
Henrique Gottardello Zecchin

Transmissão do sinal de insulina na aorta de ratos adultos

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de Clínica Médica, do médico HENRIQUE GOTTARDELLO ZECCHIN.

Prof.Dr. MÁRIO JOSÉ ABDALLA SAAD
Orientador



Orientador: Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad

**Campinas
2002**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	30
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	Z19t
V	EX
TOMBO BC/	52315
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00179762-B

BIB ID 279809

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

Z19t

Zecchin, Henrique Gottardello

Transmissão do sinal de insulina na aorta de ratos adultos /
Henrique Gottardello Zecchin. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Mario José Abdalla Saad

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Resistência à insulina. 2. Obesidade. 3. Envelhecimento. 4.
Óxido nítrico. I. Mario José Abdalla Saad. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Henrique Gottardello Zecchin

Transmissão do sinal de insulina na aorta de ratos adultos

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Medicina, área de Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad

**Campinas
2002**

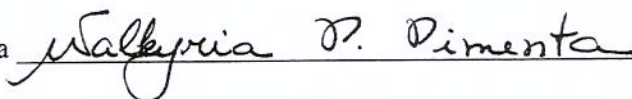
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

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



Membros:

Profa. Dra. Walkyria de Paula Pimenta



Profa. Dra. Maria Tereza Matias Baptista



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

Data: 28.08.2002

“O desejo natural dos homens bons é o conhecimento; o único alimento verdadeiro da alma, pois não se pode amar a coisa alguma antes de conhecê-la. Aquele que desperdiça a vida não deixa sobre a Terra traço mais forte que a fumaça no ar ou a espuma sobre as ondas. Nossas vidas não devem passar sem que deixem alguma lembrança na mente dos homens”

Leonardo da Vinci

Dedico este trabalho aos meus pais,
Wagner e Malvina, aos meus irmãos,
Victor e Karina, à minha esposa, Ieda e aos
meus avós.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad pelo respeito, dedicação e seriedade com que me orientou ao longo deste trabalho, e por ter me ensinado como buscar respostas para minhas perguntas. Toda a minha amizade e admiração.

Aos Profs. Drs. Kleber G. Franchini, Lício A. Velloso, Everardo M. Carneiro e Konradin Metze pela atenção e competência com que me auxiliaram em inúmeras etapas deste aprendizado.

Aos grandes amigos José Barreto e Wilson pelos ótimos momentos que passamos juntos, pela troca de conhecimentos e pelas palavras de apoio. Que nossa amizade seja duradoura.

À amiga Rosângela por seu respeito e pela disposição com que enfrentou cada novo experimento ao meu lado.

À amiga Vivian Calegari pela colaboração e determinação nos experimentos que realizamos juntos.

A todos os amigos do laboratório, Mirian, Emiko, Fernanda, Eduardo, Daniela, Alessandra, Raquel, Brahma, Cristina, Márcio Torsoni, Márcio Pereira, Cafu, Patrícia e Maria Helena, por terem me ensinado algo novo a cada dia de convivência.

Ao Sr. Luis Janeri pelo auxílio imprescindível em todos os experimentos.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões e pelas orientações para futuros trabalhos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido, processo 00/04812-0.



Sumário

1. Introdução	15
2. Objetivos	31
3. Materiais e Métodos	33
4. Resultados	45
5. Discussão	79
6. Conclusões	89
7. Summary	91
8. Referências Bibliográficas	95
9. Anexo	123
10. Publicação	125

Lista de Ilustrações

Figura 1:	56
Figura 2:	57
Figura 3:	58
Figura 4:	59
Figura 5:	60
Figura 6:	61
Figura 7:	62
Figura 8:	63
Figura 9:	64
Figura 10:	65
Figura 11:	66
Figura 12:	67
Figura 13:	68
Figura 14:	69
Figura 15:	70
Figura 16:	71
Figura 17:	72
Figura 18:	73
Figura 19:	74
Figura 20:	75
Figura 21:	76
Figura 22:	77
Figura 23:	78

Lista de abreviaturas:

μ Ci – microCuri
 α PY – anticorpo anti-fosfotirosina
AII – angiotensina II
ATP – adenosina trifosfato
bcr – breakpoint cluster region
BSA – albumina sérica bovina
DNA – ácido desoxiribonucléico
DTT – ditioneitol
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial
EPM – erro padrão da média
ERK – quinase reguladora da sinalização extracelular
GLUT – transportador de glicose
GRB2 – proteína ligadora do receptor para fator de crescimento
GSK-3 – glicogênio sintase quinase-3
HE – hematoxilina e eosina
HUVEC – células endoteliais de veia umbilical humana
Ig – imunoglobulina
IGF – fator de crescimento “insulina-like”
IR – receptor de insulina
IRS – substrato do receptor de insulina
IR β – subunidade β do receptor de insulina
ITT – teste de tolerância à insulina
JAK2 – *Janus Kinase 2*
kDa – quilodalton
Kitt – constante de desaparecimento da glicose
MAP kinase – proteína quinase ativadora da mitogênese
MEK – MAP/ERK quinase

MKP-1 – MAP quinase fosfatase-1
NO – óxido nítrico
PAI-1 – inibidor 1 do ativador do plasminogênio
PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas
PDK – proteína quinase dependente de fosfatidilinositol
PFK2 – 6-fosfofrutose 2-quinase
PH – domínio com homologia à plecstrina
PI – fosfatidilinositol
PI 3-K – fosfatidilinositol 3-quinase
PKB – proteína quinase B ou Akt
PKC – proteína quinase C
PMSF – fenilmetilsulfonilfluoreto
PTB – domínio de ligação à fosfotirosina
Raf – serina-quinase citoplasmática ativada pelo Ras e ativadora da MAP quinase
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
SH2 – *src-homology 2 domain*
SH3 – *src-homology 3 domain*
Shc – *src-homology 2 domain-containing*
SHR – ratos espontaneamente hipertensos
SOS – fator ativador do Ras, com homologia a *Son-of-sevenless*
Src – oncogene definido como produto do sarcoma-vírus Rous
STAT – *Signal Transducers and Activators of Transcription*
TCA – ácido tricloroacético
TNF – fator de necrose tumoral
t-PA – ativador do plasminogênio tecidual
TRIS – tri-hidroximetil-aminometano
VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular
VSMC – células musculares lisas vasculares

* Os termos estão apresentados de acordo com o uso genérico, o que explica a tradução literal de alguns termos e ausência de tradução em outros.

Resumo

Estudos epidemiológicos demonstram forte associação entre resistência à insulina, hipertensão e morbidade cardiovascular. A insulina, além de seus efeitos metabólicos, exerce efeitos cardiovasculares mediados pelo sistema nervoso simpático e pela via do óxido nítrico (NO). Recentemente foi descoberto que, em situações normais, a insulina ativa a produção de NO em células endoteliais em cultura através de um mecanismo dependente da fosfatidilinositol (PI) 3-quinase, com ativação da Akt e subsequente fosforilação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS3) em resíduos de serina.

As ações da insulina no sistema cardiovascular estão reduzidas em diversos estados de resistência à insulina, porém o mecanismo através do qual ocorre manutenção da pressão arterial normal e ausência de doença cardiovascular em alguns modelos animais de resistência à insulina ainda não foi estudado.

Neste estudo, usando técnicas de imunoprecipitação e *immunoblotting*, examinamos *in vivo* a regulação das proteínas envolvidas na transmissão do sinal de insulina no músculo esquelético e na aorta torácica de ratos obesos envelhecidos (12 meses de idade), os quais apresentaram resistência à insulina mas não desenvolveram doença cardiovascular, comparando-os com ratos jovens (2 meses de idade).

As vias envolvidas na transmissão intracelular do sinal de insulina tiveram comportamentos diferentes nos tecidos estudados. Os ratos com 12 meses de idade apresentaram redução significativa na transmissão do sinal de insulina pela via da PI 3-quinase no músculo esquelético, com níveis teciduais e graus de ativação normais da MAP quinase. Na aorta, entretanto, a via da PI 3-quinase / Akt mostrou-se preservada, levando à ativação normal da óxido nítrico sintase endotelial; as isoformas ERK1/2 da MAP quinase apresentaram maiores graus de fosforilação e níveis teciduais nos animais com 12 meses, tanto na ausência quanto após estímulo com insulina, em comparação aos animais jovens.

A redução na ativação da via da PI 3-quinase / Akt pela insulina no músculo esquelético de ratos com 12 meses de idade pode ter contribuído para o fenótipo de resistência à insulina apresentado por este modelo animal. No vaso, entretanto, apesar do aumento da quantidade e ativação da MAP quinase, a preservação da via da PI 3-quinase pode ter contribuído para evitar a aterosclerose e hipertensão arterial sistêmica no rato obeso e envelhecido.

1. Introdução

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células β do pâncreas, cuja síntese é ativada pela elevação da glicemia. A insulina circulante age em vários tecidos periféricos, incluindo músculo, fígado e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da captação de glicose, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como bloqueio da neoglicogênese, glicogenólise, lipólise e proteólise. Além disso, a insulina tem efeitos tardios na expressão de genes e síntese protéica, assim como na proliferação e diferenciação celulares. Uma função recém-descoberta da insulina e dos fatores de crescimento “insulina-like” (IGFs) envolve a prevenção da apoptose ou morte celular, promovendo a sobrevivência celular.

Os eventos que ocorrem após a ligação da insulina ao seu receptor são altamente regulados e específicos (Pessin & Saltiel, 2000). A compreensão das etapas moleculares da sinalização de insulina pode proporcionar novas abordagens terapêuticas para estados de resistência à insulina, incluindo obesidade, *diabetes mellitus*, hipertensão e intolerância à glicose associada a diversas endocrinopatias.

A ação da insulina na célula se inicia através da sua ligação a um receptor de membrana plasmático (Freychet, Roth, & Neville, Jr., 1971; Cuatrecasas, 1972). Os receptores de insulina estão presentes em todas as células do organismo, em concentrações variáveis, incluindo as células endoteliais e células da camada muscular lisa do vaso (King & Johnson, 1985; Jialal et al., 1985). Suas concentrações variam de 40 receptores por eritrócito circulante a mais de 200.000 receptores por adipócito ou hepatócito. O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituída por duas subunidades α , cada uma com 135 kDa e duas subunidades β , cada uma com 95 kDa, unidas por ligações dissulfeto (Kahn, 1985). A subunidade α é inteiramente extracelular e contém o domínio de ligação da insulina ou “domínio regulatório”. A subunidade β é uma cadeia peptídica transmembrana e é a responsável pela transmissão do sinal, contendo o domínio tirosina-quinase ou “domínio catalítico”.

Para os receptores transmembrana da família das tirosina-quinases a união de um ligante a sua porção extracelular (domínio regulatório) catalisa a transferência do grupo (γ)-fosfato terminal do ATP para resíduos de tirosina em proteínas-alvo selecionadas. O

aumento da carga negativa atribuída aos fosfoésteres formados em um ou mais domínios na proteína muda a sua forma e, conseqüentemente, seu estado funcional. A fosforilação de uma proteína é transitória; na célula há fosfatases, que hidrolisam a forma fosforilada do substrato protéico de volta a sua forma original. A alteração no estado de fosforilação de uma proteína é uma das principais vias de que as células dispõem para que sinais externos (hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores, drogas) possam regular as vias metabólicas intracelulares.

O receptor de insulina pertence à família de receptores de fatores de crescimento com atividade tirosina-quinase intrínseca. Após a ligação da insulina às subunidades α , o receptor se autofosforila rapidamente em múltiplos resíduos de tirosina (1158, 1162, 1163) nas subunidades β (Ebina et al., 1985) tornando-se capaz de fosforilar outros substratos em resíduos de tirosina (Kasuga, Karlsson, & Kahn, 1982). Tem sido postulado que a subunidade α mantém um tônus inibitório sobre a atividade quinase da subunidade β , que é aliviado após a ligação da insulina (White, Shoelson, Keutmann, & Kahn, 1988). A ligação da insulina induz uma alteração conformacional que modifica a interação entre os heterodímeros α - β , permitindo a transfosforilação das subunidades β , ou seja, uma subunidade β fosforila os resíduos de tirosina da outra subunidade β (Baron & Van Obberghen, 1995).

A maior evidência de que a atividade tirosina-quinase do receptor de insulina é necessária para a ação da insulina provém de experimentos com mutagênese *in vitro*, nos quais um resíduo de lisina na posição 1030 foi trocado por qualquer outro aminoácido. Com base na analogia de outras quinases, este resíduo é o sítio de união do ATP na quinase (Ebina et al., 1985; Ullrich et al., 1985). Quando essas mutações são expressas em células, a ligação da insulina ocorre normalmente mas, como quinases, são totalmente inativas e ineficientes na mediação da estimulação da insulina no metabolismo celular (Ebina et al., 1987). Isto é verdadeiro para todos os efeitos da insulina, tanto os efeitos metabólicos agudos quanto a promoção do crescimento. Mutações nos principais sítios de autofosforilação do receptor de insulina produzem efeitos similares, porém menos intensos (Wilden et al., 1992).

Após a ativação da tirosina quinase do receptor de insulina, este será capaz de fosforilar uma série de proteínas, dentre as quais as conhecidas por IRS (*substratos do receptor de insulina*) estão melhor caracterizadas. Essas proteínas-substratos que não têm atividade quinase são comumente denominadas proteínas de acoplamento pois, após a fosforilação, podem se ligar a várias outras proteínas intracelulares com domínios específicos para a transmissão do sinal de insulina. A fosforilação e as interações proteína-proteína são essenciais para transmitir e compartimentalizar o sinal da insulina (Virkamaki, Ueki, & Kahn, 1999).

A fosfotirosina no domínio 960 do receptor de insulina autofosforilado na sequência NPXpY (asparagina – prolina – qualquer aminoácido – fosfotirosina) serve de reconhecimento para o domínio PTB (*domínio de ligação à fosfotirosina*) das proteínas IRS. A modificação desta tirosina inibe completamente a fosforilação subsequente do IRS-1 e de outros substratos do receptor de insulina e leva à perda das ações biológicas dependentes de insulina (White et al., 1988).

Os substratos do receptor de insulina correspondem a uma família de proteínas fosforiladas pelo receptor de insulina ativado. Até o momento, nove membros desta família foram identificados, incluindo IRS-1 (White, Maron, & Kahn, 1985; Rothenberg et al., 1991; Sun et al., 1992), IRS-2 (Sun et al., 1995), IRS-3 (Lavan, Lane, & Lienhard, 1997b) e IRS-4 (Lavan et al., 1997a), que são vistos como os mais específicos para a sinalização da insulina; Gab-1 (Holgado-Madruga, Emlet, Moscatello, Godwin, & Wong, 1996); Shc, que tem três isoformas (Pelicci et al., 1992) e p62^{dok} (Carpino et al., 1997).

Uma proteína IRS típica apresenta alguns domínios de interação (White, 1998). Estes domínios existem na estrutura terciária natural de uma proteína ou podem ser criados por modificações covalentes da proteína, como as que ocorrem após a fosforilação de resíduos de tirosina ou serina/treonina (Virkamaki et al., 1999). Na extremidade NH₂-terminal de todas as IRS, exceto da Shc, encontra-se o domínio PH (*domínio com homologia à plecstrina*), envolvido no direcionamento das IRS à membrana celular e às proximidades do receptor de insulina. O domínio PH se liga a grupos fosfatidilinosítídeos específicos eletricamente carregados na membrana celular próximos ao receptor de insulina. O domínio PTB é crítico para o reconhecimento da sequência NPXpY na

subunidade β do receptor de insulina. Assim, os domínios PH e PTB contribuem para a interação de uma proteína IRS com o receptor de insulina. Durante a interação com o receptor de insulina, a proteína IRS é fosforilada em vários de seus resíduos de tirosina pelo receptor de insulina, criando sítios de ligação para proteínas com domínios SH2. O IRS-1 contém pelo menos vinte domínios de tirosina potencialmente susceptíveis à fosforilação, incluindo seis em seqüências YMXM e três em seqüências YXXM (Keller, Lamphere, Lavan, Kuhne, & Lienhard, 1993). Pelo menos oito destes domínios de tirosina são fosforilados pelo receptor de insulina ativado. O IRS-1 também contém cerca de 30 resíduos serina/treonina em domínios de fosforilação para serina/treonina quinases, e vários estudos indicam que a fosforilação do IRS-1 nestes resíduos pode ter efeito inibitório na sinalização da insulina (Tanti, Gremeaux, Van Obberghen, & Marchand-Brustel, 1994; De Fea & Roth, 1997b). Em células musculares lisas da aorta de ratos, o tratamento com angiotensina II reduziu a fosforilação do IRS-1 em tirosina e aumentou a sua fosforilação em resíduos de serina (Folli, Kahn, Hansen, Bouchie, & Feener, 1997).

Para estudar o papel fisiológico do IRS-1 em animais, camundongos que não expressam o gene do IRS-1 (*knockout* do gene) foram produzidos (Araki et al., 1994): surpreendentemente, camundongos homozigotos para o *knockout* do gene do IRS-1 eram viáveis e apresentavam poucas mudanças em seu metabolismo – déficit de crescimento e discreta intolerância à glicose, além do aumento de fatores de risco cardiovasculares: hipertensão arterial, hipertrigliceridemia e deficiência no relaxamento vascular dependente do endotélio (Abe et al., 1998). Isto direcionou as pesquisas a buscar vias alternativas para a sinalização de insulina. Análises posteriores do fígado de camundongos com *knockout* do gene do IRS-1 demonstraram que a insulina estimulava a fosforilação em tirosina de uma proteína com peso molecular aparente de 190 kDa em SDS-PAGE (*eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio*). Devido ao seu peso molecular semelhante ao do IRS-1 e sua aparente capacidade de compensar uma deficiência do IRS-1, essa proteína foi denominada IRS-2 e foi clonada em 1995 (Sun et al., 1995). IRS-1 e IRS-2 são co-expressos em muitas células e tecidos (fígado, músculo e tecido adiposo). Recentemente foi demonstrado que camundongos com *knockout* do gene do IRS-2 em homozigose desenvolvem uma síndrome muito semelhante ao *diabetes mellitus* tipo 2 (Withers et al.,

1998), com resistência periférica à insulina e massa reduzida de células β pancreáticas, evoluindo para deterioração da homeostase de glicose. Posteriormente, dois novos membros da família de proteínas IRS foram clonados: o IRS-3 (PM 60 kDa) é um substrato adipócito-específico do receptor de insulina, que pode ser o principal regulador da PI 3-quinase em células adiposas (Lavan & Lienhard, 1993; Smith-Hall et al., 1997; Lavan et al., 1997a; Lavan et al., 1997b); o IRS-4 é uma proteína de 160 kDa que foi detectada em células renais embrionárias humanas – HEK (Fantin et al., 1998). O papel relativo de cada uma dessas proteínas IRS nas vias de sinalização da insulina ainda requer estudos adicionais .

Após a estimulação com insulina, as proteínas IRS e Shc são imediatamente fosforiladas em resíduos de tirosina (White, 2002). A ativação destes substratos protéicos leva à ativação de duas vias específicas de sinalização, divididas apenas para maior clareza de compreensão, já que as evidências atuais indicam que estas vias não são independentes. Uma delas, a cascata p42/p44MAPK (*proteína quinase ativadora da mitogênese*), tem início com a ativação da Ras pela Shc ou pelas IRSs ativadas, levando à estimulação sequencial das proteínas quinases citoplasmáticas Raf-1, MEK e p42/p44MAPK (ERK1/2, *quinases reguladoras da sinalização extracelular*). Esta cascata termina por fosforilar fatores de transcrição nucleares que modulam a expressão de genes, o crescimento, a proliferação e a diferenciação celulares (Davis, 1993; L'Allemain, 1994). A outra cascata é conhecida como via da PI 3-quinase / PKB (*fosfatidilinositol 3-quinase / proteína quinase B*) e, além de também exercer ações sobre o crescimento celular, parece ser a responsável pelo controle do transporte de glicose, glicólise, síntese de glicogênio, síntese protéica e inibição da apoptose (Shepherd, Withers, & Siddle, 1998).

Muitas proteínas intracelulares que interagem com as IRSs contêm domínios SH2 (*Src homology 2*), que são módulos de ligação a fosfotirosinas, identificados inicialmente em 1991 (Koch, Anderson, Moran, Ellis, & Pawson, 1991). Os domínios SH2 têm maior afinidade de ligação às fosfotirosinas que os domínios PTB e reconhecem padrões específicos de aminoácidos, tornando possível uma interação proteína-proteína mais estável. As proteínas adaptadoras, que contêm domínios SH2, geralmente possuem domínios SH3 para ligação a seqüências ricas em prolina PXXP com uma estrutura em

hélice específica. Esses domínios SH3 constituem uma ligação entre as proteínas adaptadoras e seus alvos intracelulares ou subunidades catalíticas associadas. A subunidade p85 da PI 3-quinase não possui atividade enzimática intrínseca mas é responsável pela transmissão de etapas do sinal insulínico devido a sua capacidade de interação com outras proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina. A subunidade regulatória da PI 3-quinase, assim como a Grb2, são exemplos bem conhecidos de proteínas adaptadoras.

A PI 3-quinase é composta de duas subunidades: uma subunidade catalítica (p110), com peso molecular de 110 kDa, e uma subunidade regulatória (p85) com 85 kDa. Em condições de “repouso”, isto é, na ausência de estímulo com insulina, a subunidade regulatória p85 serve para estabilizar e inativar a subunidade catalítica p110. A atividade inibitória da p85 é liberada quando o domínio SH2 da porção NH₂-terminal é ocupado por um resíduo de tirosina fosforilado (Cuevas et al., 2001). A subunidade p85 é uma proteína com vários domínios: dois domínios SH2, um domínio inter-SH2, um domínio bcr (*breakpoint cluster region*) e um domínio SH3 (Carpenter & Cantley, 1990). Os domínios SH2, localizados na extremidade C-terminal da proteína, podem interagir com seqüências de fosfotirosina específicas em moléculas sinalizadoras, como o IRS-1 (White, 1998). O domínio inter-SH2 permite a associação entre a p85 e a extremidade N-terminal da p110 (Dhand et al., 1994a). O papel do domínio bcr ainda é pouco conhecido e o domínio SH3, localizado na extremidade N-terminal da subunidade p85, interage com seqüências ricas em prolina de proteínas sinalizadoras. A subunidade p110 possui duas atividades enzimáticas. Possui atividade catalítica quinase direcionada contra a posição D3 de vários fosfatidilinosítídeos, gerando os segundos mensageiros restritos à membrana PI(3,4,5)tri-fosfato – PIP₃ - e PI(3,4)bi-fosfato – PIP₂. Possui também uma atividade serina-quinase capaz de fosforilar p85 e IRS-1 em resíduos de serina podendo exercer papel modulatório negativo na sinalização da insulina (Tanti et al., 1994; Dhand et al., 1994b).

Em resposta à insulina, a subunidade p85 da PI 3-quinase se associa ao IRS-1 fosforilado em tirosina através da interação entre os domínios SH2 da p85 e as seqüências YMXM do IRS-1 (Myers, Jr. et al., 1992; Rordorf-Nikolic, Van Horn, Chen, White, & Backer, 1995) ativando a função catalítica da p110. A PI 3-quinase também é recrutada pelo IRS-2 e IRS-3 fosforilados em tirosina e podem ocorrer diferenças funcionais na

capacidade destes substratos do receptor de insulina de ativar a PI 3-quinase (Smith-Hall et al., 1997).

A PI 3-quinase ativada age rapidamente sobre uma serina/treonina quinase conhecida por c-Akt ou PKB, localizada primariamente no citosol (90%). Esta enzima corresponde ao homólogo celular humano da v-Akt, um oncogene viral detectado inicialmente em células AKR de ratos, as quais apresentam alta incidência de leucemias e linfomas a partir de timomas espontâneos e nas quais pôde ser isolado um retrovírus tumorigênico denominado AKT8 (Staal, Hartley, & Rowe, 1977; Staal & Hartley, 1988). O locus da Akt humana foi mapeado no cromossomo 14q32, próximo ao locus das cadeias pesadas de imunoglobulinas (Staal, Huebner, Croce, Parsa, & Testa, 1988). Em 1991 a Akt humana foi clonada e teve seu peso molecular determinado em 57 kDa (Bellacosa, Testa, Staal, & Tsichlis, 1991). Esta quinase apresenta alta homologia com a PKA (*proteína quinase A*) e com a PKC (*proteína quinase C*) e, por consequência, também foi denominada de PKB. O genoma de mamíferos contém três genes codificando Akt ou PKBs: Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) e Akt3 (PKB γ) (Coffer, Jin, & Woodgett, 1998). Os três homólogos têm alta conservação evolutiva (Franke, Tartof, & Tsichlis, 1994). A extremidade N-terminal da Akt contém um domínio PH (Haslam, Koide, & Hemmings, 1993; Mayer, Ren, Clark, & Baltimore, 1993) e o domínio catalítico central tem muita semelhança com a PKA e a PKC (Bellacosa et al., 1993). Todos os tecidos contêm pelo menos uma isoforma de Akt/PKB: Akt1 (PKB α) e Akt2 (PKB β) têm níveis de expressão mais altos no cérebro, timo, coração e pulmões, enquanto a Akt3 (PKB γ) é expressa de forma mais restrita, com níveis mais elevados no cérebro e testículos (Coffer & Woodgett, 1991; Jones, Jakubowicz, Pitossi, Maurer, & Hemmings, 1991; Bellacosa et al., 1993). Parece que a expressão de Akt é tanto maior quanto mais diferenciada for a célula (Coffer et al., 1998).

A insulina age de forma diferente sobre as três isoformas da Akt, de acordo com o tecido e a espécie em estudo. A administração de insulina em ratos rapidamente ativa a Akt1 no músculo esquelético, com efeitos mínimos sobre a Akt2 e sem efeitos sobre a Akt3 (Walker et al., 1998). Em humanos, a insulina ativa as três isoformas no músculo, embora o efeito sobre a Akt3 seja pequeno (Kim, Nikoulina, Ciaraldi, Henry, & Kahn, 1999). A

incubação de adipócitos de ratos com insulina *in vitro* resulta em ativação da Akt1 e Akt2, mas não da Akt3, enquanto em hepatócitos de ratos *in vitro* a insulina ativa principalmente a Akt1, com pouco efeito sobre a Akt2 e nenhum efeito sobre a Akt3 (Walker et al., 1998). Em adipócitos humanos, a insulina ativa a Akt2 (Rondinone, Carvalho, Wesslau, & Smith, 1999), mas os efeitos deste hormônio sobre as outras isoformas da Akt no tecido adiposo ainda não foram individualmente estudados.

Apesar da Akt ter potencial oncogênico (Aoki, Batista, Bellacosa, Tsichlis, & Vogt, 1998), sua regulação e função normais eram desconhecidas até que se descobriu ser um alvo de ação da PI 3-quinase (Burgering & Coffey, 1995; Kohn, Kovacina, & Roth, 1995). Os produtos lipídicos 3'-fosforilados da PI 3-quinase (PIP2, PIP3) medeiam a ativação da Akt, interagindo com seu domínio PH (Coffey et al., 1998; Lietzke et al., 2000). Através desta interação, a Akt é translocada do citosol para a membrana celular, tornando-se substrato de duas proteínas quinases, também ligadas à membrana pela interação entre seus domínios PH e os fosfatidilinosídeos gerados pela PI 3-quinase - denominadas PDK1 e PDK2 (*proteína quinase dependente de fosfatidilinositol 1 e 2*), as quais fosforilam a Akt sequencialmente em treonina 308 e serina 473 (Alessi et al., 1997; Stephens et al., 1998; Currie et al., 1999). Somente quando fosforilada nestes dois resíduos é que a Akt se torna ativa, deslocando-se da membrana para fosforilar seus substratos celulares (Alessi et al., 1996).

Como a atividade da Akt é estimulada por uma variedade de fatores de crescimento e insulina, muito se tem estudado sobre seus efeitos no metabolismo intermediário, na síntese de proteínas e na sua capacidade de afetar o potencial de crescimento celular, induzir diferenciação celular e inibir a apoptose.

Vários trabalhos têm demonstrado uma possível associação entre a ativação da Akt e a estimulação da translocação de GLUT4 (*transportador de glicose 4*) dos estoques intracelulares para a superfície celular (Tanti et al., 1997; Wang et al., 1999).

