

ELIANA PEREIRA DE ARAUJO

**OS EFEITOS DA INIBIÇÃO AGUDA DA EXPRESSÃO DO
SUBSTRATO-1 DO RECEPTOR DE INSULINA (IRS-1)
SOBRE A SECREÇÃO E AÇÃO DA INSULINA
EM RATOS WISTAR**

CAMPINAS

2005

ELIANA PEREIRA DE ARAUJO

**OS EFEITOS DA INIBIÇÃO AGUDA DA EXPRESSÃO DO
SUBSTRATO-1 DO RECEPTOR DE INSULINA (IRS-1)
SOBRE A SECREÇÃO E AÇÃO DA INSULINA
EM RATOS WISTAR**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de
Doutor em Fisiopatologia Médica, área de
concentração em Medicina Experimental.*

ORIENTADOR: Mário José Abdalla Saad

CO-ORIENTADOR: Lício Augusto Velloso

CAMPINAS

2005

Banca examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador: <i>Prof. Dr. Mario José Abdala Saad</i>
--

Membros:

Prof. Dr. José Barreto C. Carvalheira

Prof. Dr. Sigisfredo Luis Brenelli

Prof^a. Dr^a. Regina Célia M. S. Moisés

Prof. Dr. Rui Curi

Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica, área de concentração Medicina Experimental, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas.

Data: 18/08/2005

DEDICATÓRIA

Ao Lício e aos nossos filhos, pela compreensão, amor e amizade,
dedico-lhes esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Lício, pelos ensinamentos, dedicada orientação, incentivo, compreensão, companheirismo e amor.

Ao Prof. Dr. Mário Saad, pelo apoio, amizade e orientação na realização desse trabalho.

Ao Prof Dr. Everardo, pela grande amizade, constante apoio, incentivo e orientação dedicada na primeira fase do doutorado.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, pela colaboração e amizade.

À Alessandra, pela sua constante colaboração e principalmente pela grande amizade nascida durante o convívio e viagens aos congressos.

Ao Cafu, grande amigo de trabalho, que sempre esteve disposto a ajudar e alegrar o nosso dia, desde os tempos do mestrado.

À Mirian e Rachel, pela eficiente e agradável colaboração nesse trabalho.

À Maria Esméria, pela indispensável colaboração na fase que precedeu esse trabalho.

À Fernanda, pela amizade e confiança.

Ao Eli, amigo sempre tão prestativo.

A todos os amigos do Laboratório de Pâncreas Endócrino, especialmente à Eliane, por me receber sempre com carinho e disposta a ajudar.

Ao Márcio Pereira e Torsoni, por momentos de descontração e alegria vividos no laboratório.

À Daniela, Patrícia, Maristela, Graziela, Talita, Juliana, Érika e todos os amigos do laboratório, pelos bons momentos vividos durante esses anos.

Ao Sr. Luiz, pela dedicação e amor ao trabalho e pela convivência agradável.

Ao Márcio (biotério), que nos mostrou mais uma vez, o quanto é importante o trabalho feito com carinho e dedicação, obrigado pelo valioso auxílio.

À Tereza, pela amizade e pelo trabalho realizado junto à secretaria da pós.

Aos animais que doaram a vida à pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Doutorado.

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xi</i>
ABSTRACT.....	<i>xiii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	15
2- OBJETIVOS.....	21
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1- Anticorpos, reagentes químicos e materiais.....	24
3.1.1- Soluções utilizadas.....	24
3.2- Animais experimentais.....	26
3.3- Determinação da glicose plasmática e insulina sérica.....	27
3.4- Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT).....	27
3.5- Teste de tolerância à insulina (ITT).....	27
3.6- Clampe euglicêmico-hiperinsulinêmico.....	27
3.7- Captação de 2-deoxi-D-[3H]glicose (2-DG).....	28
3.8. Determinação da massa de tecido epididimal.....	29
3.9- Extração de tecidos, imunoblot e imunoprecipitação.....	29
3.10- Fracionamento subcelular.....	30
3.11- Apresentação dos dados e análise estatística.....	31
4- RESULTADOS.....	32
5- DISCUSSÃO.....	46
6- CONCLUSÃO.....	53
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
8- ANEXO.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

μCi	MicroCuri
^3H	Trício
^{125}I	Isótopo de iodo 125
Akt/PKB	Proteína serina/treonina quinase B
Anti-pY	Anti-fosfotirosina
BSA	Soro de Albumina Bovina
Cbl	Protooncogene que exerce função de substrato do receptor de insulina
CrkII	Proteína adaptadora da via da Cap-Cbl
C3G	Proteína de troca de nucleotídeo guanil
CAP	Proteína adaptadora de Cbl
C/EBP α	<i>CCAAT/enhancer binding protein α</i>
2-DG	2-deoxi-D- ^3H glicose
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERKs	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i> Quinases reguladas por sinal extracelular
Gab-1	Substrato do receptor de insulina
GLUT-4	Transportador de glicose 4
GRB-2	Proteína ligadora do receptor para fator de crescimento
GTT	Teste de tolerância à glicose
HOMA	<i>Homeostasis model assesment</i>

	Modelo de verificação de homeostase
IGF-1	<i>Insulin- like Growth Factor-1</i> Fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-1R	<i>Insulin-like Growth Factor-1 receptor</i> Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
IRS-2	Substrato 2 do receptor de insulina
IRSs	Substratos do receptor de insulina
ITT	Teste de tolerância à insulina
kDa	Quilodalton
<i>Kitt</i>	Constante de decaimento de glicose
MAPK	<i>Mitogen-activated protein Kinase</i> Proteína Quinase ativada por mitógeno
m-SOS	<i>Son-of-sevenles</i> - Fator de troca de nucleotídeo guanina
m-TOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
p60 ^{dok}	Substrato do receptor de insulina
PDK-1	<i>Phosphoinositide-dependent Kinase-1</i> Quinase dependente de fosfoinositídeo-1
PDK-2	<i>Phosphoinositide-dependent Kinase-2</i> Quinase dependente de fosfoinositídeo-2
PH	Sítio de homologia a plecstrina
PKC- α	Proteína quinase C alfa
PKC- δ	Proteína quinase C delta

PI3-quinase	Fosfatidilinositol 3-quinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonila
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i> Receptor gama ativado por proliferador de peroxisoma
PTB	Domínio de ligação fosfotirosina
PTPases	Proteínas tirosinas fosfatases
PTP1B	Proteína Tirosina Fosfatase 1 B
Raf-1	Proteína da cascata de ativação da MAP quinase
Ras	Proteína originalmente identificada como oncogene, têm participação na regulação do metabolismo e crescimento celular
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Shc	Molécula adaptadora e substrato do receptor de insulina
Src	Oncogene originalmente definido como produto do sarcoma vírus Rous
Tris	Tri(hidroximetil)-aminometano

RESUMO



O substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) desempenha função importante na conexão entre os receptores de insulina (IR) e do fator de crescimento insulina-*like*-1 (IGF-1R), e as moléculas que participam das etapas subseqüentes da transdução dos sinais gerados pelos respectivos ligantes. No presente estudo, utilizou-se um oligonucleotídeo antisense para o IRS-1 (AS IRS-1), com a finalidade de inibir a expressão dessa proteína *in vivo* e avaliar as conseqüências desse bloqueio em diferentes tecidos de ratos Wistar. O tratamento com AS IRS-1 durante três dias reduziu a expressão desta proteína em cerca de 80%, 75% e 65% ($p<0,05$) respectivamente em fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, sendo tal efeito acompanhado por uma redução de 40% ($p<0,05$) na constante de decaimento de glicose durante o teste de tolerância à insulina (ITT), por uma redução de 78% ($p<0,05$) no consumo de glicose durante o clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico e por um aumento de 90% ($p<0,05$) nos níveis basais de insulina plasmática. Os efeitos metabólicos produzidos pelo AS IRS-1 foram acompanhados pela redução significativa da fosforilação induzida por insulina da Akt [Ser⁴⁷³] em fígado (85%, $p<0,05$), músculo esquelético (40% $p<0,05$) e tecido adiposo (85%, $p<0,05$), e uma redução significativa da fosforilação em tirosina da ERK induzida por insulina em fígado (20%, $p<0,05$) e músculo esquelético (30%, $p<0,05$). Entretanto, o tratamento com AS IRS-1 promoveu aumento (60%, $p<0,05$) da fosforilação da ERK em tirosina induzida por insulina em tecido adiposo. Por fim, em ratos tratados com AS IRS-1 por oito dias, observou-se um aumento de 100% ($p<0,05$) da massa relativa de tecido adiposo epididimal e um aumento de 120% ($p<0,05$) da expressão do receptor nuclear PPAR γ . Portanto, a inibição da expressão de IRS-1 em ratos leva resistência à insulina acompanhada pela ativação de uma via de sinalização relacionada ao crescimento celular, exclusivamente em tecido adiposo branco.

ABSTRACT



Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) has an important role as an early intermediary between the insulin and IGF-1 receptors and downstream molecules that participate in the insulin and IGF-1 signal transduction. We employed an antisense oligonucleotide (IRS-1 AS) to inhibit whole-body expression of IRS-1 *in vivo* and evaluate the consequences of short-term inhibition of IRS-1 in Wistar rats. Four days treatment with IRS-1 AS reduced the expression of IRS-1 by 80, 75 and 65% ($P<0.05$) in liver, skeletal muscle, and adipose tissue, respectively. This was accompanied by a 40% ($P<0.05$) reduction in the constant of glucose decay during an insulin tolerance test, a 78% ($P<0.05$) reduction in glucose consumption during a hyperinsulinemic-euglycemic clamp, and a 90% ($P<0.05$) increase in basal plasma insulin levels. The metabolic effects produced by IRS-1AS were accompanied by a significant reduction in insulin-induced [Ser⁴⁷³] Akt phosphorylation in liver (85%, $P<0.05$), skeletal muscle (40%, $P<0.05$), and adipose tissue (85%, $P<0.05$) and a significant reduction in insulin-induced tyrosine phosphorylation of ERK in liver (20%, $P<0.05$) and skeletal muscle (30%, $P<0.05$). However, insulin-induced tyrosine phosphorylation of ERK was significantly increased (60%, $P<0.05$) in adipose tissue of IRS-1 AS treated rats. Moreover, in rats treated with IRS-1 AS for 8 days, a 100% increase ($P<0.05$) in relative epididymal fat weight and a 120% ($P<0.05$) increase in nuclear expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ were observed. Thus, acute inhibition of IRS-1 expression in rats leads to insulin resistance accompanied by activation of a growth-related pathway exclusively in white adipose tissue.

1- INTRODUÇÃO



Nas últimas décadas tem se observado um aumento surpreendente na prevalência de *diabetes mellitus* do tipo 2 (DM2) em várias regiões do planeta, inclusive no Brasil (KOPELMAN 2000; ZIMMET et al, 2001). Tal fenômeno epidemiológico se deve à associação entre fatores genéticos, os quais são pouco conhecidos (O'RAHILLY et al, 2005), fatores comportamentais, como sedentarismo e mudança do hábito alimentar, além do envelhecimento progressivo da população e, indiscutivelmente, de um aumento alarmante na prevalência de obesidade (PEREIRA et al, 2005; SCHWARTZ e PORTE, 2005). A perda do efetivo controle dos níveis sanguíneos de glicose depende da instalação simultânea e em graus variáveis de, pelo menos, dois eventos distintos, que são a resistência à ação da insulina, e a perda da capacidade da célula β pancreática em compensar a crescente demanda periférica por insulina (CAHILL, 1988). Resistência à ação da insulina é definida como a perda relativa da capacidade deste hormônio em exercer seus efeitos biológicos (SALTIEL e KAHN, 2001; SHULMAN, 2004). Esta perda pode ser determinada através de testes clínicos como o clampe hiperinsulinêmico-euglicêmico, o teste de tolerância à insulina ou o HOMA; ou pela avaliação de fenômenos moleculares envolvidos na transdução do sinal da insulina em tecidos-alvo como adiposo, músculo esquelético e fígado (WALLACE e MATTHEWS, 2002; SHULMAN, 2004).

Estudos recentes sugerem que uma falha comum na via de sinalização da insulina em tecidos periféricos e na célula β pancreática possa desempenhar uma função central no desenvolvimento do diabetes (RHODES, 2005). A insulina sinaliza através de um receptor com atividade tirosina quinase intrínseca, chamado de receptor de insulina (IR). Tal receptor é composto por duas subunidades extracelulares α e duas subunidades transmembrana β , ligadas entre si por pontes dissulfeto, formando um complexo heterotetramérico $\alpha_2\beta_2$. A ligação da insulina às subunidades α do receptor ativa uma reação de autofosforilação acionando as subunidades β que por sua vez passam a catalisar a fosforilação de vários resíduos tirosina (Tyr^{960} , Tyr^{1146} , Tyr^{1150} , Tyr^{1151} , Tyr^{1316} e Tyr^{1322}) (WHITE e KAHN, 1994). O IR e o IGF-1R (receptor do IGF-1, que apresenta semelhanças estruturais e funcionais com o receptor de insulina) utilizam alguns substratos comuns como intermediários entre as etapas iniciais e distais de suas respectivas vias de sinalização. A proteína denominada substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1), foi, como sugerido pelo seu nome, o primeiro substrato destes receptores a ser identificada (WHITE, 2002).

O IRS-1 possui 1.243 aminoácidos e apresenta uma massa molecular entre 165 a 180 kDa, sendo expresso na maioria dos tecidos de mamíferos (LEE e PILCH, 1994). O IRS-1 pertence a uma família de proteínas adaptadoras compostas por, no mínimo, quatro membros com moderado a alto grau de homologia (IRS-1 a IRS-4), e uma quinta proteína relacionada, porém, com menor grau de homologia, a Gab1 (WHITE e KAHN 1994). Todos os membros desta família possuem um sítio de homologia a plecstrina (PH) e um domínio de ligação fosfotirosina (PTB) próximo à sua região N-terminal. Outros substratos do IR foram identificados incluindo p_{60}^{dok} , Cbl, APS, e isoformas da proteína homóloga-2 do Src (Shc) (SALTIEL e KAHN, 2001).

Uma vez fosforiladas, as proteínas da família IRS passam a atuar com proteínas adaptadoras que servem como sítios ancoradouros para outras proteínas efetoras com domínios SH2 (SALTIEL e KAHN, 2001), incluindo a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-quinase) (Tyr⁴⁶⁰, Tyr⁶⁰⁸, Tyr⁹³⁹, Tyr⁹⁸⁷), a proteína adaptadora Grb2 (Tyr⁸⁹⁵) e a proteína tirosina fosfatase SHPTP2 (Tyr¹¹⁷², Tyr¹²²²) (MYERS e WHITE, 1993). As proteínas IRS acoplam os receptores de insulina e IGF-1 à cascata de sinalização das enzimas PI3-quinase e quinase regulada por sinal extracelular-1 e -2 (ERK1 e ERK2). A ativação da cascata da PI3-quinase é uma importante via de sinalização tanto para a insulina quanto para o IGF-1. A PI3-quinase é uma proteína dimérica, que apresenta uma subunidade catalítica de 110 kDa e uma subunidade regulatória de 85 kDa. A subunidade catalítica é ativada após a ligação entre proteínas IRS e domínios SH2 da subunidade regulatória (BACKER et al, 1992). Os produtos gerados pela ativação da PI3-quinase, incluindo fosfatidilinositol 3,4 bifosfato e fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato, atuam como moléculas de reconhecimento para proteínas com atividade serina quinase. Estas são recrutadas para um sítio junto à membrana plasmática onde passam a desempenhar suas funções catalíticas. As quinases dependentes de fosfoinositol-1 e -2 (PDK1 e PDK2) participam de uma primeira etapa da ativação de pelo menos 3 isoformas da proteína quinase B (PKB ou Akt), catalisando a fosforilação do resíduo Thr³⁰⁸ (ALESSI e COHEN, 1998). Entretanto, há algum tempo acreditava-se que somente com a fosforilação do resíduo Ser⁴⁷³ a Akt tivesse sua atividade catalítica máxima ativada. Em estudo recente Sarbassov et al. (SARBASSOV et al, 2005) revelaram que o complexo protéico mTOR-riCTOR é responsável pela fosforilação deste resíduo e portanto desempenha função

importante na transdução do sinal da insulina e de outros sinalizadores que utilizam a via da Akt. A Akt ativada fosforila substratos que controlam vários processos biológicos, incluindo captação de glicose, síntese de proteína, síntese de glicogênio, além de proliferação e sobrevivência celular (BRUNET, 1999).

Assim como na sinalização de outros hormônios e fatores de crescimento, a insulina tem a capacidade de estimular a via de sinalização da proteína ativada pela mitógeno (MAP) quinase e da ERK. Esta via pode ser iniciada pela fosforilação em tirosina das proteínas IRS e/ou da Shc, as quais por sua vez interagem com Grb2 recrutando a proteínas “son-of-sevenless” (SOS) para a membrana plasmática e assim ativando Ras. Uma vez ativada, Ras se comporta como um interruptor molecular, ativando uma cascata de serinas-quinase por meio da ativação de Raf, MEK e ERK. ERK ativada pode se translocar para o núcleo, onde catalisa a fosforilação de fatores de transcrição que levam à proliferação e à diferenciação celular (BOULTON et al, 1991).

Uma outra importante via de sinalização para a insulina envolve a fosforilação em tirosina do proto-oncogene Cbl (RIBON e SALTIEL, 1997). Em muitas células sensíveis à ação da insulina, Cbl está associada com a proteína adaptadora Cap, a qual liga-se à primeira por meio de seqüências ricas em prolina no domínio carboxi-terminal (RIBON e SALTIEL, 1997). Cap também é marcadamente induzida durante a diferenciação de adipócitos e esta expressão pode ser aumentada por agonistas do receptor γ ativado por proliferador de peroxisoma (PPAR γ) (RIBON et al, 1998). Após a fosforilação, o complexo Cbl/CAP se transloca para a camada lipídica da membrana plasmática onde se liga a proteína flotilina por meio do domínio SoHo (Homologia Sorbin) de CAP. A translocação de Cbl fosforilado recruta a proteína adaptadora Crk-II para a camada lipídica. Crk-II forma um complexo com a proteína C3G. Uma vez translocada para a camada lipídica, C3G se liga a uma proteína G, a TC10, catalisando então a reação de troca de GTP para GDP, resultando na ativação dessa proteína (WATSON et al, 2001). Quando ativada, TC10 proporciona um segundo sinal para a captação de glicose, paralelamente à ativação da PI3-quinase (WATSON et al, 2001).

Após a caracterização da atividade quinase do IR e da sua capacidade de transduzir o sinal da insulina através do recrutamento e ativação de substratos diretos ou indiretos, observou-se que, em diversas situações clínicas onde há resistência à insulina,

ocorre uma redução da fosforilação em tirosina, tanto do IR como de alguns de seus substratos (ASANTE-APPIAH e KENNEDY, 2003). Mecanismos moleculares associados a uma redução da fosforilação em tirosina de proteínas envolvidas na sinalização da insulina passaram ao foco da investigação da fisiopatologia envolvida na gênese do *diabetes mellitus* e doenças afins. Neste contexto, observou-se que, ambos, receptor de insulina e seus substratos IRS, podem ser fosforilados em resíduos serina, e que tal fenômeno pode levar a uma atenuação do sinal molecular gerado pela ligação da insulina ao seu receptor por induzir uma redução da fosforilação em tirosina estimulada pelo ligante (HOTAMISLIGIL et al, 1996; ALESSI et al, 1998). Esta fosforilação inibitória proporciona um “feedback” negativo para a sinalização de insulina e serve como mecanismo de “cross-talk” para outras vias de sinalização que levam a resistência à insulina (HOTAMISLIGIL et al, 1996). A ação da insulina também pode ser atenuada por meio de proteínas tirosina-fosfatases (PTPases), as quais catalisam a rápida desfosforilação do receptor de insulina e de alguns de seus substratos. Algumas dessas proteínas são expressas em células sensíveis à insulina ou expressas em maior quantidade em estado de resistência à ação desse hormônio. A mais estudada tem sido a fosfatase PTP1B, cujo “knockout” gênico leva ao aumento da fosforilação em tirosina do IR e IRSs em músculo, aumentando assim a sensibilidade à insulina (ELCHEBLY et al, 1999).

