback inhibitor during insulin stimulation [5,11].

In rodents and humans, the dietary intake of high amounts of fat has been shown to be associated with increased adiposity and insulin resistance [12]. A recent study has shown that a high-fat diet (HFD) induces a tissue-specific regulation of glucose transport with reduced glucose uptake and insulin signaling in muscle that is accompanied by an increased insulin-stimulated glucose uptake in adipose tissue [13]. In this context, insulin resistance could be tissue specific to the muscle, liver, and hypothalamus, whereas adipose tissue remains sensitive to insulin.

Another mechanism involved in HFD-dependent insulin resistance is the activation of the proinflammatory I kappa β kinase (IKK β)/inhibitor of κ B (I κ B)/nuclear factor κ B (NF κ B) pathway [14–16]. I kappa kinase (IKK) is a serine kinase; and its activation phosphorylates the I κ B, a cytoplasmic protein that inhibits nuclear translocation of NF κ B, a family of transcription factors that function as homo- or heterodimers in the regulation of the expression of proinflammatory, immunomodulatory, and antiapoptotic genes [17]. After its phosphorylation, I κ B is ubiquitinated and degraded in the proteasome, releasing NF κ B for translocation to the nucleus and activation of gene expression. It has been proposed that NF κ B-increased activation may play an important role in the pathogenesis of insulin resistance [14–17].

Since their discovery in the early 1970s, statins have been used to lower cholesterol, acting as 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors [18,19]. However, recent studies have shown that statins might have additional relevant effects on insulin resistance in animal models [20,21] and in humans [22,23]. However, the molecular mechanisms that account for this improvement in insulin sensitivity are not yet well established. The aim of the present study is to investigate the effect of a statin on insulin sensitivity and insulin signaling in the liver and muscle of HFD-fed rats.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Male Wistar rats were provided by the State University of Campinas-Central Breeding Center (Campinas, SP, Brazil). Antiphosphotyrosine and anti-IR (α IR) antibodies anti-IRS-1, anti-Akt1/2, and anti-pJNK were from Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA). Anti-pAkt was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-PI3K and anti-phospho-IRS-1^{ser307} were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Human recombinant insulin (Humulin R) was purchased from Eli Lilly (Indianapolis, IN). Routine reagents were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO) unless otherwise specified. [¹²⁵I]-Protein A was from Amersham Biosciences Group (Little Chalfont, United Kingdom).

2.2. Animals

Four-week-old male Wistar rats were randomly divided into 3 groups with similar body weights and fed for 4 weeks: control group (C), fed standard rodent chow and water ad libitum (protein, 20 kcal%; carbohydrate, 70 kcal%; lipid, 10 kcal%); HFD group, fed a fat-rich chow and water ad libitum (protein, 20 kcal%; carbohydrate, 35 kcal%; lipid, 45 kcal%, predominantly in the form of lard); and lovastatin group (L), fed a fat-rich chow and water ad libitum and treated daily with lovastatin (6 mg/kg) by oral gavage at night during the last week of the experiment. All experiments were approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas.

2.3. Methods

2.3.1. Tissue extraction and immunoprecipitation

Food was withdrawn 12 to 14 hours before the experiments. One hour before the procedure, the animal received the last dose of drug or vehicle. Rats were anesthetized with sodium thiopental (25 mg/kg body weight, intraperitoneally) and were used 10 to 15 minutes later, that is, as soon as anesthesia was ensured by the loss of pedal and corneal reflexes. The abdominal cavity was opened, the cava vein was exposed, and 0.5 mL of isotonic sodium chloride solution or insulin (6 μ g) was injected. Fragments of liver and soleus muscle were then collected at 30 and 90 seconds, respectively. The fragments were minced coarsely and homogenized immediately in extraction buffer (1% Triton-X 100, 100 mmol/L Tris [pH 7.4] containing 100 mmol/L sodium pyrophosphate, 100 mmol/L sodium fluoride, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L sodium vanadate, 2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, and 0.1 mg of aprotinin per milliliter) at 4°C with a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Littau-Luzern, Switzerland) operated at maximum speed for 30 seconds. The extracts were centrifuged at 15 000 rpm and 4°C in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA) for 45 minutes to remove insoluble material, and aliquots of the resulting supernatants containing 2.0 mg of total protein of these tissues were used for immunoprecipitation with 10 μ L of polyclonal antibodies: anti- α IR, α IRS-1, anti-Akt (Cell Signaling Technology), anti-phospho-[Thr183]-JNK, anti-phospho-IRS-1^{ser307}, and anti-I κ B α and Protein A Sepharose 6MB or Protein A/G Plus (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Tissue extraction and immunoprecipitation overnight were followed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transfer to nitrocellulose membranes, and blotting with anti-pY, α IR, anti-IRS-1, or anti-p85/PI3 kinase antibodies.

2.3.2. Protein analysis by immunoblotting

The precipitated proteins and/or whole-tissue extracts were treated with Laemmli sample buffer [24] containing 100 mmol/L dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 5 minutes, after which they were subjected to SDS-PAGE in a Bio-Rad (Hercules, CA) miniature slab gel apparatus

Table 1
Serum insulin and plasma fasting glucose levels

	C	HFD	L
Plasma glucose (mg/dL)	95 ± 11	118 ± 6	112 ± 11
Serum insulin (ng/mL)	2.22 ± 0.12*	3.76 ± 0.24**	2.68 ± 0.08

Serum insulin and plasma glucose levels. Data are expressed as mean ± SEM. Each group was composed of 6 animals.