O aumento da síntese de glicogênio em alguns tecidos pode ser regulado pela Akt pois foi demonstrado que a GSK-3 (*glicogênio sintase quinase-3*) é um de seus substratos. A inibição da GSK-3 ativa a síntese de glicogênio e o início da produção de certos mRNA (Alessi et al., 1996; Coffey et al., 1998).

Um substrato direto da Akt é a PFK2 (*6-fosfofrutose 2-quinase*) e a fosforilação da PFK2 pode explicar como a glicólise é estimulada pela insulina (Deprez, Vertommen, Alessi, Hue, & Rider, 1997).

O estímulo da síntese protéica em resposta à insulina em diversos tipos de células, principalmente músculo esquelético e tecido adiposo, também pode estar sob controle da Akt, a qual controla a atividade da quinase mTOR e da p70S6 quinase de maneira ainda não totalmente esclarecida (Burgering et al., 1995).

A morte celular programada, ou apoptose, é fundamental na regulação do desenvolvimento e no controle da homeostase tecidual em condições de *stress* celular. Fatores de crescimento como PDGF (*fator de crescimento derivado de plaquetas*), IGF-1 e a insulina podem promover a sobrevivência celular ativando a PI 3-quinase e a Akt (Ataliotis & Mercola, 1997; Kulik & Weber, 1998). A ativação da Akt induz um forte sinal anti-apoptótico. Parte deste efeito é, provavelmente, mediado pela fosforilação da BAD, um membro da família da Bcl-2. A proteína BAD no estado não-fosforilado interage com a Bcl_{XL} para induzir apoptose. Após ser fosforilada em serina pela Akt, a BAD se dissocia da Bcl_{XL} e forma um complexo inativo com a proteína 14.3.3 (Datta et al., 1997). Tem sido encontrada super-expressão da Akt em grande variedade de tumores humanos, o que pode ser interpretado como uma consequência da promoção da sobrevivência de células transformadas em condições nas quais a apoptose normalmente evitaria o seu crescimento (Coffer et al., 1998).

Recentemente, dois experimentos demonstraram que a Akt pode fosforilar e ativar diretamente a eNOS (*óxido nítrico sintase endotelial*) em dois resíduos de serina (1177 e 1179), levando à produção endotelial de óxido nítrico (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999). O óxido nítrico (NO) é um segundo mensageiro gasoso fundamental para a manutenção da homeostase cardiovascular, regulando a pressão arterial sistêmica, a remodelação vascular e a angiogênese (Huang et al., 1995; Shesely et al., 1996; Murohara et al., 1998; Rudic et al., 1998). O estímulo fisiológico mais importante para a produção contínua de NO no endotélio é o *stress* mecânico gerado pela corrente sanguínea sobre a camada endotelial. Até então, desconhecia-se como o *stress* gerado pelo movimento do sangue sobre o endotélio poderia regular a fosforilação da eNOS. Uma forma mutante de

eNOS (S1179A) é resistente à fosforilação e ativação pela Akt (Fulton et al., 1999). Através da transferência de genes com adenovírus, uma Akt constitucionalmente ativada (myr-Akt) aumenta a liberação basal de NO pelas células endoteliais, enquanto uma Akt inativa (AA-Akt) atenua a produção de NO estimulada por VEGF (*fator de crescimento do endotélio vascular*) (Fulton et al., 1999). A inibição da via da PI 3-quinase/Akt ou uma mutação na eNOS, no domínio de ligação com a Akt (serina 1177), atenua a fosforilação em serina da eNOS evitando a sua ativação. Mimetizando-se a fosforilação da Ser 1177 na eNOS há aumento de sua atividade enzimática, a qual passa a apresentar atividade máxima em concentrações sub-fisiológicas de cálcio (Dimmeler et al., 1999). Assim, ficou demonstrado que a eNOS é um substrato da Akt e que a fosforilação da eNOS pela Akt é um novo mecanismo de regulação da ativação da eNOS independente do cálcio (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999).

Outro estudo documentou novo papel fisiológico para a Akt: a regulação do tônus vasomotor (Luo et al., 2000). A expressão endotelial da forma mutante da Akt constitucionalmente ativada aumentou o diâmetro de repouso de artérias femorais de coelhos com conseqüências funcionais no fluxo sanguíneo. Esta vasodilatação pôde ser bloqueada completamente pela administração do inibidor da eNOS L-NAME. Portanto, a modulação farmacológica da atividade da Akt poderia ser útil no tratamento de distúrbios cardiovasculares associados à disfunção endotelial e redução do fluxo vascular.

A maioria dos efeitos da insulina foi caracterizada no músculo esquelético, tecido adiposo e fígado, alvos tradicionais do hormônio (Kahn, 1994; White, 1997). Estes estudos demonstraram que a insulina é um mensageiro pleiotrópico e suas ações são tecido-específicas. No entanto, tecidos que não são alvos tradicionais da insulina, como por exemplo o coração (Velloso et al., 1996), também podem sofrer alguma regulação pelo hormônio (controle do transporte de glicose, síntese de glicogênio e crescimento celular). É bem conhecida, clínica e epidemiologicamente, a associação entre as síndromes de resistência à insulina e hiperinsulinemia (como o *diabetes mellitus* tipo 2 e a obesidade) com a hipertensão arterial sistêmica, aterosclerose e hipertrofia cardíaca (Ferrannini et al., 1987; Zavaroni et al., 1989; Reaven, 1991; Sasson, Rasooly, Bhesania, & Rasooly, 1993; Feener & King, 1997). Assim, um papel da resistência à insulina e da hiperinsulinemia na

patogênese da doença cardiovascular foi proposto, mas os estudos prévios enfatizavam apenas as anormalidades no metabolismo de lipoproteínas e a hiperglicemia como possíveis efetores (Reaven, 1991; Sasson et al., 1993). Efeito direto da insulina no crescimento do miocárdio e da camada muscular arterial também foi proposto (Straus, 1984), mas pouco se sabe ainda sobre os seus mecanismos moleculares. Estudos recentes em nosso laboratório demonstraram um *cross-talk* entre os sistemas de sinalização de angiotensina II (AII) e insulina: a AII induz a fosforilação de IRS-1, IRS-2 e STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*) no coração de ratos mas, ao invés de ativação, ocorre inibição da atividade da PI 3-quinase (Saad, Velloso, & Carvalho, 1995; Velloso et al., 1996; Velloso, Carvalho, Rojas, Folli, & Saad, 1998). Foi demonstrado ainda que a AII pode modular a expressão da NOS3 nas células miocárdicas e, conseqüentemente, a função do sistema do óxido nítrico no miocárdio (Tambascia et al., 2001).

Resistência à insulina é definida como uma resposta biológica subnormal a uma determinada concentração de insulina. Virtualmente todos os pacientes com *diabetes mellitus* têm algum grau de resistência à insulina. Humanos obesos têm diminuição do nível de expressão e da atividade tirosina-quinase do receptor de insulina no músculo esquelético (Caro et al., 1987) e adipócitos (Olefsky, 1976), ambos restaurados pela perda de peso (Freidenberg, Reichart, Olefsky, & Henry, 1988), a qual melhora também a sensibilidade à insulina. Em modelos animais de obesidade genética ou adquirida, o número de receptores de insulina no fígado está reduzido e pode ser corrigido com redução da hiperinsulinemia (Hurrell, Pedersen, & Kahn, 1989). A resistência à insulina associada à obesidade também pode ser causada por alterações nos lipídios das membranas celulares secundárias à hiperlipidemia (Cremel et al., 1993). Pouco se sabe ainda sobre os locais exatos da resistência pós-receptor na obesidade e no *diabetes mellitus*. Em pacientes extremamente obesos (índice de massa corporal de 52 kg/m²), o nível de expressão de IRS-1 no músculo esquelético está reduzido em 54% em relação a pacientes não-obesos (Goodyear et al., 1995). O achado mais uniforme com relação aos substratos do receptor de insulina na obesidade é a redução da fosforilação em resíduos de tirosina do IRS-1 e da atividade da PI 3-quinase no músculo esquelético e adipócitos estimulados pela insulina

(Goodyear et al., 1995; Zierath, Krook, & Wallberg-Henriksson, 1998). Em modelos animais de obesidade, genéticos e induzidos, a fosforilação do IR e IRS-1 estimulada pela insulina está diminuída no músculo esquelético (Folli, Saad, Backer, & Kahn, 1993; Heydrick, Gautier, Olichon-Berthe, Van Obberghen, & Marchand-Brustel, 1995; Friedman et al., 1997; Kerouz, Horsch, Pons, & Kahn, 1997; Anai et al., 1998). Ratos Wistar-Hannover com 12 meses de idade apresentam obesidade e resistência à insulina. Nesses animais os níveis de IRS-1 estão reduzidos no músculo e os graus de fosforilação do receptor e do IRS-1 diminuídos no fígado e no músculo (Carvalho et al., 1996). Entretanto, a regulação das etapas iniciais da ação insulínica no tecido vascular desse modelo animal de resistência à insulina não foi ainda investigada.

A descoberta de que a Akt fosforila e ativa a eNOS (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999), a qual produz NO para controle da pressão arterial, da remodelação vascular e da angiogênese, pode explicar melhor as bases moleculares da associação entre resistência à insulina e doença cardiovascular.

Há evidências crescentes de que a resistência à insulina possa ser diretamente aterogênica (Howard et al., 1996). As ações biológicas da insulina nas células vasculares incluem aumento no transporte de aminoácidos, síntese de glicogênio, síntese de DNA e expressão gênica. Fisiologicamente, a insulina também tem efeitos vasculares específicos, como o aumento da liberação de óxido nítrico, a regulação da expressão de mRNA de proteínas da matriz e a ativação da eNOS. Os mecanismos fisiopatológicos para explicar a associação entre a resistência à insulina e doenças cardiovasculares têm sido atribuídos à capacidade da insulina de promover o crescimento da musculatura vascular lisa (King, Goodman, Buzney, Moses, & Kahn, 1985), à produção de matriz extracelular (Tamaroglio & Lo, 1994), à reabsorção renal de sódio (DeFronzo, Cooke, Andres, Faloona, & Davis, 1975) e à estimulação adrenérgica (Anderson, Hoffman, Balon, Sinkey, & Mark, 1991). Entretanto, para que essas hipóteses pudessem ser válidas, a resistência à insulina não poderia ser um fenômeno universal, mas sim restrito apenas ao músculo e tecido adiposo, enquanto os tecidos vascular e renal deveriam permanecer sensíveis à insulina. Estudos em pacientes resistentes à insulina e diabéticos tipo 2 sugerem que as células vasculares também são resistentes à insulina ao documentar que algumas funções endoteliais estão

reduzidas nesses indivíduos, como a vasodilatação arterial induzida pela infusão de insulina (Steinberg et al., 1996). Para explicar estes achados aparentemente conflitantes, Jiang et al sugeriram que algumas ações da insulina, como os efeitos estimuladores sobre a síntese de NO e seus efeitos metabólicos, estariam seletivamente inibidos em estados de resistência à insulina, enquanto seus efeitos sobre o crescimento da musculatura vascular lisa estariam preservados, podendo resultar em aceleração da aterogênese em animais resistentes à insulina (Jiang et al., 1999a). Estudo em aortas torácicas e microvasos epididimais de ratos Zucker obesos (*fa/fa*) e magros demonstrou que a fosforilação em tirosina do IR β e IRS-1/2 estimuladas pela insulina, bem como a atividade PI 3-quinase associada ao IRS-1/2 e a fosforilação em serina da Akt estavam reduzidas nos vasos dos animais obesos em comparação aos magros. Entretanto, a fosforilação em tirosina das isoformas ERK1 e ERK2 do complexo MAP quinase foi estimulada pela insulina igualmente nos microvasos do epidídimo dos animais obesos e magros, embora os níveis basais de fosforilação em tirosina da MAP quinase estivessem significativamente mais altos nas aortas e microvasos dos animais obesos em relação aos magros. No entanto, a fosforilação em serina da Akt estimulada pela insulina nas aortas dos animais não foi avaliada, apenas nos microvasos do epidídimo. Assim, no rato Zucker obeso, o qual apresenta resistência à insulina e hipertensão arterial, preserva-se o estímulo desencadeado pela insulina na via da MAP quinase (e até mesmo ocorre aumento na sua fosforilação basal) na presença de resistência na via da PI 3-quinase, ocorrendo um desequilíbrio entre estímulos pró-aterogênicos mediados pela cascata da MAP quinase (expressão de genes, proliferação e crescimento das células musculares lisas vasculares e produção de matriz extracelular) e estímulos anti-aterogênicos mediados pela via da PI 3-quinase-Akt-eNOS (regulação da pressão arterial sistêmica, remodelação vascular e angiogênese).

Vários mecanismos podem ser responsáveis pela resistência ao estímulo insulínico na via da PI 3-quinase na vasculatura de ratos obesos resistentes à insulina: aumento na fosforilação em resíduos de serina e treonina do IR β , através da ativação de isoformas da PKC, pode reduzir a atividade quinase do receptor e sua autofosforilação (Avignon et al., 1996); aumento da atividade de fosfotirosina-fosfatases pode reduzir a fosforilação do IR e IRS, reduzindo conseqüentemente a atividade da PI 3-quinase (Kusari, Kenner, Suh, Hill,

& Henry, 1994; Ahmad, Azevedo, Cortright, Dohm, & Goldstein, 1997); a dislipidemia pode desempenhar papel importante na resistência à insulina observada nos ratos Zucker obesos (Shulman, 2000); fatores circulantes e hormônios, como TNF- α e TNF- β (*fatores de necrose tumoral α e β*), angiotensina II e endotelina-1, podem inibir a sinalização da insulina no vaso através da modulação da fosforilação das IRSs e da atividade da PI 3-quinase (Hotamisligil, Budavari, Murray, & Spiegelman, 1994; Folli et al., 1997; Jiang et al., 1999b). A atividade da MAP quinase inapropriadamente elevada também pode levar a aumento da resistência à insulina pois as ERKs, proteínas do complexo MAP quinase, podem fosforilar a subunidade β do receptor de insulina e o IRS-1 em resíduos de serina, prejudicando ainda mais a via da PI 3-quinase na vasculatura do rato Zucker obeso (De Fea & Roth, 1997a).

Este fenômeno de resistência seletiva na cascata da PI 3-quinase associada à manutenção da sensibilidade à insulina na via da MAP quinase também foi documentado em músculos de pacientes obesos, resistentes à insulina, diabéticos ou não. Após *clamps* euglicêmicos seguidos por biópsias musculares, o estímulo desencadeado pela insulina na via da PI 3-quinase, avaliada pela fosforilação do IR e IRS-1 e pela associação entre IRS-1 e a subunidade p85 da PI 3-quinase, estava bastante reduzida em obesos não-diabéticos e virtualmente ausente em diabéticos tipo 2, em comparação aos controles magros. Por outro lado, a sensibilidade ao estímulo insulínico na via da MAP quinase estava completamente normal em indivíduos obesos e diabéticos (Cusi et al., 2000).

Tem sido demonstrado que o efeito estimulatório da insulina sobre a produção de óxido nítrico nos vasos pode estar seletivamente reduzido em modelos animais de resistência à insulina que apresentam doença cardiovascular. No entanto, os mecanismos através dos quais os efeitos biológicos normais da insulina estão preservados nos vasos de outros modelos animais que apresentam resistência à insulina mas que não desenvolvem doença cardiovascular ainda não foram estudados.

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Caracterizar os ratos Wistar com 2 e 12 meses de idade com relação aos seguintes parâmetros: peso, pressão arterial sistólica basal, glicemia e insulinemia de jejum, sensibilidade à insulina e estrutura histológica das aortas torácicas.
2. Determinação dos níveis teciduais e dos graus de fosforilação, após estímulo agudo com insulina, do receptor de insulina, do IRS-1, da Akt e da ERK1/2, bem como a associação insulino-estimulada entre IRS-1 e PI 3-quinase no músculo esquelético de ratos com 2 e 12 meses de idade.
3. Determinação dos níveis teciduais e graus de fosforilação, após estímulo agudo com insulina, do receptor de insulina, do IRS-1, do IRS-2, da Akt, da eNOS e da ERK1/2 nas aortas torácicas de ratos com 2 e 12 meses de idade.
4. Determinação da associação insulino-estimulada entre IRSs (1 e 2) e a PI 3-quinase, e entre a Akt e a eNOS nas aortas torácicas de ratos com 2 e 12 meses de idade.

3. Materiais e Métodos

3.1. ANIMAIS:

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar-Hannover, cedidos pelo Biotério Central da UNICAMP (CEMIB), com 2 e 12 meses de idade, alimentados após o desmame com ração padronizada pelo Biotério Central e água *ad libitum*. Os animais foram acomodados em gaiolas (4 animais jovens ou 2 animais adultos por gaiola) mantidas em ambiente silencioso com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$), em ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Os animais foram mantidos em jejum por 8 horas antes dos experimentos com extração dos tecidos (músculo esquelético e aorta), recebendo água *ad libitum*. Os estudos de *time course* foram realizados com ratos jovens e os estudos comparativos foram realizados pareando ratos controle, com 2 meses e ratos obesos e envelhecidos, com 12 meses de idade.

3.2. MATERIAIS:

Os reagentes e os aparelhos para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) e *immunoblotting* foram adquiridos da *Bio-Rad* (Richmond, CA, USA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina, ditioneitol (DTT), Triton X-100, Tween 20 e glicerol, da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO, USA). A proteína A Sepharose 6MB foi fornecida pela *Pharmacia* (Uppsala, Suécia). A proteína A com iodo radioativo ($[^{125}\text{I}]$ -proteína A) e as membranas de nitrocelulose (*Hybond ECL*, $0.45 \mu\text{m}$) foram adquiridas das *Amersham* (Avlesbury, UK). A insulina regular recombinante humana (Humulin R) foi fabricada pela *Eli Lilly* (Indianapolis, IN). O agente anestésico tiopental sódico foi adquirido da *Cristália* (Itapira, SP, Brasil). O marcador de peso molecular padrão utilizado foi o *Rainbow RPN 756* ou *800*, importado da *Amersham* (Avlesbury, UK).

O anticorpo monoclonal anti-PI 3-quinase (subunidade p85) foi importado da *Upstate Biotechnology Incorporated* (UBI – Lake Placid, NY, USA). Os anticorpos

policlonais anti-PI 3-quinase (subunidade p110 α), anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-eNOS (NOS3), anti-fosfo-eNOS-Ser-1177, anti-Akt1, anti-ERK1/2 e anti-receptor de insulina (subunidade β) foram importados da *Santa Cruz Technology* (Santa Cruz, CA, USA); os anticorpos monoclonais anti-fosfotirosina e anti-fosfo-ERK1/2 também foram importados da *Santa Cruz Technology*. O anticorpo monoclonal anti-fosfo-serina foi importado da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO, USA). O anticorpo policlonal anti-fosfo-Akt-Ser-473 foi importado da *New England Biolabs* (Beverly, MA, USA).

O ventilador para pequenos roedores usado foi o *Harvard Rodent Ventilator Model 683* da *Harvard Apparatus* (Boston, MA, USA). Cânulas orotraqueais foram adaptadas a partir de catéteres intravenosos *Insite* calibres 14 e 16 adquiridos da *Becton-Dickinson* (Juiz de Fora, MG, Brasil). *Graals* de porcelana, pistilos e pinças para manipular as aortas congeladas foram adquiridos da *Merse* (Campinas, SP, Brasil). O nitrogênio líquido foi adquirido do DEPARTAMENTO DE CRIOGENIA DO INSTITUTO DE FÍSICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.

Para aferição não-invasiva (ou indireta) da pressão arterial em ratos não-anestesiados foi utilizado o sistema de manguito caudal MKIV da *Narco BioSystems* (Austin, TX, USA).

3.3. SOLUÇÕES:

3.3.1. Solução tampão de extração A, para extrato total:

Utilizada para a extração das proteínas celulares dos tecidos estudados. Contém: Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100 mM, SDS 10% (dodecil sulfato de sódio), EDTA (ácido etileno-diamino tetracético) 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM e ortovanadato de sódio 10 mM. O ortovanadato foi acrescentado à solução no momento de utilização do tampão.

3.3.2. Solução tampão de extração B, para imunoprecipitação:

Utilizada para extração de proteínas celulares dos tecidos estudados, que foram posteriormente imunoprecipitadas. Contém: Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM (diluído em álcool etílico), Triton X-100 1% e 0,1 mg/ml de aprotinina. A solução foi mantida a 4°C, sendo que o ortovanadato, o PMSF e a aprotinina foram acrescidos à solução imediatamente antes da sua utilização.

3.3.3. Tampão de Laemmli (5X):

Utilizado para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese (SDS-PAGE). Contém: azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%.

3.3.4. Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

Contém Trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0,4%. Para uso, a solução foi diluída na proporção 1:4.

3.3.5. Solução tampão para transferência:

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

3.3.6. Solução tampão para SDS-PAGE – Gel da fase de resolução (*resolving*):

Tampão composto de EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

3.3.7. Solução tampão para SDS-PAGE - Gel da fase de empilhamento (*stacking*) das proteínas:

Contém: EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 50 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

3.3.8. Solução Basal:

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

3.3.9. Solução bloqueadora:

Utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose, após a transferência. Contém: 5% de BSA (*albumina sérica bovina*) dissolvido em solução basal.

3.3.10. Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado:

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

3.3.11. Solução para anticorpos:

Solução contendo anticorpos específicos para identificação das proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose (*immunoblotting*). Contém 3% de BSA diluído em solução basal.

3.3.12. Solução com [125 I]-proteína A:

Permite a visualização das bandas em autorradiografias. Contém 1% de BSA, dissolvido em solução basal com 2 μ Ci de [125 I]-proteína A.

3.4. MÉTODOS:

3.4.1. Procedimento cirúrgico e extração dos tecidos:

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (5mg/100g de peso corporal, i.p.) e usados 10 a 15 minutos depois, assim que a anestesia foi confirmada pela perda de reflexos corneanos e de retirada da pata à dor. A seguir, foram submetidos à intubação oro-traqueal e conectados a um ventilador ligado a uma fonte de oxigênio. A cavidade abdominal foi aberta por laparotomia mediana e a veia cava inferior exposta. Foram aplicados 0,5 ml de solução salina (NaCl 0,9%) com ou sem insulina regular (10^{-5} M, ou 1,5 UI ou 60 μ g de insulina) diretamente na veia cava inferior. A musculatura esquelética da pata traseira foi exposta e o tórax foi aberto por via transternal para localização e dissecação da aorta torácica. Após período pré-estabelecido em *time courses* para a máxima fosforilação de cada proteína em estudo, foram retirados um fragmento de músculo gastrocnêmio com cerca de 0,5 cm de diâmetro e a aorta torácica (a qual foi rapidamente lavada no próprio tampão de extração a fim de remover todo o sangue do seu lúmen), os quais foram congelados em nitrogênio líquido. Após o congelamento, os tecidos foram pulverizados em recipiente adequado (*graal* de porcelana com pistilo) e homogeneizados no tampão para imunoprecipitação (tampão B) ou extrato total (tampão A) com o auxílio de um polytron PT MR 2000 (Kinematica AG, Suíça) operando em velocidade máxima durante 20s. Os experimentos foram realizados utilizando-se *pool* de três ou mais aortas por amostra.

3.4.2. Extratos totais:

Para estudo de extratos totais, o material homogeneizado em tampão A foi mantido em banho-maria a 100°C durante 10 minutos, com a finalidade de desnaturar completamente as fosfatases que poderiam desfosforilar o receptor de insulina e seus substratos. Após os dez minutos de inativação enzimática os materiais extraídos e homogeneizados foram mantidos em gelo para transporte e centrifugação.

Utilizou-se a velocidade de 12000 rpm por 40 minutos a 4°C para remover o material insolúvel, isolando o sobrenadante para as etapas seguintes. Uma parte foi utilizada para determinar a concentração protéica de cada amostra pelo método colorimétrico de biureto (Bradford, 1976) usando o reagente *Bio-Rad* como padrão, enquanto outra parte foi utilizada para separação das proteínas em SDS-PAGE, com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970), acrescido de DTT 200 mM, em proporção de 5:1, mantida sempre a 4°C até o momento de ser submetida à fervura a 100°C durante 5 minutos e posteriormente ser aplicada em gel de poliacrilamida.

Alíquotas contendo 200 µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8 a 12%) de 2 mm de espessura, em aparelho para minigel (*Mini-Protean*, *Bio-Rad Laboratories*, Richmond, CA). No mesmo gel foi aplicada uma amostra padrão de proteínas, ou seja, o marcador de peso molecular com pesos moleculares conhecidos: miosina (220 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (46 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisosima (14,3 kDa). O SDS-PAGE foi submetido a 25 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (*stacking*) e 120 volts até o final do gel de resolução (*resolving*).

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose através de aparelho da *Bio-Rad* (*Mini-Protean*) por 2 horas a 120 volts, sob refrigeração contínua por gelo, como descrito por Towbin et al (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979), exceto pela adição de SDS 0,02% ao tampão de transferência, para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular.

A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi reduzida pela incubação destas com solução bloqueadora a 4°C por 2 horas sob agitação contínua. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal por 3 sessões de 10 minutos e incubadas com o anticorpo escolhido para *immunoblotting* (anticorpos anti-fosfotirosina (diluição 1:1000), anti-receptor de insulina subunidade β (1:100), anti-PI 3-quinase subunidades p85 ou p110 (1:500), anti-IRS-1 (1:100), anti-IRS-2 (1:100), anti-Akt1 (1:100), anti-fosfo-serina-Akt-473 (1:100), anti-fosfo-serina (1:500), anti-ERK1/2 (1:1000), anti-fosfo-ERK1/2 (1:1000), anti-NOS3 (1:500) e anti-fosfo-serina-eNOS-1177 (1:100)) diluído em solução para anticorpo por 4 horas, à temperatura ambiente sob agitação constante. As membranas foram então lavadas novamente com solução basal por 3 sessões de 10 minutos e incubadas em solução para iodo com 6 μ l de [125 I]-proteína A, durante 2 horas, à temperatura ambiente. O excesso de proteína A foi lavado com solução basal e as membranas foram expostas ao filme de Rx (Kodak XAR - Rochester, NY), com intensificador (Cronex Lightning Plus - DuPont, Wilmington, DE) em cassete mantido a -80°C. Após 12 a 72 horas, os filmes foram revelados na forma convencional. A proteína A marcada com iodo radioativo se liga aos anticorpos e pode ser detectada e visualizada em autorradiografias. A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das autorradiografias reveladas por densitometria óptica, utilizando o equipamento e programa Eagle Eye scanner (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

3.4.3. Imunoprecipitação:

Para estudos de imunoprecipitação, os tecidos pulverizados foram homogeneizados diretamente no tampão B e mantidos em recipientes no gelo. Após a centrifugação a 12000 rpm por 40 minutos a 4°C para remover o material insolúvel, utilizou-se o sobrenadante para quantificação de proteínas conforme descrito previamente e volumes das amostras com a mesma concentração de proteína foram utilizados para imunoprecipitação com os anticorpos em estudo (anti-receptor de insulina, anti-IRS-1, e anti IRS-2, anti-Akt1 e anti-NOS3). As amostras foram incubadas durante 12-14 horas a 4°C, sob agitação contínua. Em seguida acrescentou-se proteína A-Shepharose 6MB em todas as amostras para

precipitação dos complexos antígeno-anticorpo, as quais foram mantidas em agitação contínua por 2 horas. Após nova centrifugação por 15 minutos, a 12000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o material precipitado lavado por três vezes com a solução tampão específica para lavagem.

As proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de Laemmli contendo 100 mM de DTT, aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. As proteínas foram então submetidas à eletroforese em SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. Nestes experimentos de imunoprecipitação, as membranas foram submetidas ao *immunoblotting* com anticorpos anti-fosfotirosina, anti-PI 3-quinase, anti-Akt1 e anti-NOS3.

3.4.4. Preparação das aortas para análise morfológica

As aortas torácicas de animais jovens e envelhecidos foram fixadas por perfusão a 100 mmHg com paraformaldeído a 4% em 0,1 M de tampão fosfato pH 7,4, desidratadas em álcool e xilol e processadas para inclusão em parafina. Foram realizados cortes transversais sequenciais das aortas torácicas com 5 µm de espessura cada. Os cortes usados para análise morfológica dos tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Ao menos 5 cortes sequenciais da aorta ascendente, arco aórtico, aorta torácica e aorta abdominal foram examinados através de microscopia óptica. Alguns fragmentos foram desparafinizados e processados para microscopia eletrônica. Cortes ultrafinos foram corados com uranilacetato e citrato de chumbo e examinados com um microscópio eletrônico ZEISS EM 10.