Para que se tentasse obter informação a respeito do papel desempenhado por algumas das proteínas envolvidas com a transdução do sinal da insulina, alguns grupos geraram linhagens celulares e animais geneticamente manipulados, nos quais estas proteínas tiveram expressão reduzida ou abolida (SHIRAKAMI et al, 2002). De acordo com tais estudos, as proteínas IRS parecem desempenhar diferentes funções celulares, provavelmente em razão das diferenças na distribuição tecidual, localização subcelular e atividade intrínseca. O IRS-1 desempenha um papel central no crescimento somático dependente de insulina e IGF-1 (KIDO, Y et al, 2002), e o IRS-2 participa da regulação da homeostase da glicose e controle do metabolismo (WITHERS et al, 1999). A inativação do gene do IRS-1 leva à redução de 40% do crescimento embrionário e neonatal, e a inativação do gene do IRS-2 produz um fenótipo com apenas 10% de redução do tamanho em neonatos (KIDO et al, 2000). Em contraste, o “knockout” de IRS-2 leva resistência à insulina em tecidos periféricos e no fígado, mas apresenta defeito de crescimento em

apenas alguns tecidos, incluindo algumas regiões do cérebro, células β pancreática e retina, porém mais tarde leva ao desenvolvimento de DM2 (WITHERS et al, 1999). Por sua vez, o “knockout” do IRS-1 produz resistência à insulina acompanhada por intolerância à glicose sem progressão para diabetes (WITHERS et al, 1999 e BRUNING et al, 1997a). Em um modelo poligênico obtido por meio da geração de animais com silenciamento gênico combinado em heterozigose para o *IR/Irs-1* e *IR/Irs-2* observou-se que o desenvolvimento de *diabetes mellitus* ocorria em frequência similar. Entretanto, os camundongos *IR/Irs-1* são primariamente resistentes à insulina em músculo, e os camundongos *IR/Irs-2* são primariamente resistentes à insulina no fígado (KIDO et al, 2000) . Ainda, os animais *IR/Irs-1* exibem hiperplasia de células β pancreáticas, o que permite uma parcial ou completa compensação da grave resistência à insulina pelos elevados níveis de insulina plasmática (BRUNING, J.C., et al. 1997b).

Com o objetivo de obter avanços na caracterização da função do IRS-1 em ilhotas pancreáticas nós desenvolvemos e utilizamos um oligonucleotídeo fosforotioado antisense para o IRS-1 que levou a uma redução de 40% da expressão dessa proteína em ilhotas pancreáticas isoladas (ARAUJO et al, 2002; ARAUJO et al, 2004). Tais estudos revelaram que a parcial inibição desta proteína leva a um aumento da secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas de ratos Wistar normais e em ilhotas de ratos submetidos à desnutrição protéica, situação que promove redução da produção e secreção de insulina (ARAUJO et al, 2002; ARAUJO et al, 2004). Frente a estes resultados decidimos avaliar o efeito do emprego deste oligonucleotídeo *in vivo*, em animais não predispostos a diabetes e sem qualquer manipulação genética.

2- OBJETIVOS

Considerando-se que os animais “knockouts” para as proteínas IRS apresentam alterações metabólicas e funcionais intrínsecas, e que tais defeitos, sendo expressos desde o início do período embrionário podem acarretar modulações compensatórias de proteínas com funções semelhantes ou complementares às proteínas alvo; e, considerando-se ainda que, de acordo com diversos estudos genéticos e epidemiológicos, a maior parte dos casos de DM2 em populações humanas não se deve a defeitos intrínsecos de proteínas da via de sinalização da insulina até então descritas, mas sim a uma inibição progressiva da atividade molecular destas, acreditamos que a utilização de um método que permita a inibição da expressão de uma proteína importante da via de sinalização da insulina, em animais adultos e não geneticamente manipulados, possa oferecer conhecimento substancial para que se obtenham avanços na caracterização da fisiopatologia de DM2. Desta forma, os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito do tratamento de ratos Wistar machos de oito semanas com oligonucleotídeos antisense para o IRS-1 sobre:

- Os níveis de expressão de IR, IRS-1 e IRS-2 em fígado, músculo e tecido adiposo.
- A transdução do sinal da insulina através de proteínas iniciais da via de sinalização e o envolvimento da Akt e ERK, nesses tecidos.
- A ativação e translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática e a captação de glicose em fígado, músculo e tecido adiposo induzidas pela insulina.
- A variação de massa visceral e de massa corporal total e a ingestão alimentar.
- A fosforilação do IR em resíduos serina e a ativação da PTP1B após estímulo com insulina.
- A secreção e ação insulínica através de GTT, ITT e clampe hiperinsulinêmico/euglicêmico.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Anticorpos, reagentes químicos e materiais

A insulina regular humana (Humulin R) foi adquirida da Lilly. Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenil-metilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina e ditioneitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, e glicerol foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA). Proteína A com iodo radioativo (^{125}I) foi adquirida da Amersham (Amersham, UK), e a Proteína A Sepharose 6 MB da Pharmacia (Uppsala, Suécia). A membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, 0.45 μm) foi obtida da Amersham (Aylesbury, UK). O agente anestésico tiopental sódico foi adquirido da Cristália (Itapira/SP, Brasil). Os anticorpos anti-IR (sc-711, rabbit polyclonal), IRS-1 (sc-559, rabbit polyclonal), IRS-2 (sc-8299, rabbit polyclonal), p-ERK (sc-7383, mouse polyclonal, reconhecendo as subunidades 42 e 44 kDa da ERK fosforiladas em Tyr²⁰⁴), Shc (sc-1695, rabbit polyclonal), PPAR γ (sc-7196, rabbit polyclonal), GLUT-4 (sc-7938, rabbit polyclonal), e anti-fosfotirosina (sc-508, mouse monoclonal) foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Anti-AKT [Ser⁴⁷³] (9271, rabbit polyclonal) foi adquirido da Chemicon Int. (Temecula, CA, USA) e anti-PTP1B (#07-088, rabbit polyclonal) foi adquirido da Upstate Biochnology (Lake Placid, NY, USA).

3.1.1- Soluções utilizadas

- Tampão de extração A (extrato total): foi utilizado para a extração das proteínas celulares dos tecidos estudados, contém: Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100 mM, SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, 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 colocado no momento de utilização do tampão.
- Tampão de Laemmli (5X): foi usado 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%.

- 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 é diluída 1:4.
- 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. Mantida estocada a 4°C.
- Solução tampão para SDS-PAGE - Gel de resolução (resolving): tampão composto de EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.
- 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.
- Solução basal: solução básica 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%.
- Solução bloqueadora: utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose, após a transferência, contém: 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal.
- Solução tampão de extração B, para imunoprecipitação: foi utilizada para a extração de proteínas celulares dos tecidos estudados, que são 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 no momento do uso.
- 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%.

- Solução para anticorpos: solução contendo anticorpos específicos que identificam as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal.
- Solução com proteína A marcada com ^{125}I : permite a visualização das bandas em auto-radiografia, contém 0,1% de leite desnatado, dissolvido em solução basal com 2 μCi de proteína A ^{125}I .

3.2- Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos com cerca de oito semanas de idade que receberam dieta regular, ração padrão para ratos (Purina) e água *ad libitum*. Esses animais foram divididos randomicamente em três grupos; aqueles tratados com oligonucleotídeo fosforotioados antisense (AS) IRS1 (5' CGG GAT AGG AGT GGG T3') os tratados com oligonucleotídeo fosforotioados sense (S) (5' ACC CAC TCC TAT CCC G 3') e o grupo-controle (C), que recebeu apenas tampão TE (Tris-HCL 100 mM / EDTA 10 mM). Os oligonucleotídeos foram construídos a partir da sequência de mRNA de IRS1 (*Rattus norvegicus*) obtida do "GeneBank" e adquiridos através da "Invitrogen Corp". (Carsbad, CA, USA). Compatibilidade entre a sequência de mRNA de IRS1 de rato e camundongo foi verificada através do programa "Blast, PubMed" (www.ncbi.nlm.nih.gov). Este oligonucleotídeo foi usado em estudos prévios (ARAUJO et al, 2002; ARAUJO et al, 2004). Todos os animais foram obtidos do Biotério Central da Unicamp e foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco por gaiola) sob condição padronizada de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de 22 ± 2 °C. O tratamento ocorreu durante três dias, uma dose ao dia, na concentração de 0,4 nmol intraperitoneal, o procedimento experimental foi realizado na manhã do quarto dia, com exceção da avaliação da massa de tecido adiposo visceral e expressão do receptor nuclear PPAR γ , quando os animais foram tratados durante oito dias e o procedimento foi realizado na manhã do nono dia.

3.3- Determinação da glicose plasmática e da insulina sérica

A glicose foi determinada pelo método da glicose oxidase, como descrito previamente (TRINDER, 1969). A insulina foi determinada por radioimunoensaio (SCOTT et al, 1981).

3.4- Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)

O ipGTT foi realizado no final do período de tratamento com oligonucleotídeo, em ratos mantidos em jejum durante o período noturno. Foi coletada uma amostra de sangue (tempo 0) e em seguida infundido uma solução de 20% de glicose (2,0 g/kg de peso corpóreo) na cavidade abdominal. Amostras de sangue foram então coletadas das caudas dos animais nos tempos 30, 60, 90, 120 minutos e utilizadas para determinação das concentrações de glicose e de insulina.

3.5- Teste de tolerância à insulina (ITT)

Após os animais terem sido tratados como descrito anteriormente, foram mantidos em jejum por 6 h, e depois de coletada amostra de sangue da cauda (tempo 0), foi injetada insulina (2,0 U/1000g de peso corpóreo) na cavidade peritoneal e a seguir coletadas amostras nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para determinação da glicose plasmática. A razão da constante de decaimento da glicose, (kitt) foi calculada usando a fórmula $0.693/t_{1/2}$. A glicose $t_{1/2}$ foi calculada, usando a análise da queda do quadrado da concentração de glicose plasmática durante o decaimento da fase linear (BONORA et al, 1987).

3.6- Clampe euglicêmico-hiperinsulinêmico

Todos os experimentos de clampe seguiram metodologia previamente descrita (DEFRONZO et al, 1979). Depois de 6 h de jejum, os animais foram anestesiados e, em condições assépticas, foi inserido um cateter de polietileno na artéria femoral para a

coleta de amostras sanguíneas para a dosagem de glicose plasmática e insulina sérica. Um segundo cateter foi inserido na veia femoral para a administração de insulina e glicose. Os animais foram mantidos aquecidos a 37°C durante todo o estudo. Durante a primeira fase do estudo (30 min), a quantidade de insulina infundida foi àquela necessária para alcançar um platô de glicose. Após ter sido mantido o equilíbrio da glicemia, a infusão de insulina ($3,0 \text{ un.kg}^{-2}.\text{min}^{-1}$) foi mantida numa constante (0,20 ml/h) durante 2 horas e a infusão de glicose (solução de 5%) foi ajustada para manter a concentração plasmática de glicose próxima a 120 mg/dl. Amostras de sangue foram coletadas da veia femoral a cada 5 minutos para a determinação da glicemia e a cada 30 minutos para a determinação de insulina sérica. A insulina foi determinada por radioimunoensaio em duplicata nas amostras coletadas de ambos os grupos e manteve-se entre 4,0 e 9,0 ng/ml.

3.7- Captação de 2-deoxi-D-[3H]glicose (2-DG)

A captação de 2DG *in vivo*, foi realizada de acordo com métodos descritos previamente (GASPARETTI et al, 2003). Os ratos foram anestesiados e então foi injetado na veia porta 2-deoxi-glicose-[^3H], sucrose-[^{14}C] na presença ou ausência de 0,1U de insulina em 0,4 ml de tampão fosfato (0,1 M, PH 7.4) com 0,1% de albumina bovina. Após 16 minutos, foram retirados fragmentos de fígado, músculo gastrocnêmio e tecido adiposo epididimal, que rapidamente foram colocados em “NCS-II Tissue Solubilizer” (Amersham, Bucks, England), para posterior solubilização. Então o sobrenadante foi medido, usando-se líquido de cintilação (ACS-II Amersham - Japão, Tóquio) e usando o equipamento (Aloka, Model LSC -1000, Kioto), para verificar a radioatividade resultante do ^3H e do ^{14}C . A captação de 2DG foi calculada obtendo-se a diferença entre o total da radioatividade verificada e a quantidade de radioatividade presente no espaço extracelular nos respectivos tecidos. O volume do espaço extracelular foi calculado em $\mu\text{l/mg}$ dividindo a quantidade de [^{14}C] dpm/mg no tecido pela concentração de [^{14}C] dpm/ μl do plasma. Então, a concentração de [^3H] dpm/mg do extracelular pôde ser obtida multiplicando o volume extracelular em $\mu\text{l/mg}$ do tecido pela concentração de [^3H] dpm/mg do plasma. A radioatividade celular da 2DG foi convertida para picomoles usando a atividade específica e os resultados foram expressos por mg de tecido seco.

3.8- Determinação da massa de tecido epididimal

No primeiro dia de experimento, os ratos foram pareados por peso e um animal de cada grupo pareado, foi randomicamente selecionado para receber o tratamento com tampão TE, oligonucleotídeo S ou AS. Após oito dias de tratamento com uma dose por dia, os ratos foram anestesiados e a cavidade abdominal foi aberta e toda a massa de tecido adiposo epididimal foi cuidadosamente dissecada e pesada. A variação do peso absoluto da massa de tecido adiposo epididimal de cada grupo foi utilizada para cálculos e comparações.

3.9- Extração de tecidos, imunoblot e imunoprecipitação

Os animais foram anestesiados e a cavidade abdominal foi aberta para a infusão de 0,2 ml, 10^{-6} M de insulina ou de 0,2 ml de salina na veia cava. Após diferentes intervalos de tempo (para fígado 30 s, músculo 1 min e 30 s e adiposo 2 min), foram retirados fragmentos (3,0 x 3,0 mm) de tecido adiposo branco, músculo esquelético e fígado que foram imediatamente homogeneizados e solubilizados em tampão de extração adequado a 4 °C com Polytron durante 30 s. Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 40 minutos em centrífuga “Eppendorf” refrigerada. O “pellet” foi desprezado e amostras do sobrenadante foram usadas para medida da concentração protéica, utilizando-se o reagente para o ensaio Bio-Rad Protein Assay-Dye Reagent Concentrate (Melville, NY). Foi utilizado como referencial, uma curva-padrão de albumina. Amostras contendo 0,5 mg de proteína total foram usadas para imunoprecipitar durante período noturno com anticorpo anti IR, IRS1, IRS-2, SHC. A seguir, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletro-transferência do minigel da Bio-Rad, sendo realizadas durante 120 min a 80 V em gelo, banhadas com tampão de transferência. Após transferência, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em solução Tris-salina durante duas horas e depois foram lavadas com solução Tris-salina em três sessões de cinco min. A seguir foi adicionada a membrana anticorpo anti-fosfotirosina, PTP1B ou anti-fosfoerina.

A detecção do complexo antígeno-anticorpo fixado à membrana de nitrocelulose foi obtida através da marcação com ^{125}I -proteína A (diluição 1:1000 em TBS com 1% de leite desnatado). O excesso de proteína A, foi lavado com solução tris-salina e então as membranas foram expostas ao filme de RX (Kodak XAR-Rochester, NY) com intensificador (Cronex Lightining Plus intensifying screens-DuPont, Wilmington, DE). O cassete foi mantido à temperatura de -80°C . Após aproximadamente cinco dias, os filmes foram revelados na forma convencional. Após a revelação das auto-radiografias as bandas obtidas foram quantificadas, utilizando-se o programa ScionCorp. Os dados numéricos obtidos, correspondentes às bandas protéicas foram comparados estatisticamente como descrito abaixo.

Em experimentos de “imunoblot” direto 0,2 mg de extratos protéicos obtidos de cada tecido foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e então foram adicionados anticorpos anti-IR, IRS-1, IRS-2, anti-fosfo-AKT [Ser⁴⁷³], anti-fosfo-ERK, GLUT-4 e PPAR γ .

3.10- Fracionamento subcelular

Para caracterizar a expressão e localização subcelular de GLUT-4 e PPAR γ , foi empregada a metodologia de fracionamento subcelular como descrito na literatura (MIZUKAMI et al, 1997). Após tratamento de três dias para avaliação de GLUT-4 e oito dias para PPAR γ , os animais foram anestesiados, injetado insulina na veia cava (como descrito anteriormente). A seguir, foram extraídos fragmentos de músculo esquelético ou tecido adiposo nos respectivos tempos, os quais foram homogeneizados em tampão STE a 4°C [0.32M sucrose, 20mM Tris-HCl (PH 7,4), 2mM EDTA, 1M DTT, 100mM fluoreto de sódio, 100mM fosfato de sódio, 10mM ortovanadato, 1mM PMSF, 0,1 mg aprotinina], com auxílio de um homogeneizador do tipo Potter. O homogeneizado foi centrifugado (1.000 x g, 25 min, 4°C) para obter o precipitado, que então foi lavado uma vez com tampão STE, centrifugado e ressuspensão com tampão Triton [1% Triton X-20, 20mM Tris-HCl (ph7.4), 50mM NaCl, 200 mM EDTA, 10 mM de ortovanadato, 1 mM PMSF, 100 mM NaF, 100mM pirofosfato de sódio, 0,1 mg aprotinina] e deixado no gelo por

30 min. As amostras foram então novamente centrifugadas (15.000 x g, 30 min, 4°C) para obter a fração nuclear. O sobrenadante foi centrifugado (100.000 x g, 60 min, 4°C) para obter a fração citosólica, e o precipitado foi novamente ressuspenso em tampão STE com 1% Nonidet P-40, mantido no gelo por 20 minutos e novamente centrifugado (100.000 x g, 20 min, 4°C) para obter a fração de membrana. As diferentes frações foram tratadas com tampão de Laemmli com 100mM de ditioneitol (DTT), aquecido a 100°C por 5 min e as alíquotas (0,2 mg de proteína) foram submetidas a SDS-PAGE e “Western blot” com anticorpo anti-GLUT4. Amostras de extrato total e de fração nuclear de tecido adiposo foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose, e posteriormente colocado o anticorpo anti-PPAR- γ .

3.11- Apresentação dos dados e análise estatística

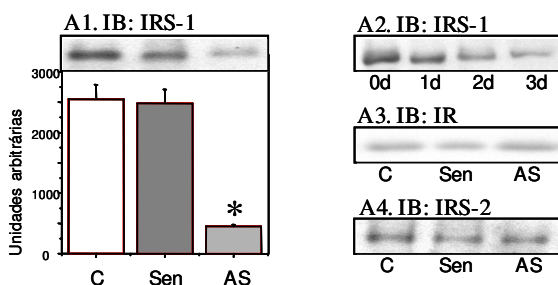
Todo os resultados numéricos estão expressos como média $\pm$ desvio da média seguido do número de experimentos. Os resultados dos “Western blot” estão apresentados como comparações diretas das bandas protéicas nas auto-radiografias, as quais foram quantificadas através de densitometria usando o programa “Scion Image” (Scion Corp). Os dados foram analisados através de teste “t Student’s”, quando comparados dois grupos, e análise de variância (Anova) seguida por análise de significância (Bonferroni) quando apropriado, comparando grupos-controle e experimental. A significância estatística adotado foi $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

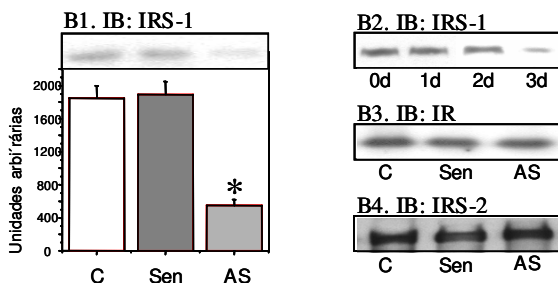
O tratamento com AS IRS-1 inibe a expressão de IRS-1 sem interferir na expressão de IR e IRS-2

O tratamento com AS IRS-1, durante três dias, reduziu significativamente a expressão da proteína IRS-1 em fígado (80%, $p<0,05$), músculo esquelético (75%, $p<0,05$), e tecido adiposo (65%, $p<0,05$) de ratos (Fig. 1 - A1, B1, C1), de acordo com análise por “Western Blot”. A capacidade de inibição da expressão de IRS-1, por meio do uso de oligonucleotídeo antisense, já era evidente após 24 h da primeira dose e aumentou progressivamente durante o período experimental (Fig. 1 – A2, B2, e C2). Os níveis protéicos de IR (Fig. 1 - A3, B3 e C3 e IRS-2 - A4, B4 e C4) não foram alterados pelo tratamento em nenhum dos tecidos analisados.