* $P < .001$: C vs HFD.

** $P < .05$: HFD vs L.

(Mini-Protean). For total extracts, 250 μ g of proteins were subjected to SDS-PAGE. Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 120 minutes at 120 V in a Bio-Rad Mini-Protean transfer apparatus [25]. Non-specific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter for 2 hours in blocking buffer (5% nonfat dry milk, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blot was incubated with specific antibodies overnight at 4°C and then incubated with 2 mCi FS^[125I]-labeled protein A (30 μ Ci/ μ g). The results were visualized by autoradiography with preflashed Kodak XAR film (Mauaus, Amazonas-Brazil). Band intensities were quantified by optical densitometry (model GS300; Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA).

2.3.3. Insulin tolerance test

All the 3 groups were submitted to an intravenous insulin tolerance test (1 U/kg body weight of insulin, intravenously); and samples for blood glucose measurements were collected at 0 (basal), 4, 8, 12, and 16 minutes after injection. Rats were anesthetized with sodium thiopental (25 mg/kg body weight, intraperitoneally) as described above, 40 μ L of blood was collected from their tails, and blood glucose concentration was measured by the glucose-oxidase method. Thereafter, the rate constant for plasma glucose disappearance (K_{it}) was calculated using the formula $0.693/(t_{1/2})$. The plasma glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least squares analysis of the plasma glucose concentrations during the linear phase of decline [26].

2.3.4. Serum insulin analysis

Serum insulin levels were analyzed by radioimmunoassay, as previously described [27].

2.3.5. Statistical analysis

All groups of animals were studied in parallel. Comparisons between different groups were performed by using Student *t* test for unpaired samples and analysis of variance as appropriate. The level of significance adopted was $P < .05$.

3. Results

3.1. Animal characteristics

Body weights were higher in HFD-fed rats than in the control group (HFD: 412 ± 5 g vs C: 347 ± 12 g, $P < .05$) and in the lovastatin group compared with control rats (L: 426 ± 20 g vs C: 347 ± 12 g, $P < .05$). The body weights of HFD-

fed rats and the rats of the lovastatin group were not statistically different. The insulin levels in HFD-fed animals were higher than those in the control group (C: 2.22 ± 0.12 ng/mL vs HFD: 3.76 ± 0.24 ng/mL, $P < .001$). The group fed on the diet and treated with lovastatin presented insulin levels that were similar to those of the controls and statistically different from the animals fed the HFD (HFD: 3.76 ± 0.24 ng/mL vs L: 2.68 ± 0.08 ng/mL, $P < .05$). We did not find any difference in fasting plasma glucose concentrations between the 3 groups. Table 1 shows the results of serum insulin and fasting plasma glucose.

The HFD animals were more insulin resistant than the control rats, as expressed by their lower plasma glucose disappearance rates measured by the insulin tolerance test (K_{it}) (C: 4.3%/min ± 0.6%/min vs HFD: 1.7%/min ± 0.4%/min, $P < .05$). The use of lovastatin increased the insulin sensitivity, as shown by the K_{it} (L: 3.3%/min ± 0.5%/min), which was different from the HFD group ($P < .05$) (Fig. 1).

3.2. Insulin signaling in liver of controls, HFD-fed rats, and lovastatin-treated rats

There were no differences in IR protein levels between the 3 groups. The insulin-induced IR tyrosine phosphorylation in the liver of HFD rats was decreased when compared with control animals. The animals treated with lovastatin presented insulin-induced IR tyrosine phosphorylation levels that were similar to those of controls (C: 100% ± 4% vs HFD: 48% ± 5%, $P < .001$; HFD vs L: 101% ± 9%, $P < .001$; Fig. 2A and B). The IR serine phosphorylation in the liver of HFD rats was increased when compared with control animals; and after the treatment with lovastatin, the IR serine phosphorylation was similar to that of the control group (C: 100% ± 10% vs HFD: 157% ± 8%, $P < .05$; HFD:

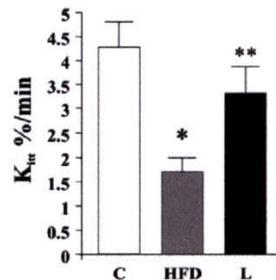


Fig. 1. All 3 groups were submitted to an intravenous insulin tolerance, as described in Materials and methods. Blood samples were collected from the tails of anesthetized rats at 0 (basal), 4, 8, 12, and 16 minutes after injection of 1 U/kg body weight of insulin intravenously; glucose concentration was measured by the glucose-oxidase method; and the rate constant for plasma glucose disappearance (K_{it}) was calculated. The HFD-fed rats were more resistant than the control rats as shown by K_{it} (C: 4.3%/min ± 0.6%/min vs HFD: 1.7%/min ± 0.4%/min, $P < .05$), and the use of lovastatin increased the insulin sensitivity (K_{it} L: 3.3%/min ± 0.5%/min vs HFD: 1.7%/min ± 0.4%/min, $P < .05$).

