

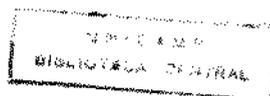
SIGISFREDO LUÍS BRENELLI (1)

**ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA EM
TECIDO RENAL: EFEITOS DO JEJUM
PROLONGADO, DA SENESCÊNCIA, DA
HIPERTROFIA RENAL COMPENSATÓRIA E DO
DIABETES MELLITUS**

*Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação, na área de
Medicina Interna da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do
título de Doutor em Medicina.*

Orientador: Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad (1)

Campinas
1996



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	Unicamp
	B75e
V.	Ex
TEMPO BC/	29465
PROC.	281/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/04/97
N.º CPD	

CM-00096727-9

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

Brenelli, Sigisfredo Luis

B75e "Etapas iniciais da ação insulínica em tecido renal: efeitos do jejum prolongado, da senescência, da hipertrofia renal compensatória e do *Diabetes Mellitus*" / Sigisfredo Luis Brenelli. Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Mário José Abdalla Saad

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Insulina. 2. Rim. 3. Receptores de substâncias endógenas. I. Mário José Abdalla Saad. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Este exemplar corresponde a versão final da tese de Doutorado, apresentada ao Curso de Pós Graduação em Medicina área de Medicina Interna FCM/ UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Medicina área de Medicina Interna, do aluno SIGIS FREDO LUIS BRENELLI.

Campinas, 11 de setembro de 1996


Prof. Dr. MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD

- ORIENTADOR -

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Aluno: Sigisfredo Luís Brenelli

Orientador: Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

Curso de Pós-Graduação em Medicina, área Medicina Interna da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 11/9/90

Dedicatória

*A meus pais, Henrique e Regina e meus irmãos,
pelo estímulo constante, principais “professores” de
minha vida.*

*À Élida, Francesco e Lucano, que justificam toda
tentativa de crescimento.*

Agradecimentos

- *Ao Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad, professor e amigo, a quem devo meu conhecimento acadêmico. Tudo o que realizei e realizarei na vida universitária será a forma do meu eterno agradecimento.*
- *À Dra. Carla, Dra. Cristina, Prof. Dr. Lício, Lucimara Fia e Ana Paula, pela colaboração diária nos experimentos e em todas as fases deste trabalho.*
- *Dona Cléo, A Conceição e Sr. Luiz, por todo o apoio desde o primeiro dia de existência do Laboratório.*
- *Ao Prof. Dr. José A. Rocha Gontijo, que me ensinou a trabalhar com animais, por sua crítica e valiosas sugestões em todo o processo de elaboração deste trabalho.*
- *A todo pessoal da Seção de Apoio Didático tanto pela grande ajuda neste trabalho, quanto pela dedicação diária em realizarmos importante função na FCM.*
- *A todos os pós-graduandos e alunos de iniciação científica do Laboratório de Biologia Molecular, com quem dividimos as alegrias e frustrações da investigação científica.*

*Entre mim e mim, há vastidões
bastantes para a navegação dos
meus desejos afligidos.*

Cecília Meirelles

Sumário

Resumo.....	i
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	11
3 Material e Métodos.....	13
4 Resultados.....	23
5 Discussão.....	57
6. Conclusão.....	71
7 Summary.....	73
8 Referências Bibliográficas.....	72
9 Anexos.....	92

Figuras

Figura 1.....	9
Figura 2.....	34
Figura 3.....	35
Figura 4.....	36
Figura 5.....	37
Figura 6.....	38
Figura 7.....	39
Figura 8.....	40
Figura 9.....	41
Figura 10.....	42
Figura 11.....	43
Figura 12.....	44
Figura 13.....	45
Figura 14.....	46
Figura 15.....	47
Figura 16.....	48
Figura 17.....	49
Figura 18.....	50
Figura 19.....	51

Figura 20	52
Figura 21	53
Figura 22.....	54
Figura 23	55
Figura 24	56

Tabelas

Tabela 1.....	93
Tabela 2	94
Tabela 3	95
Tabela 4	96
Tabela 5	97
Tabela 6	98
Tabela 7	99
Tabela 8	100
Tabela 9	101
Tabela 10	102
Tabela 11	103
Tabela 12	104
Tabela 13	105
Tabela 14	106
Tabela 15	107

Tabela 16	108
Tabela 17	109
Tabela 18	110
Tabela 19	111
Tabela 20	112

ABREVIATURAS

AII	-angiotensina II
ATP	-adenosina trifosfato
EDTA	-ácido etilendinitrilotetracético sal dissódico
EGF	-epidermal growth factor
ERKs	-quinases reguladoras da sinalização extracelular
FGF	-fibroblast growth factor
GH	-hormônio de crescimento
GRB2	-proteína ligadora do receptor para fator de crescimento
GTP	-guanosina trifosfato
IGF-1	-fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-I	-insulin-like growth factor I
IGF-II	-insulin-like growth factor II
IR	-receptor de insulina
IRS-1	-substrato 1-do receptor de insulina
ITT	-teste de tolerância à insulina
JAK1 e 2	-quinases da família Janus
MAPK	-quinase ativadora da atividade mitogênica
NGF	-nerve growth factor
PDGF	-fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF	-plated-derived growth factor
PI 3-k	-fosfatidilinositol 3 quinase
Raf	-serina quinase citoplasmática ativada pelo Ras e ativadora das MAPKs