A. Fígado



B. Músculo esquelético



C. Tecido adiposo

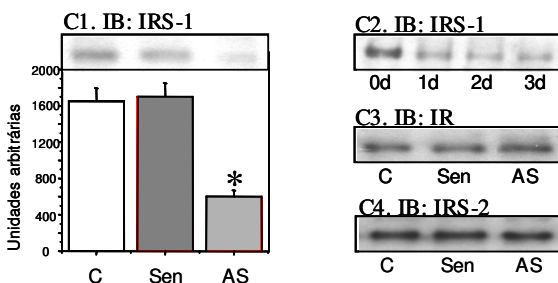


Figura 1- “Imunoblot” mostrando a expressão de IRS-1 em fígado, músculo e tecido adiposo de ratos tratados com solução tampão (C), oligonucleotídeo sense (Sen) e antisense (AS) IRS-1. Os “Western blot” à direita mostram os efeitos do tratamento após 0, 1, 2 e 3 dias com AS IRS-1 sobre a expressão de IR, IRS-1 e IRS-2 nos mesmos tecidos (* $p<0,05$).

Consequências metabólicas da inibição aguda da expressão de IRS-1

O tratamento com AS IRS-1 durante três dias não alterou os níveis de glicose plasmática após o jejum (86 ± 3 mg/dl vs. 87 ± 4 mg/dl, para o grupo-controle e AS IRS-1 respectivamente), mas levou a um aumento significativo dos níveis de insulina sérica após o jejum ($0,55\pm 0,08$ ng/ml vs. $1,1\pm 0,09$ ng/ml, para o controle e AS IRS-1 respectivamente) ($n=5$, $p<0,05$). Durante o ipGTT os níveis de glicose sanguínea dos ratos tratados com oligonucleotídeo AS foram sempre mais elevados que os níveis observados nos ratos-controle, entretanto, não houve diferença significativa quando analisado cada ponto do tempo separadamente. Não obstante, a área sob a curva foi significativamente maior nos ratos tratados com AS IRS-1 (Fig. 2A). Os níveis de insulina sérica, no tempo 0 min, foram significativamente mais elevados nos ratos tratados com AS IRS-1. No tempo 30 min, os níveis de insulina dos ratos-controle alcançaram um pico de $1,48\pm 0,11$ ng/ml (incremento de 170%). No entanto, nos ratos tratados com AS IRS-1 foi observado apenas um discreto aumento quando comparado ao basal (20%). A insulina sérica, durante o restante dos tempos analisados, foi similar à do grupo-controle e novamente, a insulina apresentou-se mais elevada no grupo de animais tratados com AS IRS-1, quando analisada a área sob a curva (Fig. 2A). Finalmente, o tratamento com AS IRS-1 promoveu redução de 40% no K_{itt} (Fig. 2B) obtido durante o ITT e redução de 82% no consumo de glicose durante o clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico (Fig. 2C).

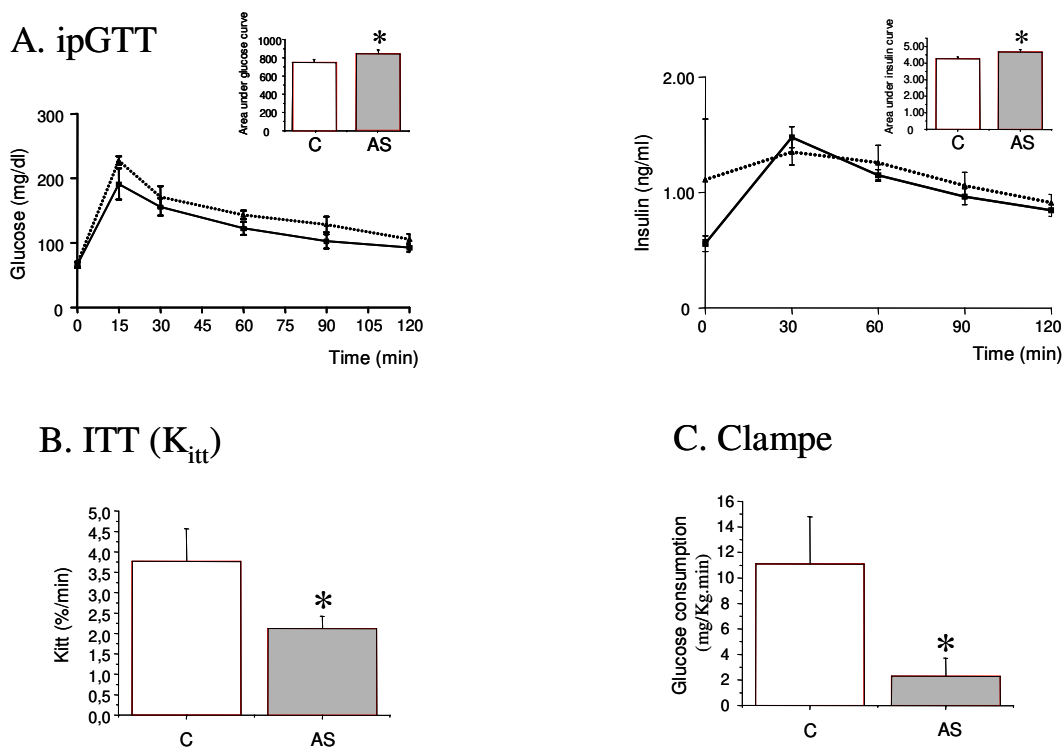


Figura 2- Efeitos do tratamento com AS IRS-1 sobre secreção e ação da insulina medidas através de GTT (A) e da ação da insulina medida através de ITT (B) e durante o clampe euglicêmico-hiperinsulinêmico (C). Ratos-controles – linhas sólidas, ratos tratados com AS IRS-1 – linhas pontilhadas. Os gráficos menores dizem respeito aos cálculos das áreas abaixo das curvas. Todos os experimentos foram realizados com $n=6$, * $p<0,05$ vs. C.

Efeitos do tratamento com AS IRS-1 sobre a transdução do sinal da insulina

Para avaliar as conseqüências da inibição da expressão de IRS-1 sobre as etapas iniciais e intermediárias da via de sinalização da insulina, ratos foram tratados com oligonucleotídeo antisense IRS-1 e comparados aos ratos-controle tratados com tampão TE. Sob anestesia, foi injetada na veia cava uma dose de insulina ($0,2$ ml, 10^{-6} M), ou salina, e após tempos determinados foram retirados fragmentos de fígado, músculo esquelético e tecido adiposo que foram rapidamente homogeneizados e a seguir empregados em métodos de imunoprecipitação e “imunoblot”. A Figura 3, mostra as conseqüências da inibição da expressão de IRS-1 nas fases iniciais e intermediárias da via de sinalização de insulina em

fígado. Houve uma redução de 50% ($p<0,05$) na fosforilação em tirosina induzida por insulina do IR (Fig. 3A), redução de 40% ($p<0,05$) na fosforilação em tirosina induzida por insulina do IRS-1 (Fig. 3B), redução de 30% ($p<0,05$) na fosforilação em tirosina induzida por insulina da Shc (Fig. 3D), redução de 85% ($p<0,05$) da fosforilação em [Ser⁴⁷³] da Akt (Fig. 3E), e redução de 20% ($p<0,05$) da fosforilação em tirosina da ERK (Fig. 3F). Não houve modulação significativa da fosforilação em tirosina induzida por insulina do IRS-2 nesse tecido (Fig. 3C). A Figura 4 mostra as consequências da inibição da expressão de IRS-1 nas fases iniciais e intermediárias da via de sinalização de insulina em músculo esquelético. Houve uma redução de 30% ($p<0,05$) da fosforilação em tirosina induzida por insulina do IR (Fig. 4A), redução de 50% ($p<0,05$) da fosforilação em tirosina induzida por insulina do IRS-1 (Fig. 4B), redução de 30% ($p<0,05$) da fosforilação em tirosina induzida por insulina da Shc (Fig. 4D), redução de 40% ($p<0,05$) da fosforilação em [Ser⁴⁷³] da Akt (Fig. 4E), e uma redução de 30% ($p<0,05$) da fosforilação em tirosina da ERK (Fig. 4F). Mais uma vez, não houve alteração significativa da fosforilação em tirosina do IRS-2 nesse tecido. Finalmente a Figura 5 mostra as consequências da inibição aguda da expressão de IRS-1 sobre as etapas iniciais e intermediárias da via de sinalização da insulina em tecido adiposo. Houve uma redução de 60% ($p<0,05$) da fosforilação induzida por insulina do IR (Fig. 5A), uma redução de 60% ($p<0,05$) da fosforilação induzida por insulina do IRS-1 (Fig. 5B), redução de 40% da fosforilação induzida por insulina da Shc (Fig. 5D) e redução de 85% ($p<0,05$) da fosforilação em [Ser⁴⁷³] da Akt (Fig. 4E). De forma surpreendente, houve um aumento significativo (50%) da fosforilação induzida por insulina do IRS-2 (Fig. 5C) e (25%) da ERK ($p<0,05$) (Fig. 5F).

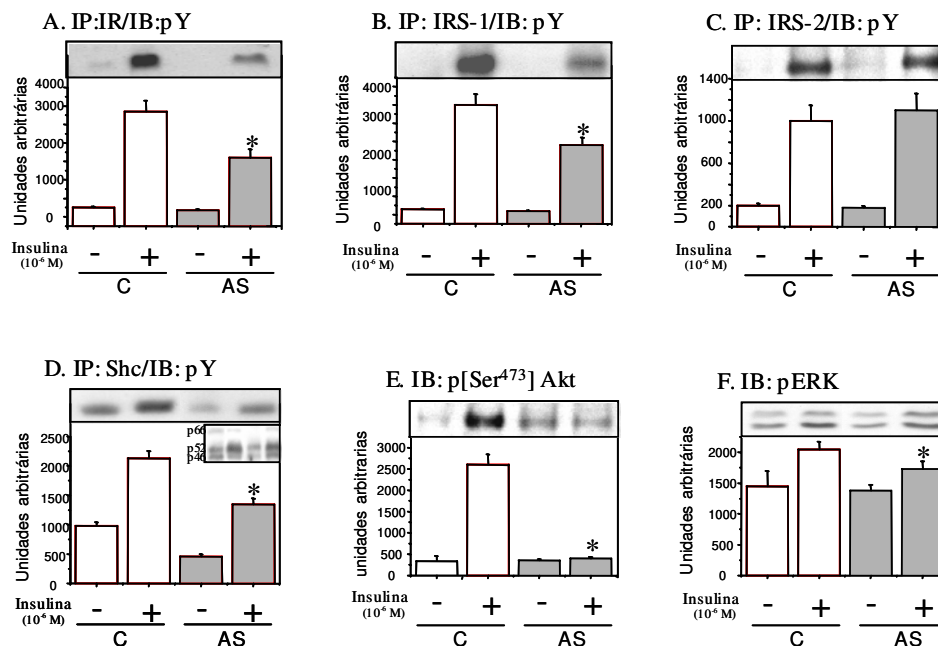


Figura 3- Efeitos da inibição da expressão de IRS-1 (AS) sobre a ativação de elementos moleculares da via de sinalização da insulina em fígado. Os ratos foram anestesiados e a seguir foi injetada salina (-) ou insulina (+) (0,2 ml, 10⁻⁶M) através da veia cava. Após 30 s (A, B, C e D) ou 5 min (E e F), fragmentos de fígado foram obtidos, homogeneizados, centrifugados e coletados alíquotas (5,0 mg) do sobrenadante que foram usados em ensaios de imunoprecipitação (IP) com anticorpo anti-IR (A), IRS-1 (B), IRS-2 (C) e Shc (D). Os imunoprecipitados foram a seguir separados por SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose, e estas foram expostas ao anticorpo anti-fosfotirosina (pY). Nos experimentos (E e F), foram coletadas amostras (0,2mg) do extrato protéico total, separados por SDS-PAGE transferidos para membrana de nitrocelulose e expostas aos anticorpos anti-fosfo [Ser⁴⁷³] Akt (E) ou anti-fosfo ERK (pERK) (F). As bandas obtidas foram avaliadas por meio de densitometria. Em D, as unidades arbitrárias densitométricas foram obtidas das médias dos valores densitométricos das bandas correspondentes de três isoformas da Shc (p66, p52 e p46). Em todos os experimentos n=6, *p<0,05 vs. C.

Inibição da expressão de IRS-1 leva a um aumento da fosforilação em serina e maior associação entre PTP1B e IR

Para avaliar as possíveis razões pelas quais o tratamento com AS IRS-1 leva à redução da fosforilação em tirosina do IR induzida por insulina em todos os tecidos estudados, ratos foram tratados com oligonucleotídeo sense e antisense para o IRS-1 ou tampão TE para estudar a fosforilação em serina induzida por insulina e a associação de PTP1B ao IR. Como mostra a Figura 6A, a inibição da expressão do IRS-1 leva a um aumento significativo da fosforilação do IR em serina em fígado (90%, $p<0,05$), músculo esquelético (55%, $p<0,05$) e tecido adiposo (110%, $p<0,05$). Da mesma forma, como mostra a Figura 6B, a inibição da expressão de IRS-1 leva a um aumento significativo da associação do IR a PTP1B em fígado (45%, $p<0,05$), músculo esquelético (55%, $p<0,05$) e tecido adiposo (80%, $p<0,05$).

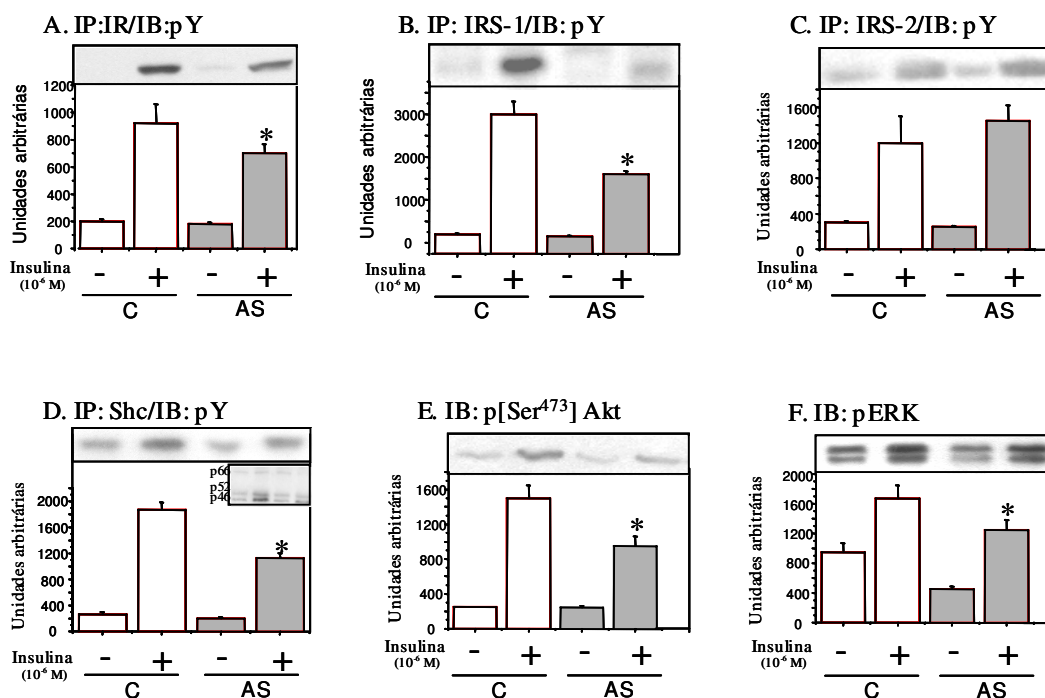


Figura 4- Efeitos da inibição da expressão de IRS-1 (AS) sobre a ativação de elementos moleculares da via de sinalização da insulina em músculo esquelético. Os ratos foram anestesiados e a seguir foi injetada salina (-) ou insulina (+) (0.2 ml, 10⁻⁶M) através da veia cava. Após 90 s (A, B, C e D) ou 5 min (E e F), fragmentos de músculo gastrocnêmio foram obtidos, homogeneizados, centrifugados e coletados alíquotas (5,0 mg) do sobrenadante que foram usados para imunoprecipitar (IP) com anticorpo anti-IR (A), IRS-1 (B), IRS-2 (C) e Shc (D), a seguir separados por SDS-PAGE, transferidos para membrana e estas foram expostas ao anticorpo anti-fosfotirosina (pY). Nos experimentos (E e F), foram coletadas amostras (0,2mg) do extrato protéico total, separadas por SDS-PAGE transferidas em membrana de nitrocelulose e expostas ao anticorpos anti-fosfo [Ser⁴⁷³]Akt (E) ou anti-fosfo ERK(pERK) (F). As bandas obtidas foram avaliadas por meio de densitometria. Em D, as unidades arbitrárias densitométricas foram obtidas das médias dos valores densitométricos das bandas correspondentes de três isoformas da Shc (p66, p52 e p46). Em todos os experimentos foram n=6, *p<0,05 vs. C.

O efeito de AS IRS-1 sobre a migração de GLUT-4 para membrana plasmática

Para avaliar as consequências funcionais da diminuição da transdução do sinal da insulina através de IR/IRS-1/Akt em músculo e tecido adiposo de ratos tratados com AS IRS-1, foi injetado uma dose de insulina (0,2 ml, 10^{-6} M) ou de salina e após 10 min, foram retirados fragmentos de tecido adiposo periepididimal e músculo gastrocnêmio e rapidamente homogeneizados em tampão específico. O extrato total, citosólico e de membrana obtido foi separado por SDS-PAGE, transferido para membrana de nitrocelulose e submetido a “imunoblot” com anticorpo anti-GLUT-4. Como mostra Figura 7, a inibição da expressão de IRS-1 não promove modulação significativa da expressão total de GLUT-4 em músculo e tecido adiposo (Fig. 7A e 7B, “Western blots” superiores). Porém, houve uma tendência de diminuição em ambos os tecidos. Da mesma forma, não houve modulação significativa da expressão de GLUT-4, em extrato citosólico em músculo e tecido adiposo de ratos tratados com AS IRS-1. (Fig. 7A e 7B, “Western blots” intermediários). Todavia, a inibição da expressão de IRS-1, levou a uma diminuição significativa da expressão de GLUT-4 em membrana de músculo e tecido adiposo visceral (Fig. 7A e 7B, “Western blots” inferiores). Os níveis de GLUT-4, em frações de extrato total, citosólico e de membrana foram similares em ratos tratados com AS IRS-1 ou controles e que não receberam injeção aguda de insulina.

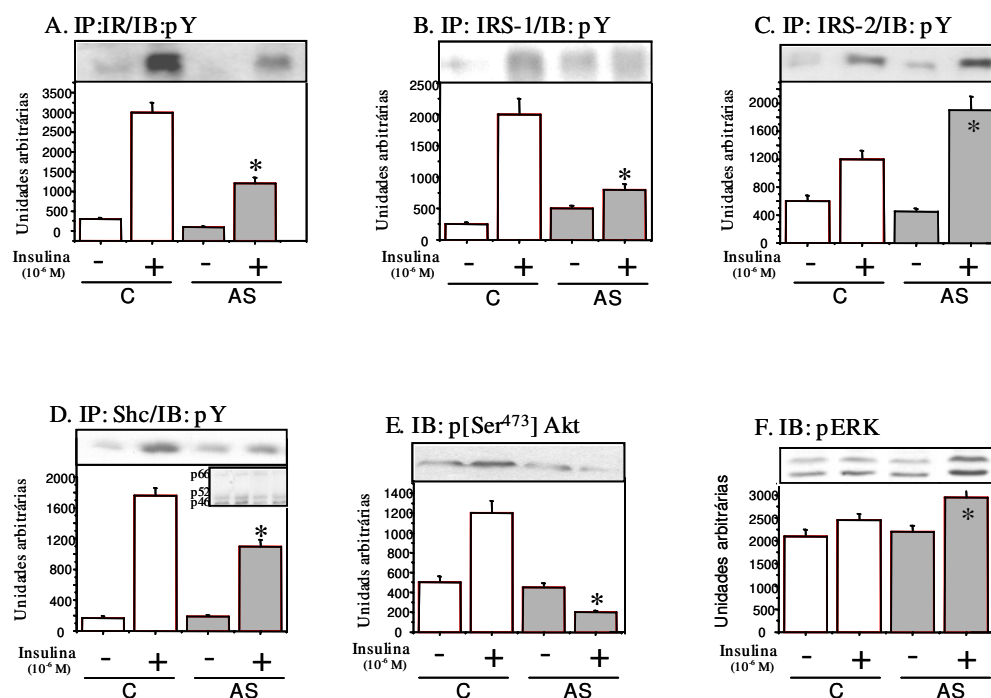


Figura 5- Efeitos da inibição da expressão de IRS-1 (AS) sobre a ativação de elementos moleculares da via de sinalização da insulina em tecido adiposo. Os ratos foram anestesiados e a seguir foi injetada salina (-) ou insulina (+) (0.2 ml, 10⁻⁶M) através da veia cava. Após 120 s (A, B, C e D) ou 5 min (E e F), fragmentos de tecido adiposo foram obtidos, homogeneizados, centrifugados e coletados alíquotas (5,0 mg) do sobrenadante que foram usados para imunoprecipitar (IP) com anticorpo anti-IR (A), IRS-1 (B), IRS-2 (C) e Shc (D), a seguir separados por SDS-PAGE, transferidos para membrana e estas foram expostas ao anticorpo anti-fosfotirosina (pY). Nos experimentos (E e F), foram coletadas amostras (0,2mg) do extrato protéico total, separados por SDS-PAGE transferidos em membrana de nitrocelulose e expostas aos anticorpos anti-fosfo [Ser⁴⁷³]Akt (E) ou anti-fosfo ERK(pERK) (F). As bandas obtidas foram avaliadas por meio de densitometria. Em D, as unidades arbitrárias densitométricas foram obtidas das médias dos valores densitométricos das bandas correspondentes de três isoformas da Shc (p66, p52 e p46). Em todos os experimentos foram n=6, *p<0,05 vs. C.