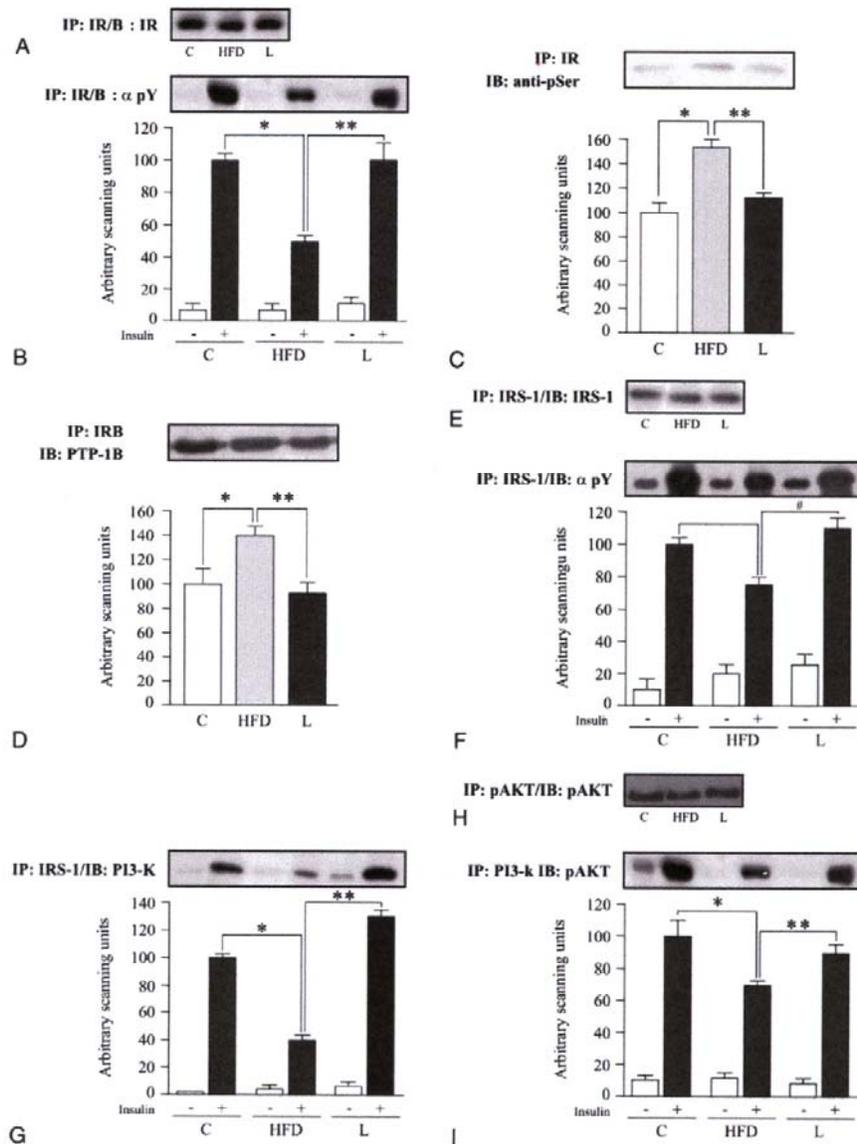


Fig. 2. Insulin signaling in the liver of control animals, animals fed on HFD for 4 weeks, and animals fed on HFD for 4 weeks and treated with lovastatin during the last week. In animals infused with insulin, the samples were extracted at 30 seconds after insulin injection. A, Immunoprecipitation (IP) with α IR and immunoblotting (IB) with α IR antibodies. B, IP with α IR and IB with α -PY. C, IP with α IR and IB with antiphosphoserine antibodies. D, IP with α IR and IB with α -PTP1B antibodies. E, IP with α -IRS-1 and IB with α -IRS-1. F, IP with α -IRS-1 and IB with α -PY. G, IP with α -IRS-1 and IB with PI3K. H, IB with α -AKT1/2 antibodies. I, IB with α -PAKT. Data are mean \pm SEM of 10 independent experiments; that is, 10 different cohorts of animals were fed on a control diet, HFD for 4 weeks, or HFD for 4 weeks plus lovastatin treatment during the last week. *HFD vs C, $P < .001$; **HFD vs L, $P < .001$; #L vs HFD, $P < .05$.

157% \pm 8% vs L: 112% \pm 4%, $P < .05$; Fig. 2C). A similar behavior was seen for the association of IR and PTP1B (C: 100% \pm 12% vs HFD: 140% \pm 8%, $P < .05$; HFD: 140% \pm 8% vs L: 95% \pm 10%, $P < 0.05$; Fig. 2D). Despite similar levels

of IRS-1 in the liver of the 3 groups, there was a decrease in insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation in the HFD group with an increase after the use of the drug (C: 100% \pm 3%, HFD: 76% \pm 7%, and L: 112% \pm 14%,