3.4.5. Aferição da pressão arterial

Dez animais de cada grupo (controles jovens e obesos envelhecidos) foram utilizados para avaliação da pressão arterial sistólica basal através do sistema de manguito caudal MKIV (Narco BioSystems, Austin, TX, USA) combinando um transdutor / amplificador que produz sinais de áudio proporcionais à pressão arterial caudal (sons de

Korotkoff amplificados) os quais foram usados para obter as medidas da pressão arterial em ratos não-anestesiados. Esta medida indireta e não-invasiva permite medidas repetidas da pressão arterial com uma correlação muito próxima (coeficiente de correlação = 0.975) das que são obtidas com registros diretos intra-arteriais (Lovenberg, 1987).

3.4.6. Avaliação da ação insulínica através do teste de tolerância à insulina curto (*Kitt*)

Animais com 2 e 12 meses de idade foram submetidos ao teste endovenoso de tolerância à insulina. Os testes foram realizados pela manhã, após jejum noturno de 12 a 14 horas. Os animais foram anestesiados, tiveram pequena amostra de sangue coletada por secção da cauda e receberam 60 µg de insulina regular na veia peniana. A partir de então, foram coletadas amostras de sangue aos 4, 8, 12 e 16 minutos após a infusão de insulina. Estas amostras foram desproteinizadas em ácido tricloroacético (TCA) e, após centrifugação, as glicemias foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico.

A velocidade de desaparecimento da glicose (*Kitt*) foi calculada pela fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose (Bonora et al., 1989).

3.4.7. Determinação da glicemia e insulinemia

Amostras de sangue obtidas por punção cardíaca direta de 10 animais de cada grupo foram centrifugadas a 6000 rpm a 20° C por 15 minutos e o soro foi utilizado para dosagem de insulina e glicose.

A avaliação da glicose plasmática foi realizada através de método enzimático colorimétrico (Trinder, 1969), sendo os resultados expressos em mg/dl.

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

3.4.8. Análise estatística

As análises estatísticas de experimentos independentes foram feitas estudando os grupos de animais em paralelo. Foi utilizado o **teste *t* de Student**, não-pareado, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), e os resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($X \pm EPM$).

4. Resultados

4.1. CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS:

As características gerais dos animais utilizados nos diferentes experimentos são apresentadas na tabela 1 do anexo.

4.1.1. Peso:

Os animais com 12 meses de idade apresentaram pesos significativamente maiores que os do grupo controle, com 2 meses de idade (2m: $137 \pm 2,4$ g x 12m: $432,6 \pm 2,7$ g, $p < 0,0001$).

4.1.2. Glicemia e Insulinemia:

As determinações de glicose plasmática e insulina sérica foram realizadas com animais em jejum por 12 a 14 horas. A glicemia de jejum foi semelhante em todos os animais, sem diferença estatisticamente significativa (2m: 123 ± 5 mg/dl x 12m: 118 ± 9 mg/dl), enquanto a insulina sérica apresentou valores mais elevados no grupo de animais envelhecidos (2m: 25 ± 4 μ U/ml x 12m: 41 ± 6 μ U/ml, $p < 0,05$).

4.1.3. Pressão arterial:

A determinação da pressão arterial sistólica basal foi feita de acordo com a descrição acima (Materiais e Métodos). Dez animais jovens e dez animais obesos e envelhecidos foram avaliados e os dados expressos na tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos avaliados com relação à pressão arterial sistólica basal (2m: 114 ± 2 mmHg x 12m: 112 ± 3 mmHg).

4.1.4. Caracterização da sensibilidade à insulina - velocidade de desaparecimento da glicose (Kitt):

A tabela 1 mostra a velocidade de desaparecimento da glicose (*Kitt*) durante o teste de tolerância à insulina curto, realizado nos primeiros 16 minutos após a infusão do hormônio, nos animais com 2 e 12 meses de idade. O *Kitt* mostrou-se significativamente menor nos animais com 12 meses quando comparado aos controles jovens com 2 meses (2m: $4,55 \pm 0,34$ %/min x 12m: $2,57 \pm 0,63$ %/min, $p < 0,01$).

4.2. EVOLUÇÃO TEMPORAL DA FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA TRANSMISSÃO DO SINAL DE INSULINA NA AORTA TORÁCICA DE RATOS APÓS ESTÍMULO AGUDO COM INSULINA ("TIME COURSES"):

A fim de determinar o tempo após a injeção de insulina em que se obtém a máxima fosforilação das proteínas em estudo, foi realizada a retirada das aortas de animais jovens (2 meses) em períodos diferentes e sequenciais após o estímulo. Cada amostra foi composta de 2 ou 3 aortas (*pool* de aortas).

Na figura 1A. observa-se o resultado obtido após imunoprecipitação com anticorpo anti-receptor de insulina (subunidade β) e *immunoblotting* com anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina: após injeção de insulina na veia cava inferior, uma proteína migrando em 95 kDa, correspondendo à subunidade β do receptor de insulina, começou a ser fosforilada em tirosina após 30 segundos, atingindo o máximo de fosforilação após 90 segundos, e daí decrescendo até 5 minutos. Na figura 1B., a imunoprecipitação com anticorpo contra IR β foi seguida de *immunoblotting* com o mesmo anticorpo a fim de demonstrar que o aumento da fosforilação observado não foi consequência do aumento dos níveis teciduais do receptor de insulina.

Na figura 2A. os extratos de aortas foram imunoprecipitados com anticorpo anti-IRS-1 e submetidos a *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina: uma proteína migrando em torno de 185 kDa, identificada como o substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), começou a ser fosforilada após 30 segundos de estímulo com insulina e teve seu estímulo máximo após 90 segundos, quando começou a retornar aos níveis basais. A figura

2B. mostra o *immunoblotting* com o anticorpo contra o próprio IRS-1, a fim de demonstrar que não houve variação em seus níveis teciduais.

A figura 3A. mostra o *time course* de fosforilação do substrato 2 do receptor de insulina (IRS-2) em tirosina após estímulo com insulina. Esta proteína segue o mesmo padrão de ativação que o IRS-1: após imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-2 e *immunoblotting* com anti-fosfotirosina notamos que há máxima fosforilação da proteína, que migra entre 185 e 195 kDa, após 90 segundos da injeção de insulina, sem que tenha ocorrido alteração na sua expressão tecidual (figura 3B.).

Na figura 4A., observa-se o efeito na fosforilação de ERK1/2 em amostras de extratos totais de aortas após estímulo com insulina: o efeito é observado após 30 segundos, é máximo após 60 segundos, mas só retorna aos níveis basais decorridos 15 minutos do estímulo. Não houve, como demonstrado na figura 4B., alteração nos níveis teciduais das duas proteínas do complexo MAP quinase após estímulo agudo com insulina.

Nas figuras 5A. e 5B., extratos totais de aortas foram submetidos a *immunoblotting* com anticorpos anti-fosfo-serina-473 e anti-Akt1, respectivamente. Observou-se que a proteína em torno de 57 kDa, identificada como Akt1 ou proteína quinase B, começa a ser fosforilada 30 segundos após estímulo insulínico, atingindo grau máximo de fosforilação após 3 minutos e retornando aos níveis basais a partir de então. Também neste experimento não houve oscilação nos níveis protéicos (figura 5B.).

Extratos totais obtidos de amostras de aortas torácicas foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida e as proteínas separadas foram então transferidas eletricamente para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpos contra fosfo-eNOS-Ser-1177 e contra eNOS total. Na figura 6A. observa-se que a óxido nítrico sintase endotelial, proteína com peso molecular aparente de 140 kDa, apresentou grau máximo de fosforilação em serina 1177 após 3 minutos do estímulo com insulina. Este resíduo de serina corresponde ao local de ligação da Akt, permitindo a ativação da eNOS. A figura 6B. mostra os mesmos extratos totais, desta vez submetidos à *immunoblotting* com anticorpo anti-eNOS, para mostrar que a quantidade da eNOS total nas amostras não foi diferente e que a maior intensidade das bandas obtidas na figura 6A. foi decorrente exclusivamente da maior fosforilação da proteína em serina e não de aumento na sua expressão tecidual.

Todos esses experimentos foram repetidos 2 a 3 vezes, sempre utilizando amostras obtidas de *pool* de 3 aortas torácicas e os tempos em que se obteve a máxima fosforilação das proteínas em estudo foram usados para a comparação entre animais jovens (2 meses) e obesos envelhecidos (12 meses).

Proteína	Tempo após infusão IV de insulina em que ocorre máxima fosforilação da proteína
IR β , IRS-1, IRS-2	90 segundos
ERK1/2	60 segundos
Akt / PKB	3 minutos
eNOS	3 minutos

4.3. COMPARAÇÕES ENTRE ANIMAIS COM 2 E 12 MESES DE IDADE:

A fim de comparar as vias intracelulares de transmissão do sinal insulínico no músculo e na aorta torácica *in vivo* de ratos Wistar machos jovens, normais, e obesos envelhecidos, resistentes à insulina, procedeu-se à extração dos tecidos nos tempos estabelecidos pelos *time courses* após estímulo com insulina. O período necessário para ocorrer a máxima fosforilação das proteínas no músculo foi determinado em estudos prévios (Carvalho et al., 1996; Carvalho, Thirone, Gontijo, Velloso, & Saad, 1997). Todos os experimentos descritos a seguir foram repetidos pelo menos 3 vezes, com *pool* de 3 aortas em cada amostra. Foram realizadas comparações entre as aortas dos dois grupos de animais quanto aos graus de fosforilação e quantidade dos seguintes elementos da via de sinalização intracelular da insulina: receptor de insulina (subunidade β), substratos 1 e 2 do receptor de insulina, Akt / PKB, eNOS, ERK1/2. Foram comparadas também as associações entre IRS- (1 e 2) e a PI 3-quinase e entre a Akt e a eNOS. No músculo foram estudadas as seguintes proteínas: subunidade β do receptor de insulina, IRS-1, PI 3-quinase, Akt e ERK1/2.

4.3.1. Sinalização da insulina no músculo esquelético de ratos com 2 e 12 meses de idade.

Não houve diferença na fosforilação em tirosina insulino-estimulada da subunidade β do receptor de insulina entre amostras de músculos esqueléticos de ratos com 2 e 12 meses de idade (fig 7A.: 2m: $100 \pm 7\%$ x 12m: $100 \pm 4\%$, média $\pm$ EPM, n=6) e os níveis teciduais do IR β também não sofreram alteração nos ratos com 12 meses (fig 7B.).

Ocorreu redução altamente significativa na fosforilação insulino-estimulada do IRS-1 em resíduos de tirosina no músculo esquelético de ratos com 12 meses comparados aos controles jovens (fig 8: 2m: $100 \pm 5\%$ x 12m: $55 \pm 4\%$, n=6, $p < 0,0001$). Também, como demonstrado na figura 9, os níveis teciduais do IRS-1 estiveram significativamente reduzidos no músculo de ratos com 12 meses de idade (2m: $100 \pm 9\%$ x 12m: $56 \pm 7\%$, n=6, $p < 0,05$).

A associação insulino-estimulada entre IRS-1 e a subunidade regulatória p85 da PI 3-quinase também apresentou redução no músculo esquelético de animais com 12 meses quando comparados aos animais jovens (fig 10: 2m: $100 \pm 5\%$ x 12m: $30 \pm 7\%$, n=6, $p < 0,0001$).

A insulina foi capaz de estimular a fosforilação em serina da Akt nos dois grupos de animais, mas os ratos mais velhos mostraram ativação significativamente reduzida da Akt após estímulo com insulina (fig 11A.: 2m: $100 \pm 4\%$ x 12m: $41 \pm 3\%$, n=6, $p < 0,0001$). Na figura 11B., o *blot*, representativo de seis experimentos, foi obtido após incubação das membranas com anticorpos anti-Akt e não foram observadas diferenças entre os níveis teciduais da Akt nos músculos dos animais dos dois grupos.

Como representado na figura 12A., a infusão de insulina foi capaz de estimular a fosforilação em tirosina de ERK1/2 igualmente nas amostras de músculos de ratos Wistar com 2 e 12 meses de idade (2m: $100 \pm 4\%$ x 12m: $102 \pm 3\%$, n=6). Quando o *immunoblotting* foi realizado com anticorpos policlonais anti-ERK1/2, como demonstrado na figura 12B., os níveis teciduais de ERK1/2 no músculo não variaram com a obesidade e o envelhecimento.

4.3.2. Efeito do envelhecimento e obesidade sobre a regulação do receptor de insulina na aorta de ratos.

As figuras 13A. e 13B. mostram imagens digitalizadas de membranas (*immunoblots*) representativas de 5 experimentos cada. As bandas digitalizadas foram quantificadas por densitometria óptica e submetidas a análises estatísticas usando o teste *t* de Student não-pareado. Unidades arbitrárias para os valores medidos foram atribuídas, de forma que 100 corresponde, na figura 13A., à fosforilação em tirosina do receptor de insulina na aorta de ratos com 2 meses de idade após estímulo insulínico. Foi observado que, após 90 segundos da infusão de insulina, a subunidade β do receptor de insulina apresentou graus de fosforilação em tirosina semelhantes nos animais jovens e nos animais obesos envelhecidos (fig 13A.: 2m: $100 \pm 8\%$ x 12m: $102 \pm 5\%$, média $\pm$ EPM, $n=5$ – cada amostra corresponde a um *pool* de 3 aortas). Na figura 13B., o *immunoblotting* foi realizado com anticorpo anti-IR β para quantificação do receptor de insulina nas aortas. Não foram observadas variações estatisticamente significativas entre os níveis teciduais do IR β entre os animais com 2 e 12 meses de idade.

4.3.3. Efeito do envelhecimento e obesidade sobre a regulação do IRS-1 e IRS-2 na aorta de ratos.

Os experimentos demonstrados nas figuras 14A. e 14B. foram obtidos após imunoprecipitação, com anticorpo anti-IRS-1, de extratos de aortas extraídas após 90 segundos de infusão de solução salina (controles) ou insulina. Na figura 14A., as membranas foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina para avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em tirosina estimulado por insulina. Na figura 14B., o *immunoblotting* foi realizado com o mesmo anticorpo anti-IRS-1 para avaliação do nível tecidual do IRS-1 nas aortas dos grupos de animais em estudo. Como demonstrado no gráfico da figura 14A., não houve diferença estatisticamente significativa entre a fosforilação do IRS-1 em tirosina, estimulada por insulina, entre animais com 2 meses e 12 meses (2m: $100 \pm 4\%$ x 12m: $105 \pm 3\%$, $n=6$). A quantidade de IRS-1 nas aortas dos animais

jovens e obesos envelhecidos também não apresentou variação significativa entre os grupos (fig 14B.).

A figura 15A. mostra os resultados obtidos a partir de extratos de aortas de animais com 2 e 12 meses de idade após 90 segundos de infusão de solução salina com ou sem insulina: as amostras foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-2 e *immunoblotting* com anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina. Não ocorreu variação significativa entre a fosforilação insulino-estimulada do IRS-2 em resíduos de tirosina nas aortas de animais com 2 e 12 meses ($2m=100\pm5\%$ vs. $12m=95\pm8\%$, $n=6$). Na figura 15B. observamos que, após *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-2, não houve variação significativa nos níveis teciduais do IRS-2 nas aortas torácicas dos animais jovens e envelhecidos.

4.3.4. Efeito do envelhecimento e obesidade sobre a associação IRS-1/PI 3-quinase e IRS-2/PI 3-quinase na aorta de ratos.

Na figura 16 foi avaliada a associação estimulada por insulina entre o substrato 1 do receptor de insulina e a subunidade regulatória p85 da PI 3-quinase nos animais com 2 e 12 meses. Após imunoprecipitação das amostras com anticorpo policlonal anti-IRS-1, as membranas foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo contra a subunidade p85 da PI 3-quinase. O valor arbitrário 100 para a média das leituras das bandas obtidas após estímulo com insulina nos animais jovens foi atribuído. Foi observado que, na ausência de estímulo com insulina, a associação entre IRS-1 e PI 3-quinase (p85) é bastante discreta, porém, após estímulo, a associação aumenta aproximadamente 9 vezes. No entanto, não ocorreu variação estatisticamente significativa entre a associação insulino-estimulada do IRS-1 com a subunidade p85 da PI 3-quinase nos 2 grupos de animais ($2m: 100\pm5\%$ x $12m: 98\pm7\%$, $n=6$).

A figura 17 corresponde ao estudo da associação estimulada por insulina entre IRS-2 e a subunidade p85 da PI 3-quinase nos animais jovens e obesos envelhecidos. Após estímulo com insulina, houve aumento da associação entre IRS-2 e p85 para $100\pm11\%$ nos

animais com 2 meses e $107 \pm 4\%$ nos animais com 12 meses ($n=6$, $p=0,56$), ou seja, não houve variação estatisticamente significativa entre os dois grupos.

4.3.5. Efeito do envelhecimento e obesidade sobre a regulação da proteína quinase B / Akt na aorta de ratos.

Na figura 18A., extratos totais de amostras de aortas de ratos com 2 e 12 meses foram submetidos a *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfo-serina-Akt-473 após 3 minutos de estímulo *in vivo* com insulina. Observam-se graus semelhantes, sem diferença estatisticamente significativa, entre a fosforilação basal (2m= $53 \pm 10\%$ vs. 12m= $48 \pm 11\%$, $n=10$, $p>0,05$) e insulino-estimulada da Akt em serina 473 (2m= $100 \pm 6\%$ vs. 12m= $96 \pm 5\%$, $n=10$, $p>0,05$) nos animais com 2 e 12 meses. Conforme pode ser observado na figura 18B., representativa de 10 experimentos, a quantidade de Akt1 nas aortas não variou entre os animais jovens e adultos.

4.3.6. Efeito do envelhecimento e obesidade sobre a associação Akt/eNOS na aorta de ratos.

A figura 19 mostra os resultados obtidos após imunoprecipitação de extratos de aortas de animais dos dois grupos com anticorpo específico contra Akt1 seguida de *immunoblotting* com anticorpo contra eNOS. A associação insulino-estimulada (após 3 minutos de estímulo) entre a Akt1 e a eNOS em animais com 2 e 12 meses de idade não apresentou diferenças significativas (2m: $100 \pm 6\%$ x 12m: $100 \pm 3\%$, $n=6$, $p>0,5$).

4.3.7. Efeito do envelhecimento e obesidade sobre a regulação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) na aorta de ratos.

Na figura 20A., extratos totais de aortas foram submetidos a *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfo-eNOS-Ser-1177. Não ocorreu alteração na fosforilação da eNOS em serina 1177 estimulada por insulina, comparando-se os animais jovens, com sensibilidade

normal à insulina, com os animais obesos envelhecidos, resistentes à insulina (2m: $100 \pm 3\%$ x 12m: $95 \pm 7\%$, $n=6$, $p>0,5$). Também, como demonstrado na figura 20B., não ocorreram variações estatisticamente significativas entre os níveis protéicos da eNOS nas aortas dos dois grupos de animais.

4.3.8. Efeito do envelhecimento e obesidade sobre a regulação da MAP quinase (ERK1/2) na aorta de ratos.

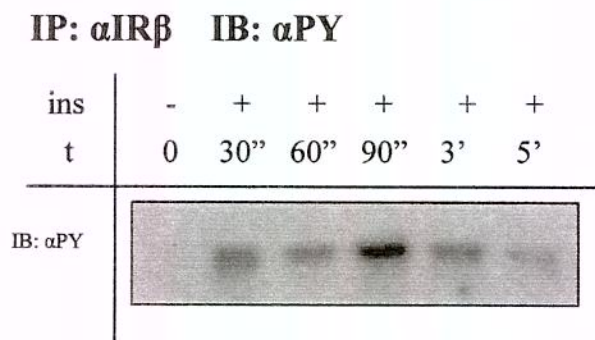
Conforme se observa na figura 21, a insulina é capaz de induzir aumento na fosforilação das proteínas do complexo MAP quinase (ERK1/2), tanto em ratos jovens quanto em adultos. Interessante é observar que ratos com 12 meses apresentaram aumento da fosforilação basal dessas proteínas, da ordem de 2,2 vezes o basal encontrado em animais com 2 meses (2 m= $50 \pm 5\%$ x 12m= $110 \pm 6\%$, $n=12$, $p<0,0001$). Um minuto após a injeção de insulina, o complexo ERK1/2 foi mais estimulado em ratos envelhecidos do que em ratos jovens (2m = $100 \pm 8\%$ x 12m= $208 \pm 4\%$, $n=12$, $p<0,0001$). O aumento na fosforilação basal e pós-estímulo das isoformas ERK1/2 da MAP quinase nos animais com 12 meses de idade acompanhou, como demonstrado na figura 22, o aumento na quantidade de ERK1/2 encontrada na aorta destes animais, aproximadamente duas vezes aquela encontrada em animais jovens (sem estímulo com insulina: 2m= $100 \pm 4\%$ x 12m= $210 \pm 8\%$, $n=12$, $p<0,0001$; com estímulo insulínico: 2m= $100 \pm 9\%$ x 12m= $218 \pm 10\%$, $n=12$, $p<0,0001$).

4.4. ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS AORTAS DE ANIMAIS COM 2 E 12 MESES DE IDADE:

Em todos os cortes seriados examinados à microscopia óptica não foram evidenciadas alterações estruturais compatíveis com aterosclerose nas aortas de ratos com 12 meses de idade, tais como depósitos de lípidos e células espumosas, espessamento da camada íntima ou proliferação de células musculares lisas (figura 23). A análise ultra-

estrutural também não revelou alterações nas aortas de ratos envelhecidos (dados não mostrados).

A.



B.

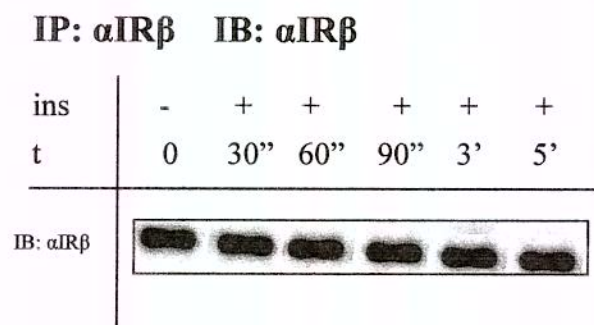
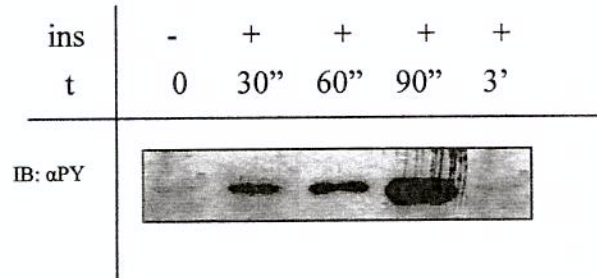


Figura 1. "Time course" de fosforilação insulino-estimulada da subunidade beta do receptor de insulina (IR β) em resíduos de tirosina na aorta de ratos jovens, com 2 meses de idade (**A**). Após imunoprecipitação com anticorpo contra IR β , as membranas foram submetidas a *immunoblotting* com o mesmo anticorpo para quantificação dos níveis protéicos do receptor de insulina nas aortas estudadas (**B**).

A.

IP: α IRS-1 IB: α PY



B.

IP: α IRS-1 IB: α IRS-1

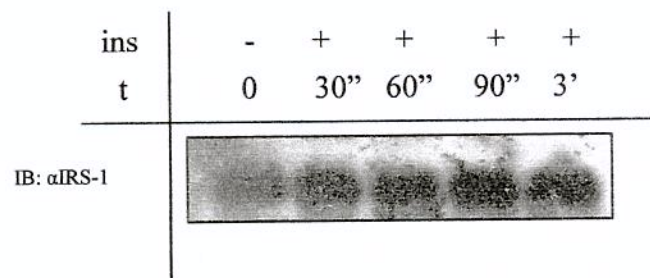


Figura 2. "Time course" de fosforilação insulino-estimulada do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) em resíduos de tirosina na aorta de ratos jovens (A). Após imunoprecipitação com anticorpo contra IRS-1, as membranas foram submetidas a *immunoblotting* com o mesmo anticorpo para quantificação dos níveis protéicos do IRS-1 nas aortas estudadas (B).

A.

IP: α IRS-2		IB: α PY				
ins	t	-	+	+	+	+
		0	30"	60"	90"	3'
IB: α PY						

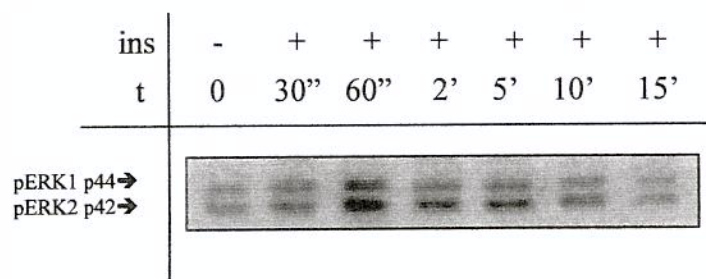
B.

IP: α IRS-2		IB: α IRS-2				
ins	t	-	+	+	+	+
		0	30"	60"	90"	3'
IB: α IRS2						

Figura 3. "Time course" de fosforilação insulino-estimulada do substrato 2 do receptor de insulina (IRS-2) em resíduos de tirosina na aorta de ratos jovens (A). Após imunoprecipitação com anticorpo contra IRS-2, as membranas foram submetidas a *immunoblotting* com o mesmo anticorpo para quantificação dos níveis protéicos do IRS-2 nas aortas estudadas (B).

A.

Extrato Total: pERK1/2



B.

Extrato Total: ERK1/2

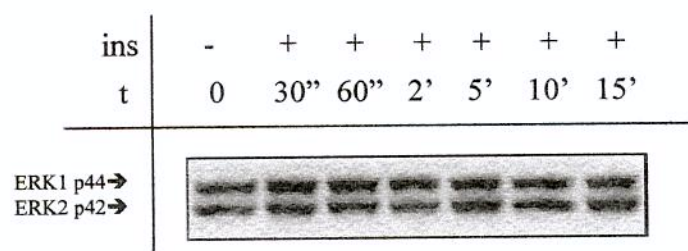


Figura 4. "Time course" de fosforilação insulino-estimulada das isoformas ERK1/2 da MAP quinase em resíduos de tirosina em amostras de extratos totais de aortas de ratos jovens (A). Extratos totais de aortas foram também submetidos a *immunoblotting* com anticorpo anti-ERK1/2 para avaliação dos níveis protéicos das duas proteínas do complexo MAP quinase (B).

A.

Extrato total: p-Akt-Ser-473

ins	-	+	+	+	+	+	+
t	0	30"	60"	90"	3'	5'	10'
pAkt→							

B.

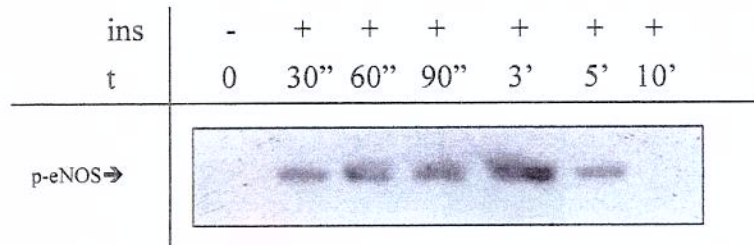
Extrato total: Akt1

ins	-	+	+	+	+	+	+
t	0	30"	60"	90"	3'	5'	10'
Akt1→							

Figura 5. "Time course" de fosforilação insulino-estimulada da Akt em serina-473 em amostras de extratos totais de aortas de ratos jovens (**A**). Extratos totais de aortas foram também submetidos a *immunoblotting* com anticorpo anti-Akt1 para avaliação dos níveis protéicos desta proteína nas aortas dos animais estudados (**B**).

A.

Extrato total: p-eNOS-Ser-1177



B.