Efeitos da inibição da expressão de IRS-1 na captação de glicose em tecido específico

Para avaliar os efeitos da inibição da expressão de IRS-1 sobre a captação de glicose em tecido específico, foi realizado o ensaio de captação de 2-deoxi-D-[³H] glicose (2-DG). Em fígado, a inibição da expressão de IRS-1 não exerceu efeito na captação de glicose em situação basal ou estimulada de insulina (Fig. 7C). Porém, como esperado, em músculo esquelético, a inibição da expressão de IRS-1 levou a uma redução significativa da captação de glicose estimulada por insulina (25%, $p < 0,05$) (Fig. 7D). Finalmente, em tecido adiposo, a inibição da expressão de IRS-1 não promoveu queda significativa na captação de glicose estimulada por insulina (20%, $p = 0,074$) e, de forma surpreendente houve um aumento significativo na captação de glicose em situação basal de insulina (80%, $p < 0,05$) (Fig. 7E).

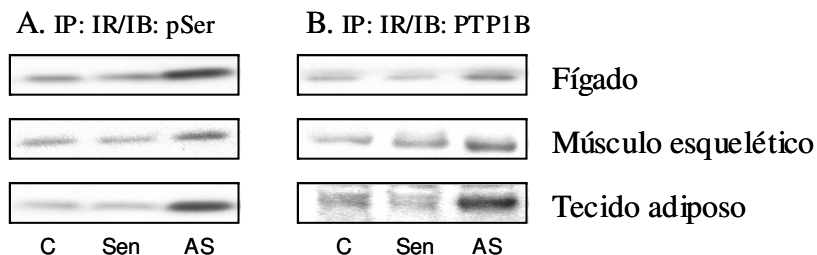


Figura 6- Efeito da inibição da expressão de IRS-1 (AS) sobre a fosforilação em serina (pSer) e associação de PTP1B ao IR em fígado, músculo esquelético e tecido adiposo de ratos. Fragmentos de fígado, músculo esquelético e tecido adiposo foram homogeneinizados e amostras (5,0 mg) de extrato total obtido foram usados para experimentos de imunoprecipitação (IP) com anticorpos anti-IR. Os imunocomplexos foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e expostas aos anticorpos anti-fosfoserina (pSer) (A) e anticorpos anti-PTP1B (B). As bandas específicas foram analisadas por meio de densitometria. Todas as condições foram $n=5$, $p < 0,05$ AS vs C.

A inibição da expressão de IRS-1 leva a um aumento da adiposidade visceral e aumento da expressão de PPAR- γ

A observação de que a inibição da expressão de IRS-1 leva a um aumento da sinalização de insulina em tecido adiposo através da via de sinalização da ERK, que está relacionada com crescimento, levou-nos a avaliar a implicação deste fenômeno sobre a

massa de tecido adiposo visceral, após o tratamento com AS IRS-1, durante um período maior de tempo. Para isto, ratos foram tratados durante oito dias com AS IRS-1, Sen IRS-1 ou tampão TE e, na manhã do nono dia, os animais foram anestesiados e submetidos à remoção de todo o tecido adiposo da região periepididimal. Outro grupo de ratos foram submetidos a tratamento similar e a gordura periepididimal foi removida para fracionamento subcelular e avaliação da expressão de PPAR- γ . Não houve diferenças significativas na variação de peso corpóreo (Fig. 8A) e na ingestão alimentar de 24h (Fig. 8B) entre os grupos. No entanto, houve aumento significativo na variação de peso corpóreo entre os ratos tratados com AS IRS-1 (controle, $0,635 \pm 0,025$ g/dia; sense IRS-1, $0,625 \pm 0,289$ g/dia; AS IRS-1, $1,125 \pm 0,325$ g/dia, $n=6$, $p<0,05$), e um significativo aumento na variação intrapar de massa de gordura periepididimal (Fig. 8C). Finalmente, a expressão de PPAR- γ tanto em extrato total como em extrato nuclear estavam significativamente aumentados em tecido adiposo de ratos tratados com AS IRS-1 (Fig. 8D).

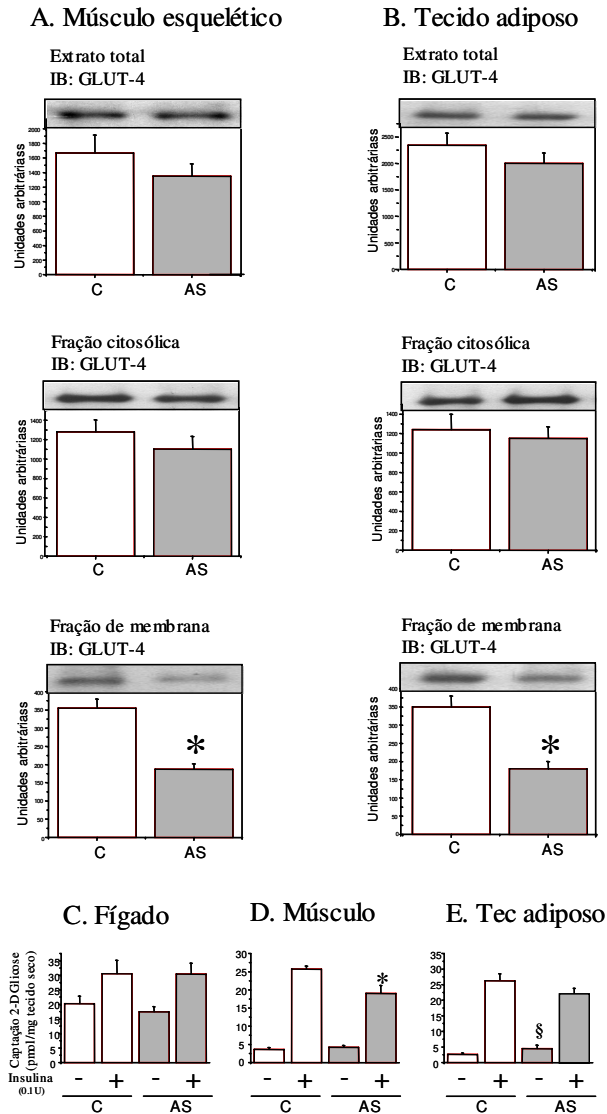


Figura 7- Efeitos da inibição de IRS-1 (AS) sobre a distribuição subcelular de GLUT-4 em músculo esquelético (A) e tecido adiposo (B) e sobre a captação de 2DG em fígado (C), músculo esquelético (D) e tecido adiposo (E). Após estímulo com insulina fragmentos de músculo esquelético e tecido adiposo foram retirados nos tempos pré-determinados, homogeneizados e amostras (0,2mg) de extrato total obtido foram usados para experimentos de fracionamento subcelular. Os extratos obtidos foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e expostos ao anticorpo anti-GLUT-4. As bandas específicas foram analisadas por meio de densitometria. O ensaio de captação de glicose foi realizado de acordo com o protocolo já descrito em Materiais e Métodos. Todas as condições foram n=5, *p<0,05 vs. C+, §p<0,05 vs. C-.

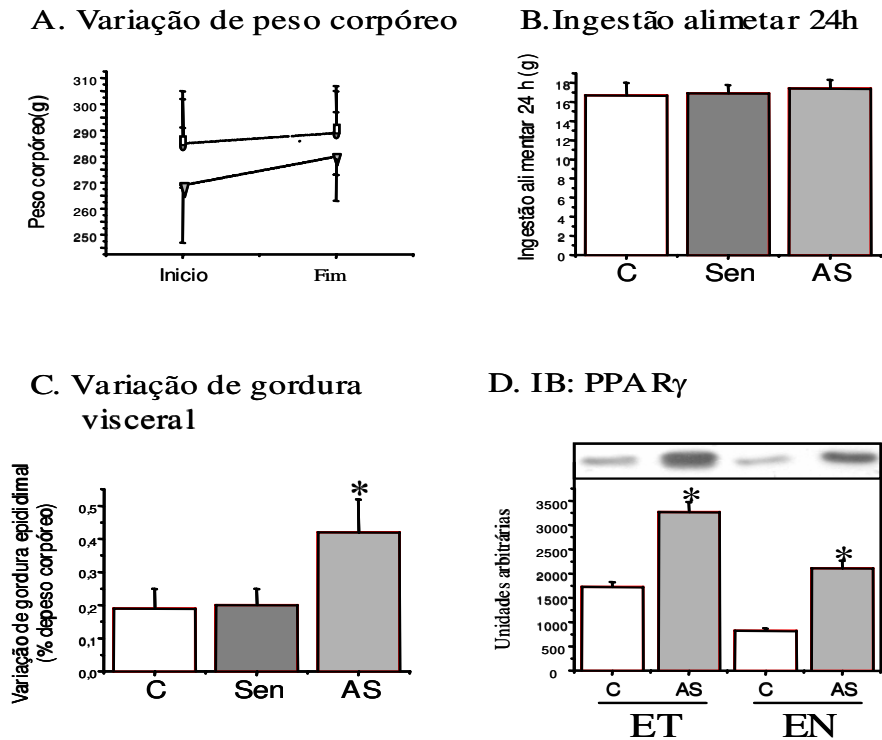


Figura 8- Efeitos da inibição da expressão de IRS-1 (AS ou triângulo invertido, Controle ou quadrado) sobre a variação de peso (A), ingestão de alimento em 24 h (B), variação de peso da gordura visceral (C) e expressão de PPAR γ (D) em extrato total (ET) ou extrato nuclear (EN) de tecido adiposo visceral. Em todos os experimentos, n=6, *p<0,05 vs. C.

5- DISCUSSÃO

Obesidade e DM2 alcançaram proporções epidêmicas em várias regiões do mundo (ZIMMET et al, 2001 e OGDEN et al, 2003). Resistência à ação da insulina é o principal fator predisponente ao desenvolvimento de DM2, e se manifesta com frequência em pacientes obesos que não apresentam o quadro clínico e laboratorial de diabetes (VAAG et al, 1995). Muitos estudos realizados com humanos e com modelos animais de resistência à insulina e diabetes têm demonstrado defeitos moleculares progressivos na maquinaria de sinalização da insulina em músculo esquelético, tecido adiposo e fígado (SAAD et al, 1992; CARVALHO et al, 1996; BJORNHOLM et al, 2002).

Por outro lado, sabendo-se que a inibição da lipólise e o armazenamento de triglicérides em tecido adiposo são eventos regulados pela insulina, a razão pela qual se observa a manutenção do armazenamento de gordura, ou mesmo um contínuo ganho de peso corpóreo (muitas vezes devido ao aumento de massa de tecido adiposo), mesmo após a instalação da resistência à insulina, tem sido uma questão de intenso debate (TRAVERS et al, 2002; MOSCA et al, 2004). Em estudos recentes, Mosca e colaboradores (MOSCA et al, 2004) revelaram que indivíduos que apresentam resistência à insulina são particularmente suscetíveis ao ganho de peso associado com ingestão de alimentos ricos em gordura. O mesmo verificou-se ao estudar duas populações distintas geneticamente, índios Pima (ODELEYE et al, 1997) e chineses da ilha Maurício (HODGE et al, 1996); os quais apresentam resistência à insulina associado ao ganho de peso. Por outro lado, em duas outras populações, os indianos e os creolos (HODGE et al, 1996), encontrou-se uma relação inversa entre ganho de peso e resistência à insulina. Da mesma forma, Folsom e colaboradores (FOLSOM et al, 1998) relataram que em pacientes com variações genéticas similares aos dois casos anteriores, observa-se uma associação direta e inversa entre resistência à insulina e ganho de peso. Finalmente, em dois trabalhos recentes (TRAVERS et al, 2000 e GIACCO et al, 2004), foi demonstrada uma relação inversa entre resistência à insulina e o desenvolvimento da obesidade. Portanto, baseado em dados clínicos, pode-se dizer que fatores genéticos, idade e condições ambientais, como composição da dieta podem favorecer a associação entre resistência à insulina e ganho de peso.

A insulina liga-se a seu receptor específico promovendo a ativação da função tirosina quinase da subunidade catalítica β . A seguir, agindo através do próprio receptor e de substratos do receptor, exerce seus múltiplos efeitos em diversos órgãos

insulino-sensíveis (SALTIEL e KAHN, 2001). As proteínas IRS, particularmente IRS-1 e IRS-2, são os substratos do receptor de insulina mais estudados. Essas proteínas exercem funções de ancoradouros para substratos indiretos dos receptores de insulina e de IGF-1. Através destes ocorre a ativação da fosfatidilinositol 3 quinase (PI 3-quinase) e a cascata da ERK (WHITE, 2002), por exemplo. Atuando por meio da via da PI 3-quinase, a insulina promove ativação da Akt, controlando alguns fenômenos metabólicos como a captação de glicose, a síntese de glicogênio, a síntese de proteínas e lípidos além de exercer efeito sobre mecanismos reguladores da apoptose (BURGERING e COFFER, 1995; CROSS et al, 1995). Por outro lado, através da ativação da cascata da ERK, a insulina controla o crescimento e diferenciação celulares e a mitogênese (TOBE et al, 1992; AVRUCH et al, 2001).

Na primeira etapa deste estudo, nós examinamos os efeitos metabólicos e moleculares da inibição, por curto período de tempo, da expressão de IRS-1 em ratos Wistar. O tratamento com AS IRS-1 foi extremamente efetivo na inibição da expressão da proteína alvo em fígado, músculo e tecido adiposo e, como consequência, os animais se tornaram resistentes à insulina. Não houve evidências clínicas ou laboratoriais de desenvolvimento de diabetes depois de oito dias de tratamento com AS IRS-1, o qual ocorreu, provavelmente, em razão da capacidade das células β de suprirem a nova demanda. O exame cuidadoso da curva de insulina durante o ipGTT (particularmente o incremento do tempo 0 para o tempo 30 min) sugere que há perda da primeira fase de secreção de insulina e intolerância à glicose. Anomalia, na primeira fase de secreção de insulina, acompanhada por intolerância à glicose é descrita como um indício da falência da secreção de insulina que acompanha o quadro de DM2 (MATHIS et al, 2001). Desta forma, demonstramos que a inibição por curto período de tempo da expressão de IRS-1 leva a resistência à insulina, a qual é acompanhada por uma resposta compensatória, porém defeituosa das células β pancreáticas. É interessante observar que em camundongos *knockout* de IRS-1 tanto homozigotos quanto heterozigotos, as ilhotas pancreáticas apresentam defeitos de secreção de insulina após o estímulo com glicose e arginina (KULKARNI et al, 1999). Além disso, ilhotas pancreáticas que não apresentam manipulação genética ou ilhotas de ratos de linhagens não diabéticas, quando tratadas com oligonucleotídeo antisense IRS-1, como realizamos nos estudos de mestrado (ARAUJO

et al, 2002) ou numa etapa que precedeu o desenvolvimento deste estudo (ARAÚJO et al, 2004), apresentam um aumento da secreção de insulina estimulada por glicose. Portanto, estes dados sustentam a hipótese de que a perda da primeira fase de secreção de insulina esteja associada a hiperinsulinemia e a resistência à insulina, e que tal fenômeno possa decorrer de um defeito comum da função do IRS-1 na periferia e ilhota pancreática.

A etapa seguinte constituiu-se da avaliação dos efeitos da inibição da expressão do IRS-1 na regulação das vias de sinalização da insulina que levam à ativação da Akt e ERK. Como esperado, a sinalização da insulina através de IRS-1 e Akt foi reduzida em todos os tecidos estudados. E também a sinalização da insulina através de Shc apresentou-se reduzida. Observou-se ainda que a fosforilação em tirosina do IR induzida por insulina estava significativamente diminuída em fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, um fenômeno que não é observado em camundongos “knockout” de IRS-1 (YAMAUCHI et al, 1996 e VALVERDE et al, 1999). Na nossa opinião existem, no mínimo, três razões para isso acontecer. Inicialmente, isso pode ser uma questão de estequiometria. Uma vez que IRS-1 e IRS-2 se ligam ao mesmo sítio do IR, e IRS-1 está expresso em menor concentração isso poderia levar a uma maior interação entre IRS-2 e IR, o que poderia levar a maior fosforilação em tirosina induzida por insulina do IRS-2, mesmo em face de uma menor fosforilação em tirosina de IR. Em segundo lugar, o balanço entre ativação e repressão das proteínas tirosina fosfatases que regulam negativamente a fosforilação do IR e seus substratos, IRS-1 e IRS-2 (ASANTE-APPIAH et al, 2003; HIRATA et al, 2003). No camundongo “knockout” do IRS-1, a ausência de IRS-1 é acompanhada por um aumento da expressão de IRS-2. Ao contrário, em ratos tratados com oligonucleotídeo AS IRS-1, não houve aumento da expressão de IRS-2 durante o período experimental avaliado. A falta de IRS-1 sem um aumento compensatório de IRS-2 pode facilitar a ligação das proteínas fosfatases ao IR, levando a uma desfosforilação precoce deste. Outra possibilidade é que a diminuição da expressão de IRS-1, sem um aumento compensatório da expressão de IRS-2, pode afetar a regulação da ativação das serinas quinases induzidas por insulina que catalisam a fosforilação em serina do IR, um fenômeno que notoriamente emperra a ativação induzida por insulina do seu receptor (BOLLAG et al, 1986; LIU et al, 2001). Verificamos duas destas hipóteses através da imunoprecipitação com anticorpo anti-IR e “Western blot” com anticorpos anti-fosfoserina e anti-PTP1B.

Em todos os tecidos avaliados, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, houve um aumento da fosforilação em serina do IR e da sua associação com a proteína PTP1B. Na verdade, nós não investigamos as demais serinas quinases envolvidas em outros eventos fisiológicos ou patológicos do controle da sinalização da insulina, como por exemplo, PKC- α , PKC- δ e m-TOR (BOLLAG et al, 1986; ZICK, 2003). Sabe-se que a associação entre IR e PTP1-B ocorre da mesma forma em dois modelos animais de obesidade, o Goto-Kikazaki e o rato tratado com glutamato monossódico (MSG) (DADKE et al, 2000; HIRATA et al, 2003). Em ambos, há reduzida fosforilação em tirosina do IR que está acompanhada do aumento da associação e da função catalítica da PTP1B. Portanto, podemos concluir que a curta inibição da expressão de IRS-1 pode interferir com a fosforilação em tirosina do IR através de no mínimo dois mecanismos, fosforilação em serina do IR, e atividade aumentada das proteínas fosfatases.