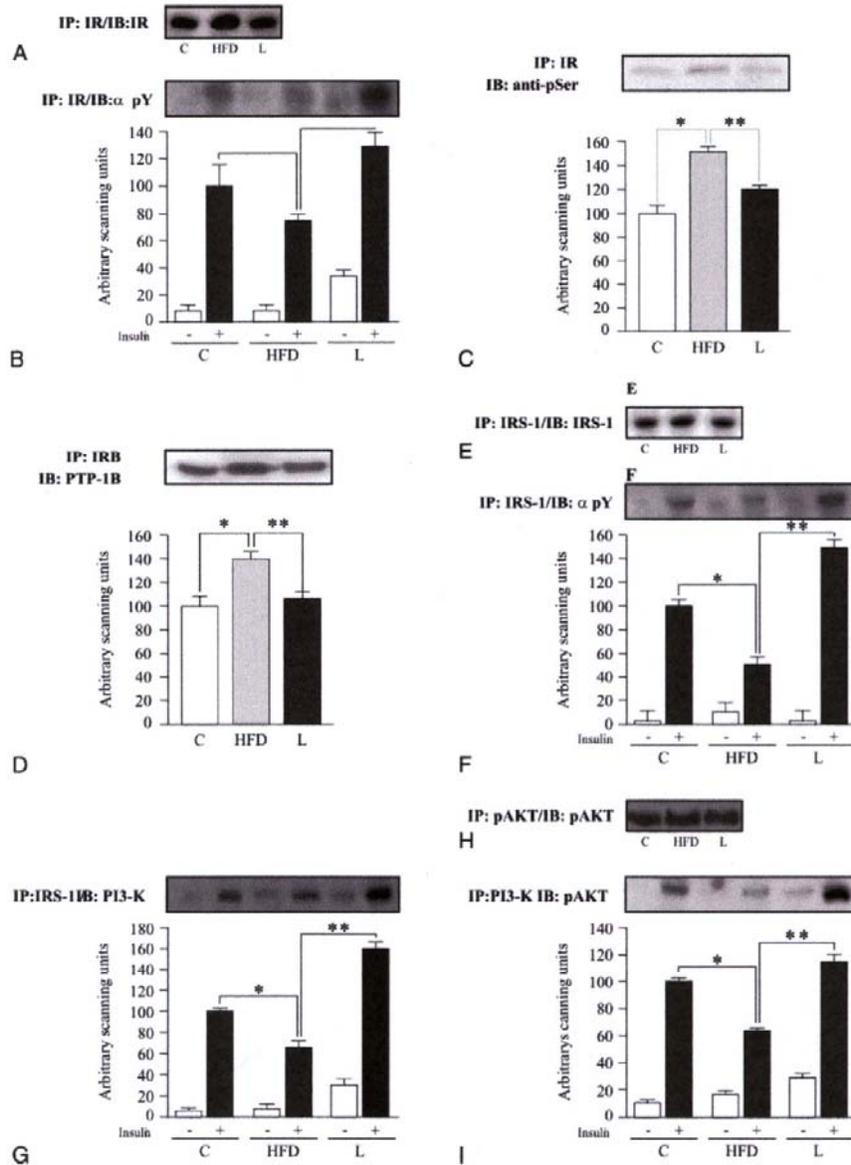


Fig. 3. Insulin signaling in the skeletal muscle of control animals, animals fed on HFD for 4 weeks, and animals fed on HFD for 4 weeks and treated with lovastatin during the last week. In animals infused with insulin, the samples were extracted at 90 seconds after insulin injection. A, IP with α -IR and IB with α -IR antibodies. B, IP with α -IR and IB with α -PY. C, IP with α -IR and IB with anti-phosphoserine antibodies. D, IP with α -IR and IB with anti-PTP1B antibodies. E, IP with α -IRS-1 and IB with α -IRS-1. F, IP with α -IRS-1 and IB with α -PY. G, IP with α -IRS-1 and IB with PI3K. H, IB with α -AKT1/2 antibodies. I, IB with α -PAKT. Data are mean \pm SEM of 10 independent experiments. *HFD vs C, $P < .001$; **HFD vs L, $P < .001$.

$P < .05$ between HFD animals and lovastatin group; Fig. 2E and F). The IRS-1/PI3K association presented a similar behavior (C: $100\% \pm 0.5\%$ vs HFD: $40\% \pm 4\%$, $P < .001$; HFD vs L: $121\% \pm 4\%$, $P < .001$; Fig. 2G). There were no differences in Akt protein levels between the groups

(Fig. 2H). However, animals fed on the HFD presented a decrease in insulin-induced Akt serine phosphorylation, which was reversed after lovastatin treatment (C: $100\% \pm 5\%$ vs HFD: $70\% \pm 2\%$, $P < .001$; HFD vs L: $95\% \pm 5\%$, $P < .001$; C vs L, $P < .05$; Fig. 2I).