Extrato total: eNOS (NOS3)

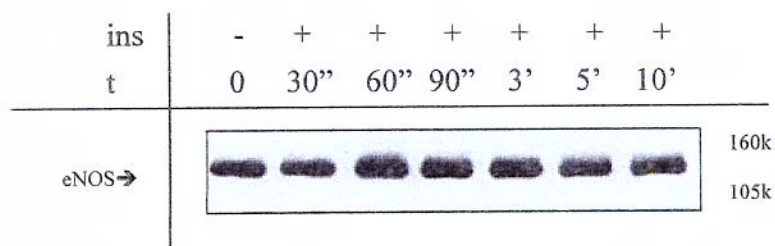


Figura 6. "Time course" de fosforilação insulino-estimulada da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS, NOS3) em serina-1177 em amostras de extratos totais de aortas de ratos jovens (A). Extratos totais de aortas foram também submetidos a *immunoblotting* com anticorpo anti-NOS3 para avaliação dos níveis protéicos desta proteína nas aortas dos animais estudados (B).

Fosforilação e níveis teciduais do IR β no músculo

IP: IR β

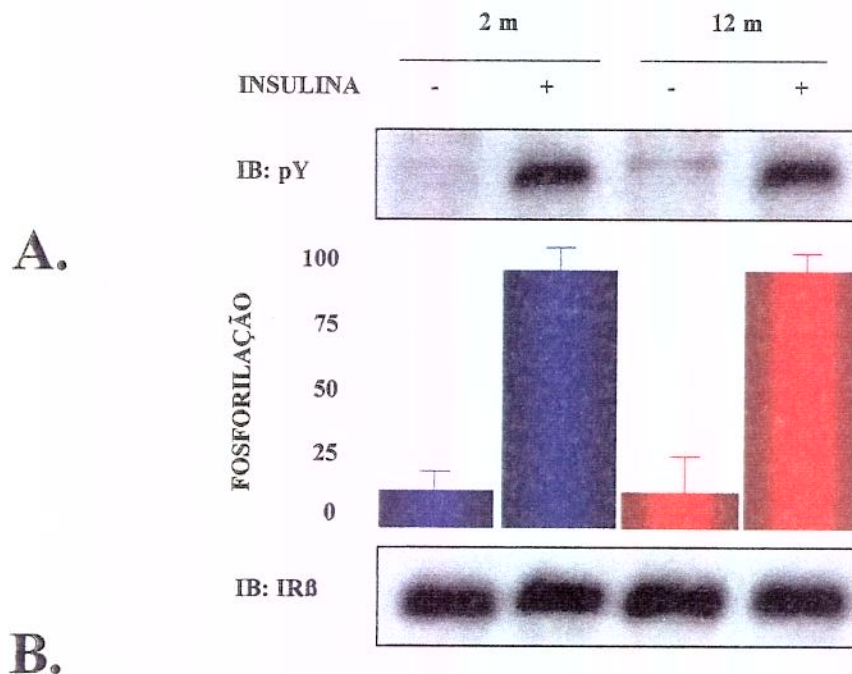


Figura 7. (A.) Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da subunidade beta do receptor de insulina (IR β), 90 segundos após a infusão de solução salina (-) ou insulina (+), em amostras de músculos esqueléticos previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR β , extraídas de animais jovens (2 meses) e envelhecidos (12 meses). Após a infusão de salina com ou sem insulina na veia cava inferior, fragmentos de músculos esqueléticos foram extraídos e homogeneizados em tampão de extração B mantido a 4° C. Após a centrifugação, alíquotas com as mesmas quantidades de proteínas foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpo anti-IR β e separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS a 8%, transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose e submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina e [¹²⁵I]-proteína A. Após autorradiografia, as bandas foram quantificadas através da densitometria óptica de 5 experimentos. **(B.)** Avaliação dos níveis protéicos da subunidade β do receptor de insulina no músculo esquelético. Para quantificar os níveis teciduais do receptor, as membranas de nitrocelulose obtidas após imunoprecipitação de extratos teciduais com anticorpo anti-IR β foram estripadas e submetidas a novo *immunoblotting* com anticorpo anti-IR β e [¹²⁵I]-proteína A, e então submetidas a autorradiografia. Os valores são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Unidades arbitrárias foram atribuídas relativamente aos controles estimulados.

Fosforilação do IRS-1 no músculo

IP: IRS-1

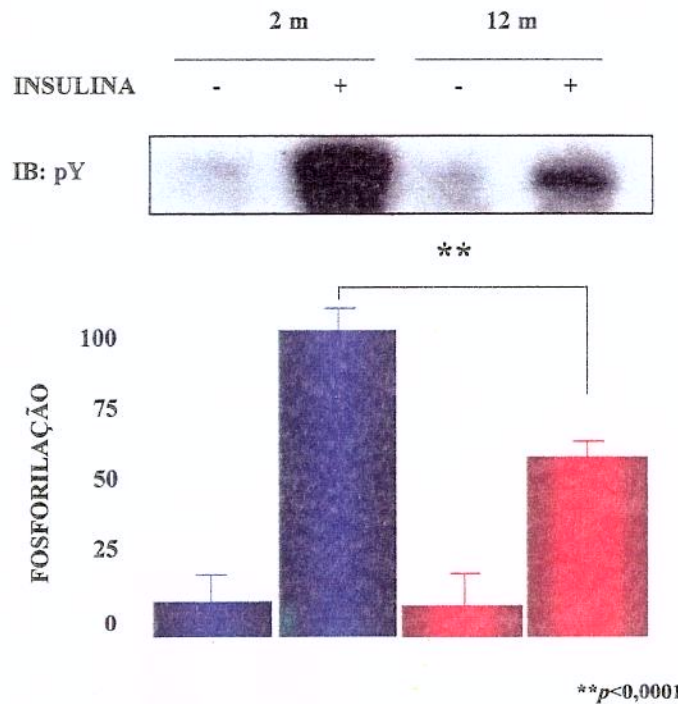


Figura 8. Efeito do envelhecimento e obesidade sobre o grau de fosforilação insulino-estimulado do IRS-1 em tirosina no músculo esquelético de ratos. Os tecidos foram extraídos 90 segundos após infusão em *bolus* de solução salina com ou sem insulina na veia cava inferior. As proteínas foram extraídas em tampão contendo inibidores de proteases e fosfatases, imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, separadas em gel de poliacrilamida sob condições redutoras, transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina. Após autorradiografia, as bandas obtidas a partir de 6 experimentos foram avaliadas através de densitometria óptica. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM. Unidades arbitrárias foram atribuídas em relação aos animais jovens estimulados com insulina. ** $p<0,0001$

Níveis teciduais do IRS-1 no músculo

IP: IRS-1

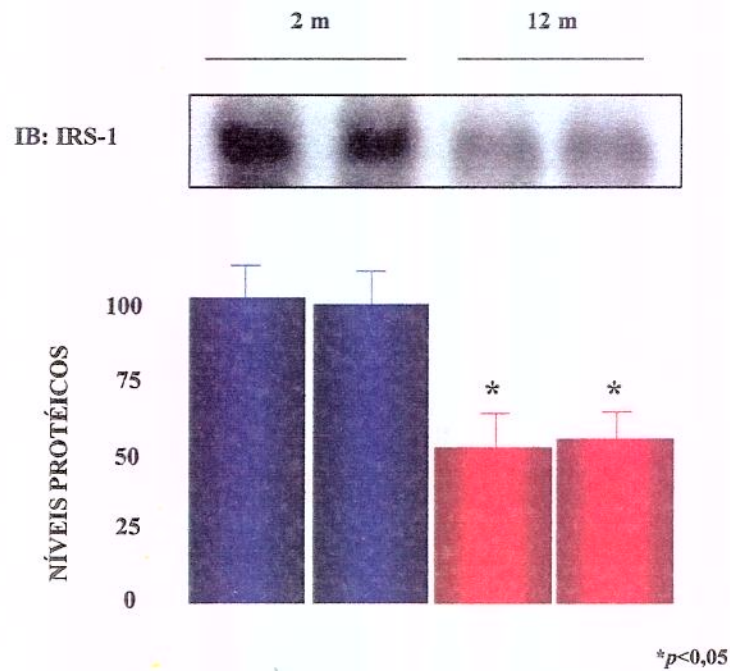


Figura 9. Efeito do envelhecimento e obesidade sobre os níveis teciduais do IRS-1 no músculo esquelético de ratos Wistar machos. Para quantificar os níveis teciduais do receptor, as membranas de nitrocelulose obtidas após imunoprecipitação de extratos teciduais com anticorpo anti-IRS-1 foram estripadas e submetidas a novo *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1 e [125 I]-proteína A, e então submetidas a autorradiografia. Os valores são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Unidades arbitrárias foram atribuídas relativamente aos controles. * $p<0,05$.

Associação IRS-1/PI 3-quinase no músculo

IP: IRS-1

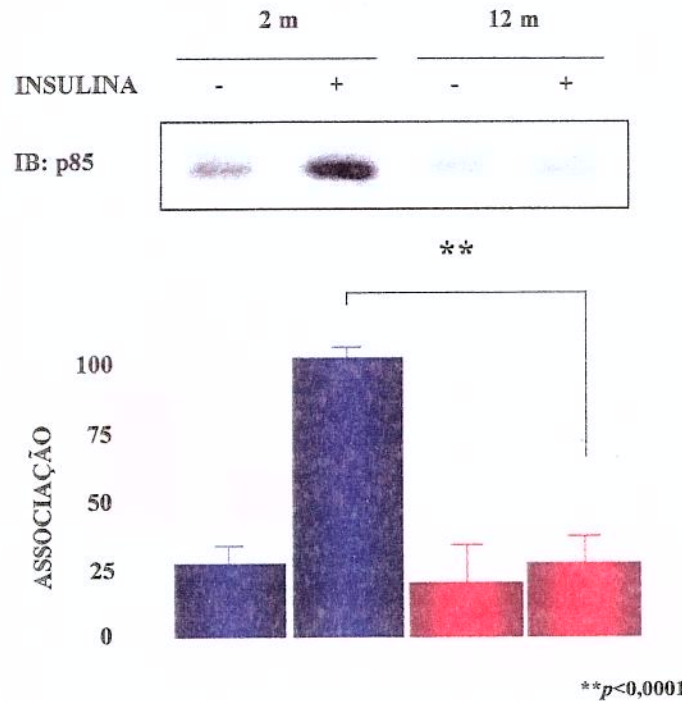


Figura 10. Associação insulino-estimulada entre IRS-1 e a subunidade regulatória p85 da PI 3-quinase no músculo de ratos jovens (2m) e adultos (12m). Os tecidos foram extraídos e homogeneizados em tampão adequado e quantidades iguais de proteínas foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1, separadas em gel de poliacrilamida, transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose e submetidas a *immunoblotting* com anticorpo contra a subunidade p85 da enzima PI 3-quinase. Seis experimentos foram utilizados para densitometria óptica. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM. Unidades arbitrárias foram atribuídas relativamente aos controles estimulados. $**p<0,0001$.

Fosforilação e níveis teciduais da Akt no músculo

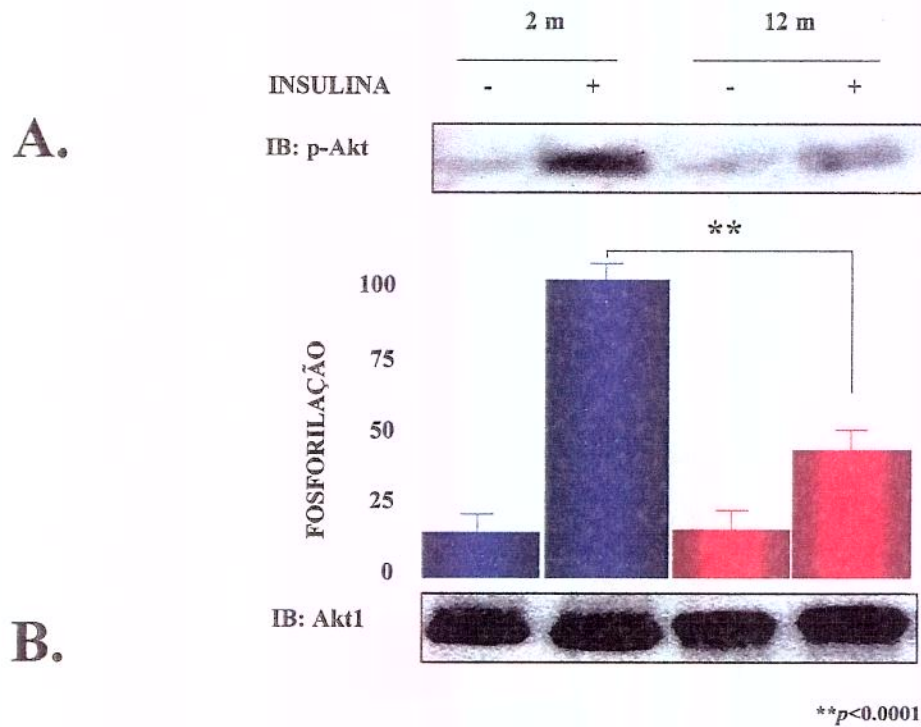


Figura 11. (A.) Efeito do envelhecimento e obesidade sobre o grau de fosforilação insulino-estimulado da Akt em serina-473 no músculo esquelético de ratos. Extratos totais de músculos contendo 200 μ g de proteínas foram separados em gel de poliacrilamida-SDS a 10% e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpo anti-fosfo-(serina 473)-Akt e [125 I]-proteína A, autoradiografadas e as bandas quantificadas através de densitometria óptica. (B.) As membranas foram estripadas e submetidas a novo *immunoblotting*, desta vez com anticorpo anti-Akt1 para avaliar a quantidade da proteína nos tecidos dos animais jovens (2m) e envelhecidos (12m). Os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=8). Unidades arbitrárias foram estabelecidas em relação aos animais jovens estimulados com insulina. ** $p < 0,0001$.

Fosforilação e níveis teciduais da MAP quinase no músculo

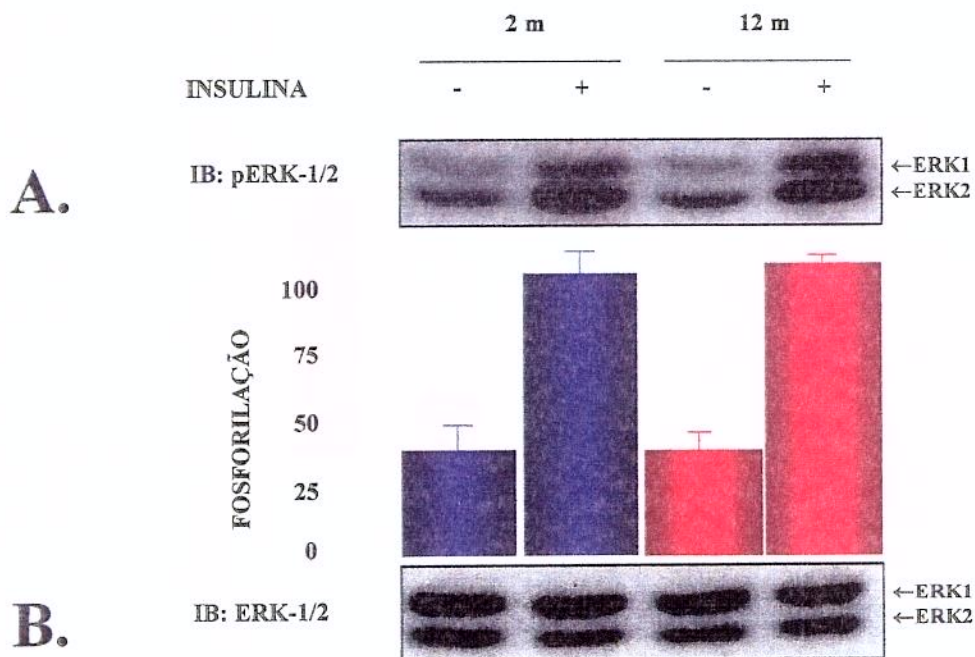


Figura 12. (A.) Efeito do envelhecimento e obesidade sobre o grau de fosforilação insulino-estimulado das isoformas ERK1/2 da MAP quinase no músculo esquelético de ratos. Extratos totais de músculos contendo 200 µg de proteínas foram separados em gel de poliacrilamida-SDS a 12% e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpo anti-fosfo-ERK1/2 e [¹²⁵I]-proteína A, autoradiografadas e as bandas quantificadas através de densitometria óptica. (B.) As membranas foram estripadas e submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-ERK1/2 para avaliação dos níveis teciduais de ERK1/2 no músculo de animais jovens (2m) e envelhecidos (12m). Os valores são expressos como média ± EPM (n=6). Unidades arbitrárias foram estabelecidas em relação aos animais jovens estimulados com insulina.

Fosforilação e níveis teciduais do IR β na aorta

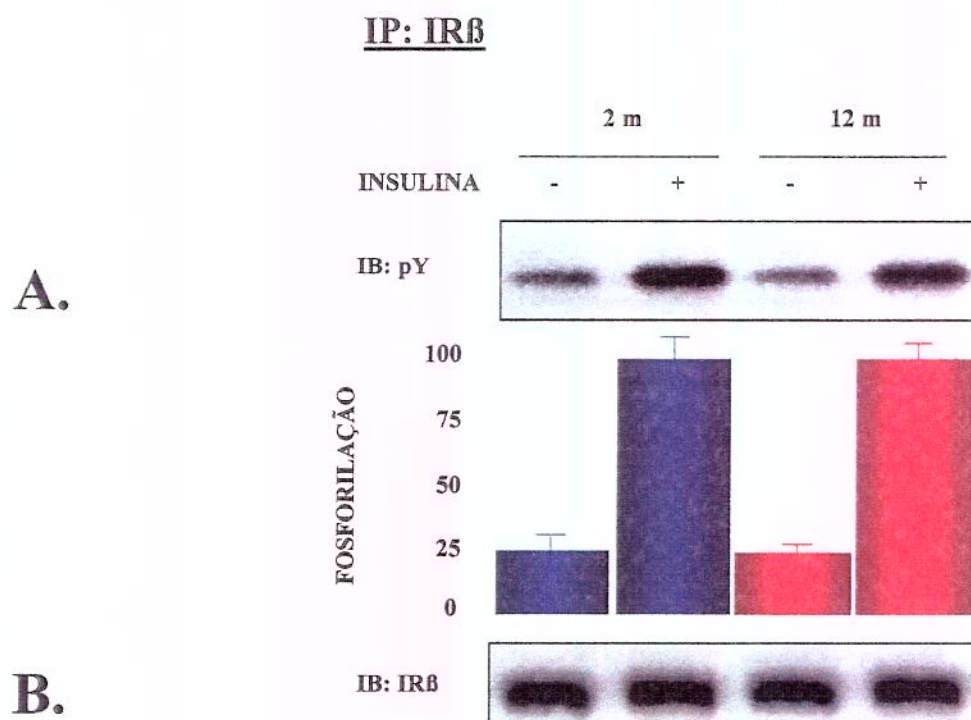


Figura 13. (A.) Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da subunidade beta do receptor de insulina (IR β), 90 segundos após a infusão de solução salina (-) ou insulina (+), em amostras de aortas previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR β , extraídas de animais jovens (2 meses) e envelhecidos (12 meses). Após a infusão de salina com ou sem insulina na veia cava inferior, as aortas foram extraídas, lavadas para retirada do excesso de sangue e homogeneizadas em tampão de extração B mantido a 4° C. Após a centrifugação, alíquotas com as mesmas quantidades de proteínas foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpo anti-IR β e separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS a 8%, transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose e submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina e [125 I]-proteína A. Após autorradiografia, as bandas foram quantificadas através da densitometria óptica de 5 experimentos. (B.) Avaliação dos níveis protéicos da subunidade β do receptor de insulina (IR β) nas aortas torácicas de ratos com 2 e 12 meses de idade. Para quantificar os níveis teciduais do receptor, as membranas de nitrocelulose obtidas após imunoprecipitação de extratos de aortas com anticorpo anti-IR β foram estripadas e submetidas a novo *immunoblotting* com anticorpo anti-IR β e [125 I]-proteína A, e então submetidas a autorradiografia. Os valores são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Unidades arbitrárias foram atribuídas relativamente aos controles estimulados.

Fosforilação e níveis teciduais do IRS-1 na aorta

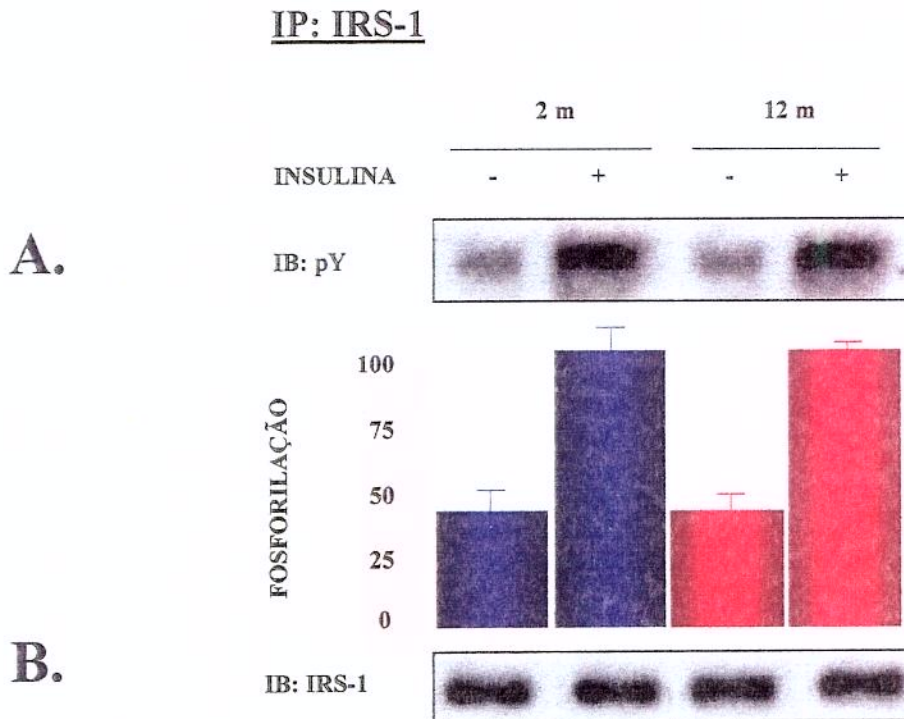


Figura 14. (A.) Efeito do envelhecimento e obesidade sobre o grau de fosforilação insulino-estimulado do IRS-1 em tirosina na aorta torácica de ratos. As aortas foram extraídas 90 segundos após infusão em *bolus* de solução salina com ou sem insulina na veia cava inferior. As proteínas foram extraídas em tampão contendo inibidores de proteases e fosfatases, imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, separadas em gel de poliacrilamida sob condições redutoras, transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina. Após autorradiografia, as bandas obtidas a partir de 6 experimentos foram avaliadas através de densitometria óptica. (B.) Níveis protéicos do IRS-1 na aorta de torácica de ratos com 2 e 12 meses de idade. Para avaliar a quantidade de IRS-1 nas aortas, as membranas de nitrocelulose obtidas após imunoprecipitação de extratos de aortas com anticorpo anti-IRS-1 foram estripadas e submetidas a *immunoblotting* com o mesmo anticorpo usado para imunoprecipitação e [125 I]-proteína A, e então submetidas a autorradiografia e densitometria óptica. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM. Unidades arbitrárias foram atribuídas em relação aos animais jovens estimulados com insulina.

Fosforilação e níveis teciduais do IRS-2 na aorta

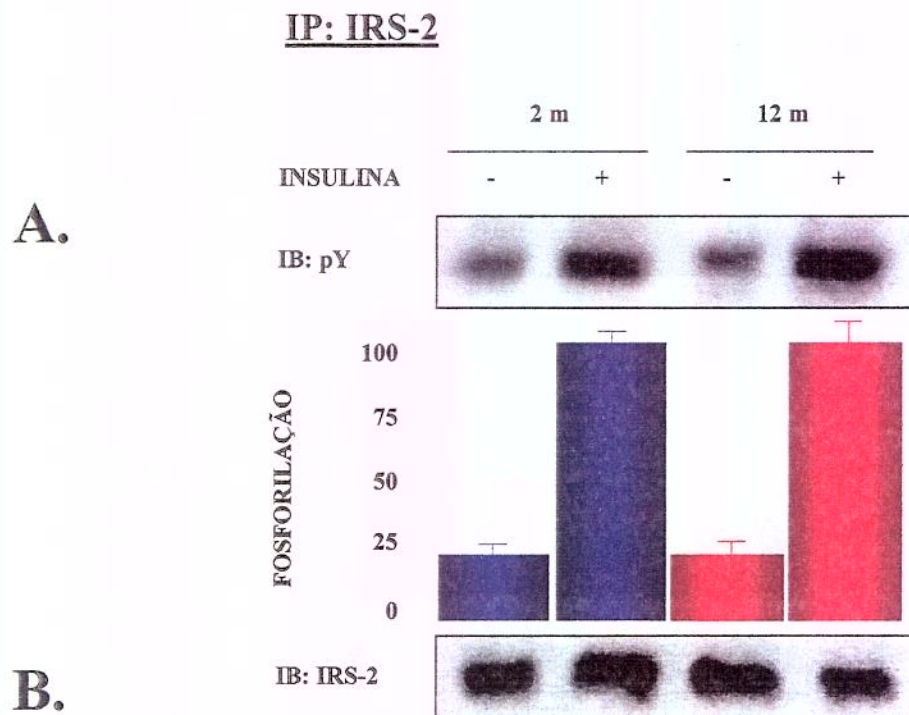


Figura 15. (A.) Avaliação do grau de fosforilação insulino-estimulado do IRS-2 em tirosina na aorta torácica de ratos com 2 e 12 meses de idade. As aortas foram extraídas após infusão em *bolus* de solução salina com ou sem insulina na veia cava inferior. As proteínas foram extraídas como descrito na figura 13, porém a imunoprecipitação foi conduzida com anticorpo específico contra IRS-2. O *immunoblotting* foi realizado com anticorpo anti-fosfotirosina. Seis experimentos foram utilizados para determinar a fosforilação em tirosina do IRS-2 através de densitometria óptica. (B.) Avaliação dos níveis protéicos do IRS-2 na aorta de torácica de ratos jovens (2 m) e envelhecidos (12 m). Para avaliar a quantidade de IRS-2 nas aortas, as membranas de nitrocelulose obtidas após imunoprecipitação de extratos de aortas com anticorpo anti-IRS-2 foram estripadas e submetidas a *immunoblotting* com o mesmo anticorpo usado para imunoprecipitação e [¹²⁵I]-proteína A, e então submetidas a autorradiografia e densitometria óptica. Os valores são expressos como média ± EPM.

Associação IRS-1/PI 3-quinase na aorta

IP: IRS-1

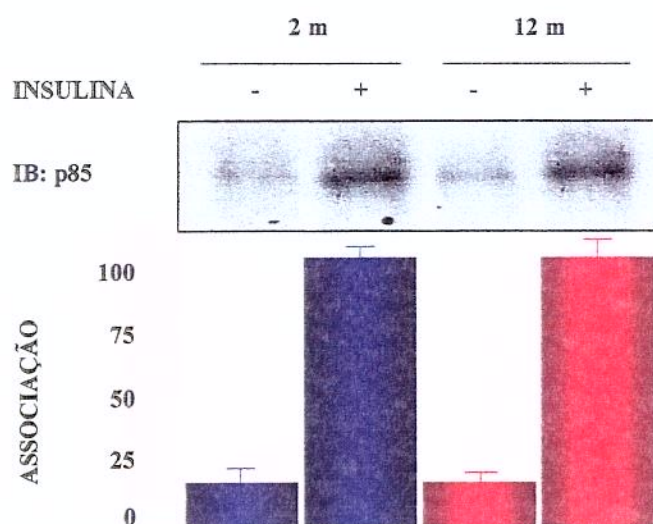


Figura 16. Associação insulino-estimulada entre IRS-1 e a subunidade regulatória p85 da PI 3-quinase e níveis protéicos de p85 nas aortas de ratos jovens (2m) e envelhecidos (12m). As aortas foram extraídas e homogeneizadas em tampão adequado e quantidades iguais de proteínas foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1, separadas em gel de poliacrilamida, transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose e submetidas a *immunoblotting* com anticorpo contra a subunidade p85 da enzima PI 3-quinase com o objetivo de avaliar os efeitos do envelhecimento e da obesidade sobre a associação entre IRS-1/PI 3-quinase nas aortas torácicas dos ratos. Seis experimentos foram utilizados para densitometria óptica. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM.