A respeito da ativação da via de sinalização da insulina relacionada ao crescimento celular, a cascata da MAP-quinase, a qual foi avaliada através da determinação da fosforilação em tirosina induzida por insulina da ERK1 e ERK2, surpreendeu-nos o fato de que a redução da expressão de IRS-1 levou à redução da ativação de ERK1 e ERK2 em fígado e em músculo esquelético, o que foi acompanhado de um contrastante e significativo aumento da atividade de ERK1 e ERK2 em tecido adiposo. Tal fenômeno foi acompanhado por uma maior fosforilação em tirosina induzida por insulina do IRS-2 apenas nesse tecido. Em camundongos *knockout* de IRS-1, foi observado diminuição da atividade da via de sinalização da insulina, mas não foi observada ativação da ERK nos tecidos de animais vivos e em cultura de células (YAMAUCHI et al, 1996; BRUNING et al, 1997b). Porém, há dados controversos na literatura, relatando que a ERK desempenha função de crescimento e diferenciação em tecido adiposo. Alguns estudos mostram que a ativação das proteínas ERK pela insulina promove mitogênese acompanhado de inibição da diferenciação (FONT DE MORA et al, 1997; KIM et al, 2001), enquanto outros mostram que a ERK promove diferenciação do pré-adipócito em adipócito (ZHANG et al, 1996 e MACHINAL-QUELIN et al, 2002). Em um estudo recente, Prusty e colaboradores (PRUSTY et al 2002) observaram que, em pré-adipócitos 3T3-L1, a insulina induz ativação precoce e transitória da ERK, a qual induz a expressão de C/EBP α and PPAR- γ , que são fatores transcricionais envolvidos, respectivamente, com a diferenciação de pré-adipócitos

e a adipogênese (ROSEN et al, 2000). Esses autores concluíram que, durante a diferenciação de adipócitos a ERK exerce um efeito positivo participando de fases iniciais de sua indução. Porém, a completa diferenciação de adipócitos pode ocorrer através da ativação do PPAR- γ que participa do controle de etapas subsequentes da adipogênese. No estudo realizado por ZHANG et al. (1996), observou-se que a insulina pode promover a ativação do PPAR- γ através da ERK, em adipócitos em cultura. É interessante ressaltar que em um estudo clínico recente avaliaram-se 1.152 genes em tecido adiposo omental de pacientes magros e obesos, revendo-se que, entre outros, os genes que codificam as proteínas da família da MAP-quinase estavam significativamente aumentados em pacientes obesos (GOMEZ-AMBROSI et al, 2004). De acordo com esse estudo, a atividade das proteínas da família MAP-quinase em tecido adiposo de pacientes obesos pode participar tanto de eventos relacionados com ganho de peso como no controle da adipogênese.

Para determinar o efeito da inibição aguda da expressão de IRS-1 sobre eventos controlados pela insulina, foram avaliadas a expressão subcelular de GLUT-4 e a captação de glicose pelos tecidos periféricos. Foi demonstrado que em músculo esquelético a inibição da expressão de IRS-1 reduz a migração de GLUT-4 para a membrana celular, e isso foi acompanhado pela redução significativa da captação de glicose induzida por insulina. Em tecido adiposo, houve uma redução da migração de GLUT-4 para a membrana celular que foi acompanhada por uma tendência de redução de captação de glicose induzida por insulina, porém com um aumento da captação basal de glicose. Em nossa opinião, este é um fenômeno interessante que pode contribuir para explicar a razão pela qual há um aumento da massa de gordura nesse modelo animal. Em um estudo recente realizado em nosso laboratório (THIRONE et al, 2004), verificou-se que em um modelo animal de obesidade ocorre o aumento da ativação da via de sinalização Cap/Cbl em paralelo à inibição da via de sinalização do IRS-1 (CHIANG et al, 2001). Estes dados sugerem que a inibição da via de sinalização através de IRS-1 (que pode ser encontrado através de uma inibição direta com oligonucleotídeo antisense, ou indiretamente através de mecanismos desconhecidos, como em um modelo animal de obesidade) leva à ativação de mecanismos que mantém a captação de glicose exclusivamente em tecido adiposo e permite um contínuo crescimento da massa de gordura mesmo quando o animal é resistente a insulina.

Estes efeitos foram documentados nesta fase do projeto por meio da avaliação da variação de ganho da massa corpórea e a expressão do fator de transcrição PPAR- γ . A relação de ganho de massa corpórea e a variação da massa de tecido adiposo visceral sofreram aumentos significativos em ratos tratados com AS IRS-1. Além disso, as expressões total e nuclear de PPAR- γ foram significativamente aumentadas pela inibição de IRS-1.

Na nossa opinião, há dois achados importantes nesta parte do estudo. Primeiro foi demonstrado que a inibição de curta duração da expressão do IRS-1 é suficiente para produzir um fenótipo de resistência à insulina e, além disso, obteve-se um método barato, fácil e reprodutível para se criar um modelo de resistência à insulina, sem manipulações genéticas. Em segundo lugar, a inibição de curta duração da expressão de IRS-1 induz resistência funcional e molecular à insulina em músculo e, paralelamente, ativação da via de sinalização da insulina relacionada a crescimento celular em tecido adiposo. Estes achados oferecem novos subsídios para o entendimento da complexa relação entre resistência à insulina e o ganho contínuo de massa adiposa, colocando o defeito da transdução do sinal através de IRS-1 em uma posição central neste cenário.

6- CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, neste estudo, podemos concluir que a inibição da expressão de IRS-1, *in vivo*, por um período curto de tempo promove:

- Resistência molecular e funcional à ação da insulina;
- Aumento da massa corpórea em decorrência do aumento de gordura intra-abdominal;
- Ativação de uma via de crescimento exclusivamente em tecido adiposo branco.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSI, D. R.; COHEN, P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev*, 1: 55-62, 1998.

ARAUJO, E. P.; AMARAL, M. E.; FILIPUTTI, E.; DE SOUZA, C. T.; LAURITO, T. L.; AUGUSTO, V. D. et al. Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *J Endocrinol*, 1: 25-38, 2004.

ARAUJO, E. P.; AMARAL, M. E.; SOUZA, C. T.; BORDIN, S.; FERREIRA, F.; SAAD, M. J. et al. Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. *FEBS Lett*, 3: 437-42, 2002.

ASANTE-APPIAH, E.; KENNEDY, B. P. Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 4: E663-70, 2003.

AVRUCH, J.; KHOKHLATCHEV, A.; KYRIAKIS, J. M.; LUO, Z.; TZIVION, G.; VAVVAS, D. et al. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res*, 127-55, 2001.

BACKER, J. M.; MYERS, M. G., JR.; SHOELSON, S. E.; CHIN, D. J.; SUN, X. J.; MIRALPEIX, M. et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *Embo J*, 9: 3469-79, 1992.

BJORNHOLM, M.; AL-KHALILI, L.; DICKER, A.; NASLUND, E.; ROSSNER, S.; ZIERATH, J. R. et al. Insulin signal transduction and glucose transport in human adipocytes: effects of obesity and low calorie diet. *Diabetologia*, 8: 1128-35, 2002.

BOLLAG, G. E.; ROTH, R. A.; BEAUDOIN, J.; MOCHLY-ROSEN, D.; KOSHLAND, D. E. JR. Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 16: 5822-4, 1986.

BONORA, E.; MANICARDI, V.; ZAVARONI, I.; COSCELLI, C.; BUTTURINI, U. Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. *Diabete Metab*, 2: 116-21, 1987.

BOULTON, T. G.; NYE, S. H.; ROBBINS, D. J.; IP, N. Y.; RADZIEJEWSKA, E.; MORGENBESSER, S. D.; DEPINHO, R. A.; PANAYOTATOS, N.; COBB, M. H.; YANCOPOULOS, G. D. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, 4: 663-75, 1991.

BRUNET, A.; BONNI, A.; ZIGMOND, M. J.; LIN, M. Z.; JUO, P.; HU, L. S. et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 6: 857-68, 1999.

BRUNING, J. C.; WINNAY, J.; BONNER-WEIR, S.; TAYLOR, S. I.; ACCILI, D.; KAHN, C. R. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell*, 4: 561-72, 1997a.

BRUNING, J. C.; WINNAY, J.; CHEATHAM, B.; KAHN, C. R. Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells. *Mol Cell Biol*, 3: 1513-21, 1997b.

BURGERING, B. M.; COFFER, P. J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, 6541: 599-602, 1995.

CAHILL, G. F. JR. Beta-cell deficiency, insulin resistance, or both? *N Engl J Med*, 19: 1268-70, 1988.

CARVALHO, C. R.; BRENELLI, S. L.; SILVA, A. C.; NUNES, A. L.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology*, 1: 151-9, 1996.

CHIANG, S. H.; BAUMANN, C. A.; KANZAKI, M.; THURMOND, D. C.; WATSON, R. T.; NEUDAUER, C. L. et al. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature*, 6831: 944-8, 2001.

CROSS, D. A.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMINGS, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 6559: 785-9, 1995.

DADKE, S. S.; LI, H. C.; KUSARI, A. B.; BEGUM, N.; KUSARI, J. Elevated expression and activity of protein-tyrosine phosphatase 1B in skeletal muscle of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 3: 583-9, 2000.

DEFRONZO, R. A.; TOBIN, J. D.; ANDRES, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*, 3: E214-23, 1979.

ELCHEBLY, M.; PAYETTE, P.; MICHALISZYN, E.; CROMLISH, W.; COLLINS, S.; LOY, A. L. et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, 5407: 1544-8, 1999.

FOLSOM, A. R.; VITELLI, L. L.; LEWIS, C. E.; SCHREINER, P. J.; WATSON, R. L.; WAGENKNECHT, L. E. Is fasting insulin concentration inversely associated with rate of weight gain? Contrasting findings from the CARDIA and ARIC study cohorts. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1: 48-54, 1998.

FONT DE MORA, J.; PORRAS, A.; AHN, N.; SANTOS, E. Mitogen-activated protein kinase activation is not necessary for, but antagonizes, 3T3-L1 adipocytic differentiation. *Mol Cell Biol*, 10: 6068-75, 1997.

GASPARETTI, A. L.; DE SOUZA, C. T.; PEREIRA-DA-SILVA, M.; OLIVEIRA, R. L.; SAAD, M. J.; CARNEIRO, E. M. et al. Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. *J Physiol*, Pt 1: 149-62, 2003.

GIACCO, R.; CLEMENTE, G.; BUSIELLO, L.; LASORELLA, G.; RIVIECCIO, A. M.; RIVELLESE, A. A. et al. Insulin sensitivity is increased and fat oxidation after a high-fat meal is reduced in normal-weight healthy men with strong familial predisposition to overweight. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2: 342-8, 2004.

GOMEZ-AMBROSI, J.; CATALAN, V.; DIEZ-CABALLERO, A.; MARTINEZ-CRUZ, L. A.; GIL, M. J.; GARCIA-FONCILLAS, J. et al. Gene expression profile of omental adipose tissue in human obesity. *Faseb J*, 1: 215-7, 2004.

- HIRATA, A. E.; ALVAREZ-ROJAS, F.; CARVALHEIRA, J. B.; CARVALHO, C. R.; DOLNIKOFF, M. S.; ABDALLA SAAD, M. J. Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. *Life Sci*, 11: 1369-81, 2003.
- HODGE, A. M.; DOWSE, G. K.; ALBERTI, K. G.; TUOMILEHTO, J.; GAREEBOO, H.; ZIMMET, P. Z. Relationship of insulin resistance to weight gain in nondiabetic Asian Indian, Creole, and Chinese Mauritians. Mauritius Non-communicable Disease Study Group. *Metabolism*, 5: 627-33, 1996.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A.; ELLIS, R.; WHITE, M. F.; SPIEGELMAN, B. M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*, 5249: 665-8, 1996.
- KIDO, Y.; BURKS, D. J.; WITHERS, D.; BRUNING, J. C.; KAHN, C. R.; WHITE, M. F.; ACCILI, D. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest*, 2: 199-205, 2000.
- KIDO, Y.; NAKAE, J.; HRIBAL, M. L.; XUAN, S.; EFSTRATIADIS, A.; ACCILI, D. Effects of mutations in the insulin-like growth factor signaling system on embryonic pancreas development and beta-cell compensation to insulin resistance. *J Biol Chem*, 39: 36740-7, 2002.
- KIM, S. W.; MUISE, A. M.; LYONS, P. J.; RO, H. S. Regulation of adipogenesis by a transcriptional repressor that modulates MAPK activation. *J Biol Chem*, 13: 10199-206, 2001.
- KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. *Nature*, 6778: 635-43, 2000.
- KULKARNI, R. N.; WINNAY, J. N.; DANIELS, M.; BRUNING, J. C.; FLIER, S. N.; HANAHAN, D. et al. Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. *J Clin Invest*, 12: R69-75, 1999.
- LEE, J.; PILCH, P. F. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am J Physiol*, 2 Pt 1: C319-34, 1994.

LIU, Y. F.; PAZ, K.; HERSCHKOVITZ, A.; ALT, A.; TENNENBAUM, T.; SAMPSON, S. R. et al. Insulin stimulates PKC ζ -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins. *J Biol Chem*, 17: 14459-65, 2001.

MACHINAL-QUELIN, F.; DIEUDONNE, M. N.; LENEVEU, M. C.; PECQUERY, R.; GIUDICELLI, Y. Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, 4: C853-63, 2002.

MATHIS, D.; VENCE, L.; BENOIST, C. Beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature*, 6865: 792-8, 2001.

MIZUKAMI, Y.; YOSHIOKA, K.; MORIMOTO, S.; YOSHIDA, K. A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem*, 26: 16657-62, 1997.

MOSCA, C. L.; MARSHALL, J. A.; GRUNWALD, G. K.; CORNIER, M. A.; BAXTER, J. Insulin resistance as a modifier of the relationship between dietary fat intake and weight gain. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 6: 803-12, 2004.

MYERS, M. G., JR. WHITE, M. F. The new elements of insulin signaling. Insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains. *Diabetes*, 5: 643-50, 1993.

ODELEYE, O. E.; DE COURTEN, M.; PETTITT, D. J.; RAVUSSIN, E. Fasting hyperinsulinemia is a predictor of increased body weight gain and obesity in Pima Indian children. *Diabetes*, 8: 1341-5, 1997.

OGDEN, C. L.; CARROLL, M. D.; FLEGAL, K. M. Epidemiologic trends in overweight and obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 4: 741-60, vii, 2003.

O'RAHILLY, S.; BARROSO, I.; WAREHAM, N. J. Genetic factors in type 2 diabetes: the end of the beginning? *Science*, 5708: 370-3, 2005.

PEREIRA, M. A.; KARTASHOV, A. I.; EBBELING, C. B.; VAN HORN, L.; SLATTERY, M. L.; JACOBS, D. R. JR. et al. Fast-food habits, weight gain, and insulin resistance (the CARDIA study): 15-year prospective analysis. *Lancet*, 9453: 36-42, 2005.

PRATIPANAWATR, W.; PRATIPANAWATR, T.; CUSI, K.; BERRIA, R.; ADAMS, J. M.; JENKINSON, C. P.; MAEZONO, K.; DEFRONZO, R. A.; MANDARINO, L. J. Skeletal muscle insulin resistance in normoglycemic subjects with a strong family history of type 2 diabetes is associated with decreased insulin-stimulated insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation. *Diabetes*, 11: 2572-8, 2001.

PRUSTY, D.; PARK, B. H.; DAVIS, K. E.; FARMER, S. R. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*, 48: 46226-32, 2002.

RHODES, C. J. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science*, 5708: 380-4, 2005.

RIBON, V.; JOHNSON, J. H.; CAMP, H. S.; SALTIEL, A. R. Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 25: 14751-6, 1998.

RIBON, V.; SALTIEL, A. R. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J*, 839-45, 1997.

ROSEN, E. D.; WALKEY, C. J.; PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*, 11: 1293-307, 2000.

SAAD, M. J.; ARAKI, E.; MIRALPEIX, M.; ROTHENBERG, P. L.; WHITE, M. F.; KAHN, C. R. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest*, 5: 1839-49, 1992.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 6865: 799-806, 2001.

SARBASSOV, D. D.; GUERTIN, D. A.; ALI, S. M.; SABATINI, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 5712: 1098-101, 2005.

SCHWARTZ, M. W.; PORTE, D. JR. Diabetes, obesity, and the brain. *Science*, 5708: 375-9, 2005.

SCOTT, A. M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*, 5: 470-5, 1981.

SHIRAKAMI, A.; TOYONAGA, T.; TSURUZOE, K.; SHIROTANI, T.; MATSUMOTO, K.; YOSHIZATO, K. et al. Heterozygous knockout of the IRS-1 gene in mice enhances obesity-linked insulin resistance: a possible model for the development of type 2 diabetes. *J Endocrinol*, 2: 309-19, 2002.

SHULMAN, G. I. Unraveling the cellular mechanism of insulin resistance in humans: new insights from magnetic resonance spectroscopy. *Physiology (Bethesda)*, 183-90, 2004.

THIRONE, A. C.; CARVALHEIRA, J. B.; HIRATA, A. E.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance. *Endocrinology*, 1: 281-93, 2004.

TOBE, K.; KADOWAKI, T.; HARA, K.; GOTOH, Y.; KOSAKO, H.; MATSUDA, S. et al. Sequential activation of MAP kinase activator, MAP kinases, and S6 peptide kinase in intact rat liver following insulin injection. *J Biol Chem*, 29: 21089-97, 1992.

TRAVERS, S. H.; JEFFERS, B. W.; ECKEL, R. H. Insulin resistance during puberty and future fat accumulation. *J Clin Endocrinol Metab*, 8: 3814-8, 2002.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol*, 2: 158-61, 1969.

VAAG, A.; HENRIKSEN, J. E.; MADSBAD, S.; HOLM, N.; BECK-NIELSEN, H. Insulin secretion, insulin action, and hepatic glucose production in identical twins discordant for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 2: 690-8, 1995.

VALVERDE, A. M.; KAHN, C. R.; BENITO, M. Insulin signaling in insulin receptor substrate (IRS)-1-deficient brown adipocytes: requirement of IRS-1 for lipid synthesis. *Diabetes*, 11: 2122-31, 1999.

WALLACE, T. M.; MATTHEWS, D. R. The assessment of insulin resistance in man. *Diabet Med*, 7: 527-34, 2002.

WATSON, R. T.; SHIGEMATSU, S.; CHIANG, S. H.; MORA, S.; KANZAKI, M.; MACARA, I. G. et al. Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation. *J Cell Biol*, 4: 829-40, 2001.

WHITE, M. F. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 3: E413-22, 2002.

WHITE, M. F.; KAHN, C. R. The insulin signaling system. *J Biol Chem*, 1: 1-4, 1994.

WITHERS, D. J.; BURKS, D. J.; TOWERY, H. H.; ALTAMURO, S. L.; FLINT, C. L.; WHITE, M. F. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet*, 1: 32-40, 1999.

YAMAUCHI, T.; TOBE, K.; TAMEMOTO, H.; UEKI, K.; KABURAGI, Y.; YAMAMOTO-HONDA, R. et al. Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol*, 6: 3074-84, 1996.

ZHANG, B.; BERGER, J.; ZHOU, G.; ELBRECHT, A.; BISWAS, S.; WHITE-CARRINGTON, S. et al. Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*, 50: 31771-4, 1996.

ZICK, Y. Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord*, S56-60, 2003.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 6865: 782-7, 2001.

8- ANEXO

Short-Term *in Vivo* Inhibition of Insulin Receptor Substrate-1 Expression Leads to Insulin Resistance, Hyperinsulinemia, and Increased Adiposity

Eliaana P. Araújo, Cláudio T. De Souza, Alessandra L. Gasparetti, Mirian Ueno, Antonio C. Boschero, Mário J. A. Saad, and Lício A. Velloso

Departments of Internal Medicine (E.P.A., C.T.D.S., A.L.G., M.U., M.J.A.S., L.A.V.) and Physiology and Biophysics (A.C.B.), State University of Campinas, Campinas, Sao Paulo, Brazil 13083-970

Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) has an important role as an early intermediary between the insulin and IGF receptors and downstream molecules that participate in insulin and IGF-I signal transduction. Here we employed an antisense oligonucleotide (IRS-1AS) to inhibit whole-body expression of IRS-1 *in vivo* and evaluate the consequences of short-term inhibition of IRS-1 in Wistar rats. Four days of treatment with IRS-1AS reduced the expression of IRS-1 by 80, 75, and 65% ($P < 0.05$) in liver, skeletal muscle, and adipose tissue, respectively. This was accompanied by a 40% ($P < 0.05$) reduction in the constant of glucose decay during an insulin tolerance test, a 78% ($P < 0.05$) reduction in glucose consumption during a hyperinsulinemic-euglycemic clamp, and a 90% ($P < 0.05$) increase in basal plasma insulin level. The metabolic effects produced by IRS-1AS were accompanied by a significant re-

duction in insulin-induced [Ser (473)] Akt phosphorylation in liver (85%, $P < 0.05$), skeletal muscle (40%, $P < 0.05$), and adipose tissue (85%, $P < 0.05$) and a significant reduction in insulin-induced tyrosine phosphorylation of ERK in liver (20%, $P < 0.05$) and skeletal muscle (30%, $P < 0.05$). However, insulin-induced tyrosine phosphorylation of ERK was significantly increased (60%, $P < 0.05$) in adipose tissue of IRS-1AS-treated rats. In rats treated with IRS-1AS for 8 d, a 100% increase ($P < 0.05$) in relative epididymal fat weight and a 120% ($P < 0.05$) increase in nuclear expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ were observed. Thus, acute inhibition of IRS-1 expression in rats leads to insulin resistance accompanied by activation of a growth-related pathway exclusively in white adipose tissue. (*Endocrinology* 146: 1428–1437, 2005)

INSULIN RECEPTOR SUBSTRATE (IRS)-1 is a 1243-amino acid protein with an apparent molecular mass of 165–180 kDa, expressed in most mammalian tissues (1). IRS-1 belongs to a family of adaptor proteins composed of at least four members (IRS-1 to IRS-4) (2). All the members of this family possess pleckstrin homology and phosphotyrosine binding (PTB) domains at their N terminus. Moreover, IRS proteins possess several tyrosine residues that may be phosphorylated by upstream kinases generating recognition sites for downstream signal transducers (2). The important role played by IRS-1 and IRS-2 as direct substrates of the insulin receptor (IR) and IGF-I receptor was revealed by generation of cell lines harboring different mutants of these proteins and also the construction of whole-body knockouts of each protein (3, 4). According to these studies, IRS-1 plays a central role in IGF-I-dependent somatic growth, whereas IRS-2 participates mostly in regulation of glucose homeostasis (5). Deletion of the IRS-1 gene leads to an up

to 40% reduction in embryonic and neonatal growth (3), whereas deletion of the IRS-2 gene produces a phenotype with only a 10% reduction in neonatal body size (4). In contrast, knockout of IRS-2 leads to insulin resistance accompanied by abnormal β -cell development (5), and later to type 2 diabetes mellitus, whereas IRS-1 knockout produces insulin resistance accompanied by glucose intolerance with no progression to overt diabetes (6).