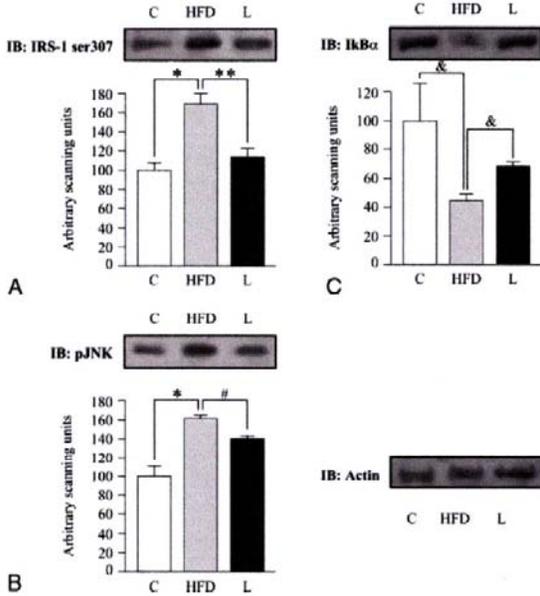


Fig. 4. Insulin signaling in the liver of control animals, animals fed on HFD for 4 weeks, and animals fed on HFD for 4 weeks and treated with lovastatin during the last week. A, IB with α -IRS-1^{ser307} antibodies. B, IB with α -JNK1. C, IB with I κ B α . D, IB with antiactin antibodies. Data are mean \pm SEM of 10 independent experiments. *HFD vs C, $P < .001$; **HFD vs L, $P < .001$; #HFD vs L, $P < .01$; &C vs HFD and HFD vs L, $P < .05$.

3.3. Insulin signaling in the skeletal muscle of controls, HFD-fed rats, and lovastatin-treated rats

There were no differences in IR protein levels in the skeletal muscle of controls, HFD-fed animals, and lovastatin-treated animals (Fig. 3A). Despite an apparent decrease in insulin-stimulated IR tyrosine phosphorylation in the HFD-fed animals and increase after use of lovastatin, there were no statistical differences between the groups (C: $100\% \pm 17\%$, HFD: $76\% \pm 4\%$, and L: $129\% \pm 23\%$; Fig. 3B). The IR serine phosphorylation in the muscle of HFD rats was increased when compared with control animals (C: $100\% \pm 8\%$ vs HFD: $155\% \pm 8\%$, $P < .05$; Fig. 3C). In the group fed on the HFD and treated with lovastatin, the IR serine phosphorylation was similar to that of the control group (HFD: $155\% \pm 8\%$ vs L: $116\% \pm 5\%$, $P < .05$; Fig. 3C). A similar behavior was seen for the association of IR and PTP1B (C: $100\% \pm 10\%$ vs HFD: $140\% \pm 8\%$, $P < .05$; HFD: $140\% \pm 8\%$ vs L: $105\% \pm 8\%$, $P < .05$; Fig. 3D). However, although no differences were observed in IRS-1 protein levels, the HFD-fed animals presented a significantly reduced insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation compared with control rats and an increased phosphorylation after the use of the drug (C: $100\% \pm 5\%$ vs HFD: $51\% \pm 7\%$, $P < .001$; HFD vs L: $151\% \pm 3\%$, $P < .001$; Fig. 3E and F).

The IRS-1/PI3K association presented similar results (C: $100\% \pm 1\%$ vs HFD: $54\% \pm 20\%$, $P < .001$; HFD vs L: $179\% \pm 11\%$, $P < .001$; Fig. 3G). There were no differences in Akt protein levels between the groups (Fig. 3H); however, the HFD-fed rats presented a decrease in insulin-induced Akt serine phosphorylation that was reversed by the use of lovastatin (C: $100\% \pm 2\%$ vs HFD: $64\% \pm 2\%$, $P < .001$; HFD vs L: $116\% \pm 7\%$, $P < .001$, Fig. 3I).

3.4. Phospho-IRS-1^{ser307}, phospho-JNK, and I κ B α in the liver of controls, HFD-fed rats, and lovastatin-treated rats

The consumption of the HFD significantly increased the levels of phospho-IRS-1^{ser307} of the rats in the HFD group compared with those of the control rats, and the treatment with lovastatin decreased it to values similar to those of controls (C: $100\% \pm 5\%$ vs HFD: $171\% \pm 20\%$, $P < .001$; HFD vs L: $113\% \pm 12\%$, $P < .001$; Fig. 4A). Similarly, the HFD-fed animals presented a significant increase in the levels of phospho-[Thr183]-JNK compared with controls; and this increase was reversed in the group of animals treated with lovastatin (C: $100\% \pm 7\%$ vs HFD: $162\% \pm 3\%$, $P < .001$; HFD vs L: $141\% \pm 3\%$, $P < .01$; Fig. 4B). There was a decrease in I κ B α in HFD-fed rats, suggesting an activation of IKK β , which was reversed in the lovastatin group (C: $100\% \pm 6\%$, HFD: $44\% \pm 4\%$, and L: $67\% \pm 2\%$; Fig. 4C).