Associação IRS-2/PI 3-quinase na aorta

IP: IRS-2

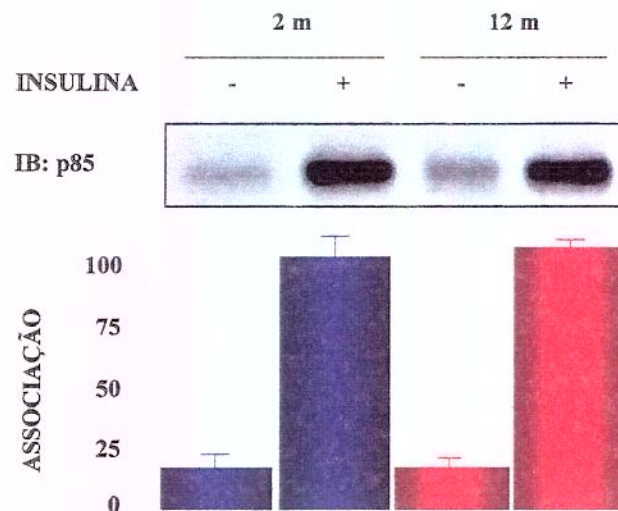


Figura 17. Associação insulino-estimulada entre IRS-2 e a subunidade regulatória p85 da PI 3-quinase nas aortas de ratos jovens (2m) e envelhecidos (12m). As aortas foram extraídas e homogeneizadas em tampão adequado e quantidades iguais de proteínas foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-2, separadas em gel de poliacrilamida sob condições redutoras, transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose e submetidas a *immunoblotting* com anticorpo contra a subunidade p85 da enzima PI 3-quinase para avaliação dos efeitos do envelhecimento e da obesidade sobre a associação entre IRS-2/PI 3-quinase nas aortas torácicas dos ratos. A figura é representativa de 6 experimentos. Os valores obtidos através de densitometria óptica são expressos como média ± EPM.

Fosforilação e níveis teciduais da Akt na aorta

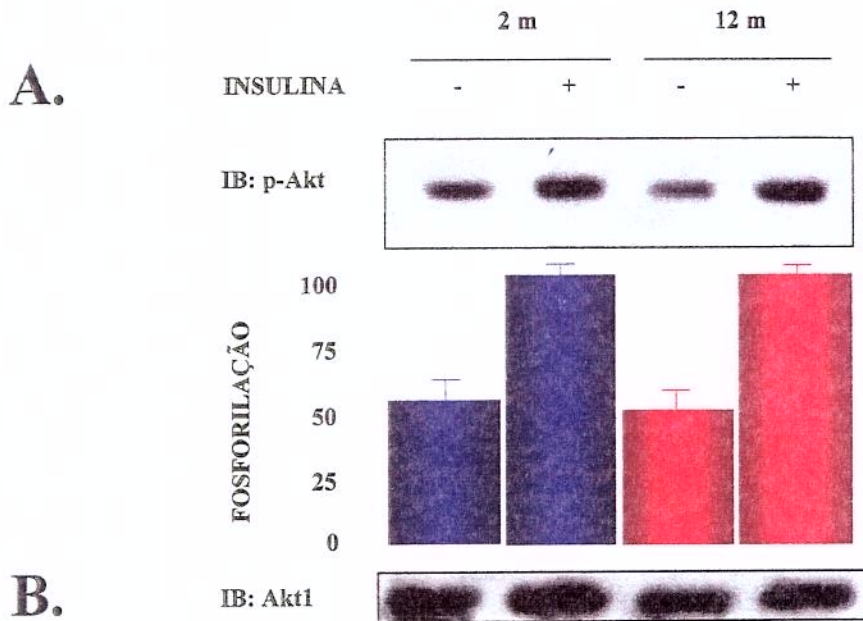


Figura 18. (A.) Efeito do envelhecimento e obesidade sobre o grau de fosforilação insulino-estimulado da Akt em serina-473 na aorta torácica de ratos. Extratos totais de aortas contendo 200 µg de proteínas foram separados em gel de poliacrilamida-SDS a 10% e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpo anti-fosfo-(serina 473)-Akt e [¹²⁵I]-proteína A, autoradiografadas e as bandas quantificadas através de densitometria óptica. (B.) Níveis protéicos da Akt na aorta torácica de ratos. Os experimentos foram conduzidos conforme descrito anteriormente e as membranas foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-Akt1 para avaliar a quantidade da proteína nas aortas dos animais jovens (2m) e envelhecidos (12m). Os valores são expressos como média ± EPM (n=10). Unidades arbitrárias foram estabelecidas em relação aos animais jovens estimulados com insulina.

Associação Akt/eNOS na aorta

IP: Akt

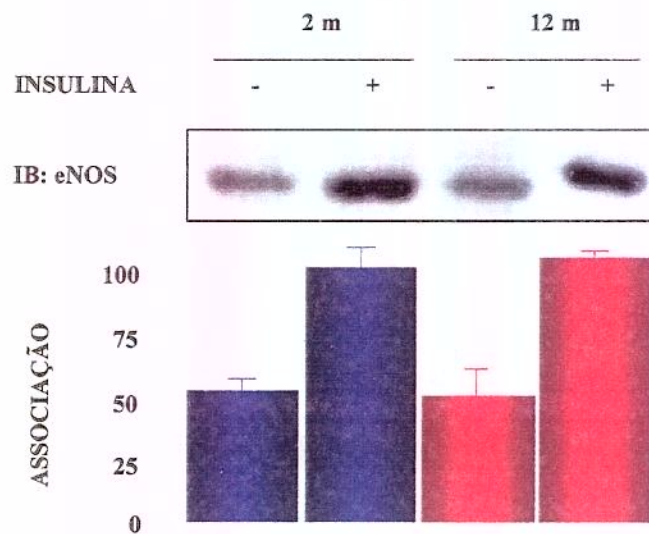


Figura 19. Associação insulino-estimulada entre Akt1 e eNOS (NOS3) nas aortas de ratos jovens (2m) e envelhecidos (12m). As aortas foram extraídas 3 minutos após infusão de solução salina com ou sem insulina, homogeneizadas em tampão B e quantidades iguais de proteínas foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpo anti-Akt1, separadas em gel de poliacrilamida a 8%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetidas a *immunoblotting* com anticorpo contra a eNOS para avaliação dos efeitos do envelhecimento e da obesidade sobre a associação entre Akt1/eNOS nas aortas torácicas dos ratos. Os valores obtidos através de densitometria óptica são expressos como média $\pm$ EPM (n=6). Unidades arbitrárias foram estabelecidas com relação aos controles estimulados.

Fosforilação e níveis teciduais da eNOS na aorta

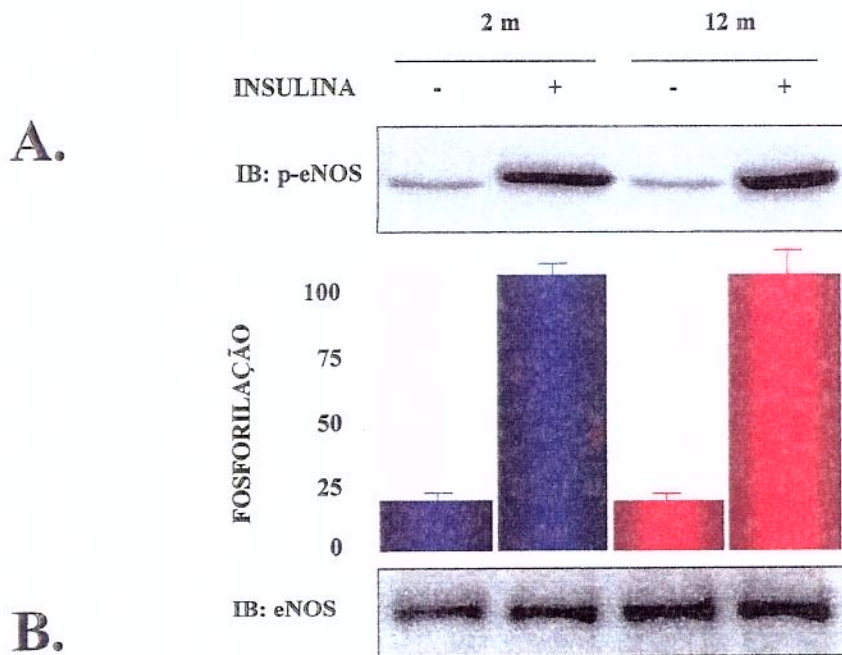


Figura 20. (A.) Efeito do envelhecimento e obesidade sobre o grau de fosforilação insulino-estimulado da eNOS (NOS3) em serina-1177 na aorta torácica de ratos. Extratos totais de aortas contendo 200 µg de proteínas foram separados em gel de poliacrilamida-SDS a 8% e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpo anti-fosfo-(serina 1177)-eNOS e [¹²⁵I]-proteína A, autoradiografadas e as bandas quantificadas através de densitometria óptica. A figura é representativa de 6 experimentos. Unidades arbitrárias foram estabelecidas em relação aos animais jovens estimulados com insulina. (B.) Níveis protéicos da eNOS na aorta torácica de ratos jovens e envelhecidos. Extratos totais de aortas torácicas foram separados em gel de poliacrilamida-SDS a 8%, transferidas eletricamente para membranas de nitrocelulose e posteriormente submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-eNOS, autoradiografadas e as bandas quantificadas por densitometria óptica. Os valores são expressos como média ± EPM.

Fosforilação da ERK1/2 na aorta

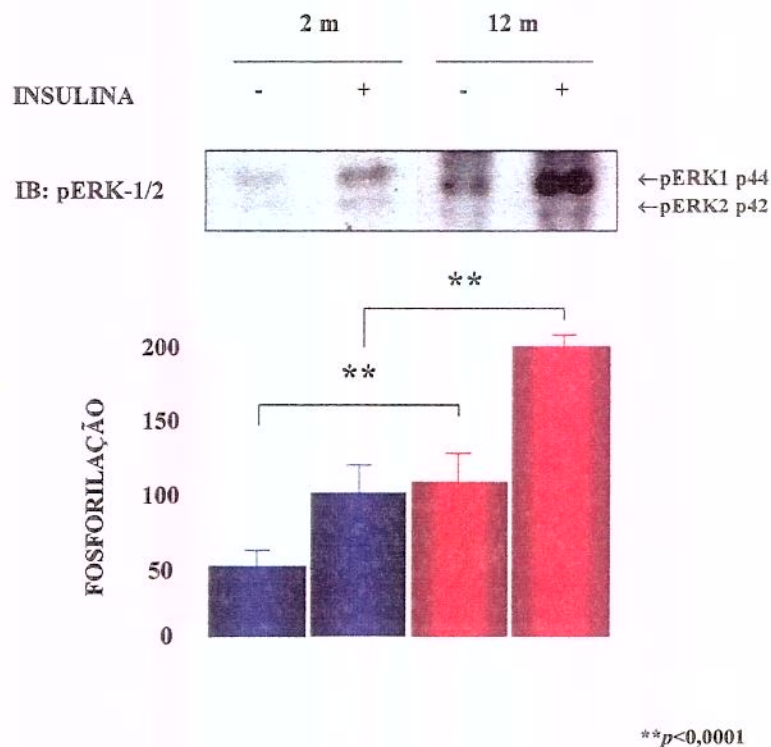


Figura 21. Avaliação da fosforilação em tirosina insulino-estimulada das proteínas ERK1/2 nas aortas de animais jovens (2 m) e envelhecidos (12 m). As proteínas das aortas foram isoladas como descrito anteriormente. Após infusão de solução salina com ou sem insulina, as aortas torácicas foram dissecadas e extraídas dos animais, o excesso de sangue foi lavado e as aortas foram homogeneizadas em tampão A fervente. Amostras contendo as mesmas quantidades de proteínas (200 μ g) foram suspensas em 50 mL de tampão de Laemmli contendo 100 mM de ditiotreitol e fervidas por 5 minutos antes de serem submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. A transferência elétrica para membranas de nitrocelulose foi realizada e as proteínas fosforiladas foram detectadas com anticorpos monoclonais contra fosfotirosina-204-ERK1/2 e [125 I]-proteína A e submetidas a autorradiografia. A densitometria óptica foi realizada em autorradiografias de 12 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM. **, $p < 0,0001$. Unidades arbitrárias foram estabelecidas em relação aos animais jovens estimulados com insulina.

Níveis protéicos da ERK1/2 na aorta

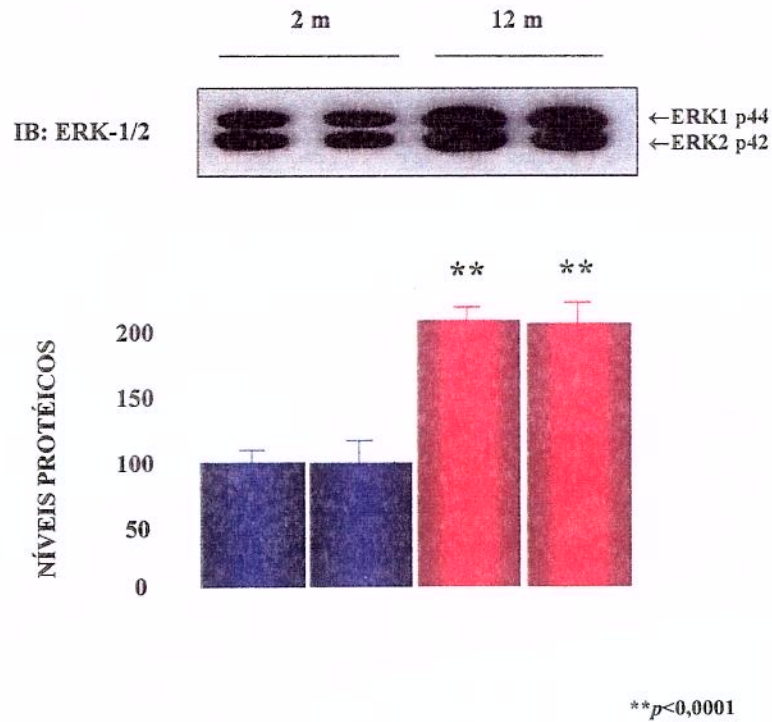


Figura 22. Efeito do envelhecimento e obesidade sobre os níveis protéicos das isoformas ERK1/2 da MAP quinase na aorta torácica de ratos. As aortas foram extraídas e homogeneizadas em tampão de extração A fervente. Quantidades iguais de proteínas (200 µg) foram separadas em gel de poliacrilamida a 12%, transferidas eletricamente para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpos policlonais contra ERK1/2 e [125 I]-proteína A. A densitometria óptica foi realizada em autorradiografias de 12 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM. **, $p<0,0001$. Unidades arbitrárias relativas aos controles estimulados.

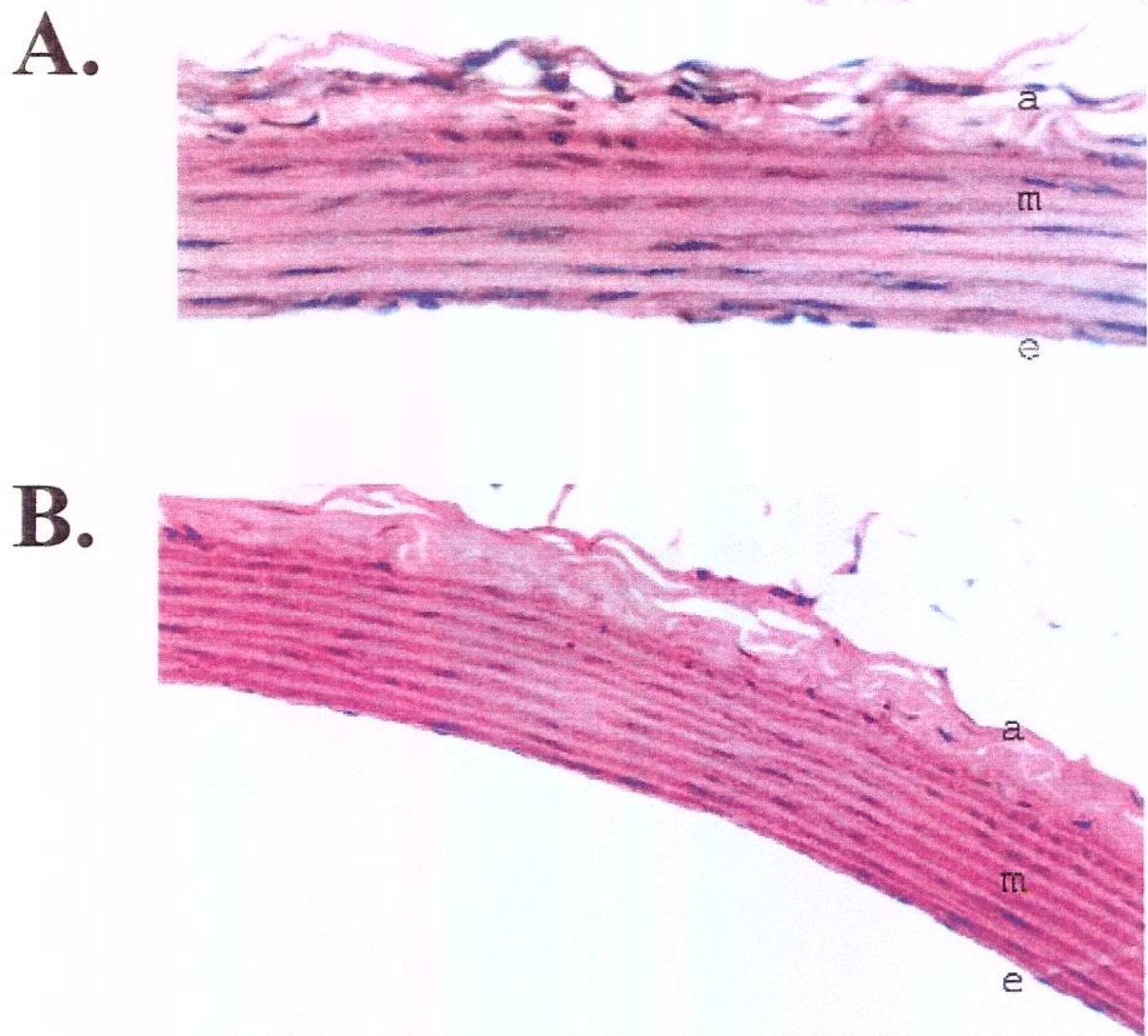


Figura 23. Microscopia óptica de cortes transversais de aortas torácicas de ratos com 2 e 12 meses de idade. A. aorta torácica de rato com 2 m, HE, aumento x250. B. aorta torácica de rato com 12 m, HE, aumento x400. (e=endotélio, m=camada média, a=camada adventícia).

5. Discussão

A resistência à insulina tem sido considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose (Howard et al., 1996). A doença vascular é a principal causa de mortes e responde por um grande percentual da morbidade em pacientes diabéticos tipo 1 ou tipo 2 (Stern, 1995). No *diabetes mellitus* tipo 2 há acometimento de microvasos (microangiopatia) e grandes vasos (macroangiopatia). A doença microvascular é demonstrada pela retinopatia, neuropatia e nefropatia, enquanto a macroangiopatia é caracterizada pela aceleração da aterosclerose, afetando órgãos vitais como cérebro e coração. A aterosclerose no *diabetes mellitus* é multifatorial e inclui interações complexas entre hiperglicemia, hiperlipidemia, *stress* oxidativo, envelhecimento acelerado, hiperinsulinemia e/ou hiper-pró-insulinemia, e alterações na coagulação e fibrinólise (Calles-Escandon, Garcia-Rubi, Mirza, & Mortensen, 1999). Uma hipótese atual para a lesão inicial da aterosclerose envolve alterações na função da célula endotelial (Lusis, 2000), isto é, vasodilatação reduzida em resposta à acetilcolina ou hiperemia, redução na produção de óxido nítrico pelo endotélio, elevação dos níveis plasmáticos de fator de von Willebrand, trombomodulina, selectina, PAI-1 (*inibidor 1 do ativador do plasminogênio*), colágeno tipo IV e t-PA (*ativador do plasminogênio tecidual*).

Apesar das artérias e arteríolas não serem consideradas tecidos-alvo “tradicionais” da ação da insulina, como o fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, nos últimos anos muitos trabalhos têm sugerido ou demonstrado que os vasos são sensíveis à insulina. A disfunção endotelial tem sido bem documentada em diabéticos tipo 2 (Cosentino & Luscher, 1998) e também pode estar presente em indivíduos que apresentam apenas resistência à insulina sem hiperglicemia, como alguns pacientes obesos (Steinberg et al., 1996), ou naqueles com diminuição da tolerância à glicose (Ferri et al., 1998) ou antecedente pessoal de diabetes gestacional (Anastasiou et al., 1998).

A insulina desencadeia seus processos metabólicos e de crescimento celular inicialmente através de um receptor de membrana específico (Freychet et al., 1971; Cuatrecasas, 1972; Kahn, 1985). A ligação da insulina à subunidade α extracelular implementa a atividade tirosina-quinase do receptor contra ele mesmo (Patti & Kahn, 1998), gerando resíduos de fosfotirosina na subunidade β do receptor, os quais atuam como sítios de reconhecimento para substratos intracelulares, como as quatro proteínas da família

IRS (White, 1998) e outros substratos, incluindo Gab-1, p60^{dok}, Cbl, APS e isoformas da Shc (Pessin et al., 2000). Essas proteínas são fosforiladas em resíduos de tirosina pelo receptor de insulina, podendo então estabelecer interações não-covalentes com proteínas adaptadoras com domínios SH2, os quais apresentam alta afinidade pela fosfotirosina (Backer et al., 1992; Folli et al., 1993; Kuhne, Pawson, Lienhard, & Feng, 1993; Pawson AJ, 1998), como a subunidade regulatória p85 da enzima fosfatidilinositol (PI) 3-quinase e uma proteína adaptadora intracelular conhecida por Grb-2. A ligação dos substratos do receptor a essas proteínas adaptadoras com domínios SH2 pode regular suas atividades ou, em alguns casos, sua localização subcelular.

A PI 3-quinase tem um papel fundamental nas ações metabólicas e mitogênicas da insulina (Shepherd et al., 1998). A inibição da PI 3-quinase bloqueia a maior parte das ações metabólicas da insulina, incluindo a estimulação do transporte de glicose e a síntese de glicogênio e lipídios. Essa enzima catalisa a fosforilação de fosfoinosítídeos na posição 3 para produzir fosfatidilinositol-3-fosfatos, especialmente PtdIns(3,4,5)P₃, os quais promovem o direcionamento da Akt para a membrana celular para que esta possa ser alvo da enzima PDK1, uma das serina quinases que fosforilam e ativam a serina/treonina quinase Akt (Alessi et al., 1997). Tem sido sugerido que a ativação da Akt tenha papel importante nas ações da insulina sobre o crescimento celular e sobre o metabolismo de glicose e proteínas.

Foi demonstrado, em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), que a Akt pode fosforilar e ativar diretamente a eNOS em dois resíduos de serina (1177 e 1179), levando ao aumento da produção endotelial de óxido nítrico através da conversão de L-arginina em L-citrulina e NO (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999). O óxido nítrico é um determinante fundamental da homeostase cardiovascular, participando da regulação da pressão arterial sistêmica, da remodelação vascular, da angiogênese e da agregação plaquetária (Moncada & Higgs, 1993; Murohara et al., 1998; Rudic et al., 1998). A redução na biodisponibilidade do óxido nítrico é uma característica de pacientes com doença coronariana (Zeiher, 1996) e está associada ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (Moroi et al., 1998).

Como ocorre com outros fatores de crescimento, a insulina também é capaz de estimular uma via que leva à modulação de uma família de serina/treonina quinases conhecida por MAP quinase, componentes principais de vias controladoras da embriogênese e da diferenciação, proliferação e morte celulares (Pearson et al., 2001). A ativação de vias de sinalização intracelulares por fatores de crescimento, hormônios e neurotransmissores é mediada através de duas MAP quinases muito relacionadas, p44 e p42, denominadas ERK1 e ERK2, respectivamente. Esta via se inicia com a fosforilação em tirosina de proteínas IRS e/ou Shc, as quais interagem com a proteína adaptadora Grb2, recrutando a proteína SOS (*Son-of-sevenless*) para a membrana plasmática para ativação da Ras. A ativação da Ras também requer a estimulação da tirosina fosfatase SHP2, através da interação com substratos do receptor, como Gab-1 ou IRS-1/2. Uma vez ativada, a Ras opera estimulando uma cascata de serina quinases com a ativação sequencial da Raf, MEK e ERK. As proteínas ERK1/2 são reguladas por dupla fosforilação em resíduos específicos de tirosina e treonina dentro de uma sequência característica *Thr-Glu-Tyr* (TEY). Em resposta à ativação, estas duas MAP quinases podem fosforilar outras proteínas em serina e treonina. A ERK ativada também pode se translocar para o núcleo, onde catalisa a fosforilação de fatores de transcrição como p62^{TCF}, iniciando uma série de eventos que culminam com a proliferação ou diferenciação celulares (Boulton et al., 1991). O bloqueio desta via com mutantes dominantes negativos ou inibidores farmacológicos previne o crescimento celular estimulado pela insulina, mas não tem repercussão sobre as ações metabólicas do hormônio (Lazar et al., 1995). Embora modelos de animais que não expressam alguns componentes desta via (como Raf-1, B-Raf e MEK1) apresentem um desenvolvimento embrionário anormal do sistema vascular, incompatível com a vida, camundongos que não expressam o gene ERK1 são normais sob vários aspectos fenotípicos, sem alterações na angiogênese ou no desenvolvimento placentário (Wojnowski et al., 1997; Wojnowski et al., 1998; Giroux et al., 1999; Pages et al., 1999).

Assim, após estímulo com insulina, o receptor de insulina pode ativar duas vias intracelulares nas células da parede vascular: uma via (PI 3-quinase / Akt / eNOS) que leva ao aumento da produção vascular de óxido nítrico e, portanto, apresenta potencial anti-aterogênico, e outra via (Ras / Raf / MAP quinase), associada ao crescimento de células

vasculares e à expressão de proteínas da matriz extracelular (Xi, Graf, Goetze, Hsueh, & Law, 1997), com potencial pró-aterogênico.

Apesar das vias de transmissão do sinal de insulina terem sido muito estudadas no fígado, músculo e tecido adiposo, estas vias foram pouco estudadas no tecido vascular.

O protocolo apresentado neste trabalho permitiu caracterizar, pela primeira vez, as vias de transmissão do sinal de insulina na aorta torácica *in vivo* após estímulo agudo com este hormônio e imunoprecipitação e *immunoblotting* de extratos teciduais com anticorpos específicos. Este método possibilitou o estudo direto da ação molecular da insulina no vaso dentro de seu ambiente mais fisiológico, sem interferência de possíveis artefatos bioquímicos. Todo cuidado foi tomado para que os experimentos fossem realizados da maneira mais ética possível, permitindo estabelecer um protocolo que poderá ser utilizado em novos trabalhos.

O modelo de animal escolhido foi o rato Wistar com 12 meses de idade, o qual foi estudado paralelamente ao rato com 2 meses de idade. Estes animais apresentaram, com o envelhecimento, ganho de peso e maior resistência à insulina, caracterizada por hiperinsulinemia e por uma menor velocidade de desaparecimento de glicose após teste de tolerância à insulina curto. Os animais com 2 e 12 meses de idade mantiveram-se normoglicêmicos e normotensos, com medidas não-invasivas de pressão arterial sistólica basal iguais às dos animais jovens. Para avaliar a presença ou não de aterosclerose nos animais envelhecidos, foi realizado o processamento e análise morfológica de cortes seriados de aortas torácicas de animais com 2 e 12 meses de idade, e observou-se que as aortas de animais com 12 meses não apresentaram hipertrofia e hiperplasia de células musculares lisas e nem alterações estruturais compatíveis com aterosclerose. Assim, nesse modelo animal, a resistência à insulina não foi acompanhada de hipertensão arterial sistêmica ou aterosclerose e por isso foi escolhido para tentar elucidar o mecanismo intracelular de transmissão do sinal de insulina no vaso de um animal que, apesar da resistência à insulina, não desenvolve doença cardiovascular.