The generation of mutants that lack the expression of key proteins involved in insulin and IGF-I signal transduction have contributed enormously to our present understanding of the molecular mechanisms that participate in the genesis of diabetes mellitus and related diseases such as obesity (7), hypertension (8), dyslipidemia (9), and vasculopathy (8). However, in human diabetes the lack of expression of, for example, IRS-1 or IRS-2 or even the expression of functionally compromised mutated proteins, is a rare epidemiological phenomenon (10, 11). In most patients with diabetes mellitus and also most animal models of insulin resistance, the functional impairment of proteins that participate in the transduction of the insulin signal seems to occur progressively, beginning at some time during postnatal life (12–16). For this reason, modulation of expression or function of proteins belonging to the insulin signaling pathway in adult and nongenetically manipulated and non-diabetes-prone animals may reveal novel insights into the pathogenesis of this complex disorder.

We recently employed a phosphorothioate-modified antisense oligonucleotide to IRS-1 that leads to a 40% reduction in expression of this protein in isolated rat pancreatic islets

First Published Online November 18, 2004

Abbreviations: Akt, Protein kinase B; AS, antisense oligonucleotide; 2-DG, 2-deoxy-D-[3 H] glucose; GLUT-4, glucose transporter-4; ipGTT, ip glucose tolerance test; IR, insulin receptor; IRS, insulin receptor substrate; IRS-1AS, antisense oligonucleotide to IRS-1; ITT, insulin tolerance test; *Kitt*, constant rate for glucose disappearance; PI 3-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PTB, phosphotyrosine binding; Sen, sense oligonucleotide; Shc, SH2-containing protein; STE, buffer of sucrose, Tris-HCl, and EDTA; TE, buffer of Tris-HCl and EDTA.

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

(17, 18). The objective of the present study was to employ this antisense oligonucleotide to evaluate the effect of short-term *in vivo* inhibition of IRS-1 expression in non-diabetes-prone Wistar rats. To our surprise, IRS-1 expression inhibition led to glucose intolerance and hyperinsulinemia, and, most interestingly, it led to a selective stimulation of a growth-related signal transduction pathway in white adipose tissue, which was accompanied by increased fat accumulation in this anatomical territory.

Materials and Methods

Antibodies, chemicals, and buffers

Reagents for SDS-PAGE and immunoblotting were from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). HEPES, phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, and BSA (fraction V) were from Sigma (St. Louis, MO). Protein A-Sepharose 6MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden), ¹²⁵I-protein A was from ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA), and nitrocellulose paper (BA85, 0.2 μm) was from Amersham (Aylesbury, UK). Sodium thiopental (Amytal) and human recombinant insulin (Humulin R) were from Lilly (Indianapolis, IN). Antibodies anti-IR (sc-711, rabbit polyclonal), IRS-1 (sc-559, rabbit polyclonal), IRS-2 (sc-8299, rabbit polyclonal), SH2-containing protein (Shc) (sc-1695, rabbit polyclonal), p-ERK (sc-7383, mouse monoclonal, recognizing 42- and 44-kDa ERK phosphorylated at Tyr²⁰⁴), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)γ (sc-7196, rabbit polyclonal), glucose transporter-4 (GLUT-4) (sc-7938, rabbit polyclonal), and phosphotyrosine (sc-508, mouse monoclonal) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Anti-[Ser⁴⁷³]-Akt (9271, rabbit polyclonal) was purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-phospho-serine (AB1603, rabbit polyclonal) was purchased from Chemicon International (Temecula, CA), and anti-PTP1B (no. 07-088, rabbit polyclonal) was purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY).

Determination of glucose and insulin

Glucose was determined by the glucose oxidase method, as previously described (19). Insulin was determined by RIA (20).

Phosphorothioate-modified oligonucleotides

Sense and antisense phosphorothioate oligonucleotides specific for IRS-1 (sense, 5'-ACC CAC TCC TAT CCC G-3' and antisense, 5'-CGG GAT AGG AGT GGG T-3') were produced by Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). The sequence was selected among three unrelated pairs of oligonucleotides on the basis of their ability to block IRS-1 protein expression, as evaluated by immunoblot of total protein extracts of isolated pancreatic islets using specific anti-IRS-1 antibodies. The antisense oligonucleotide sequences were submitted to BLAST analyses (www.ncbi.nlm.nih.gov) and matched only for the *Rattus norvegicus* IRS-1 coding sequence. This oligonucleotide has been used in previous studies (17, 18).

Experimental animals and research protocols

Eight-week-old male Wistar rats (*R. norvegicus*) from the University of Campinas Central Animal Breeding Center were used in the experiments. The rats were allowed *ad libitum* access to standard rodent chow and water. Food was withdrawn 12 h before the experiments. All experiments were conducted in accordance with the principles and procedures described by the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and were approved by the State University of Campinas Ethical Committee. Rats were randomly sorted into three groups: a control group (C) that received one ip daily dose of 100 μl TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA); a sense group that received one daily dose of 100 μl TE buffer containing 0.4 nmol IRS-1 sense oligonucleotide (Sen); and an antisense group that received one daily dose of 100 μl TE buffer containing 0.4 nmol IRS-1 antisense oligonucleotide (AS). Treatment was performed during 3 d, and the experimental procedure was performed on the morning of the fourth

day, except for the measurement of epididymal adipose tissue mass and determination of PPARγ expression, when treatment was performed during 8 d, and procedure was performed on the morning of the ninth day.

Intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT)

An ipGTT was performed at the end of the experimental period. After an overnight fast, the rats were anesthetized as described above. After collection of an unchallenged sample (time 0), a solution of 20% glucose (2.0 g/kg body weight) was administered into the peritoneal cavity. Blood samples were collected from the tail at 30, 60, 90, and 120 min for determination of glucose and insulin concentrations.

Insulin tolerance test (ITT)

To perform an iv ITT, food was withdrawn 6 h before the test and the rats were anesthetized as described above. Insulin (6 μg) was injected through the tail vein, and blood samples were collected at 0, 4, 8, 12, and 16 min from the tail for serum glucose determination. The constant rate for glucose disappearance (*K_{itt}*) was calculated using the formula, $0.693/t_{1/2}$. Glucose half-time ($t_{1/2}$) was calculated from the slope of the least-square analysis of plasma glucose concentrations during the linear decay phase (21).

Clamp studies

All procedures for clamp studies followed previously published descriptions of the method (22). After a 6-h fast, a 2-h hyperinsulinemic euglycemic clamp study was performed in the lower limb. Under sodium thiopental anesthesia and aseptic conditions, a monoocclusive polyethylene catheter was inserted into the femoral artery for infusion of insulin and glucose. A second polyvinyl catheter was inserted into the femoral vein for blood sampling, and the animal was kept in a heated box (37°C) throughout the study. During the first phase of the study (30 min), a priming dose of insulin was infused followed by a rate of glucose infusion necessary to reach a plateau. After glucose equilibration, insulin infusion ($3.0 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) was maintained for 2 h with constant rate (0.20 ml/h), and a variable infusion of glucose (5% solution) was adjusted to maintain the plasma glucose concentration at approximately 120 mg/dl. Blood samples were collected from the femoral vein every 5 min for plasma glucose measurement and every 30 min for plasma insulin determinations. Insulin was measured in duplicate by RIA and oscillated between 4.0 and 9.0 ng/ml in samples collected from animals of both experimental groups.

2-Deoxy-D-[³H] glucose (2-DG) uptake studies

The tissue uptake of 2-DG was measured *in vivo* according to a method described previously (23). The rats were anesthetized and then injected with 6.0 μCi of 2-deoxy-D-[³H] glucose and [¹⁴C]-sucrose in the presence or absence of 0.1 U insulin in 0.4 ml isotonic phosphate buffer (pH 7.4) with 0.1% defatted BSA through the portal vein. After 16 min, slices of liver, gastrocnemius muscle, and epididymal adipose tissue were quickly removed and solubilized in NCS-II tissue solubilizer (Amersham, Buckinghamshire, UK). The radioactivity of ³H in the resulting supernatant was measured in a liquid scintillation fluid (ACS-II Amersham-Japan, Tokyo, Japan), using a scintillation counter (Aloka, model LSC-1000, Kyoto, Japan). Cellular uptake of 2-DG was calculated as the difference between the total tissue radioactivity and the amount of radioactivity present in the tissue extracellular space. The extracellular space volume in microliters per milligram was calculated by dividing the amount of [¹⁴C] disintegrations per minute per milligram of tissue by the amount of [¹⁴C] disintegrations per minute per microliter of plasma. The concentration of extracellular [³H] disintegrations per minute per milligram of tissue could then be obtained by multiplying the extracellular volume in microliters per milligram of tissue by the concentration of [³H] disintegrations per minute per microliter of plasma. The cellular radioactivity was then converted to picomoles of 2-DG using the specific activity, and the results were expressed per milligram of dry tissue.

Epididymal fat mass determination

Rats were paired by body weight, and one of the animals of the pair was randomly selected for determination of epididymal fat pad at experimental d 0. The other animal of the pair was included in the treatment protocol. After 8 d treatment with one ip daily dose of IRS-1 Sen or AS or TE buffer, rats were anesthetized, the abdominal cavity opened, and the entire epididymal fat pad carefully dissected and weighed. Absolute weight of epididymal fat pad and intrapair variation of epididymal fat pad were used for comparisons.

Tissue extraction, immunoblotting, and immunoprecipitation

The abdominal cavities of anesthetized rats were opened, and the rats received an infusion of insulin (0.2 ml , 10^{-6} M) or saline (0.2 ml) through the cava vein. After different intervals (described in *Results*), fragments ($3.0 \times 3.0 \times 3.0 \text{ mm}$) of white adipose tissue, liver, and skeletal muscle were excised and immediately homogenized in solubilization buffer at 4°C [1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2.0 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 0.1 mg aprotinin/ ml] with a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operated at maximum speed for 30 sec. Insoluble material was removed by centrifugation for 20 min at $9000 \times g$ in a 70.Ti rotor (Beckman) at 4°C . The protein concentration of the supernatants was determined by the Bradford dye binding method. Aliquots of the resulting supernatants containing 5.0 mg total protein were used for immunoprecipitation with antibodies against IR, IRS-1, IRS-2, and Shc at 4°C overnight, followed by SDS-PAGE, transfer to nitrocellulose membranes, and blotting with antiphosphotyrosine, antiphosphoserine, anti-IR, anti-IRS-1, or anti-IRS-2. In direct immunoblot experiments, 0.2 mg of protein extracts obtained from each tissue were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-IR, IRS-1, IRS-2, anti-phospho[Ser⁴⁷³]-Akt or anti-phospho-ERK antibodies.

Subcellular fractionation

To characterize the expression and subcellular localization of GLUT-4 and PPAR γ , a subcellular fractionation protocol was employed as described previously (24). Fragments of skeletal muscle and adipose tissue obtained from rats treated, or not, with insulin according to the protocols described above were minced and homogenized in 2 volumes of STE buffer at 4°C [0.32 M sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 100 mM sodium fluoride, 100 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, and 0.1 mg aprotinin/ ml]. The homogenates were centrifuged ($1000 \times g$, 25 min, 4°C) to obtain pellets. The pellets were washed once with STE buffer ($1000 \times g$, 10 min, 4°C) and suspended in Triton buffer [1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 200 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 100 mM NaF, 100 mM sodium pyrophosphate, and 0.1 mg aprotinin/ ml], kept on ice for 30 min, and centrifuged ($15,000 \times g$, 30 min, 4°C) to obtain the nuclear fraction. The supernatant was centrifuged ($100,000 \times g$, 60 min, 4°C) to obtain the S100 fraction (which contains most of all intracellular membranes, both low- and high-density microsomes) and the pellet, which was suspended in STE buffer plus 1% Nonidet P-40, kept on ice for 20 min and centrifuged ($100,000 \times g$, 20 min) to obtain the membrane fraction. The fractions were treated with Laemmli buffer with 100 mM dithiothreitol, heated in a boiling water bath for 5 min, and aliquots (0.2 mg of protein) were subjected to SDS-PAGE and Western blotting with anti-GLUT-4 antibodies. Samples from adipose tissue total extract and nuclear fraction were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane, which were blotted with anti-PPAR γ antibodies.

Data presentation and statistical analysis

All numerical results are expressed as the mean $\pm$ SEM of the indicated number of experiments. The results of blots are presented as direct comparisons of bands in autoradiographs and quantified by densitometry using the Scion Image software (Scion Corp., Frederick, MD). Data were analyzed by the two-tailed unpaired Student's *t* test or repeat-

measures ANOVA (one-way or two-way ANOVA) followed by *post hoc* analysis of significance (Bonferroni test) when appropriate, comparing experimental and control groups. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

IRS-1AS treatment inhibits IRS-1 without affecting IR and IRS-2 expression

Three days of treatment with IRS-1AS but not IRS-1Sen significantly reduced the expression of IRS-1 protein in liver (80% , $P < 0.05$), skeletal muscle (75% , $P < 0.05$), and adipose tissue (65% , $P < 0.05$) of rats (Fig. 1, A1, B1, and C1), as detected by immunoblot. The inhibiting capacity of the IRS-1AS was already detectable 24 h after the first dose and

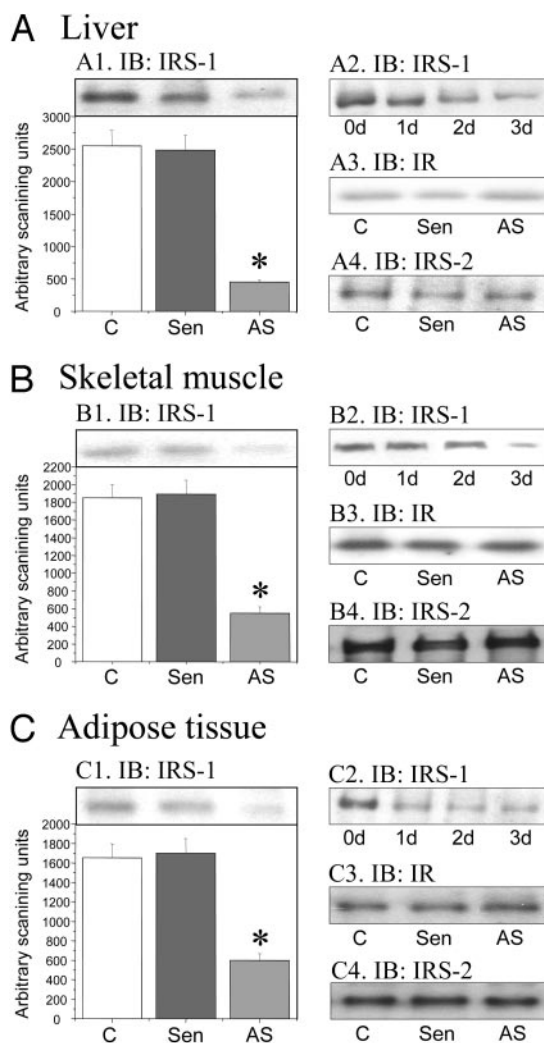


FIG. 1. Determination of IRS-1 (A1, A2, B1, B2, C1, and C2), IR (A3, B3, and C3), and IRS-2 (A4, B4, and C4) protein expression in liver (A), skeletal muscle (B), and adipose tissue (C) of rats treated for 3 d with Sen or AS IRS-1 phosphorothioate-modified oligonucleotides or with vehicle (C). In A2, B2, and C2, the rats were treated with only AS IRS-1 oligonucleotide for 0, 1, 2 or 3 d. Fragments of liver, skeletal muscle, or adipose tissue were homogenized, and samples (0.2 mg) of total protein extracts obtained were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted (IB) with specific antibodies. Specific bands were densitometrically quantified. For all conditions, $n = 5$; *, $P < 0.05$ vs. C.

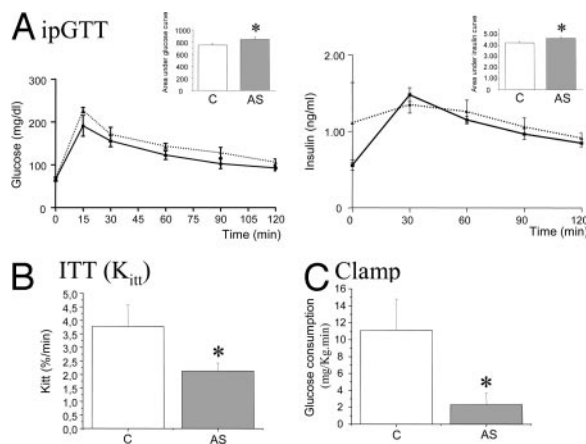


FIG. 2. A, Glucose (left) and insulin (right) levels during an ipGTT. The areas under the glucose and insulin curves are depicted as insets. Control (C) rats, solid lines; IRS-1AS-treated rats, dashed lines. B, K_{itt} during the ITT was calculated as described in Materials and Methods. C, Glucose consumption (milligrams per kilograms per minute) during the hyperinsulinemic-euglycemic clamp. The evaluation of insulin action was performed according to the method described in Materials and Methods. In all experiments, $n = 6$; *, $P < 0.05$ vs. C.

increased progressively during the experimental period (Fig. 1, A2, B2, and C2). The protein levels of IR (Fig. 1, A3, B3, and C3) and IRS-2 (Fig. 1, A4, B4, and C4) were not affected by IRS-1 inhibition in any of the tissues analyzed.

Metabolic consequences of short-term inhibition of IRS-1 expression

The treatment with IRS-1AS for 3 d produced no effect on the fasting glucose levels (86 ± 3 vs. 87 ± 4 mg/dl, for control

and IRS-1AS, respectively) but led to a significant increase in fasting insulin levels (0.55 ± 0.08 vs. 1.1 ± 0.09 ng/ml, for control and IRS-1AS, respectively, $n = 5$, $P < 0.05$). During the ipGTT the levels of blood glucose of IRS-1AS-treated rats were constantly higher than the level of the control and, although no significant differences were obtained when analyzing each time point separately, the area under the glucose curve was significantly higher for IRS-1AS-treated rats (Fig. 2A). The blood insulin levels were higher in IRS-1AS-treated rats at time 0'. At time 30', blood insulin levels of control rats presented a peak reaching 1.48 ± 0.11 ng/ml (170%), whereas in IRS-1AS-treated rats, only a discrete increment from basal was observed (20%). During the remainder of the test, the blood insulin levels were similar between control and IRS-1AS groups, and, again the area under the insulin curve was higher for IRS-1AS-treated rats (Fig. 2A). Furthermore, the treatment with IRS-1AS promoted a reduction of 40% in the K_{itt} (Fig. 2B) obtained during the ITT and a reduction of 82% in glucose consumption during a hyperinsulinemic-normoglycemic clamp (Fig. 2C).