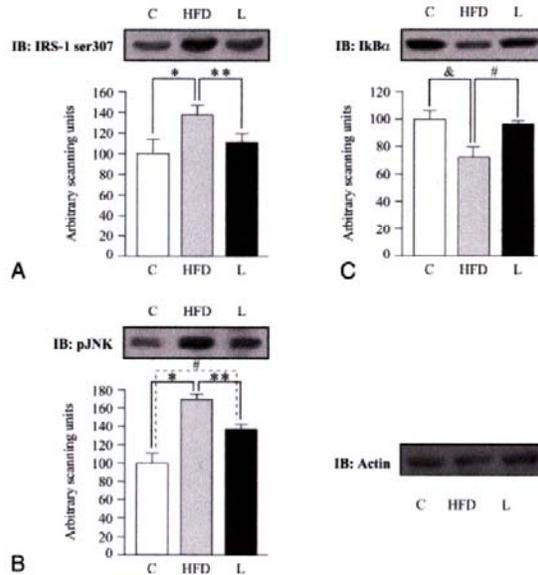


Fig. 5. Insulin signaling in the skeletal muscle of control animals, animals fed on HFD for 4 weeks, and animals fed on HFD for 4 weeks and treated with lovastatin during the last week. A, IB with α -IRS-1^{ser307} antibodies. B, IB with α -JNK1. C, IB with I κ B α . D, IB with antiactin antibodies. Data are mean \pm SEM of 10 independent experiments. *HFD vs C, $P < .001$; **HFD vs L, $P < .001$; #C vs L, $P < .01$; &C vs HFD and HFD vs L, $P < .05$.

3.4.1. Phospho-IRS-1^{ser307}, phospho-JNK, and IκBα in the skeletal muscle of controls, HFD-fed rats, and lovastatin-treated rats

The levels of phospho-IRS-1^{ser307} increased in the group of animals treated with the HFD compared with the control rats, and this increase was reversed in the lovastatin-treated rats compared with the controls (C: 100% ± 14% vs HFD: 137% ± 7%, $P < .001$; HFD vs L: 110% ± 12%, $P < .05$; Fig. 5A). Increased phospho-[Thr183]-JNK was observed in the HFD-fed rats compared with controls, and a reversal of this increase was also seen in the lovastatin-treated animals (C: 100% ± 6% vs HFD: 172% ± 2%, $P < .001$; HFD vs L: 138% ± 2%, $P < .001$; C vs L, $P < .01$; Fig. 5B). The use of the HFD decreased the IκBα in the HFD group compared with control animals, whereas treatment with lovastatin reversed this decrease to values similar to those of controls rats (C: 100% ± 7% vs HFD: 72% ± 6%, $P < .05$; HFD vs L: 97% ± 3%, $P < .01$; Fig. 5C).

4. Discussion

In the present study, we demonstrated that lovastatin, an 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, has insulin-sensitizing properties in HFD-fed rats. Treatment with lovastatin resulted in a marked improvement in insulin sensitivity characterized by an increase in the glucose disappearance rate during the insulin tolerance test. This increase in insulin sensitivity was associated with an increased insulin-stimulated IRS-1/PI3K/Akt pathway in the liver and muscle of HFD-fed rats in parallel with a decrease in the inflammatory pathway (JNK and IKK/IκB/NFκB) related to insulin resistance.

Our data showing an improvement in insulin sensitivity in statin-treated HFD-fed rats are in agreement with the results of 3 separate studies in humans [28–30]. In these studies, the authors used both simvastatin and cerivastatin and measured insulin action by euglycemic hyperinsulinemic glucose clamp and by homeostatic model assessment. In other studies, the improvement in insulin action by statin was not demonstrated, probably because of the lack of direct assessment of insulin action or inclusion of patients using other drugs that interfered in insulin action [31,32]. A retrospective cohort study using Saskatchewan health databases found that the use of statin was associated with a delay of 10 months in starting insulin treatment in patients with type 2 diabetes mellitus [33]. In Zucker rats, atorvastatin resulted in a dose-dependent increase in insulin sensitivity [21].

In the present study, the increase in insulin sensitivity induced by lovastatin was associated with an increase in insulin-stimulated IR tyrosine phosphorylation in parallel with a reduction in IR serine phosphorylation and also in the IR/PTP1B association in liver and muscle. Previous data showed that an increase in IR serine phosphorylation is associated with impairment in insulin-induced activation of

its receptor [34–36]. Another mechanism that controls IR function is the activity of PTP1B, and previous studies have demonstrated an increase in IR/PTP1B association in situations of insulin resistance [36,37]. In this regard, the reversal of increased IR serine phosphorylation and also of IR/PTP1B association induced by lovastatin may have a role in the improved insulin sensitivity induced by this drug. Our data also show that lovastatin treatment was associated with an increase in the insulin-stimulated IRS-1/PI3K/Akt pathway. This finding is consistent with studies demonstrating statin-induced activation of Akt/PKB [38,39]. A previous study suggested that Akt/PKB activation by statin is PI3K dependent [39]. Our data showing an increase in the insulin-induced activation of upstream regulators of Akt/PKB, such as IRS-1 and PI3K, in the liver and muscle of HFD-fed rats reinforce this previous study. This effect of statin may have an important role in the improvement of insulin sensitivity in HFD-fed animals because this pathway has been implicated in glucose transport in muscle and in glycogen synthesis in liver and muscle [40,41].

Serine phosphorylation of IRS proteins is believed to be a major mechanism of suppression of IRS-1 activity that contributes to insulin resistance [40]. One possible kinase that might increase IRS-1 serine phosphorylation in HFD-fed rats is JNK [13]. Our data showing that statin reversed Ser³⁰⁷ IRS-1 phosphorylation and blunted JNK activation in liver and muscle provide new insights into the mechanism of statin improvement in insulin action.