Os mecanismos moleculares da resistência à insulina no fígado e músculo de ratos envelhecidos já foram estudados (Carvalho et al., 1996). Os animais envelhecidos apresentaram, em relação aos animais jovens, redução na fosforilação insulino-estimulada

do IRS-1 em resíduos de tirosina no músculo, assim como redução na fosforilação da Akt em serina; redução dos níveis protéicos de IRS-1 no músculo; redução na associação insulino-estimulada entre IRS-1 e PI 3-quinase no músculo. Como a ativação da via da PI 3-quinase pela insulina está ligada a funções metabólicas, como transporte de glicose no músculo e tecido adiposo (Cheatham et al., 1994; Haruta et al., 1995) e à síntese de glicogênio e proteínas no fígado e músculo (Shepherd, Nave, & Siddle, 1995; Mendez, Myers, Jr., White, & Rhoads, 1996), as alterações demonstradas nas vias de sinalização de insulina no músculo podem ter contribuído para a resistência à insulina observada nesses animais.

Neste trabalho foi demonstrado que a insulina tem efeito direto no tecido vascular usando as vias de sinalização comumente descritas em outros tecidos. Os graus de fosforilação insulino-estimulados do receptor de insulina em resíduos de tirosina não diferiram significativamente entre as aortas dos animais com 2 e 12 meses de idade. Os níveis teciduais da subunidade β do receptor também não variaram entre os dois grupos. A fosforilação em tirosina do IRS-1 e a sua associação com a subunidade p85 da PI 3-quinase, após estímulo agudo com insulina, foram idênticas quando comparadas as aortas dos animais jovens e envelhecidos. A quantidade de IRS-1 não variou entre as aortas dos dois grupos de animais. Também não foram observadas diferenças significativas nos graus de fosforilação do IRS-2 em tirosina e na sua associação com a p85, após estímulo com insulina, quando foram comparadas as aortas dos dois grupos de animais; os níveis teciduais de IRS-2 também não variaram com o envelhecimento e obesidade.

Jiang et al (Jiang et al., 1999b) demonstraram que a insulina ativa a PI 3-quinase em células musculares lisas vasculares predominantemente através de sua associação com o IRS-2, e que a endotelina-1, um polipeptídeo ativo secretado por células endoteliais, notadamente elevada no sangue de pacientes resistentes à insulina, inibe a atividade PI 3-quinase estimulada pela insulina possivelmente aumentando a fosforilação em serina de IR e IRS-2 através da ativação da PKC.

Os graus de fosforilação da Akt em serina, tanto na ausência de estímulo quanto após estímulo com insulina, foram idênticos nas aortas de animais com 2 e 12 meses de idade, bem como seus níveis teciduais. Não houve redução na fosforilação da Akt na

vasculatura destes animais, fato que se contrapõe parcialmente ao estudo de Jiang et al (Jiang et al., 1999a), o qual demonstrou que células vasculares em cultura, extraídas do epidídimo de ratos Zucker obesos e resistentes à insulina, apresentam redução nos níveis de fosforilação insulino-estimulada da Akt em serina. O autor não demonstrou dados quanto à fosforilação da Akt na aorta destes animais.

Hixon et al (Hixon et al., 2000) demonstraram que células musculares lisas de artérias de capacitância de modelos animais de hipertensão exibem altas concentrações e atividade de Akt, a qual pode levar à hipertrofia e poliploidização celulares. Os animais de nosso estudo, obesos e resistentes à insulina, se revelaram normotensos, com níveis teciduais e ativação normal da Akt pela insulina.

A Akt ativada é capaz de fosforilar a óxido nítrico sintase endotelial em resíduos de serina (Serina 1177 e 1179), ativando-a. A eNOS é a isoforma de NOS responsável pela produção do clássico EDRF ou “fator de relaxamento derivado do endotélio”, como descrito por Furchgott (Furchgott, 1999), que posteriormente foi identificado como o próprio óxido nítrico, um gás regulatório pluripotencial no sistema cardiovascular, produzido através do aminoácido L-arginina. O óxido nítrico dilata os vasos sangüíneos e inibe a função plaquetária e leucocitária, enquanto os inibidores da NOS elevam a pressão arterial e reduzem o fluxo sangüíneo (Papapetropoulos, Rudic, & Sessa, 1999). Muitos desses efeitos biológicos foram confirmados através da produção de camundongos que não expressam a eNOS (Huang et al., 1995; Shesely et al., 1996; Godecke et al., 1998). Além de seus efeitos cardiovasculares, estudos recentes sugerem que a NO desempenha um papel importante na modulação da sensibilidade à insulina e metabolismo de carboidratos, e que a eNOS tem função metabólica predominante sobre as outras isoformas (Shankar, Wu, Shen, Zhu, & Baron, 2000), ou seja, camundongos que não expressam a eNOS apresentam resistência à insulina no fígado e tecidos periféricos.

No presente estudo, a associação insulino-estimulada entre Akt e eNOS não diferiu significativamente entre as aortas dos dois grupos de animais estudados. Provavelmente em consequência dessa associação normal, a fosforilação basal e insulino-estimulada da eNOS em serina também foi idêntica nas aortas dos animais jovens e envelhecidos. Os níveis protéicos de eNOS também não variaram com o envelhecimento e obesidade nesse modelo

animal de resistência à insulina. Uma outra possibilidade para explicar a fosforilação e ativação normais da eNOS nos animais com 12 meses de idade pode ser a ausência de hiperglicemia nesses animais: Du et al (Du et al., 2001) demonstraram, em células endoteliais de aortas bovinas incubadas em meio de cultura com excesso de glicose e em aortas de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, que a hiperglicemia, através do aumento da produção mitocondrial de superóxido, é capaz de promover modificações covalentes no resíduo de serina 1177 da eNOS, ou seja, no sítio de ligação com a Akt, reduzindo em 67% a atividade catalítica da eNOS.

A seguir, foram avaliados os efeitos do envelhecimento e da obesidade sobre a ativação e quantidade das proteínas ERK1 e ERK2 nas aortas dos animais em estudo. Observou-se que animais com 12 meses apresentam um aumento da fosforilação basal (sem estímulo insulínico) dessas duas isoformas da MAP quinase da ordem de 2,2 vezes o valor basal avaliado em animais com 2 meses de idade. Após estímulo com insulina, as proteínas ERK1/2 apresentaram maiores graus de fosforilação em tirosina nas aortas dos animais envelhecidos. A variação da fosforilação da ERK1/2, ou seja, antes e após o estímulo com insulina, acompanhou o aumento dos níveis teciduais de ERK1/2 na aorta dos animais envelhecidos, aproximadamente 2 vezes a quantidade de proteína encontrada nas aortas dos animais jovens.

Estes dados estão parcialmente de acordo com Jiang et al (Jiang et al., 1999a), o qual demonstrou que, em cultura de microvasos extraídos de epidídimo de ratos Zucker obesos, há aumento da fosforilação basal de ERK1/2 (2 vezes); porém, após estímulo com insulina, o grau de fosforilação encontrado em ratos magros e obesos era idêntico. Durante *clamp* euglicêmico, entretanto, o autor não observou fosforilação em tirosina da MAP quinase na aorta e fígado destes animais, atribuindo a falta de resultados positivos nestes tecidos à dificuldade de isolar o *pool* da MAP quinase especificamente ativado pela insulina nos estudos de *clamp*.

A inativação ou atenuação do estímulo na MAP quinase é mediado por uma classe de proteínas fosfatases que inclui a MKP-1 (*MAP quinase fosfatase-1*), também conhecida por CL100, Erp e hVH-1 (Sun, Tonks, & Bar-Sagi, 1994). Em culturas primárias de células musculares lisas vasculares de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), Begum et al

(Begum, Ragolia, Rienzie, McCarthy, & Duddy, 1998) observaram indução deficiente na MKP-1 atribuída a um bloqueio na via da PI 3-quinase/NOS após estímulo com insulina, levando a uma ativação sustentada da MAP quinase e crescimento celular acelerado. Nos ratos Wistar aqui estudados, uma redução na atividade da MKP-1 no vaso poderia contribuir para o aumento da fosforilação da MAP quinase, embora isso não possa ser atribuído a um bloqueio da via da PI 3-quinase.

Ao contrário da ativação da PI 3-quinase, muito pouco se conhece sobre a ativação da ERK1/2 induzida pela insulina em condições de resistência à insulina *in vivo*. Os dados aqui apresentados são os primeiros na literatura a demonstrar que a insulina estimula o complexo MAP quinase na aorta de ratos *in vivo* e que estas proteínas estão hiperativadas nos animais adultos em relação aos jovens, tanto na ausência quanto na presença de estímulo, possivelmente devido ao aumento de seus níveis teciduais associados ao envelhecimento e obesidade.

A ativação da via da MAP quinase pela insulina não está reduzida em diabéticos tipo 2, possivelmente permitindo que a hiperinsulinemia crônica exerça efeitos deletérios sobre o crescimento das células musculares lisas dos vasos (Cusi et al., 2000). No entanto, no modelo animal de resistência à insulina aqui apresentado, o aumento da ativação e dos níveis teciduais da MAP quinase na aorta não foi associado à aterosclerose e hipertensão, sugerindo que provavelmente a preservação da via da PI 3-quinase / Akt / eNOS no vaso contribuiu para evitar o desenvolvimento de doença cardiovascular nestes animais.

Nas artérias de indivíduos diabéticos, a disfunção endotelial parece envolver tanto uma resistência à insulina específica na via da PI 3-quinase quanto a hiperglicemia (Hsueh & Law, 1998; Jiang et al., 1999b). A resistência seletiva na via da PI 3-quinase resultaria em redução na produção endotelial da molécula anti-aterogênica de óxido nítrico. Por outro lado, a manutenção ou aumento da atividade da via da MAP quinase poderia levar a uma maior proliferação das células musculares lisas vasculares e maior produção de PAI-1 (Hsueh et al., 1998).

Os mecanismos moleculares da regulação tecido-específica da sinalização de insulina no rato Wistar com 12 meses de idade, o qual apresenta resistência à insulina mas não desenvolve doença cardiovascular, podem estar relacionados à expressão de proteínas

envolvidas nas etapas iniciais da ação da insulina, aos graus de fosforilação em serina do IR β e IRSs e à atividade de fosfotirosina-fosfatases. Desta forma, a redução nos níveis teciduais do IRS-1 poderia contribuir para explicar a reduzida transmissão do sinal de insulina através da via da PI 3-quinase no músculo destes animais.

Recentemente foi demonstrado que a fosforilação insulino-estimulada do IR β e IRS-1/2, bem como a ativação da PI 3-quinase, estão seletivamente reduzidas no tecido vascular de ratos Zucker obesos resistentes à insulina (Jiang et al., 1999a). Como o rato Zucker obeso é um modelo experimental que associa obesidade e diabetes à doença cardiovascular, como a hipertensão arterial sistêmica (Carlson, Shelton, White, & Wyss, 2000), poder-se-ia supor que doenças cardiovasculares associadas à resistência à insulina poderiam ser parcialmente explicadas por anormalidades na via da PI 3-quinase nos tecidos vasculares, e que os ratos Wistar com 12 meses de idade não apresentaram doença cardiovascular, mesmo na presença de resistência à insulina acentuada, porque a via da PI 3-quinase / Akt / eNOS está preservada na aorta destes animais.

Em resumo, ratos Wistar com 12 meses de idade apresentaram obesidade e resistência à insulina, caracterizada por uma redução acentuada na transmissão do sinal de insulina pela via da PI 3-quinase no músculo, com preservação da via da MAP quinase neste tecido. Porém, na aorta, a via da PI 3-quinase / Akt / eNOS está preservada, em desequilíbrio com um aumento na ativação e níveis protéicos da MAP quinase. Apesar da via da MAP quinase ser considerada pró-aterogênica, estes animais não desenvolveram doença cardiovascular (hipertensão arterial sistêmica e aterosclerose), o que sugere que a preservação da via da PI 3-quinase / Akt / eNOS no vaso provavelmente contribuiu para evitar a aterosclerose e hipertensão arterial sistêmica no rato envelhecido com resistência à insulina.

6. Conclusões

- Ratos Wistar machos com 12 meses são obesos, resistentes à insulina, normoglicêmicos e normotensos.
- A insulina pode ativar diferencialmente as vias da PI 3-quinase e da MAP quinase no músculo esquelético e no vaso *in vivo*.
- As alterações na transmissão do sinal de insulina no músculo (redução na ativação da via da PI 3-quinase / Akt) podem contribuir para explicar a resistência à insulina neste modelo animal.
- A resistência à insulina não foi acompanhada de hipertensão arterial sistêmica ou aterosclerose neste modelo animal.
- O aumento da quantidade e ativação da MAP quinase não induziu hipertrofia, hiperplasia e alterações estruturais nas aortas dos animais com 12 meses de idade.
- A preservação da via da PI 3-quinase / Akt / eNOS no vaso provavelmente contribuiu para evitar a aterosclerose e hipertensão arterial no rato envelhecido com resistência à insulina.

7. Summary

The association between insulin resistance, hypertension and cardiovascular morbidity has been well established. However, the mechanism by which there is maintenance of normal blood pressure and absence of cardiovascular disease despite insulin resistance in some animal models is not clear.

Besides its metabolic effects, insulin is able to act in cardiovascular system directly in vascular cells promoting the increase in amino acid transport, glycogen synthesis, DNA synthesis, gene expression, nitric oxide release and regulation of mRNA expression of matrix proteins. Insulin stimulates the tyrosine kinase activity of its receptor, resulting in the phosphorylation of its cytosolic substrates IRSs and Shc, which bind differentially to various downstream signaling proteins, such as phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K). Recently, it has been demonstrated that insulin is able to stimulate NO production in cultured endothelial cells through a PI 3-K pathway, activating the serine/threonine protein kinase Akt and subsequently phosphorylating and activating the endothelial nitric oxide synthase (eNOS / NOS3). As is the case for other growth factors, insulin also stimulates the mitogen-activated protein (MAP) kinase extracellular signal-regulated kinase (ERK), which is critical in mitogenic response.

The insulin resistance of type 2 diabetes, obesity and aging is characterized by defects at many levels, with decreases in receptor concentration and kinase activity, in concentration and phosphorylation of IRS-1 and -2, in PI 3-K activity, in glucose transporter translocation and in the activity of intracellular enzymes in muscle, liver and adipocytes.

In the present study, the insulin signaling pathways in skeletal muscle and thoracic aortae from 2- and 12-month-old rats – which have insulin resistance but do not develop cardiovascular disease – have been analysed using immunoprecipitation and immunoblotting techniques.

The 12-month-old normotensive rats showed marked insulin resistance, which parallels the reduced effects of this hormone in insulin signaling cascade in muscle. In aorta, phosphatidylinositol (PI) 3-kinase/Akt pathway was preserved, leading to a normal activation of endothelial nitric oxide synthase; however, mitogen-activated protein (MAP)

kinase isoforms showed higher levels and activation in middle-aged rats, both in the basal state and after stimulation with insulin, when compared to young rats.

Insulin-stimulated IR, IRS-1, IRS-2, Akt and eNOS phosphorylation showed no differences in aortae from 2- and 12-month-old rats. The tissue levels of these proteins did not change with aging and obesity. Insulin-stimulated associations between IRS-1 / PI 3-K, IRS-2 / PI 3-K and Akt / eNOS showed no changes in the aortae from these two groups of animals. However, there was an increase in ERK1/2 protein levels and activation in aged rats, both in the basal state and after stimulation with insulin, when compared to young rats.

The results of the present study suggest that the preservation of PI 3-K pathway in aorta, in spite of an increase in MAP kinase protein levels and activation, may contribute to explain the absence of atherosclerosis and hypertension in this animal model of insulin resistance and suggests that PI 3-K / Akt / eNOS pathway is more important than MAP kinase activation in the control of cardiovascular effects of insulin resistance.

8. Referências bibliográficas

Abe, H., Yamada, N., Kamata, K., Kuwaki, T., Shimada, M., Osuga, J. et al. (1998). Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *The Journal of Clinical Investigation*, 101, 1784-1788.

Ahmad, F., Azevedo, J. L., Cortright, R., Dohm, G. L., & Goldstein, B. J. (1997). Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 100, 449-458.

Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. et al. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal*, 15, 6541-6551.

Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. et al. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph. *Current Biology*, 7, 261-9.

Anai, M., Funaki, M., Ogihara, T., Terasaki, J., Inukai, K., Katagiri, H. et al. (1998). Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats. *Diabetes*, 47, 13-23.

Anastasiou, E., Lekakis, J. P., Alevizaki, M., Papamichael, C. M., Megas, J., Souvatzoglou, A. et al. (1998). Impaired endothelium-dependent vasodilatation in women with previous gestational diabetes. *Diabetes Care*, 21, 2111-2115.

Anderson, E. A., Hoffman, R. P., Balon, T. W., Sinkey, C. A., & Mark, A. L. (1991). Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 87, 2246-2252.

Aoki, M., Batista, O., Bellacosa, A., Tsichlis, P., & Vogt, P. K. (1998). The akt kinase: molecular determinants of oncogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 14950-14955.

Araki, E., Lipes, M. A., Patti, M. E., Bruning, J. C., Haag, B. 3., Johnson, R. S. et al. (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, 372, 186-90.

Ataliotis, P. & Mercola, M. (1997). Distribution and functions of platelet-derived growth factors and their receptors during embryogenesis. *International Review of Cytology*, 172, 95-127.

Avignon, A., Yamada, K., Zhou, X., Spencer, B., Cardona, O., Saba-Siddique, S. et al. (1996). Chronic activation of protein kinase C in soleus muscles and other tissues of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki (GK), obese/aged, and obese/Zucker rats. A mechanism for inhibiting glycogen synthesis. *Diabetes*, 45, 1396-1404.

Backer, J. M., Myers, M. G., Jr., Shoelson, S. E., Chin, D. J., Sun, X. J., Miralpeix, M. et al. (1992). Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *The EMBO Journal*, 11, 3469-3479.

Baron, V. & Van Obberghen, E. (1995). Mechanism of insulin action. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales*, 189, 25-41.

Begum, N., Ragolia, L., Rienzie, J., McCarthy, M., & Duddy, N. (1998). Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by insulin in vascular smooth muscle cells. Evaluation of the role of the nitric oxide signaling pathway and potential defects in hypertension. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 25164-70.

Bellacosa, A., Franke, T. F., Gonzalez-Portal, M. E., Datta, K., Taguchi, T., Gardner, J. et al. (1993). Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications. *Oncogene*, 8, 745-754.

Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P., & Tsichlis, P. N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*, 254, 274-277.

Bonora, E., Moghetti, P., Zancanaro, C., Cigolini, M., Querena, M., Cacciatori, V. et al. (1989). Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 68, 374-8.

Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D. et al. (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, 65, 663-75.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-54.

Burgering, B. M. & Coffey, P. J. (1995). Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, 376, 599-602.

Calles-Escandon, J., Garcia-Rubi, E., Mirza, S., & Mortensen, A. (1999). Type 2 diabetes: one disease, multiple cardiovascular risk factors. *Coronary Artery Disease*, 10, 23-30.

Carlson, S. H., Shelton, J., White, C. R., & Wyss, J. M. (2000). Elevated sympathetic activity contributes to hypertension and salt sensitivity in diabetic obese Zucker rats. *Hypertension*, 35, 403-8.

Caro, J. F., Sinha, M. K., Raju, S. M., Ittoop, O., Pories, W. J., Flickinger, E. G. et al. (1987). Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 79, 1330-1337.

Carpenter, C. L. & Cantley, L. C. (1990). Phosphoinositide kinases. *Biochemistry*, 29, 11147-11156.

Carpino, N., Wisniewski, D., Strife, A., Marshak, D., Kobayashi, R., Stillman, B. et al. (1997). p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell*, 88, 197-204.

Carvalho, C. R., Brenelli, S. L., Silva, A. C., Nunes, A. L., Velloso, L. A., & Saad, M. J. (1996). Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology*, 137, 151-9.

Carvalho, C. R., Thirone, A. C., Gontijo, J. A., Velloso, L. A., & Saad, M. J. (1997). Effect of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action. *Diabetes*, 46, 1950-7.

Cheatham, B., Vlahos, C. J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J., & Kahn, C. R. (1994). Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Molecular and Cellular Biology*, 14, 4902-11.

Coffer, P. J., Jin, J., & Woodgett, J. R. (1998). Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *The Biochemical Journal*, 335 (Pt 1), 1-13.

Coffer, P. J. & Woodgett, J. R. (1991). Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *European Journal of Biochemistry*, 201, 475-481.

Cosentino, F. & Luscher, T. F. (1998). Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 32 Suppl 3, S54-S61.

Cremel, G., Fickova, M., Klimes, I., Leray, C., Leray, V., Meuillet, E. et al. (1993). Lipid modulation of insulin receptor tyrosine kinase activity in cultured cells, animals, and reconstituted systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 683, 164-171.

Cuatrecasas, P. (1972). Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69, 1277-1281.

Cuevas, B. D., Lu, Y., Mao, M., Zhang, J., LaPushin, R., Siminovitch, K. et al. (2001). Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 27455-27461.

Currie, R. A., Walker, K. S., Gray, A., Deak, M., Casamayor, A., Downes, C. P. et al. (1999). Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *The Biochemical Journal*, 337 (Pt 3), 575-583.

Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M. E., Pratipanawatr, T. et al. (2000). Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *The Journal of Clinical Investigation*, 105, 311-20.

Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. et al. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91, 231-241.

Davis, R. J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 14553-6.

De Fea, K. & Roth, R. A. (1997a). Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 31400-6.

De Fea, K. & Roth, R. A. (1997b). Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. *Biochemistry*, 36, 12939-12947.

DeFronzo, R. A., Cooke, C. R., Andres, R., Faloona, G. R., & Davis, P. J. (1975). The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. *The Journal of Clinical Investigation*, 55, 845-855.

Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D. R., Hue, L., & Rider, M. H. (1997). Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B

and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 17269-17275.

Dhand, R., Hara, K., Hiles, I., Bax, B., Gout, I., Panayotou, G. et al. (1994a). PI 3-kinase: structural and functional analysis of intersubunit interactions. *The EMBO Journal*, 13, 511-521.

Dhand, R., Hiles, I., Panayotou, G., Roche, S., Fry, M. J., Gout, I. et al. (1994b). PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *The EMBO Journal*, 13, 522-533.

Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399, 601-5.

Du, X. L., Edelstein, D., Dimmeler, S., Ju, Q., Sui, C., & Brownlee, M. (2001). Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *The Journal of Clinical Investigation*, 108, 1341-8.

Ebina, Y., Araki, E., Taira, M., Shimada, F., Mori, M., Craik, C. S. et al. (1987). Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 704-708.

Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E. et al. (1985). The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell*, 40, 747-758.

Fantin, V. R., Sparling, J. D., Slot, J. W., Keller, S. R., Lienhard, G. E., & Lavan, B. E. (1998). Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 10726-10732.

Feener, E. P. & King, G. L. (1997). Vascular dysfunction in diabetes mellitus. *Lancet*, 350 Suppl 1, SI9-13.

Ferrannini, E., Buzzigoli, G., Bonadonna, R., Giorico, M. A., Oleggini, M., Graziadei, L. et al. (1987). Insulin resistance in essential hypertension. *The New England Journal of Medicine*, 317, 350-357.

Ferri, C., Desideri, G., Baldoncini, R., Bellini, C., De Angelis, C., Mazzocchi, C. et al. (1998). Early activation of vascular endothelium in nonobese, nondiabetic essential hypertensive patients with multiple metabolic abnormalities. *Diabetes*, 47, 660-667.

Folli, F., Kahn, C. R., Hansen, H., Bouchie, J. L., & Feener, E. P. (1997). Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *The Journal of Clinical Investigation*, 100, 2158-2169.

Folli, F., Saad, M. J., Backer, J. M., & Kahn, C. R. (1993). Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-

resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, 92, 1787-1794.

Franke, T. F., Tartof, K. D., & Tsichlis, P. N. (1994). The SH2-like Akt homology (AH) domain of c-akt is present in multiple copies in the genome of vertebrate and invertebrate eucaryotes. Cloning and characterization of the *Drosophila melanogaster* c-akt homolog Dakt1. *Oncogene*, 9, 141-148.

Freidenberg, G. R., Reichart, D., Olefsky, J. M., & Henry, R. R. (1988). Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss. *The Journal of Clinical Investigation*, 82, 1398-1406.

Freychet, P., Roth, J., & Neville, D. M., Jr. (1971). Insulin receptors in the liver: specific binding of (¹²⁵ I)insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68, 1833-1837.

Friedman, J. E., Ishizuka, T., Liu, S., Farrell, C. J., Bedol, D., Koletsky, R. J. et al. (1997). Reduced insulin receptor signaling in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 273, E1014-E1023.

Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K. et al. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, 399, 597-601.

Furchgott, R. F. (1999). Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Bioscience Reports*, 19, 235-51.

Giroux, S., Tremblay, M., Bernard, D., Cardin-Girard, J. F., Aubry, S., Larouche, L. et al. (1999). Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Current Biology*, 9, 369-372.

Godecke, A., Decking, U. K., Ding, Z., Hirchenhain, J., Bidmon, H. J., Godecke, S. et al. (1998). Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circulation Research*, 82, 186-94.

Goodyear, L. J., Giorgino, F., Sherman, L. A., Carey, J., Smith, R. J., & Dohm, G. L. (1995). Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *The Journal of Clinical Investigation*, 95, 2195-2204.

Haruta, T., Morris, A. J., Rose, D. W., Nelson, J. G., Mueckler, M., & Olefsky, J. M. (1995). Insulin-stimulated GLUT4 translocation is mediated by a divergent intracellular signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 27991-4.

Haslam, R. J., Koide, H. B., & Hemmings, B. A. (1993). Pleckstrin domain homology. *Nature*, 363, 309-310.

Heydrick, S. J., Gautier, N., Olichon-Berthe, C., Van Obberghen, E., & Marchand-Brustel, Y. (1995). Early alteration of insulin stimulation of PI 3-kinase in muscle and adipocyte from gold thioglucose obese mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 268, E604-E612.

Hixon, M. L., Muro-Cacho, C., Wagner, M. W., Obejero-Paz, C., Millie, E., Fujio, Y. et al. (2000). Akt1/PKB upregulation leads to vascular smooth muscle cell hypertrophy and polyploidization. *The Journal of Clinical Investigation*, 106, 1011-20.

Holgado-Madruga, M., Emlet, D. R., Moscatello, D. K., Godwin, A. K., & Wong, A. J. (1996). A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature*, 379, 560-564.

Hotamisligil, G. S., Budavari, A., Murray, D., & Spiegelman, B. M. (1994). Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *The Journal of Clinical Investigation*, 94, 1543-1549.

Howard, G., O'Leary, D. H., Zaccaro, D., Haffner, S., Rewers, M., Hamman, R. et al. (1996). Insulin sensitivity and atherosclerosis. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators. *Circulation*, 93, 1809-17.

Hsueh, W. A. & Law, R. E. (1998). Cardiovascular risk continuum: implications of insulin resistance and diabetes. *The American Journal of Medicine*, 105, 4S-14S.

Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., Bevan, J. A. et al. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*, 377, 239-42.

Hurrell, D. G., Pedersen, O., & Kahn, C. R. (1989). Alterations in the hepatic insulin receptor kinase in genetic and acquired obesity in rats. *Endocrinology*, 125, 2454-2462.

Jialal, I., Crettaz, M., Hachiya, H. L., Kahn, C. R., Moses, A. C., Buzney, S. M. et al. (1985). Characterization of the receptors for insulin and the insulin-like growth factors on micro- and macrovascular tissues. *Endocrinology*, 117, 1222-1229.

Jiang, Z. Y., Lin, Y. W., Clemont, A., Feener, E. P., Hein, K. D., Igarashi, M. et al. (1999a). Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 104, 447-57.

Jiang, Z. Y., Zhou, Q. L., Chatterjee, A., Feener, E. P., Myers, M. G., Jr., White, M. F. et al. (1999b). Endothelin-1 modulates insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase pathway in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*, 48, 1120-30.

Jones, P. F., Jakubowicz, T., Pitossi, F. J., Maurer, F., & Hemmings, B. A. (1991). Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 4171-4175.

Kahn, C. R. (1985). The molecular mechanism of insulin action. *Annual Review of Medicine*, 36, 429-451.

Kahn, C. R. (1994). Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, 43, 1066-1084.

Kasuga, M., Karlsson, F. A., & Kahn, C. R. (1982). Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science*, 215, 185-7.