Insulin signal transduction under IRS-1 expression inhibition

To evaluate the consequences of IRS-1 expression inhibition on the initial and intermediary steps of the insulin signaling pathway, rats were treated with IRS-1AS or IRS-1Sen (not shown) and compared with control. Under anesthesia, a single, acute dose of insulin (0.2 ml, 10^{-6} M), or saline, was injected through the cava vein, and fragments of liver, skeletal muscle, and visceral adipose tissue were obtained, homogenized, and employed in immunoprecipitation and im-

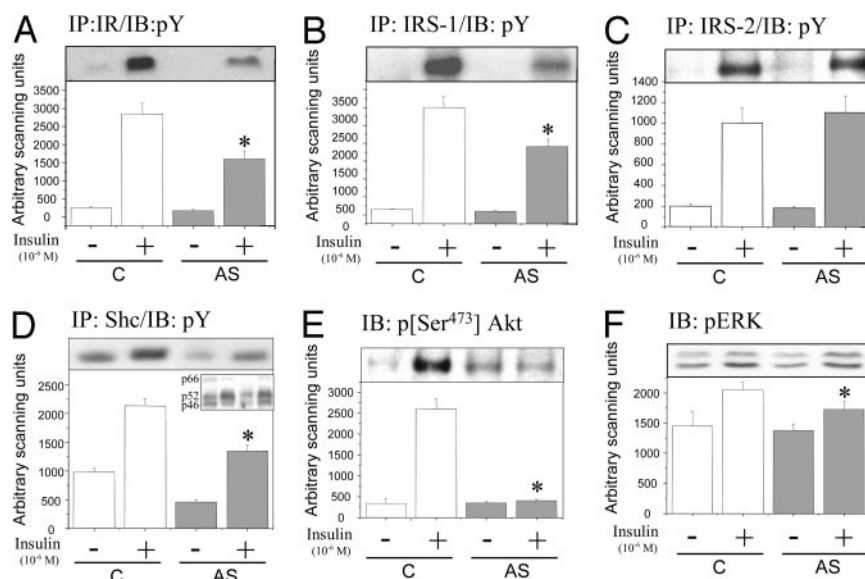


FIG. 3. Insulin signal transduction in liver. Control (C) and IRS-1AS-treated rats were anesthetized and acutely injected with saline (–) or insulin (+) (0.2 ml, 10^{-6} M) through the cava vein. After 90 sec (A–D) or 5 min (E and F), fragments of the liver were obtained, homogenized, centrifuged, and aliquots (5.0 mg) of the supernatants used for immunoprecipitation (IP) with anti-IR (A), -IRS-1 (B), -IRS-2 (C), and -Shc (D) antibodies. The immunoprecipitates were then separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted (IB) with antiphosphotyrosine (pY) antibodies. In direct Western blot experiments (E and F), samples (0.2 mg) from total extracts were separated by SDS-PAGE transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-phospho-[Ser⁴⁷³] Akt antibodies (E) or anti-phospho ERK (pERK) (F) antibodies. The bands obtained were scanned and evaluated by densitometry. In D, the arbitrary scanning units were obtained from the means of densitometric values of the bands corresponding to the three Shc isoforms (p66, p52, and p46) (inset shows a broader view of the blot). In all experiments, $n = 6$; *, $P < 0.05$ vs. C+.

munoblotting assays. Figure 3 depicts the consequences of IRS-1 expression inhibition on the early and intermediary steps of the insulin signaling pathway in the liver. There was a 50% ($P < 0.05$) reduction in the insulin-induced tyrosine phosphorylation of the IR (Fig. 3A), a 40% ($P < 0.05$) reduction in insulin-induced tyrosine phosphorylation of the IRS-1 (Fig. 3B), a 30% ($P < 0.05$) reduction in insulin-induced tyrosine phosphorylation of Shc (Fig. 3D), an 85% ($P < 0.05$) reduction in [Ser⁴⁷³]-phosphorylation of Akt (Fig. 3E), and a 20% ($P < 0.05$) reduction in tyrosine phosphorylation of ERK (Fig. 3F). No significant modulation of insulin-induced IRS-2 phosphorylation was detected in this tissue (Fig. 3C).

Figure 4 depicts the consequences of IRS-1 expression inhibition on the early and intermediary steps of the insulin signaling pathway in skeletal muscle. There was a 30% ($P < 0.05$) reduction in insulin-induced tyrosine phosphorylation of the IR (Fig. 4A), a 50% ($P < 0.05$) reduction in insulin-induced tyrosine phosphorylation of the IRS-1 (Fig. 4B), a 30% ($P < 0.05$) reduction in insulin-induced tyrosine phosphorylation of Shc (Fig. 4D), a 40% ($P < 0.05$) reduction in [Ser⁴⁷³]-phosphorylation of Akt (Fig. 4E), and a 30% ($P < 0.05$) reduction in tyrosine phosphorylation of ERK (Fig. 4F). Once more no significant modulation in insulin-induced IRS-2 phosphorylation was detected in this tissue (Fig. 4C). Finally, Fig. 5 depicts the consequences of IRS-1 expression inhibition on the early and intermediary steps of the insulin signaling pathway in visceral adipose tissue. There was a 60% ($P < 0.05$) reduction in insulin-induced tyrosine phosphorylation of the IR (Fig. 5A), a 60% ($P < 0.05$) reduction in insulin-induced tyrosine phosphorylation of the IRS-1 (Fig. 5B), a 40% ($P < 0.05$) reduction in insulin-induced tyrosine phosphorylation of Shc (Fig. 5D), and an 85% ($P < 0.05$)

reduction in [Ser⁴⁷³]-phosphorylation of Akt (Fig. 4E). Surprisingly, there were significant increases in insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS-2 (50%, $P < 0.05$; Fig. 5C) and ERK (25%, $P < 0.05$; Fig. 5F).

Inhibition of IRS-1 expression leads to increased serine phosphorylation and PTP1B binding to IR

To evaluate the possible reasons that IRS-1AS treatment led to reduced insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR in all tissues studied, rats were treated with IRS-1Sen, IRS-1AS, or saline and employed in experiments for determination of basal IR serine phosphorylation and insulin-induced IR-PTP1B association. As shown in Fig. 6A, inhibition of IRS-1 expression was significantly associated with increased basal serine phosphorylation of IR in liver (90%, $P < 0.05$), skeletal muscle (55%, $P < 0.05$), and adipose tissue (110%, $P < 0.05$). Similarly, as shown in Fig. 6B, the inhibition of IRS-1 was significantly associated with increased insulin-induced binding of PTP1B to IR in liver (45%, $P < 0.05$), skeletal muscle (55%, $P < 0.05$), and adipose tissue (80%, $P < 0.05$).

Insulin-induced membrane localization of GLUT-4 is impaired in muscle and adipose tissue of rats treated with IRS-1AS

To evaluate the functional consequences of the impairment of the insulin signaling through the IR/IRS-1/Akt signal transduction pathway in muscle and adipose tissue of rats treated with IRS-1AS, the experimental animals were injected with a single iv dose of insulin (0.2 ml, 10^{-6} M) or saline, and after 10 min, fragments of the peri-epididymal fat

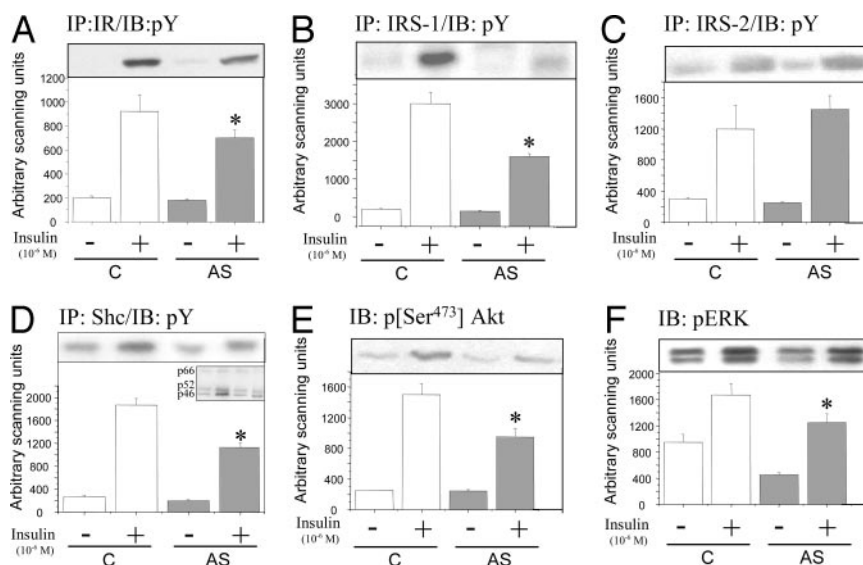


FIG. 4. Insulin signal transduction in skeletal muscle. Control (C) and IRS-1AS-treated rats were anesthetized and acutely injected with saline (–) or insulin (+) (0.2 ml, 10^{-6} M) through the cava vein. After 90 sec (A–D) or 5 min (E and F), fragments of the gastrocnemius were obtained, homogenized, centrifuged, and aliquots (5.0 mg) of the supernatants used for immunoprecipitation (IP) with anti-IR (A), -IRS-1 (B), -IRS-2 (C), and -Shc (D) antibodies. The immunoprecipitates were then separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted (IB) with antiphosphotyrosine (pY) antibodies. In direct Western blot experiments (E and F), samples (0.2 mg) from total extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with anti-phospho-[Ser⁴⁷³] Akt antibodies (E) or anti-phospho ERK (pERK) (F) antibodies. The bands obtained were scanned and evaluated by densitometry. In D, the arbitrary scanning units were obtained from the means of densitometric values of the bands corresponding to the three Shc isoforms (p66, p52, and p46) (inset shows a broader view of the blot). In all experiments, $n = 6$; *, $P < 0.05$ vs. C+.

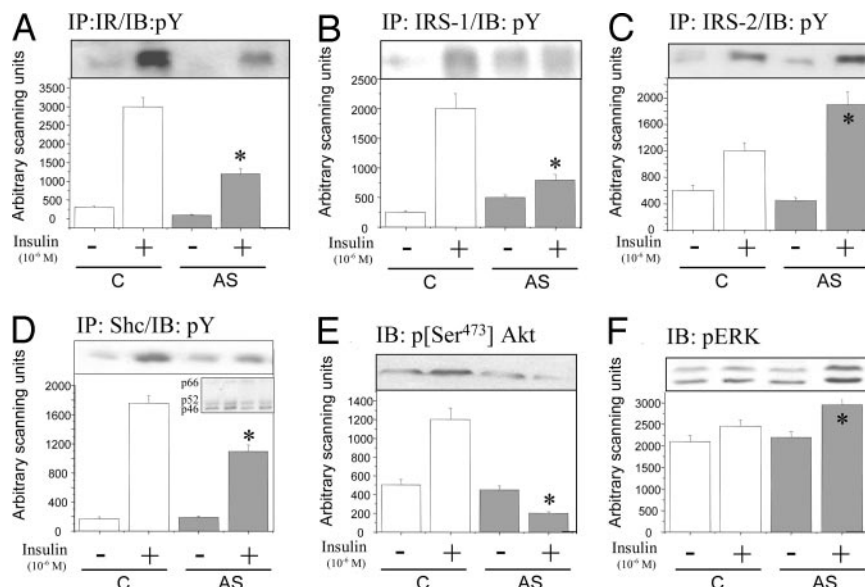


FIG. 5. Insulin signal transduction in adipose tissue. Control (C) and IRS-1AS-treated rats were anesthetized and acutely injected with saline (–) or insulin (+) (0.2 ml, 10⁻⁶ M) through the cava vein. After 90 sec (A–D) or 5 min (E and F), fragments of the epididymal fat were obtained, homogenized, centrifuged, and aliquots (5.0 mg) of the supernatants used for immunoprecipitation (IP) with anti-IR (A), -IRS-1 (B), -IRS-2 (C), and -Shc (D) antibodies. The immunoprecipitates were then separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted (IB) with antiphosphotyrosine (pY) antibodies. In direct Western blot experiments (E and F), samples (0.2 mg) from total extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with anti-phospho-[Ser⁴⁷³] Akt antibodies (E) or anti-phospho ERK (pERK) (F) antibodies. The bands obtained were scanned and evaluated by densitometry. In D, the arbitrary scanning units were obtained from the means of densitometric values from the bands corresponding to the three Shc isoforms (p66, p52, and p46) (inset shows a broader view of the blot). In all experiments, *n* = 6; *, *P* < 0.05 vs. C+.

and gastrocnemius muscle were excised and homogenized. Total extracts, S100, and membrane fractions obtained were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and submitted to immunoblotting with anti-GLUT-4 antibodies. As depicted in Fig. 7, the inhibition of IRS-1 expression promoted no significant modulation of total GLUT-4 in muscle and adipose tissue (Fig. 7, A and B, *upper blots*). There was, however, a tendency to decrease in both tissues. Similarly, the levels of GLUT-4 in S100 fractions of both tissues were not modulated by IRS-1 expression inhibition (Fig. 7, A and B, *middle blots*). However, IRS-1 expression inhibition led to significant reduction in insulin-induced GLUT-4 expression in the membrane fraction of muscle and visceral adipose tissue (Fig. 7, A and B, *lower blots*). The levels of GLUT-4 in total extracts and S100 and membrane fractions

were similar in control and IRS-1AS rats not stimulated with insulin (saline injected) (not shown).

Effect of IRS-1 inhibition on tissue-specific glucose uptake

To evaluate the effect of inhibition of IRS-1 expression on tissue-specific glucose uptake, we performed a 2-DG uptake assay. In liver, the inhibition of IRS-1 expression exerted no role on basal and insulin-stimulated glucose uptake (Fig. 7C). Conversely and expectedly, in skeletal muscle, the inhibition of IRS-1 expression led to a significant reduction of insulin-induced glucose uptake (25%, *P* < 0.05; Fig. 7D). Finally, in adipose tissue, IRS-1 expression inhibition promoted a non-significant fall in insulin-induced glucose uptake (20%, *P* = 0.074) and surprisingly a significant increase in basal glucose uptake (80%, *P* < 0.05; Fig. 7E).

Increased visceral adiposity and increased nuclear expression of PPAR γ in IRS-1AS-treated rats

The observation that the inhibition of IRS-1 expression leads to increased insulin signaling through the growth-related ERK pathway in adipose tissue prompted us to evaluate the implication of this phenomenon in adipose tissue mass variation during a longer period of treatment with IRS-1AS. For this, rats were treated for 8 d with IRS-1AS, IRS-1Sen, or TE buffer and on the morning of the ninth day were anesthetized, killed, and all adipose tissue in the periepididymal region then surgically removed. Another group of rats was submitted to similar treatment regimens, and the periepididymal fat was removed for subcellular fractionation and evaluation of PPAR γ expression. There were no

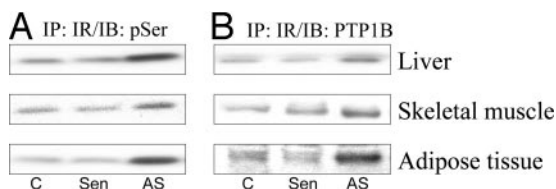


FIG. 6. Determination of serine phosphorylation (A) and insulin-induced IR-PTP1B association (B) in liver, skeletal muscle, and adipose tissue of rats treated for 3 d with Sen or AS IRS-1 phosphorothioate-modified oligonucleotides or vehicle (C). Fragments of liver, skeletal muscle, or adipose tissue were homogenized, and samples (5.0 mg) of total protein extracts obtained were used in immunoprecipitation (IP) experiments with anti-IR antibodies. Immunocomplexes were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted (IB) with anti-phospho-serine (pSer) antibodies (A) or anti-PTP1B antibodies (B). Specific bands were densitometrically quantified. For all conditions, *n* = 5.

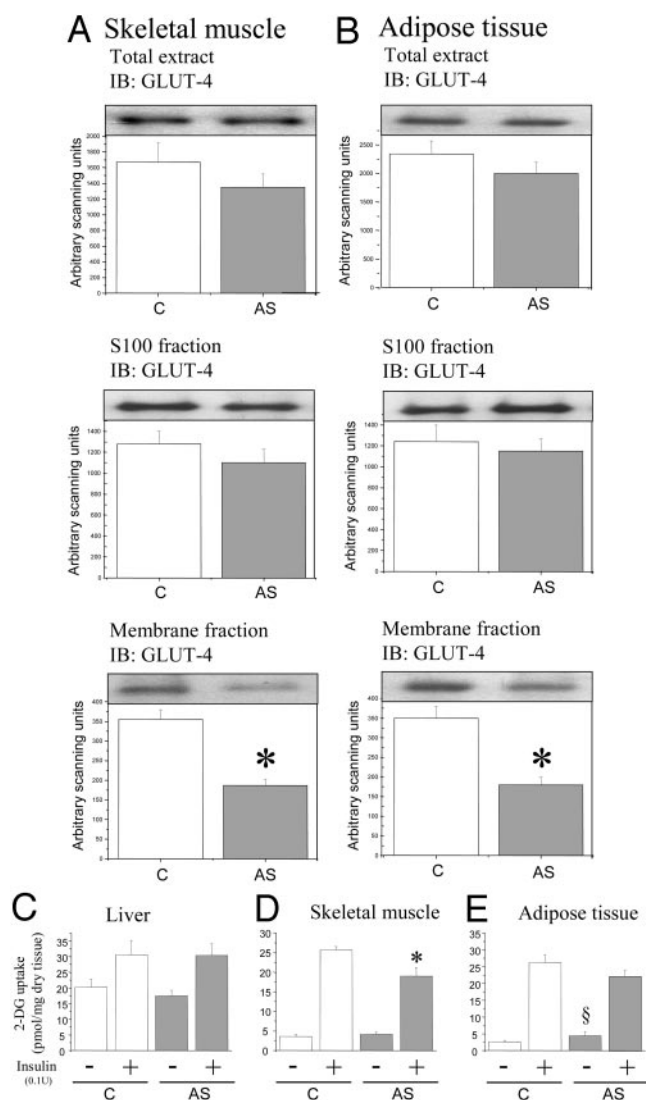


FIG. 7. Evaluation of insulin-induced GLUT-4 expression (A and B) and 2-DG uptake (C–E) in tissues of rats treated with IRS-1AS or vehicle (C). Protein extract samples (0.2 mg) obtained from skeletal muscle (A) and adipose tissue (B) of rats treated with IRS-1AS or vehicle for 3 d and acutely treated with insulin (200 μ l, 10^{-6} M) were either directly separated by SDS-PAGE (A and B, upper graphs) or initially submitted to a subcellular fractionation protocol, and then the S100 (A and B, middle graphs) and membrane fractions (A and B, lower graphs) obtained were separated by SDS-PAGE. The SDS-PAGE-separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-GLUT-4 antibodies. Bands obtained were scanned and densitometrically evaluated. The 2-DG uptake assay was performed in samples obtained from liver (C), skeletal muscle (D), and adipose tissue (E), according to the protocol described in *Materials and Methods*. In all experiments, $n = 5$; *, $P < 0.05$ vs. C+; §, $P < 0.05$ vs. C-.

significant differences in body weight variation (Fig. 8A) and 24-h food intake (Fig. 8B) among the groups. However, there was a significant increase in the rate of body weight gain in IRS-1AS-treated rats (control, 0.635 ± 0.288 g/d; IRS-1Sen, 0.625 ± 0.289 g/d; IRS-1AS, 1.125 ± 0.325 g/d, $n = 6$, $P < 0.05$), and a significant increase in intrapair variation of periepididymal fat mass (Fig. 8C). Finally, both total and nuclear

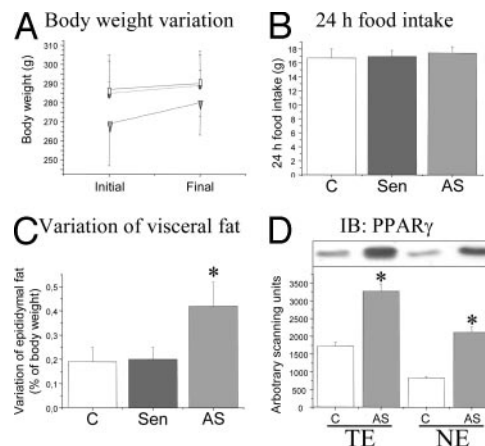


FIG. 8. Effect of an 8-d treatment with IRS-1AS on body weight variation, food intake, adiposity, and subcellular expression of PPAR γ . Rats treated with Sen (filled circles) or AS (filled triangles) IRS-1 phosphorothioate-modified oligonucleotides or vehicle (C) (open squares) were evaluated for 8-d body weight variation (A), mean 24-h food intake (B), intrapair variation in relative epididymal fat mass (C), and expression of PPAR γ (D), which was determined in total protein extracts (TE) or nuclear protein extracts (NE) separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted (IB) with anti-PPAR γ antibody. In all experiments, $n = 6$; *, $P < 0.05$ vs. C.

expression of PPAR γ were significantly increased in adipose tissue of IRS-1AS-treated rats (Fig. 8D).