Another mechanism involved in HFD-dependent insulin resistance is the activation of the proinflammatory IKK/IκB/NFκB pathway [14,16]. We have also demonstrated a decrease in the level of IκB in the liver and muscle of rats fed on a HFD compared with control animals, suggesting an activation of this pathway. Interestingly, the statin treatment also reversed this activation. Hence, in our study, the use of lovastatin in rats on HFD reversed the deleterious effects of the insulin signaling pathway with regard to JNK activation and IKK/IκB/NFκB pathway.

Clinical and experimental studies strongly support an anti-inflammatory role for statins. Liver is a major site of action of statins, particularly in the inhibition of cholesterol synthesis. However, the hepatocyte is also a source of proinflammatory mediators; and a decrease in the expression of these factors could be an important mechanism of the anti-inflammatory action of these drugs [42]. The cholesterol synthesis is a complex process that generates isoprenoids, such as farnesyl pyrophosphate and geranylgeranyl pyrophosphate, that serve as lipid attachments for a variety of signaling molecules, such as guanosine-3-phosphate (GTP)-binding protein Ras and its related Ras-like proteins, such as Rho, Rac, Rab, Rap, and Ral [43,44]. The translocation of Ras to the membrane is necessary for activity and is dependent on farnesylation. Similarly, attachment of Rho and Rac to the membrane is required for activity; but in contrast to Ras, these factors undergo geranylgeranylation. Ras has been associated with cellular proliferation, Rac with

generation of reactive oxygen species, and Rho with activation of proinflammatory pathways [41,44]. Interestingly, Rho and Rac proteins can induce NF κ B activity by a mechanism that induces phosphorylation of I κ B and nuclear accumulation of NF κ B [45,46]. In the case of NF κ B, statins have also been shown to limit NF κ B nuclear accumulation and DNA binding, perhaps via an increase in the expression of I κ B [47,48]. In addition, statins have been shown to reduce the expression of c-jun [48], indicating a possible effect on JNK activity. Our data showing that statin blunted the activation of IKK/I κ B/NF κ B and JNK in liver and muscle of HFD-fed rats indicate a possible mechanism for their anti-inflammatory effect on insulin action. In addition to alterations described in this study induced by the HFD, other mechanisms can also induce insulin resistance [49–51]. We cannot exclude the possibility that lovastatin could also be acting through other mechanisms, contributing to its effect of improving insulin action.

In summary, statin treatment improves insulin sensitivity in HFD-fed rats by reversing the decrease in the insulin-stimulated IRS-1/PI3K/Akt pathway in the liver and muscle. The effect of statins on insulin action is further supported by our findings that HFD rats treated with statin demonstrate a reduction in IRS-1 serine phosphorylation, IKK/I κ B/NF κ B pathway, and JNK activity associated with an improvement in insulin action. Overall, these results provide important new insight into the mechanism of statin action in insulin sensitivity.

References

- [1] Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 1998;182:31–48.
- [2] Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathway in time and space. *Trends Cell Biol* 2002;12:65–71.
- [3] 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;92:2065–72.
- [4] Brozinick Jr JT, Birnbaum MJ. Insulin, but not contraction, activates Akt/PKB in isolated rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 1998;273:14679–82.
- [5] Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* 2003;278:2896–902.
- [6] Weston CR, Lambright DG, Davis RJ. Signal transduction: MAP kinase signaling specificity. *Science* 2002;296:2345–7.
- [7] Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Soc Symp* 1999;64:1–12.
- [8] Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002;420:333–6.
- [9] Nikulina MA, Sandhu N, Shamim Z, Andersen NA, Oberson A, Dupraz P, et al. The JNK binding domain of islet-brain 1 inhibits IL-1 induced JNK activity and apoptosis but not the transcription of key proapoptotic or protective genes in insulin secreting cell lines. *Cytokine* 2003;24:13–24.
- [10] Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK): from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:205–19.
- [11] Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate–1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 2002;277:1531–7.
- [12] Chopra M, Galbraith S, Darnton-Hill L. A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition. *Bull World Health Organ* 2002;80:952–8.
- [13] Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, et al. Western diet modulates insulin signaling, JNK activity and IRS-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 2005;146:1576–87.
- [14] Schoelson SE, Lee J, Yuan M. Inflammation and the IKK β /I κ B/NF κ B axis in obesity and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27(Suppl 3):S49–S52.
- [15] Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005;11:182–90.
- [16] Itai S, Ruderman NR, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C and I κ B- α . *Diabetes* 2002;51:2205–11.
- [17] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 2002;109:S81–S96.
- [18] Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterolgenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Tokyo)* 1976;29:1346–8.
- [19] Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 2001;292:1160–4.
- [20] Suzuki M, Kakuta H, Takahashi A, Shimano H, Tada-lida K, Yokoo T, et al. Effects of atorvastatin on glucose metabolism and insulin resistance in KK/Ay mice. *J Atheroscler Thromb* 2005;12:77–84.
- [21] Wong V, Stavar L, Szeto L, Uffelman K, Wang C-H, Fantus G, et al. Atorvastatin induces insulin sensitization in Zucker lean and fatty rats. *Atherosclerosis* 2006;348–55.
- [22] Okada K, Maeda N, Kikuchi K, Tatsukawa M, Sawayama Y, Hayashi J. Pravastatin improves insulin resistance in dyslipidemic patients. *J Atheroscler Thromb* 2005;12:322–9.
- [23] Huptas S, Geiss H-C, Otto C, Parhofer KG. Effect of atorvastatin (10 mg/day) on glucose metabolism in patients with metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 2006;98:66–9.
- [24] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [25] 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;76:4350–4.
- [26] Bonora P, Moghetti C, Zaccanaro M, Cigolini M, Querena V, Cacciatori A, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:374–8.
- [27] Morgan CR, Lazarow A. Immunoassay of pancreatic and plasma insulin following alloxan injection of rats. *Diabetes* 1965;14:669–71.
- [28] Paolisso G, Barbagallo M, Petrella G, Ragno E, Barbieri M, Giordano M, et al. Effects of simvastatin and atorvastatin administration on insulin resistance and respiratory quotient in aged dyslipidemic non-insulin dependent diabetic patients. *Atherosclerosis* 2000;150:121–7.
- [29] Paolisso G, Sgambato S, De Riu S, Gambardella A, Verza M, Varricchio M, et al. Simvastatin reduces plasma lipid levels and improves insulin action in elderly, non-insulin dependent diabetics. *Eur J Clin Pharmacol* 1991;40:27–31.
- [30] Paniagua JA, Lopez-Miranda J, Escribano A, Berral FJ, Marin C, Bravo D, et al. Cerivastatin improves insulin sensitivity and insulin secretion in early-state obese type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:2596–603.
- [31] Farrer M, Winocour PH, Evans K, Neil HA, Laker MF, Kesteven P, et al. Simvastatin in non-insulin dependent diabetes mellitus: effect on serum lipids, lipoproteins and haemostatic measures. *Diabetes Res Clin Pract* 1994;23:111–9.
- [32] Ohrvall M, Lithell H, Johansson J, Vessby B. A comparison between the effects of gemfibrozil and simvastatin on insulin sensitivity in

- patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and hyperlipoproteinemia. *Metabolism* 1995;44:212-7.
- [33] Yee A, Majumdar SR, Simpson SH, McAlister FA, Tsuyuki RT, Johnson JA. Statin use in type 2 diabetes mellitus is associated with a delay in starting insulin. *Diabet Med* 2004;9:962-7.
- [34] Bollag GE, Roth RA, Beaudoin J, Mochly-Rosen D, Koshl Jr DE. Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:5822-4.
- [35] Rosenzweig T, Braiman L, Bak A, Alt A, Kuroki T, Sampson SR. Differential effects of tumor necrosis factor alpha on protein kinase C isoforms and mediate inhibition of insulin receptor signaling. *Diabetes* 2002;51:1921-30.
- [36] Araújo EP, De C, Souza T, Gasparetti AL, Ueno M, Boschero AC, et al. Short-term in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. *Endocrinology* 2005;146:1428-37.
- [37] Hirata AE, Alvarez-Rojas F, Carvalho JB, Carvalho CR, Dolnikoff MS, Abdalla Saad MJ. Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. *Life Sci* 2003;73:1369-81.
- [38] Contreras JL, Smyth CA, Bilbao G, Young CJ, Thompson JA, Eckhoff DE. Simvastatin induces activation of the serine-threonine protein kinase AKT and increases survival of isolated human pancreatic islets. *Transplantation* 2002;74:1063-9.
- [39] Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefler DJ, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 2000;6:1004-10.
- [40] Sattiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001;414:799-806.
- [41] Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995;378:785-9.
- [42] Arnaud C, Burger F, Steffens S, Veillard NR, Nguyen TH, Trono D, et al. Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: new evidence for direct antiinflammatory effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1231-6.
- [43] Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997;11:2295-322.
- [44] Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:89-118.
- [45] Montaner S, Perona R, Saniger L, Lacal JC. Activation of serum response factor by RhoA is mediated by the nuclear factor- κ B and C/EBP transcription factors. *J Biol Chem* 1999;274:8506-15.
- [46] Perona R, Lopez-Miranda J, Escribano A, Berral FJ, Marin C, Bravo D, et al. Activation of the nuclear factor- κ B by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* 1997;11:463-75.
- [47] Wagner AH, Gebauer M, Guldenzoph B, Hecker M. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent inhibition of CD40 expression by atorvastatin in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1784-9.
- [48] Dichtl W, Dulak J, Erick M, Alber HF, Schwarzwacher SP, Ares MP, et al. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:58-63.
- [49] Maddux BA, Chang YN, Accili D, McGuinness OP, Youngren JF, Goldfine ID. Overexpression of the insulin receptor inhibitor PC-1/ENPP1 induces insulin resistance and hyperglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E746-9.
- [50] Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalho JB, de Oliveira MG, et al. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* 2005;54:959-67.
- [51] Pender C, Goldfine ID, Kulp JL, Tanner CJ, Maddux BA, MacDonald KG, et al. Analysis of insulin-stimulated insulin receptor activation and glucose transport in cultured skeletal muscle cells from obese subjects. *Metabolism* 2005;54:598-603.