Keller, S. R., Lamphere, L., Lavan, B. E., Kuhne, M. R., & Lienhard, G. E. (1993). Insulin and IGF-I signaling through the insulin receptor substrate 1. *Molecular Reproduction and Development*, 35, 346-351.

Kerouz, N. J., Horsch, D., Pons, S., & Kahn, C. R. (1997). Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse. *The Journal of Clinical Investigation*, 100, 3164-3172.

Kim, Y. B., Nikoulina, S. E., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., & Kahn, B. B. (1999). Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 104, 733-41.

King, G. L., Goodman, A. D., Buzney, S., Moses, A., & Kahn, C. R. (1985). Receptors and growth-promoting effects of insulin and insulin-like growth factors on

cells from bovine retinal capillaries and aorta. *The Journal of Clinical Investigation*, 75, 1028-36.

King, G. L. & Johnson, S. M. (1985). Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. *Science*, 227, 1583-6.

Koch, C. A., Anderson, D., Moran, M. F., Ellis, C., & Pawson, T. (1991). SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*, 252, 668-674.

Kohn, A. D., Kovacina, K. S., & Roth, R. A. (1995). Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *The EMBO Journal*, 14, 4288-4295.

Kuhne, M. R., Pawson, T., Lienhard, G. E., & Feng, G. S. (1993). The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 11479-11481.

Kulik, G. & Weber, M. J. (1998). Akt-dependent and -independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I. *Molecular and Cellular Biology*, 18, 6711-6718.

Kusari, J., Kenner, K. A., Suh, K. I., Hill, D. E., & Henry, R. R. (1994). Skeletal muscle protein tyrosine phosphatase activity and tyrosine phosphatase 1B protein content are associated with insulin action and resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 93, 1156-1162.

L'Allemain, G. (1994). Deciphering the MAP kinase pathway. *Progress in Growth Factor Research*, 5, 291-334.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

Lavan, B. E., Fantin, V. R., Chang, E. T., Lane, W. S., Keller, S. R., & Lienhard, G. E. (1997a). A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 21403-21407.

Lavan, B. E., Lane, W. S., & Lienhard, G. E. (1997b). The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 11439-11443.

Lavan, B. E. & Lienhard, G. E. (1993). The insulin-elicited 60-kDa phosphotyrosine protein in rat adipocytes is associated with phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 5921-5928.

Lazar, D. F., Wiese, R. J., Brady, M. J., Mastick, C. C., Waters, S. B., Yamauchi, K. et al. (1995). Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 20801-7.

- Lietzke, S. E., Bose, S., Cronin, T., Klarlund, J., Chawla, A., Czech, M. P. et al. (2000). Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Molecular Cell*, 6, 385-94.
- Lovenberg, W. (1987). Techniques for the measurements of blood pressure. *Hypertension*, 9 (Suppl), 15-16.
- Luo, Z., Fujio, Y., Kureishi, Y., Rudic, R. D., Daumerie, G., Fulton, D. et al. (2000). Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide-dependent vasomotor activity in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 106, 493-499.
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407, 233-241.
- Mayer, B. J., Ren, R., Clark, K. L., & Baltimore, D. (1993). A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell*, 73, 629-630.
- Mendez, R., Myers, M. G., Jr., White, M. F., & Rhoads, R. E. (1996). Stimulation of protein synthesis, eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation, and PHAS-I phosphorylation by insulin requires insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 16, 2857-64.
- Moncada, S. & Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England Journal of Medicine*, 329, 2002-2012.
- Moroi, M., Zhang, L., Yasuda, T., Virmani, R., Gold, H. K., Fishman, M. C. et al. (1998). Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and

pregnancy in vascular response to injury in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 101, 1225-1232.

Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C. et al. (1998). Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 101, 2567-2578.

Myers, M. G., Jr., Backer, J. M., Sun, X. J., Shoelson, S., Hu, P., Schlessinger, J. et al. (1992). IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 10350-4.

Olefsky, J. M. (1976). Decreased insulin binding to adipocytes and circulating monocytes from obese subjects. *The Journal of Clinical Investigation*, 57, 1165-1172.

Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F. et al. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science*, 286, 1374-1377.

Papapetropoulos, A., Rudic, R. D., & Sessa, W. C. (1999). Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research*, 43, 509-20.

Patti, M. E. & Kahn, C. R. (1998). The insulin receptor—a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 9, 89-109.

Pawson AJ (1998). *Protein modules in signal transduction: Current Topics in Microbiology and Immunology*. (vols. 228).

Pearson, G., Robinson, F., Beers, G. T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. et al. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*, 22, 153-183.

Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G. et al. (1992). A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*, 70, 93-104.

Pessin, J. E. & Saltiel, A. R. (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106, 165-169.

Reaven, G. M. (1991). Insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, and hypertension. Parallels between human disease and rodent models. *Diabetes Care*, 14, 195-202.

Rondinone, C. M., Carvalho, E., Wesslau, C., & Smith, U. P. (1999). Impaired glucose transport and protein kinase B activation by insulin, but not okadaic acid, in adipocytes from subjects with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*, 42, 819-825.

Rordorf-Nikolic, T., Van Horn, D. J., Chen, D., White, M. F., & Backer, J. M. (1995). Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase by tyrosyl phosphoproteins. Full

activation requires occupancy of both SH2 domains in the 85-kDa regulatory subunit.

The Journal of Biological Chemistry, 270, 3662-3666.

Rothenberg, P. L., Lane, W. S., Karasik, A., Backer, J., White, M., & Kahn, C. R. (1991). Purification and partial sequence analysis of pp185, the major cellular substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 8302-8311.

Rudic, R. D., Shesely, E. G., Maeda, N., Smithies, O., Segal, S. S., & Sessa, W. C. (1998). Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, 101, 731-736.

Saad, M. J., Velloso, L. A., & Carvalho, C. R. (1995). Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. *The Biochemical Journal*, 310 (Pt 3), 741-744.

Sasson, Z., Rasooly, Y., Bhesania, T., & Rasooly, I. (1993). Insulin resistance is an important determinant of left ventricular mass in the obese. *Circulation*, 88, 1431-1436.

Shankar, R. R., Wu, Y., Shen, H. Q., Zhu, J. S., & Baron, A. D. (2000). Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes*, 49, 684-7.

Shepherd, P. R., Nave, B. T., & Siddle, K. (1995). Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in

3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *The Biochemical Journal*, 305, 25-8.

Shepherd, P. R., Withers, D. J., & Siddle, K. (1998). Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *The Biochemical Journal*, 333 (Pt 3), 471-490.

Shesely, E. G., Maeda, N., Kim, H. S., Desai, K. M., Krege, J. H., Laubach, V. E. et al. (1996). Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 13176-81.

Shulman, G. I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106, 171-176.

Smith-Hall, J., Pons, S., Patti, M. E., Burks, D. J., Yenush, L., Sun, X. J. et al. (1997). The 60 kDa insulin receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells. *Biochemistry*, 36, 8304-8310.

Staal, S. P. & Hartley, J. W. (1988). Thymic lymphoma induction by the AKT8 murine retrovirus. *The Journal of Experimental Medicine*, 167, 1259-1264.

Staal, S. P., Hartley, J. W., & Rowe, W. P. (1977). Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 3065-3067.

Staal, S. P., Huebner, K., Croce, C. M., Parsa, N. Z., & Testa, J. R. (1988). The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics*, 2, 96-98.

Steinberg, H. O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A., Brechtel, G., & Baron, A. D. (1996). Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 97, 2601-10.

Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G. F., Holmes, A. B. et al. (1998). Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science*, 279, 710-714.

Stern, M. P. (1995). Diabetes and cardiovascular disease. The "common soil" hypothesis. *Diabetes*, 44, 369-374.

Straus, D. S. (1984). Growth-stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo. *Endocrine Reviews*, 5, 356-369.

Sun, H., Tonks, N. K., & Bar-Sagi, D. (1994). Inhibition of Ras-induced DNA synthesis by expression of the phosphatase MKP-1. *Science*, 266, 285-8.

Sun, X. J., Miralpeix, M., Myers, M. G., Jr., Glasheen, E. M., Backer, J. M., Kahn, C. R. et al. (1992). Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 22662-22672.

Sun, X. J., Wang, L. M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers, M. G., Jr., Glasheen, E. et al. (1995). Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature*, 377, 173-7.

Tamaroglio, T. A. & Lo, C. S. (1994). Regulation of fibronectin by insulin-like growth factor-I in cultured rat thoracic aortic smooth muscle cells and glomerular mesangial cells. *Experimental Cell Research*, 215, 338-46.

Tambascia, R. C., Fonseca, P. M., Corat, P. D., Moreno, H., Jr., Saad, M. J., & Franchini, K. G. (2001). Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II-infused rats. *Hypertension*, 37, 1423-1428.

Tanti, J. F., Gremeaux, T., Van Obberghen, E., & Marchand-Brustel, Y. (1994). Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 6051-6057.

Tanti, J. F., Grillo, S., Gremeaux, T., Coffey, P. J., Van Obberghen, E., & Marchand-Brustel, Y. (1997). Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology*, 138, 2005-2010.

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350-4.

Trinder, P. (1969). Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of Clinical Pathology*, 22, 158-161.

Ullrich, A., Bell, J. R., Chen, E. Y., Herrera, R., Petruzzelli, L. M., Dull, T. J. et al. (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*, 313, 756-761.

Velloso, L. A., Carvalho, C. R., Rojas, F. A., Folli, F., & Saad, M. J. (1998). Insulin signalling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway. *Cardiovascular Research*, 40, 96-102.

Velloso, L. A., Folli, F., Sun, X. J., White, M. F., Saad, M. J., & Kahn, C. R. (1996). Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 12490-12495.

Virkkamaki, A., Ueki, K., & Kahn, C. R. (1999). Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 103, 931-943.

Walker, K. S., Deak, M., Paterson, A., Hudson, K., Cohen, P., & Alessi, D. R. (1998). Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *The Biochemical Journal*, 331 (Pt 1), 299-308.

Wang, Q., Somwar, R., Bilan, P. J., Liu, Z., Jin, J., Woodgett, J. R. et al. (1999). Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 4008-4018.

White, M. F. (1997). The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia*, 40 Suppl 2, S2-17.

White, M. F. (1998). The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 182, 3-11.

White, M. F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 283, E413-E422.

White, M. F., Livingston, J. N., Backer, J. M., Lauris, V., Dull, T. J., Ullrich, A. et al. (1988). Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell*, 54, 641-649.

White, M. F., Maron, R., & Kahn, C. R. (1985). Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. *Nature*, 318, 183-186.

White, M. F., Shoelson, S. E., Keutmann, H., & Kahn, C. R. (1988). A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 2969-2980.

Wilden, P. A., Siddle, K., Haring, E., Backer, J. M., White, M. F., & Kahn, C. R. (1992). The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and anti-receptor antibodies. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 13719-13727.

Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D. J., Ren, J. M., Previs, S. et al. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391, 900-904.

Wojnowski, L., Stancato, L. F., Zimmer, A. M., Hahn, H., Beck, T. W., Lerner, A. C. et al. (1998). Craf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mechanisms of Development*, 76, 141-149.

Wojnowski, L., Zimmer, A. M., Beck, T. W., Hahn, H., Bernal, R., Rapp, U. R. et al. (1997). Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nature Genetics*, 16, 293-297.

Xi, X. P., Graf, K., Goetze, S., Hsueh, W. A., & Law, R. E. (1997). Inhibition of MAP kinase blocks insulin-mediated DNA synthesis and transcriptional activation of c-fos by Elk-1 in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters*, 417, 283-6.

Zavaroni, I., Bonora, E., Pagliara, M., Dall'Aglio, E., Luchetti, L., Buonanno, G. et al. (1989). Risk factors for coronary artery disease in healthy persons with hyperinsulinemia and normal glucose tolerance. *The New England Journal of Medicine*, 320, 702-706.

Zeihner, A. M. (1996). Endothelial vasodilator dysfunction: pathogenetic link to myocardial ischaemia or epiphenomenon? *Lancet*, 348 Suppl 1, s10-s12.

Zierath, J. R., Krook, A., & Wallberg-Henriksson, H. (1998). Insulin action in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 182, 153-160.

9. Anexo

Tabela 1. Características gerais dos animais quanto à idade, peso, glicemia, insulinemia, pressão arterial sistólica basal e velocidade de desaparecimento da glicose (K_{itt}) dos dois grupos estudados (2 e 12 meses de idade). Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média e a significância expressa em $*p$ entre os dois grupos.

Grupos	Peso (g)	Glicemia (mg/dl)	Insulinemia (μ U/ml)	Pressão arterial sistólica (mmHg)	K_{itt} (%/min)
2 meses	137 $\pm$ 2,4 (n=30)	123 $\pm$ 5 (n=10)	25 $\pm$ 4 (n=10)	114 $\pm$ 2 (n=10)	4,55 $\pm$ 0,34 (n=10)
12 meses	432,6 $\pm$ 2,7 (n=30) $*p<0,0001$	118 $\pm$ 9 (n=10)	41 $\pm$ 6 (n=10) $*p<0,05$	112 $\pm$ 3 (n=10)	2,57 $\pm$ 0,63 (n=10) $*p<0,01$

10. Publicação

Full title: Insulin resistance in obese middle-aged rats differentially affects insulin signalling in muscle and aorta

Abbreviated title for page heading: H.G.Zecchin et al.: Insulin signalling in aorta of obese/aged rats

Author's names: Henrique G. Zecchin¹, Rosângela M. N. Bezerra¹, José B. C. Carvalheira¹, Konradin Metze², Kleber G. Franchini¹ and Mario J. A. Saad¹

Institution: ¹Departamento de Clínica Médica e ²Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil

Corresponding author: M. J. A. Saad, Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, Cidade Universitária, Campinas, São Paulo, 13083-970, Brasil, Phone/Fax: 55-19-37888950, e-mail:msaad@fcm.unicamp.br

Word count: Abstract: 205 Text: 5392

Abstract

1)Aims/hypothesis. Insulin resistance and hyperinsulinemia, in some situations, have been associated with the development of cardiovascular diseases and hypertension. However, the mechanism by which there is maintenance of normal blood pressure and absence of cardiovascular diseases despite insulin resistance in some animal models is not clear. The aim of this study was to investigate insulin signalling pathways directly *in vivo* in skeletal muscle and thoracic aorta from obese middle-aged (12-month-old) rats which have insulin resistance but not cardiovascular disease.

2)Methods. We have used *in vivo* insulin infusion, followed by tissues extraction, immunoprecipitation and immunoblotting.

3)Results. Middle-aged normotensive rats showed marked insulin resistance, which parallels the reduced effects of this hormone in insulin signalling cascade in muscle. In aorta, however, phosphatidylinositol (PI) 3-kinase/Akt pathway is preserved, leading to a normal activation of endothelial nitric oxide synthase, but mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms showed higher levels and activation in middle-aged rats, both in the basal state and after stimulation with insulin, when compared to young rats.

4)Conclusions/interpretation. This study shows that the preservation of PI 3-K/Akt pathway in aorta, in spite of an increase in MAP kinase protein levels and activation, may contribute to explain the absence of cardiovascular disease in this animal model of insulin resistance.

Keywords: aging, obesity, insulin resistance, aorta, phosphatidylinositol 3-kinase, MAP kinase, Akt, endothelial cell-nitric oxide synthase.

Abbreviations: α PY, antibody against phosphotyrosine; BSA, bovine serum albumin; eNOS, endothelial cell-nitric oxide synthase; ERK, extracellular signal-related kinase; IR, insulin receptor; IR β , insulin receptor β subunit; IRS, insulin receptor substrate; MAP kinase, mitogen-activated protein kinase; MEK, MAP/ERK kinase; NO, nitric oxide; PAI-1,

plasminogen activator inhibitor-1; PI, phosphatidylinositol; PKB, protein kinase B; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; SH2, src-homology 2 domain; SH3, src-homology 3 domain; Shc, src-homology 2 domain-containing; VSMC, vascular smooth muscle cell.

Introduction

Insulin may regulate many vascular functions under physiological conditions. Biological actions of insulin in vascular cells include increases in amino acid transport, glycogen synthesis, DNA synthesis and gene expression [1,2]. It also has specific vascular actions, such as enhancing the release of nitric oxide (NO) [3] and regulating mRNA expression of matrix proteins [4,5] and constitutive endothelial NO synthase (eNOS) [6,7]. Physiologically, insulin infusion stimulates local vasodilation by enhancing NO's action [8,9].

Normal endothelial production of NO plays an important role in preventing vascular disease: in addition to its function as an endogenous vasodilator, NO released from endothelial cells is a potent inhibitor of platelet aggregation and adhesion to the vascular wall and also controls the expression of proteins involved in atherogenesis [10].

In vascular cells, insulin actions are initiated through binding to the insulin receptor α subunit, which activates the intrinsic receptor tyrosine kinase [11], resulting in autophosphorylation of insulin receptor β subunit (IR β) and tyrosine phosphorylation of intracellular adapter proteins such as insulin receptor substrates (IRS-1 and IRS-2) [12,13] and Shc [14]. Tyrosine-phosphorylated IRS-1 or IRS-2 binds to src-homology 2 (SH2) domains of intracellular proteins, including the p85

regulatory subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase [15]. The interaction of IRS and p85 subunit of PI 3-kinase results in the activation of p110 catalytic subunit of PI 3-kinase. In the vasculature, the activation of PI 3-kinase increases serine phosphorylation of Akt which, in turn, directly phosphorylates eNOS on serine 1177 and activates the enzyme, leading to increased NO production [16,17].

It has been proposed that some of insulin's actions in the vasculature, such as the stimulatory effects on NO production, are selectively inhibited in the obese Zucker rats, which present insulin resistance and hypertension. However, other animal models of insulin resistance present normal blood pressure and absence of cardiovascular disease, but the mechanism by which normal biological effects of insulin are preserved in aorta of these animals is not yet clearly understood.

In the present study, we have characterized insulin signalling pathways directly *in vivo* in skeletal muscle and thoracic aortae from insulin-resistant, non-diabetic, obese middle-aged Wistar rats.

Materials and methods

Experimental animals

Male Wistar rats were obtained from the UNICAMP Central Animal Breeding Center (Campinas, SP, Brazil) and divided into two groups by age (2 and 12 months old) with body weights of 137 ± 2.4 and 432.6 ± 2.7 g, respectively. Animals were allowed free access to standard rodent chow and water *ad libitum*. Food was

withdrawn 12 hours before the experiments. All experiments involving animals were approved by the University of Campinas ethical committee.

Antibodies and Chemicals

The reagents and apparatus for SDS-PAGE and immunoblotting were obtained from Bio-Rad (Richmond, CA). TRIS, phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween-20 and glycerol were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Human recombinant insulin (Humulin R) and sodium amobarbital were purchased from Eli Lilly & Co. (Indianapolis, IN). [¹²⁵I]Protein A was obtained from Amersham (Aylesbury, UK), and protein A-Sepharose 6 MB was obtained from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Nitrocellulose (BA85; 0.2 µm) was purchased from Schleicher & Schuell, Inc. (Keene, NH). M_r standards were myosin (194 kDa), β-galactosidase (116 kDa), BSA (85 kDa) and ovalbumin (49.5 kDa).

Monoclonal antiphosphotyrosine (αPY) and anti-PI 3-kinase (p85) antibodies were obtained from Upstate Biotechnology, Inc. (UBI – Lake Placid, NY). Polyclonal antibodies against beta subunit of insulin receptor (C-19, sc-711), IRS-1 (C-20, sc-559), IRS-2 (A-19, sc-1556), eNOS (NOS3, C-20, sc-654), phospho-eNOS (Ser 1177, sc-12972), Akt1 (C-20, sc-1618) and ERK1 (C-16, sc-93: reactive with ERK1 p44 and, to a lesser extent, ERK2 p42), as well as the monoclonal antibody against phospho-ERK (Tyr 204, E-4, sc-7383) were

purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Polyclonal antibodies against phospho-Akt (Ser 473) were obtained from New England Biolabs (Beverly, MA).

Buffers

Buffer A consisted of 100 mM TRIS, 1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA and 10 mM sodium vanadate. Buffer B was similar to buffer A except that 1% Triton X-100 replaced 1% SDS and 2 mM phenylmethylsulphonic fluoride (PMSF) and 0.1 mg/ml aprotinin were added. Buffer C contained 100 mM TRIS, 10 mM sodium vanadate, 10 mM EDTA and 1% Triton X-100.

Immunoprecipitation and Western immunoblotting

Rats were anaesthetized by intraperitoneal injection of sodium amobarbital (100 mg/kg body weight) and the experiments were performed after the loss of corneal and pedal reflexes. The abdominal cavity was opened, the cava vein was exposed, and 0.5 ml of normal saline (0.9% NaCl) with or without 10^{-5} M of insulin was injected. Thoracic aorta and hind limb skeletal muscle were isolated after 60, 90 or 180 seconds (according to the protein studied), frozen with liquid N₂, powdered with a glass Dounce homogenizer on ice for at least 80 strokes and immediately homogenized in freshly prepared, boiling buffer A when intended for immunoblots, or freshly prepared, ice-cold buffer B when intended for

immunoprecipitation. The extracts were centrifuged at 30.000 x g and 4° C in a Beckman Coulter, Inc. 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA) for 45 min to remove insoluble material. Protein concentration in the supernatants was determined by the Bradford method [18].

For immunoprecipitations, samples containing 3 mg of total protein were incubated with antibodies against IR β (0.3 mg/ml), IRS-1 (1:1000 dilution), IRS-2 (1:1000) or eNOS (1:500) at 4°C overnight, followed by the addition of Protein A Sepharose 6 MB for 1 hour. The pellets were repeatedly washed in buffer C (five times), resuspended in 50 ml of Laemmli sample buffer [19], and boiled for 5 minutes prior to loading onto the gel. For immunoblotting, similar sized aliquots (200 mg of total protein) were suspended in 50 ml of Laemmli sample buffer containing 100 mM dithiothreitol and boiled for 5 minutes before loading onto a 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) system in a miniature slab gel apparatus from Bio-Rad.

Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 2 hours at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean) as described previously [20] except for the addition of 0.02% SDS to the transfer buffer to enhance the elution of high molecular mass proteins. Nonspecific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter overnight at 4° C in blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10 mM TRIS, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween-20). The nitrocellulose blot was then incubated with the following antibodies: antiphosphotyrosine (1 mg/ml), anti-p85 subunit of PI 3-kinase (1:500), anti-insulin receptor (1:100), anti-IRS-1 (1:100), anti-IRS-2 (1:100), anti-ERK1/2

(p44/42 MAP kinase, 1:1000), anti-tyrosine-phosphorylated ERK1/2 (1:1000), anti-Akt1 (1:1000), anti-phospho-(ser-473)-Akt (1:1000), anti-eNOS (1:1000) and anti-phospho-(ser-1177)-eNOS (1:1000), each one diluted in blocking buffer (0.3% BSA instead of non-fat dry milk) overnight at 4° C, and then washed for 60 minutes with blocking buffer without milk. The blots were subsequently incubated with 2 µCi [¹²⁵I]protein A (30 µCi/µg) in 10 ml blocking buffer for 2 hours at room temperature and then washed again for 30 minutes as described above. [¹²⁵I]Protein A bound to the antiphosphotyrosine and antipeptide antibodies was detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) with Cronex Lightning Plus intensifying screens (DuPont, Wilmington, DE) at -80° C for 12-48 hours. Band intensities were quantitated by optical densitometry (model GS 300, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA) of the developed autoradiographs.

Fifteen-minute insulin tolerance test

Rats were fasted overnight and submitted to an intravenous insulin tolerance test (IVITT; 0.5 ml of 6 µg insulin, i. v.) and samples for blood glucose determination were collected at 0 (basal), 4, 8, 12, and 16 minutes after injection. Rats were anaesthetized with sodium amobarbital as described above, 40 µl of blood was collected from their tails and blood glucose level was measured by the glucose oxidase method. Thereafter, the rate constant for plasma glucose disappearance (K_{itt}) 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 [21].

Blood pressure measurement

A tail-cuff system (MKIV, Narco BioSystems, Austin, TX, USA) combining a transducer/amplifier which provides output signals proportional to cuff pressure and amplified Korotkoff sounds was used to obtain blood pressure measurements in conscious rats. This indirect approach permits repeated measurements with a close correlation (correlation coefficient = 0.975) compared to direct intra-arterial recording [22].

Vascular tissue preparation for morphological analysis

Rats were heparinized, deeply anaesthetized with pentobarbital sodium and killed with a lethal dose of lidocaine. Aortae were perfusion fixed at 100 mmHg with 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/l phosphate buffer, pH 7.4, dehydrated in alcohol and xylol and routinely paraffin embedded. Step sections (5 μ m) were stained with hematoxylin and eosin. At least 5 step sections of ascending, arch, thoracic and abdominal aorta were examined by light microscopy. Fragments were deparaffinized and routinely processed for electronmicroscopy. Ultrathin sections were stained with uranylacetate and lead citrate and examined with a ZEISS EM 10 electron microscope.

Statistical analysis

Experiments were always performed by studying the two groups of animals in parallel. For comparisons, unpaired Student's *t* test was used. The significance level was set at *p* less than 0.05.

Results

Animal characteristics

Table 1 describes the physiological parameters of the two groups of animals studied. The 12-month-old rats were heavier than their controls (2m: 137±2.4 g vs 12m: 432.6±2.7 g, *p*<0.0001). Fasting blood glucose and systolic blood pressure were similar in the two groups. Older animals were significantly more insulin resistant than the young controls, as expressed by their higher serum insulin levels (2m: 25±4 vs 12m: 41±6, *n*=10 each, *p*<0.05) and lower plasma glucose disappearance rates measured in the fifteen minute insulin tolerance test (*K_{itt}* 2m: 4.55±0.34 vs *K_{itt}* 12m: 2.57±0.63, *n*=10 each, *p*<0.01).

Histological examination of aortae from 2- and 12-month-old animals

In all step sections examined there were no signs of atherosclerotic changes, such as lipid and foam cells deposition, intimal thickening or SMC

proliferation, neither on light microscopic examination nor on ultrastructural sections in aortae from 12-month-old animals.

Insulin signalling in skeletal muscle from 2-month-old and 12-month-old animals

There was no difference in insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor beta subunit between muscles from 2- and 12-month-old rats (2m: $100 \pm 7\%$ vs 12m: $100 \pm 4\%$, $n=6$), as observed in figure 1A., and the protein levels of IR β also did not change in obese middle-aged rats (figure 1B.).

There was a significant decrease in insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation in muscles from obese / aged rats, as compared to controls (figure 1C., 2m: $100 \pm 5\%$ vs 12m: $55 \pm 4\%$, $n=6$, $p<0.0001$). Also, as shown in figure 1D., IRS-1 protein levels were significantly reduced in muscle from 12-month-old rats (2m: $100 \pm 9\%$ vs 12m: $56 \pm 7\%$, $n=6$, $p<0.05$).

The insulin-stimulated association between IRS-1 and the p85 regulatory subunit of PI 3-kinase was also diminished in skeletal muscle from 12-month-old animals compared to 2-month-old controls (fig. 1E., 2m: $100 \pm 5\%$ vs 12m: $30 \pm 7\%$, $n=6$, $p<0.0001$).

Insulin was able to stimulate the serine phosphorylation of Akt in both groups of animals, but older animals showed a significantly reduced level of Akt activation after insulin infusion (fig. 1F., 2m: $100 \pm 4\%$ vs 12m: $41 \pm 3\%$, $n=6$, $p<0.0001$). In figure 1G. the blot, representative of six experiments, was obtained after incubating the membranes with anti-Akt antibodies, and there was no

difference between the protein levels of Akt in skeletal muscle from these two groups.

As shown in figure 1H., insulin was able to stimulate tyrosine phosphorylation of ERK1/2 equally in skeletal muscle from 2- and 12-month-old Wistar rats (2m: $100\pm4\%$ vs 12m: $102\pm3\%$, $n=6$). When the immunoblotting was conducted with anti-ERK1/2 polyclonal antibodies, as shown in figure 1I., the protein levels of ERK1/2 in muscle did not change significantly with obesity and aging.

Insulin signalling in aorta from 2-month and 12-month-old animals

Insulin-stimulated IR β tyrosine phosphorylation levels were similar in aortae from both young and middle-aged rats (fig. 2A., representative of 5 different experiments). To evaluate the tissue levels of the insulin receptor beta subunit, nitrocellulose membranes of IR β immunoprecipitates were stripped and reblotted with antibodies against IR β (fig. 2B.). The tissue levels of IR β did not change between the two groups.