Discussion

Obesity and type 2 diabetes mellitus have reached epidemic proportions in several regions of the world (25–27). Resistance to insulin action is the hallmark of type 2 diabetes and is also commonly found in obese patients who have not developed diabetes (28). Most studies concerned with the characterization of the insulin signal transduction in peripheral tissues of humans and animal models of insulin resistance and diabetes have reported a progressive deterioration of the insulin signaling machinery in skeletal muscle, adipose tissue, and liver (12, 15, 29–32). However, because the inhibition of lipolysis and the storage of triglycerides in adipose tissue are both insulin-regulated events, the reason there is a maintenance of fat stores, or even a continuous gain of body weight (mostly due to increased adipose tissue mass), for some time after the installation of insulin resistance has become a matter of intense debate (33–38). In a recent study, Mosca *et al.* (33) have shown that insulin-resistant subjects are particularly susceptible to weight gain associated with the ingestion of high-fat food. Accordingly, in two genetically distinct populations, Pima Indians (37) and Chinese Mauritians (36), insulin resistance was a predicting factor for weight gain. However, in two other populations, Asian Indians and Creoles (36), there was an inverse relationship between weight gain and insulin resistance. In the same manner, analyzing patients with variable genetic backgrounds from two distinct studies, Folsom and coworkers (34) reported both direct and inverse association of insulin resistance and weight gain. Finally, in two recent reports (35, 38), an inverse relationship between insulin resistance and development of obesity was determined. Thus, based on

clinical data, factors such as genetic background, age and environmental modifiers such as diet composition may favor, or not, the association between insulin resistance and weight gain.

To exert its pleiotropic, multiorgan actions, insulin binds to its cognate receptor (IR) to activate the catalytic, tyrosine kinase activity toward itself and at least nine direct substrates (39). The IRS proteins, particularly IRS-1 and IRS-2, are by far the most studied substrates of the IR. These docking proteins couple insulin/IGF receptors to the phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) and ERK cascades (2). Through the PI 3-kinase pathway, insulin promotes the activation of Akt leading to metabolic consequences such as control of glucose uptake, glycogen synthesis, and cell survival (40, 41). On the other hand, through the activation of ERK, insulin controls cell growth and mitogenesis (42, 43).

In the first part of the present study, we evaluated the metabolic and molecular outcomes of short-term inhibition of IRS-1 expression in Wistar rats. The treatment with IRS-1AS was extremely effective for inhibiting the expression of the target protein in liver, muscle, and adipose tissue, and as a consequence, the experimental animals became insulin resistant. There were no clinical or laboratorial signs of overt diabetes after 4 or 8 (not shown) d of treatment with IRS-1AS, which was probably due to the capacity of the pancreatic β -cell to respond to the extra demand. The careful examination of the insulin curve during the ipGTT (particularly the increment from time 0 to time 30 min) suggests that a loss of the first-phase insulin secretion occurs. Defective first-phase insulin secretion is a feature of incipient type 2 diabetes and insulin resistance (44). Thus, we suspect that short-term inhibition of IRS-1 expression leads to insulin resistance, which is accompanied by a compensatory but dysfunctional response by the pancreatic islets. It is interesting to note that in mice with homozygous and heterozygous knockout of the IRS-1, the pancreatic islets exhibit defective response to glucose and arginine (6). However, when pancreatic islets of nongenetically manipulated, non-diabetes-prone rats are treated with IRS-1AS, an increase in glucose-stimulated insulin secretion is observed (17). Nevertheless, this increase occurs after 15 min of exposition of the islets to high glucose, suggesting that inhibition of IRS-1 expression interferes with the first phase of insulin secretion (17). Taken together, all these facts provide further support for the current concept that the loss of first-phase insulin secretion associated with hyperinsulinemia in insulin-resistant states may be the common consequence of peripheral and central (pancreatic islet) defective signaling through IRS-1.

Next, we evaluated the outcomes of inhibition of IRS-1 expression on the regulation of the pathways that lead to Akt and ERK activation. As expected, insulin signaling through IRS-1 and Akt was reduced in all tissues studied. Moreover, signaling through Shc was also reduced. Conversely, we were surprised by the fact that insulin-induced tyrosine phosphorylation of the IR was significantly reduced in liver, skeletal muscle, and adipose tissue, a phenomenon that is not observed in IRS-1 knockout mice (45, 46). In our opinion, there are at least three possible reasons for this finding. First, it could be a matter of stoichiometry. Because IRS-1 and IRS-2 bind to the same domain of the IR, the lower concentration

of IRS-1 would allow for higher interaction between IR and IRS-2, which would then lead to higher IRS-2 tyrosine phosphorylation, even in the face of a reduced tyrosine phosphorylation of the IR. Second, the balance between activation and repression of tyrosine phosphatases that shut down IR signal transduction depend on the levels and interactions between the IR and its substrates, IRS-1 and IRS-2 (47–49). In IRS-1 knockout mice, the absence of IRS-1 is accompanied by an increased expression of IRS-2. However, in IRS-1AS-treated rats, no increase in IRS-2 was detected during the experimental period evaluated in this study. It is possible that the lack in IRS-1 without a compensatory increase in IRS-2 may facilitate phosphatase binding to IR, leading to precocious dephosphorylation.

Another possibility is that the lack of expression of IRS-1, without any compensatory increase in IRS-2, may affect the regulation of insulin-induced activation of serine kinases that catalyze serine phosphorylation of the IR, a phenomenon known to impair insulin-induced activation of its receptor (50–52). We tested two of these hypotheses by blotting IR immunoprecipitates with antiserine and anti-PTP1B antibodies. Indeed, in all three tissues, there were significant increases in serine phosphorylation and PTP1B binding to the IR. Although we did not investigate the identity of the putative serine kinases involved in IR serine phosphorylation in the present case, we have no reason to believe that they would differ from those serine kinases involved in the control of insulin signaling in other physiological and pathological contexts, such as protein kinase C α or C δ and mammalian target of rapamycin (50–53). Concerning the association between the IR and PTP1B, it occurs on a similar fashion of that reported in two distinct animal models of obesity, the Goto-Kakizaki and the monosodium glutamate-treated rat (49, 54). In both examples, there is reduced IR tyrosine phosphorylation that is accompanied by increased PTP1B association and catalytic function. Thus, we can conclude that short-term inhibition of IRS-1 expression may affect IR tyrosine phosphorylation status through at least two distinct mechanisms, serine phosphorylation and tyrosine phosphatase targeting.

With respect to the activation of the growth-promoting, mitogenesis-inducing MAPK cascade, which was evaluated by determination of insulin-induced tyrosine phosphorylation of ERK1 and ERK2, we were again surprised by the finding that, although the inhibition of IRS-1 expression led to a reduction in ERK1 and ERK2 activation in liver and skeletal muscle, it also led to a significant and contrasting increase in ERK1 and ERK2 activation in adipose tissue. This was accompanied by an increased insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS-2 only in adipose tissue. When evaluating IRS-1 knockout mice, other groups have observed either impairment or nonmodulation of the activation of ERK by insulin, depending on the tissue studied and whether employing live animals or cultured cells (45, 55). Controversial data exist regarding the possible roles for ERK in adipose tissue growth and differentiation. Some studies have shown that activation of ERK proteins by various effectors, including insulin, leads to a blockade of adipogenesis (56–58), whereas other studies have shown that ERK promotes preadipocyte differentiation (59–61). In a recent study, Prusty

et al. (62) observed that, in 3T3-L1 preadipocytes, insulin induces an early and transitory activation of ERK, which leads to activation of CCAAT/enhancer-binding protein- α and PPAR γ , transcriptional factors enrolled with preadipocyte differentiation and adipogenesis, respectively (63). The authors conclude that, during incipient adipocyte differentiation, ERK offers a positive signal, participating in the early induction of adiposity. However, in fully differentiated adipocyte it may act by inhibiting PPAR γ and, thus, participate in the control of further adipogenesis. Interestingly, in a recent clinical study, the gene expression profile of 1152 genes was evaluated in omental adipose tissue of lean and obese subjects. Among others, the genes coding for proteins of the MAPK family were significantly increased in the obese patients (64). According to the authors, activated MAPK proteins in adipose tissue of obese subjects may participate either in further weight gain or control of adipogenesis.

To determine the impact of short-term IRS-1 expression inhibition on functional events controlled by insulin, we evaluated GLUT-4 subcellular expression and glucose uptake. First, it was demonstrated that in skeletal muscle the inhibition of IRS-1 reduces GLUT-4 migration to the cell membrane, a phenomenon that is accompanied by a significant reduction of insulin-induced glucose uptake. In addition, in adipose tissue, there was a reduction of GLUT-4 migration to the cell membrane, but this was accompanied by a tendency of reduction of insulin-induced glucose uptake and a significant increase of basal glucose uptake. In our opinion, these are interesting phenomena, which may contribute to explain the reason that there is fat mass increase in the present model. In a recent study (65), some of us have shown that in an animal model of obesity, there is increased activation of the Cbl (c-Cbl protooncogene)-associated protein/Cbl pathway (66), which occurs in parallel to the inhibition of the IRS-1 signaling pathway. Taken together, these data suggest that the inhibition of insulin signaling through IRS-1 (which may be achieved through a direct inhibition by antisense oligonucleotide, or indirectly, through an unknown mechanism, such as in the animal model of obesity) leads to the activation of mechanisms that sustain glucose uptake exclusively by adipose tissue and allows continuous growth of fat mass, even when the animal is insulin resistant. These effects were further documented in the present model by evaluating body weight variation and expression of the adipogenic transcription factor PPAR γ . Both the rate of body weight gain and the variation in visceral adipose tissue mass were significantly increased in IRS-1AS-treated rats. Moreover, the total and nuclear expression of PPAR γ were significantly stimulated by the inhibition of IRS-1.

In our opinion, there are two interesting outcomes of the present study. Initially, it is shown that short-term inhibition of IRS-1 expression is sufficient to produce a phenotype of insulin resistance. Therefore, it provides a costless and easily reproducible method for making a nongenetically manipulated animal resistant to insulin. Second, short-term inhibition of IRS-1 induces a clear molecular and functional resistance to insulin in muscle, which is paralleled by the activation of a growth-promoting pathway in adipose tissue. These findings offer new insights into the complex relationship of insulin resistance and continuously increasing adi-

posity, placing a defective signal transduction through IRS-1 into a pivotal position in this scenario.

Acknowledgments

We thank Dr. Nicola Conran for English language editing.

Received June 22, 2004. Accepted November 10, 2004.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Lício A. Velloso, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Sao Paulo, Brazil 13083-970. E-mail: lavelloso@fcm.unicamp.br.

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sao Paulo and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

References

- Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF 1991 Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352:73–77
- White MF 2002 IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E413–E422
- Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag 3rd B, Johnson RS, Kahn CR 1994 Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372:186–190
- Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF 1998 Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391:900–904
- Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF 1999 Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated β -cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet* 23:32–40
- Kulkarni RN, Winnay JN, Daniels M, Bruning JC, Flier SN, Hanahan D, Kahn CR 1999 Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured β -cell lines. *J Clin Invest* 104:R69–R75
- Kim JK, Michael MD, Previs SF, Peroni OD, Mauvais-Jarvis F, Neschen S, Kahn BB, Kahn CR, Shulman GI 2000 Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J Clin Invest* 105:1791–1797
- Vicent D, Ilany J, Kondo T, Naruse K, Fisher SJ, Kisanuki YY, Bursell S, Yanagisawa M, King GL, Kahn CR 2003 The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance. *J Clin Invest* 111:1373–1380
- Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR 1998 A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2:559–569
- Zhang Y, Wat N, Stratton IM, Warren-Perry MG, Orho M, Groop L, Turner RC 1996 UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS-1 and β -adrenergic-receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations. UK Prospective Diabetes Study. *Diabetologia* 39:1505–1511
- Sesti G 2000 Insulin receptor substrate polymorphisms and type 2 diabetes mellitus. *Pharmacogenomics* 1:343–357
- 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* 137:151–159
- Korshennikova E, Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Goto T, Virkamaki A 2002 Elevated fasting insulin concentrations associate with impaired insulin signaling in skeletal muscle of healthy subjects independent of obesity. *Diabetes Metab Res Rev* 18:209–216
- Meyer MM, Levin K, Grimmshann T, Beck-Nielsen H, Klein HH 2002 Insulin signalling in skeletal muscle of subjects with or without type II-diabetes and first degree relatives of patients with the disease. *Diabetologia* 45:813–822
- Pratipanawatr W, Pratipanawatr T, Cusi K, Berria R, Adams JM, Jenkinson CP, Maezono K, DeFronzo RA, Mandarino LJ 2001 Skeletal muscle insulin resistance in normoglycemic subjects with a strong family history of type 2 diabetes is associated with decreased insulin-stimulated insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation. *Diabetes* 50:2572–2578
- Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ 2000 Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 105:311–320
- Araujo EP, Amaral ME, Souza CT, Bordin S, Ferreira F, Saad MJ, Boschero AC, Magalhaes EC, Velloso LA 2002 Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. *FEBS Lett* 531:437–442
- Araujo EP, Amaral ME, Filiputti E, De Souza CT, Laurito TL, Augusto VD, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA, Carneiro EM 2004 Restoration of insulin

- secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *J Endocrinol* 181:25–38
19. Trinder P 1969 Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol* 22:158–161
20. Scott AM, Atwater I, Rojas E 1981 A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* 21:470–475
21. Bonora E, Manicardi V, Zavaroni I, Coscelli C, Butturini U 1987 Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. *Diabetes Metab* 13:116–121
22. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R 1979 Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237:E214–E223
23. Gasparetti AL, de Souza CT, Pereira-da-Silva M, Oliveira RL, Saad MJ, Carneiro EM, Velloso LA 2003 Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. *J Physiol* 552: 149–162
24. Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, Yoshida K 1997 A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem* 272:16657–16662
25. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J 2001 Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782–787
26. Flier JS 2004 Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116:337–350
27. Ogden CL, Carroll MD, Flegal KM 2003 Epidemiologic trends in overweight and obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 32:741–760, vii
28. Vaag A, Henriksen JE, Madsbad S, Holm N, Beck-Nielsen H 1995 Insulin secretion, insulin action, and hepatic glucose production in identical twins discordant for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 95:690–698
29. Saad MJ, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR 1992 Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest* 90:1839–1849
30. Saad MJ, Folli F, Kahn JA, Kahn CR 1993 Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Invest* 92:2065–2072
31. Saad MJ, Folli F, Araki E, Hashimoto N, Csermely P, Kahn CR 1994 Regulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-F442A adipocytes. Effects of differentiation, insulin, and dexamethasone. *Mol Endocrinol* 8:545–557
32. Bjornholm M, Al-Khalili L, Dicker A, Naslund E, Rossner S, Zierath JR, Arner P 2002 Insulin signal transduction and glucose transport in human adipocytes: effects of obesity and low calorie diet. *Diabetologia* 45:1128–1135
33. Mosca CL, Marshall JA, Grunwald GK, Cornier MA, Baxter J 2004 Insulin resistance as a modifier of the relationship between dietary fat intake and weight gain. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:803–812
34. Folsom AR, Vitelli LL, Lewis CE, Schreiner PJ, Watson RL, Wagenknecht LE 1998 Is fasting insulin concentration inversely associated with rate of weight gain? Contrasting findings from the CARDIA and ARIC study cohorts. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22:48–54
35. Giacco R, Clemente G, Busiello L, Lasorella G, Rivieccio AM, Rivellese AA, Riccardi G 2004 Insulin sensitivity is increased and fat oxidation after a high-fat meal is reduced in normal-weight healthy men with strong familial predisposition to overweight. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:342–348
36. Hodge AM, Dowse GK, Alberti KG, Tuomilehto J, Gareebou H, Zimmet PZ 1996 Relationship of insulin resistance to weight gain in nondiabetic Asian Indian, Creole, and Chinese Mauritians. Mauritius Non-communicable Disease Study Group. *Metabolism* 45:627–633
37. Odeleye OE, de Courten M, Pettitt DJ, Ravussin E 1997 Fasting hyperinsulinemia is a predictor of increased body weight gain and obesity in Pima Indian children. *Diabetes* 46:1341–1345
38. Travers SH, Jeffers BW, Eckel RH 2002 Insulin resistance during puberty and future fat accumulation. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3814–3818
39. Saltiel AR, Kahn CR 2001 Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799–806
40. Burgering BM, Coffey PJ 1995 Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376:599–602
41. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA 1995 Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785–789
42. Tobe K, Kadowaki T, Hara K, Gotoh Y, Kosako H, Matsuda S, Tamemoto H, Ueki K, Akanuma Y, Nishida E, Yzaki Y 1992 Sequential activation of MAP kinase activator, MAP kinases, and S6 peptide kinase in intact rat liver following insulin injection. *J Biol Chem* 267:21089–21097
43. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF 2001 Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 56:127–155
44. Mathis D, Vence L, Benoist C 2001 β -Cell death during progression to diabetes. *Nature* 414:792–798
45. Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, Takahashi Y, Yoshizawa F, Aizawa S, Akanuma Y, Sonenberg N, Yzaki Y, Kadowaki T 1996 Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 16:3074–3084
46. Valverde AM, Kahn CR, Benito M 1999 Insulin signaling in insulin receptor substrate (IRS)-1-deficient brown adipocytes: requirement of IRS-1 for lipid synthesis. *Diabetes* 48:2122–2131
47. Asante-Appiah E, Kennedy BP 2003 Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E663–E670
48. Rocchi S, Tartare-Deckert S, Sawka-Verhelle D, Gamha A, van Obberghen E 1996 Interaction of SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor: studies of the domains involved using the yeast two-hybrid system. *Endocrinology* 137: 4944–4952
49. Hirata AE, Alvarez-Rojas F, Carvalheira JB, Carvalho CR, Dolnikoff MS, Abdalla Saad MJ 2003 Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. *Life Sci* 73:1369–1381
50. Bollag GE, Roth RA, Beaudoin J, Mochly-Rosen D, Koshland Jr DE 1986 Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor *in vitro* and reduces its protein-tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5822–5824
51. Rosenzweig T, Braiman L, Bak A, Alt A, Kuroki T, Sampson SR 2002 Differential effects of tumor necrosis factor- α on protein kinase C isoforms α and Δ mediate inhibition of insulin receptor signaling. *Diabetes* 51:1921–1930
52. Liu YF, Paz K, Herschkovitz A, Alt A, Tennenbaum T, Sampson SR, Ohba M, Kuroki T, LeRoith D, Zick Y 2001 Insulin stimulates PKC ζ -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins. *J Biol Chem* 276:14459–14465
53. Zick Y 2003 Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27(Suppl 3):S56–S60
54. Dadke SS, Li HC, Kusari AB, Begum N, Kusari J 2000 Elevated expression and activity of protein-tyrosine phosphatase 1B in skeletal muscle of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki rats. *Biochem Biophys Res Commun* 274:583–589
55. Bruning JC, Winnay J, Cheatham B, Kahn CR 1997 Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells. *Mol Cell Biol* 17:1513–1521
56. Font de Mora J, Porras A, Ahn N, Santos E 1997 Mitogen-activated protein kinase activation is not necessary for, but antagonizes, 3T3-L1 adipocytic differentiation. *Mol Cell Biol* 17:6068–6075
57. Shimba S, Wada T, Tezuka M 2001 Arylhydrocarbon receptor (AhR) is involved in negative regulation of adipose differentiation in 3T3-L1 cells: AhR inhibits adipose differentiation independently of dioxin. *J Cell Sci* 114:2809–2817
58. Kim SW, Muise AM, Lyons PJ, Ro HS 2001 Regulation of adipogenesis by a transcriptional repressor that modulates MAPK activation. *J Biol Chem* 276: 10199–10206
59. Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S, White-Carrington S, Szalkowski D, Moller DE 1996 Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J Biol Chem* 271:31771–31774
60. Bost F, Caron L, Marchetti I, Dani C, Le Marchand-Brustel Y, Binetruy B 2002 Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage. *Biochem J* 361:621–627
61. Machinal-Quelin F, Dieudonne MN, Leneuve MC, Pecquery R, Giudicelli Y 2002 Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes *in vitro*: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C853–C863
62. Prusty D, Park BH, Davis KE, Farmer SR 2002 Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and C/EBP α gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 277:46226–46232
63. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM 2000 Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14:1293–1307
64. Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Diez-Caballero A, Martinez-Cruz LA, Gil MJ, Garcia-Foncillas J, Cienfuegos JA, Salvador J, Mato JM, Fruhbeck G 2004 Gene expression profile of omental adipose tissue in human obesity. *FASEB J* 18:215–217
65. Thirone AC, Carvalheira JB, Hirata AE, Velloso LA, Saad MJ 2004 Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance. *Endocrinology* 145:281–293
66. Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, Macara IG, Pessin JE, Saltiel AR 2001 Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 410:944–948