There was no difference in insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation in aortae from 2- and 12-month-old rats, as shown in figure 2C. (2m: $100\pm4\%$ vs 12m: $105\pm3\%$, $n=6$). In figure 2D., the same membranes were stripped and submitted to immunoblotting with anti-IRS-1 antibodies to evaluate the protein

levels of IRS-1 in these tissues. No significant difference was found in IRS-1 protein levels in the aortae of young and middle-aged rats.

The insulin-stimulated association between IRS-1 and the p85 regulatory subunit of PI 3-kinase in aorta was investigated (fig. 2E). After stimulation with insulin, the association between IRS-1 and PI 3-kinase (p85) was increased by 8-fold, with no difference between 2- and 12-month-old rats (2m: $100 \pm 5\%$ vs 12m: $98 \pm 7\%$, $n=6$).

We also evaluated the effects of obesity and aging on insulin-stimulated IRS-2 tyrosine phosphorylation, IRS-2 protein levels, as well as its association with p85 regulatory subunit of PI 3-kinase by immunoprecipitation with antibodies against IRS-2 and immunoblotting with antiphosphotyrosine, anti-IRS-2 and anti-PI 3-kinase (p85) antibodies. After insulin injection, there were similar increases in IRS-2 phosphotyrosine contents between the two groups of animals (2m: $100 \pm 5\%$ vs 12m: $95 \pm 6\%$, $n=6$), as shown in figure 2F. The tissue levels of IRS-2 were evaluated by immunoblotting with anti-IRS-2 antibodies, and showed no difference between the two groups of rats (fig. 2G.). Next, we evaluated the insulin-stimulated IRS-2 association with p85 subunit of PI 3-kinase in aortae from these animals (fig. 2H.). After insulin injection, p85 association to IRS-2 increased to $100 \pm 11\%$ in 2-month-old rats and to $107 \pm 4\%$ in 12-month-old rats ($n=6$ each, $p=0,56$), showing no significant difference between these two groups.

Figure 3A. shows that basal levels of Akt serine phosphorylation in aorta were not different between the two groups of animals (2m: $53 \pm 10\%$ vs 12m: $48 \pm 11\%$, $n=10$, $p>0.05$). Insulin was able to increase Akt serine phosphorylation in

both groups of animals in a similar manner (2m: $100\pm 6\%$ vs 12m: $96\pm 5\%$, $n=10$, $p>0.05$). When these membranes were submitted to immunoblotting with anti-Akt antibodies, as shown in figure 3B., there was no difference between the two groups, indicating that vascular protein levels of Akt did not change with obesity and aging.

Akt is activated in response to insulin and so becomes capable of phosphorylating endothelial cell-nitric oxide synthase in serine 1177 and 1179, activating the production of nitric oxide. To evaluate the association between Akt and its downstream effector eNOS in the vascular tissue, both before and after insulin stimulation, we conducted experiments in which similar sized aliquots of thoracic aortae were immunoprecipitated with anti-Akt antibodies, resolved under reducing conditions in SDS-PAGE, electrically transferred to nitrocellulose membranes and incubated with antibodies against eNOS for immunoblotting. As shown in figure 3C., in the absence of stimulation with insulin, the association between Akt and eNOS in aorta is discrete, represented by faint bands, and was not different between young and middle-aged rats (2m: $52\pm 4\%$ vs 12m: $50\pm 8\%$, $n=6$, $p>0.5$). However, after stimulation with insulin, their association was increased by 2-fold, consistent with a stable association of Akt and eNOS, with no difference between 2- and 12-month-old rats (2m: $100\pm 7\%$ vs 12m: $104\pm 3\%$, $n=6$, $p>0.5$).

Whole cell lysates obtained from thoracic aortae before or 3 minutes after insulin injection into the cava vein were resolved in SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and incubated with anti-phospho-(serine-1177)-eNOS or

anti-eNOS antibodies for immunoblotting. As shown in figure 3D., there was no difference in insulin-stimulated serine phosphorylation of e-NOS in aortae from 2- and 12-month-old rats (2m: $100 \pm 3\%$ vs 12m: $95 \pm 7\%$, $n=6$, $p>0.5$). Also, as shown in figure 3E., the protein levels of e-NOS did not change significantly between these two groups.

Tyrosine phosphorylation and protein levels of MAP kinase (ERK1/2) in aorta from 2-month and 12-month-old animals

Using monoclonal antibodies against Tyr-204 phosphorylated ERK1 and ERK2, the levels of ERK1/2 activation were examined in rat thoracic aortae in the basal state and after insulin stimulation in *in vivo* experiments. As shown in figure 3F., insulin was able to stimulate tyrosine phosphorylation of ERK1/2 differentially in aortae from 2- and 12-month-old Wistar rats. Of note, 12-month-old rats exhibited increased basal tyrosine phosphorylation of ERK1/2, 2.2-fold higher than those found in young rats (2m: $50 \pm 5\%$ vs 12m: $110 \pm 6\%$, $n=12$, $p<0.0001$). After insulin injection into the cava vein, tyrosine phosphorylation of ERK1/2 was significantly higher, by 2-fold, in aortae from obese middle-aged rats than in controls (2m: $100 \pm 8\%$ vs 12m: $208 \pm 4\%$, $n=12$, $p<0.0001$). Next, whole tissue extracts obtained from aortae homogenates from young and middle-aged rats were resolved under reducing conditions in 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and incubated with polyclonal antibodies against ERK1/2 proteins to evaluate the tissue levels of these protein kinases. In fact, as shown in

figure 3G., obese middle-aged rats demonstrated higher levels of ERK1/2 in aortae than their younger controls, by 2.1-fold (2m: $100 \pm 4\%$ vs 12m: $210 \pm 8\%$, $n=12$, $p<0.0001$).

Discussion

Reduced insulin sensitivity has been proposed as an important risk factor in the development of atherosclerosis [23]. Vascular diseases represent an important cause of the morbidity and mortality associated with diabetes and other insulin resistant states, and a very large body of experimental work has sought to elucidate the cellular and molecular mechanisms that underlie this important pathophysiological process. In the present work we have characterized the influence of obesity and aging on insulin signal transduction pathways in the vasculature of young (2-month-old) and middle-aged (12-month-old) Wistar male rats. The 12-month-old rats are obese and have insulin resistance, normal fasting blood glucose, increased serum insulin and insulin resistance, characterized by reduced glucose disappearance rate during the insulin tolerance test, but they develop neither hypertension nor atherosclerosis.

The molecular mechanism of insulin resistance in these animals is probably related to abnormalities in insulin signalling pathways in skeletal muscle. PI 3-kinase / Akt pathway is severely impaired in skeletal muscle from obese middle-aged rats, with reductions in insulin-stimulated phosphorylation of IRS-1 and Akt, as well as IRS-1 protein levels and in the association between IRS-1 / PI 3-kinase,

as previously described [24]. Since activation of PI 3-kinase pathway by insulin is linked to metabolic functions such as glucose transport in muscle and adipocytes [25,26] and glycogen and protein synthesis in liver and muscle [27,28], alterations in insulin signalling pathways in muscle can contribute to the insulin resistance observed in these animals.

In contrast, tyrosine phosphorylation of IR β and IRS-1/2, insulin-stimulated association between IRS-1/2 and PI 3-kinase, and serine phosphorylation of Akt and eNOS are preserved in the aortae of obese animals. The molecular mechanism of this tissue-specific regulation of insulin signalling (reduced in muscle and preserved in aorta) in the obese insulin-resistant animal may be related to the expression of proteins involved in early steps of insulin action, to the level of serine phosphorylation of IR β and IRSs and to the activity of phosphotyrosine phosphatases. In this regard, the reduction in IRS-1 protein expression may contribute to explain the reduced insulin signalling observed in muscle.

Recently, insulin signalling in vascular tissues has been emphasized. It has been shown that activation of PI 3-kinase pathway could be involved in insulin's stimulatory effect on NO release in cultured vascular endothelial cells [3]. This effect of insulin on NO could be responsible for insulin's vasodilatory actions [8,9]. In an insulin-resistant state, the vasodilation induced by insulin could be blunted in decorrence of inhibition of PI 3-kinase pathway. Interestingly, the vasodilatory effect of insulin is also reduced in obese subjects and patients with type 2 diabetes [29]. In addition, it has been reported that insulin's vasodilatory effect could be

partially due to increases in eNOS gene expression via PI 3-kinase pathway [6]. Besides vasodilatory actions, stimulation of NO production by insulin may also affect vascular remodelling, such as inhibiting VSMC proliferation and migration and inhibiting platelet aggregation and leukocyte adhesion to endothelial cells [30]. These reports suggest that the inhibition of PI 3-kinase pathway in vascular tissues of insulin-resistant states might contribute to the loss of insulin's effect on NO production, which would enhance the atherogenic potential of the insulin-resistant state.

Recently, it has been demonstrated that insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IR β and IRS proteins and PI 3-kinase activation were selectively impaired in vascular tissues of insulin-resistant obese Zucker rats [31]. Since the diabetic obese Zucker rat represent an experimental model that links obesity to diabetes and associated cardiovascular disease, such as hypertension [32], we could infer that cardiovascular diseases associated to insulin resistance could be partially explained by the presence of abnormalities in PI 3-kinase pathway in vascular tissues, and that our animals did not present cardiovascular disease, even in face of severe insulin resistance, because PI 3-K / Akt / eNOS pathway was preserved in aorta.

In contrast to PI 3-kinase activation, much less is known about insulin's activation of ERK1/2 MAP kinase in insulin-resistant or diabetic conditions *in vivo*. Selective hyperexpression of insulin signalling on ERK1/2 MAP kinase pathway in the vascular tissues could be pathophysiologically important in the development of

cardiovascular diseases. Pathway-selective insulin resistance may result in increased potentiation of VSMC proliferation and production of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) via the Ras/Raf/MEK/MAP kinase pathway [31]. Activation of the MAP kinase pathway by insulin is not reduced in type 2 diabetes, perhaps allowing for some of the detrimental effects of chronic hyperinsulinemia on cellular growth in the vasculature [33]. However, in this animal model of insulin resistance, the increased activation and protein levels of MAP kinase in aorta was not associated with hypertension nor atherosclerosis, suggesting that probably the preservation of PI 3-kinase/Akt/eNOS pathway contributed to avoid the development of cardiovascular diseases in these animals.

In summary, this study shows that insulin can activate differentially both the PI 3-kinase and MAP kinase pathways in the vasculature and in skeletal muscle *in vivo*. The PI 3-kinase pathway is severely blunted, with preservation of ERK1/2 pathway, in skeletal muscle from obese middle-aged animals, possibly with a causative role in the insulin resistance of these animals. On the other side, the preservation of PI 3-K/Akt pathway in aorta, in spite of an increase in MAP kinase protein levels and activation, may contribute to explain the absence of cardiovascular disease in this animal model of insulin resistance.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). The authors would like to thank Mr. Luis Janieri for his technical assistance.

Table 1. Characteristics of obese middle-aged Wistar rats (12-month-old) and their young controls (2-month-old). Data are given as mean $\pm$ SEM. p values less than 0.05 were considered to be significantly different.

Groups	Body weight (g)	Blood glucose (mg/dl)	Serum insulin (μ U/ml)	Systolic blood pressure (mmHg)	K_{itt} (%/min)
2-month- old	137 $\pm$ 2.4 ($n=30$)	123 $\pm$ 5 ($n=10$)	25 $\pm$ 4 ($n=10$)	114 $\pm$ 2 ($n=10$)	4.55 $\pm$ 0.34 ($n=10$)
12-month- old	432.6 $\pm$ 2.7 ^a ($n=30$)	118 $\pm$ 9 ($n=10$)	41 $\pm$ 6 ^b ($n=10$)	112 $\pm$ 3 ($n=10$)	2.57 $\pm$ 0.63 ^c ($n=10$)

^a $p < 0.0001$ versus young controls

^b $p < 0.05$ versus young controls

^c $p < 0.01$ versus young controls

Legends

Fig. 1. Effect of obesity and aging on insulin-stimulated insulin receptor tyrosine phosphorylation (A.), insulin receptor protein levels (B.), insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation (C.), IRS-1 protein levels (D.), insulin-stimulated association between IRS-1 and p85 (E.), insulin-stimulated Akt serine phosphorylation (F.), Akt protein levels (G.) insulin-stimulated ERK1/2 tyrosine phosphorylation (H.) and ERK1/2 protein levels (I.) in skeletal muscle from young (2-month-old) and middle-aged (12-month-old) rats. The values are expressed as the mean $\pm$ SEM. Arbitrary units relative to stimulated controls. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.0001$.

Fig. 2. Effect of obesity and aging on insulin-stimulated insulin receptor tyrosine phosphorylation (A.), insulin receptor protein levels (B.), insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation (C.), IRS-1 protein levels (D.), insulin-stimulated association between IRS-1 and p85 (E.), insulin-stimulated IRS-2 tyrosine phosphorylation (F.), IRS-2 protein levels (G.) and insulin-stimulated association between IRS-2 and p85 (H.) in aortae from young (2-month-old) and middle-aged (12-month-old) rats. The values are expressed as the mean $\pm$ SEM. Arbitrary units relative to stimulated controls.

Fig. 3. Effect of obesity and aging on insulin-stimulated Akt serine phosphorylation (A.), Akt protein levels (B.), insulin-stimulated association between Akt and eNOS (C.), insulin-stimulated eNOS serine phosphorylation (D.), eNOS protein levels (E.), insulin-stimulated ERK1/2 tyrosine phosphorylation (F.) and ERK1/2 protein levels (G.) in aortae from young (2-month-old) and middle-aged (12-month-old) rats. The values are expressed as the mean $\pm$ SEM. Arbitrary units relative to stimulated controls. **, $p < 0.0001$.

Fig. 1.

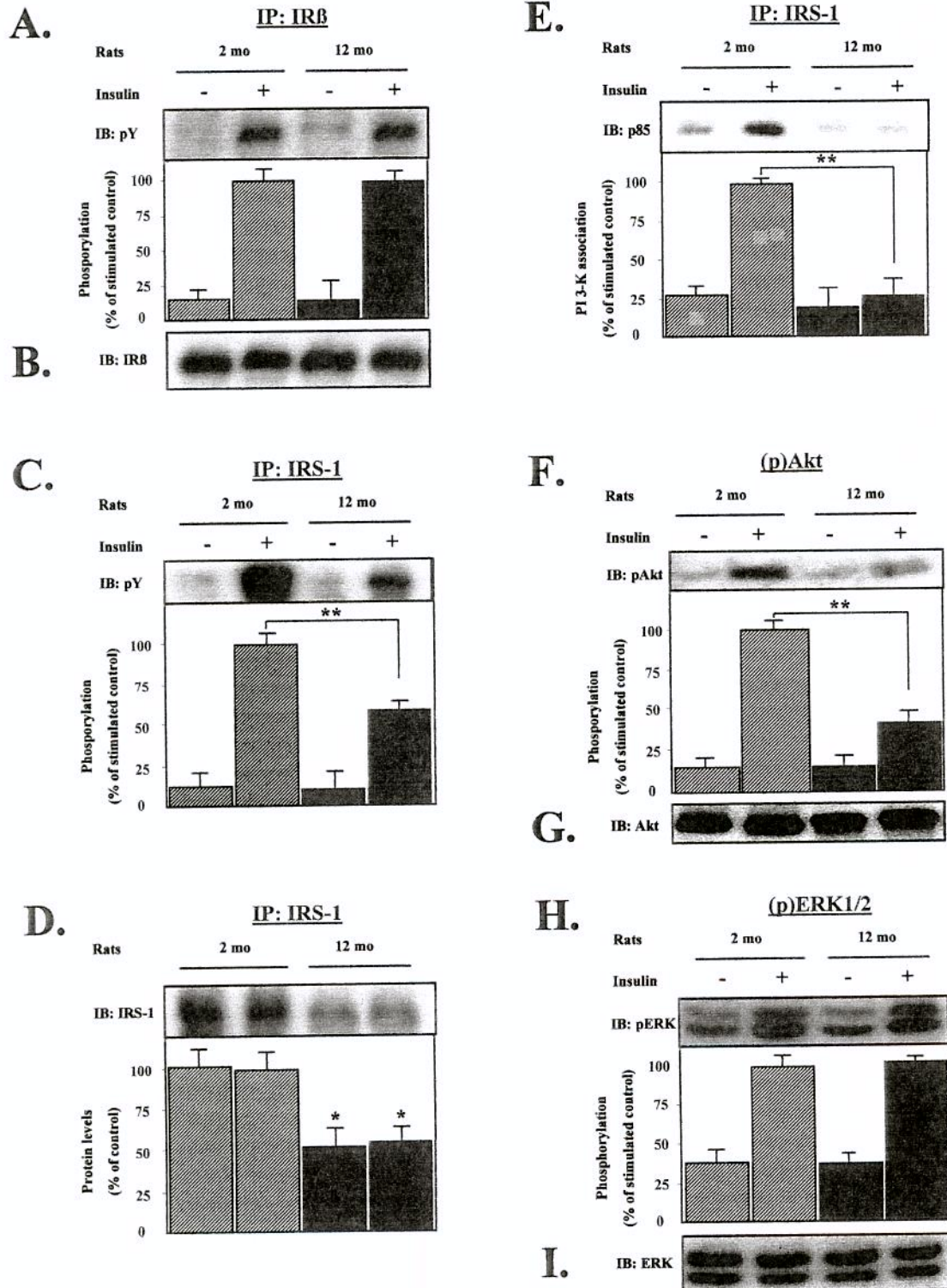


Fig. 2.

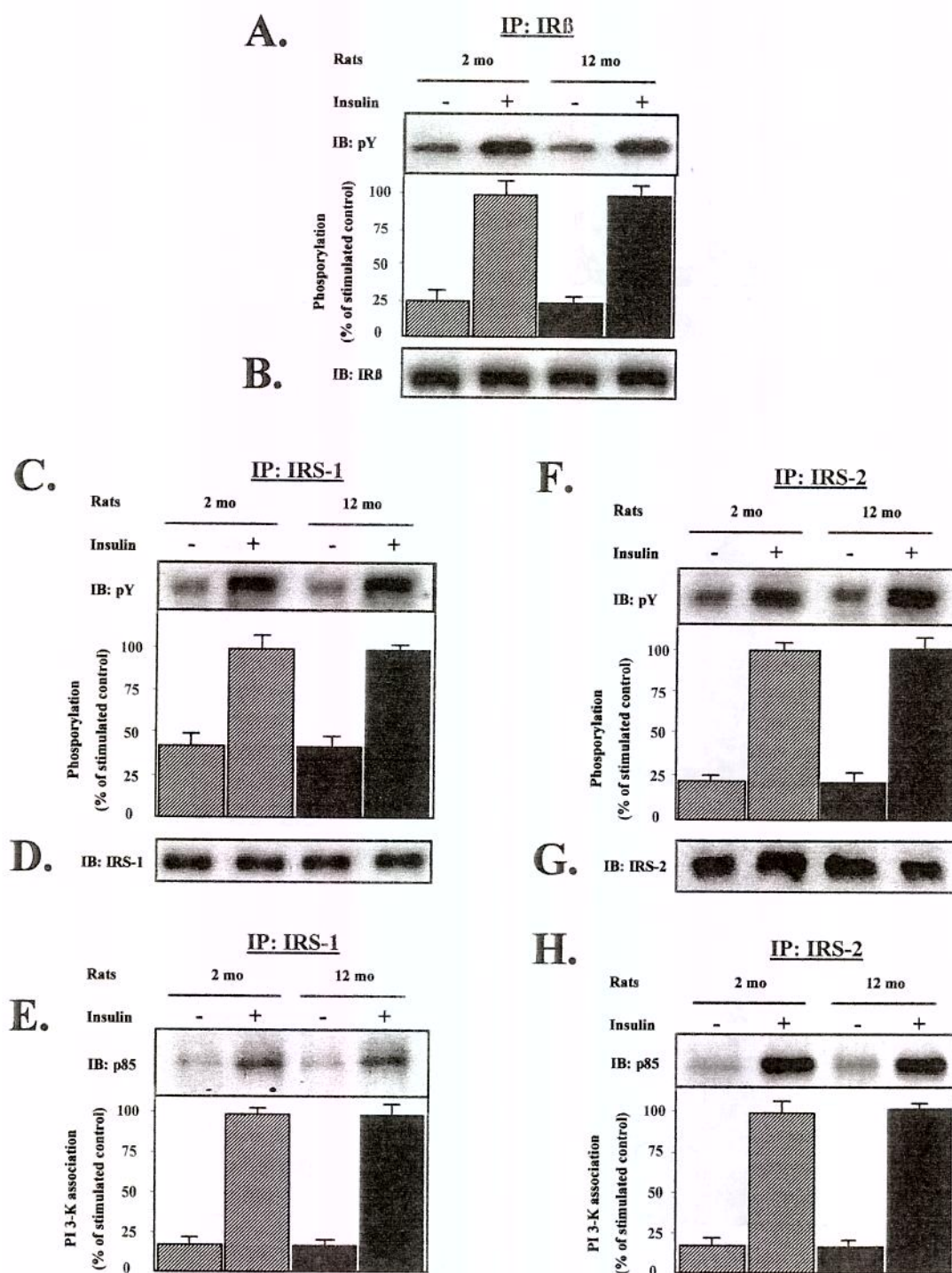
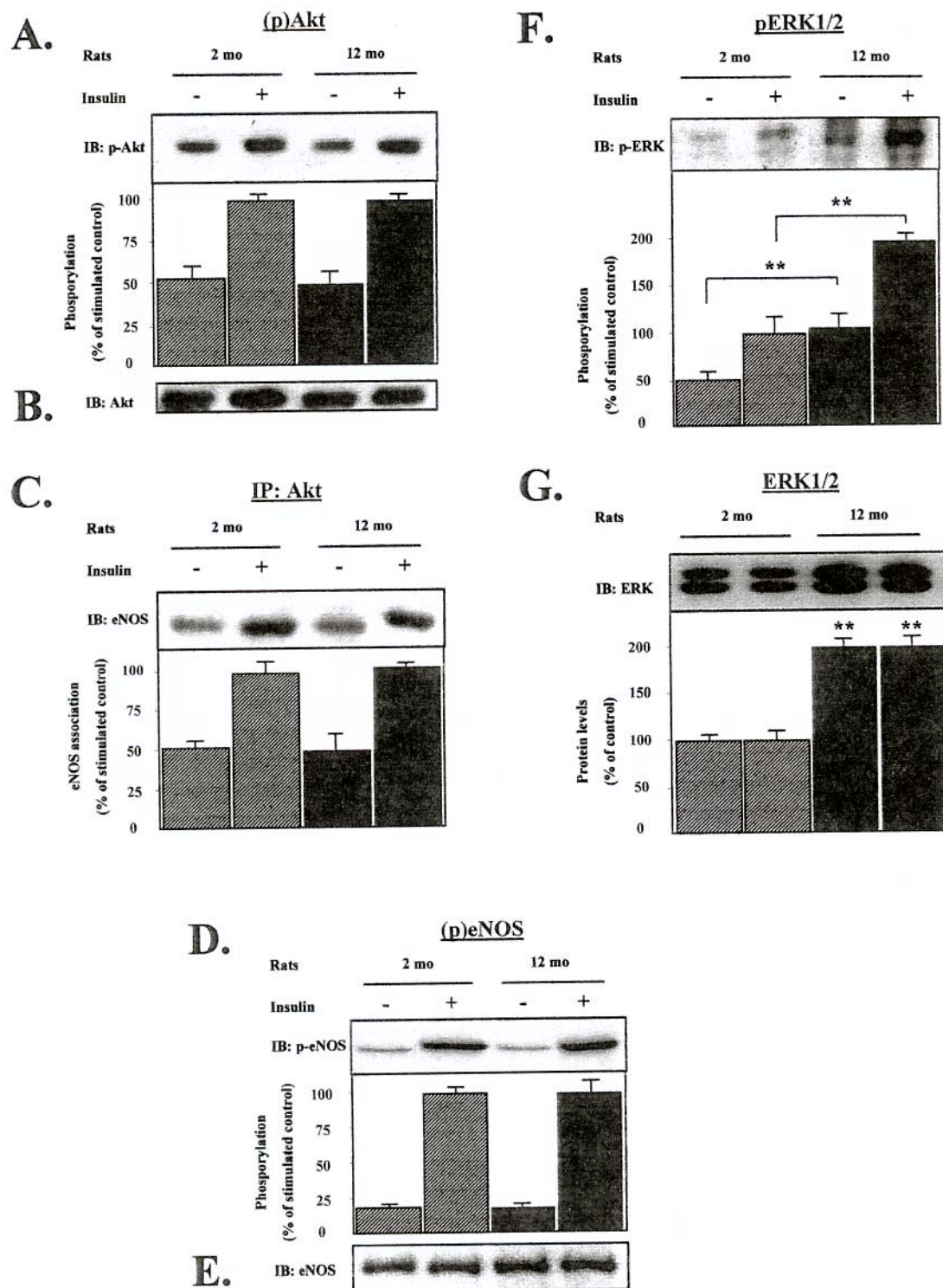


Fig. 3.



References

1. King GL, Goodman AD, Buzney S, Moses A, Kahn CR (1985) Receptors and growth-promoting effects of insulin and insulinlike growth factors on cells from bovine retinal capillaries and aorta. *J Clin Invest* 75: 1028-36.
2. Obata T, Kashiwagi A, Maegawa H et al. (1996) Insulin signaling and its regulation of system A amino acid uptake in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 79: 1167-76.
3. Zeng G, Quon MJ (1996) Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 98: 894-8.
4. Anderson PW, Zhang XY, Tian J et al. (1996) Insulin and angiotensin II are additive in stimulating TGF-beta 1 and matrix mRNAs in mesangial cells. *Kidney Int* 50: 745-53.
5. Tamaroglio TA, Lo CS (1994) Regulation of fibronectin by insulin-like growth factor-I in cultured rat thoracic aortic smooth muscle cells and glomerular mesangial cells. *Exp Cell Res* 215: 338-46.
6. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N et al. (2000) Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation* 101: 676-81.
7. Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC (1999) Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 43: 509-20.

8. Scherrer U, Randin D, Vollenweider P, Vollenweider L, Nicod P (1994) Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest* 94: 2511-5.
9. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD (1994) Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 94: 1172-9.
10. Li H, Forstermann U (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 190: 244-54.
11. Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR (1982) Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* 215: 185-7.
12. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR et al. (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-7.
13. Sun XJ, Wang LM, Zhang Y et al. (1995) Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377: 173-7.
14. Skolnik EY, Lee CH, Batzer A et al. (1993) The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *EMBO J* 12: 1929-36.
15. Myers MG, Jr., Backer JM, Sun XJ et al. (1992) IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10350-4.

16. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-5.
17. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ et al. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399: 597-601.
18. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
19. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
20. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4.
21. Bonora E, Moghetti P, Zaccanaro C et al. (1989) Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 68: 374-8.
22. Lovenberg W (1987) Techniques for the measurements of blood pressure. *Hypertension* 9 (Suppl): 15-16.
23. Howard G, O'Leary DH, Zaccaro D et al. (1996) Insulin sensitivity and atherosclerosis. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators. *Circulation* 93: 1809-17.

24. Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ (1996) Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* 137: 151-9.
25. Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR (1994) Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 14: 4902-11.
26. Haruta T, Morris AJ, Rose DW, Nelson JG, Mueckler M, Olefsky JM (1995) Insulin-stimulated GLUT4 translocation is mediated by a divergent intracellular signaling pathway. *J Biol Chem* 270: 27991-4.
27. Mendez R, Myers MG, Jr., White MF, Rhoads RE (1996) Stimulation of protein synthesis, eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation, and PHAS-I phosphorylation by insulin requires insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 16: 2857-64.
28. Shepherd PR, Nave BT, Siddle K (1995) Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J* 305: 25-8.
29. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD (1996) Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 97: 2601-10.

30. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-42.
31. Jiang ZY, Lin YW, Clemont A et al. (1999) Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest* 104: 447-57.
32. Carlson SH, Shelton J, White CR, Wyss JM (2000) Elevated sympathetic activity contributes to hypertension and salt sensitivity in diabetic obese Zucker rats. *Hypertension* 35: 403-8.
33. Cusi K, Maezono K, Osman A et al. (2000) Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 105: 311-20.