Ras	-proteína originalmente identificada como um oncogene, tem participação na regulação do metabolismo e crescimento celular
SDS-PAGE	-sódio dodecil-sulfato-gel de poliacrilamida
SH2	-segunda homologia ao Src
SH3	-terceira homologia ao Src
Shc	-molécula adaptadora e substrato do receptor de insulina
SHPTP2	-fosfotirosina fosfatase ativada pela IRS-1 fosforilado
SOS	-fator ativador do Ras, apresenta homologia à Drosophila Son-of-sevenless
Src	-oncogene originalmente definido como produto do sarcoma vírus Rous
TGF- α	-transforming growth factor
Tris	-Tri-hidroximetilaminometano

Resumo

A insulina estimula a autofosforilação do receptor, ativando a capacidade tirosina quinase deste, resultando em fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina. O IRS-1 fosforilado liga-se à enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase), ativando-a. Nos últimos anos, demonstrou-se que essas etapas iniciais da ação insulínica apresentam regulação tecido-específica em diferentes situações fisiopatológicas. Tais estudos, realizados em tecido muscular, hepático e adiposo, não foram efetuados em tecido renal. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar os níveis e grau de fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1, bem como a associação deste com a PI 3-quinase em tecido renal. Estes experimentos foram realizados em situações de resistência à insulina com hiperinsulinemia (ratos senis com vinte meses) ou hipoinsulinemia (ratos com diabetes induzido pela estreptozotocina e em jejum prolongado por 72 horas) e, em situações de crescimento renal (diabetes e hipertrofia contralateral compensatória secundária após o 2º, 7º e 28º dia da uninefrectomia).

A metodologia utilizada envolveu infusão de insulina ou solução salina 0,9 % na veia cava inferior, sendo retirados fragmentos do tecido renal, para posterior imunoprecipitação e “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina, antiIR, antiIRS-1 e antiPI 3-quinase.

Após infusão de insulina, três bandas ficaram evidentes no “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina: uma banda de peso molecular de 80 kDa, que parece ser um substrato do receptor de insulina, tecido específico; outra de 95 kDa, correspondente à subunidade β do receptor de insulina e uma terceira, entre 165-185 kDa, coletivamente chamada pp 185 (que contém o IRS-1 e IRS-2 - substratos 1 e 2 do receptor de insulina). Em experimentos para avaliação temporal e dose-resposta, verificou-se o pico de fosforilação destas proteínas aos 90 segundos após infusão, via veia cava inferior, de 10^{-5} M de insulina.

Nos animais mantidos em jejum prolongado houve um aumento para $189 \pm 9\%$, $p < 0,0001$ (n=04) e para $134 \pm 9\%$, $p < 0,001$ (n=09) nos níveis teciduais de receptor de insulina e do IRS-1 respectivamente, quando comparados com animais alimentados. O nível de fosforilação em tirosina sofreu um aumento para $163 \pm 7\%$, $p < 0,0001$ (n=05); 211

$\pm 18\%$, $p < 0,0001$ ($n=08$) e para $150 \pm 9\%$, $p < 0,0001$ ($n=06$) nas bandas de 95 kDa (subunidade β do receptor de insulina), da pp185 e da pp 80, respectivamente. Em amostras previamente submetidas a imunoprecipitação com anticorpos antiIRS-1 e, a seguir submetidas a "immunoblotting" com anticorpos antifosfotirosina, demonstrou-se um aumento para $192 \pm 9\%$, $p < 0,005$ ($n=04$) no grau de fosforilação do IRS-1. A mesma membrana de nitrocelulose incubada com anticorpo antiPI 3-quinase apresentou um aumento para $232 \pm 9\%$, $p < 0,0001$ ($n=04$) na banda correspondente a esta enzima, sugerindo que a elevação no grau de fosforilação do IRS-1 é acompanhado de aumento na associação IRS-1/PI 3-quinase.

Para os animais que se tornaram diabéticos após uso de estreptozotocina, houve elevação nos níveis protéicos para $186 \pm 9\%$, $p < 0,0001$ ($n=8$) e para $146 \pm 8\%$, $p < 0,0001$ ($n=8$) para IR e IRS-1, respectivamente. Observou-se, também, um aumento de $141 \pm 7\%$, $p < 0,0001$ ($n=5$) na fosforilação da subunidade β e para $238 \pm 42\%$ $p < 0,01$ ($n=6$) da pp 185, sempre em relação ao controle. Concordante com estes resultados, a imunoprecipitação com anticorpo antiIRS-1 demonstrou aumento para $230 \pm 13\%$, $p < 0,0001$ ($n=5$) na fosforilação do IRS-1 e, após imunoprecipitação com anticorpo antiPI 3-quinase, aumento na quantidade de PI 3-quinase associada ao IRS-1 para $210 \pm 15\%$, $p < 0,0001$ ($n=5$). Aumentou, ainda, o grau de fosforilação da banda que migra em torno da pp 120 independentemente do estímulo com insulina. Esses resultados demonstraram elevação nos níveis e grau de fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1 em tecido renal, em situações de hipoinsulinemia (jejum e *diabetes mellitus*), sugerindo uma regulação similar à que ocorre no tecido hepático.

O efeito de envelhecimento sobre as proteínas envolvidas na transmissão do sinal insulínico foi caracterizado por uma diminuição para $58 \pm 12\%$ ($p < 0,05$) na fosforilação do receptor de insulina, para $66 \pm 6\%$ ($p < 0,05$) na da pp 185 e para $68 \pm 12\%$ ($p < 0,05$) na fosforilação da pp 80. Em concordância, a associação IRS-1/PI 3-quinase apresentou uma diminuição para $40 \pm 15\%$ ($p < 0,05$). A redução no grau de fosforilação, tanto do receptor de insulina quanto do IRS-1, não foi acompanhada de redução no nível tecidual desta proteína. No envelhecimento, a regulação das proteínas

envolvidas nas etapas iniciais da transmissão do sinal insulínico em tecido renal foi também similar à do tecido hepático.

Animais submetidos à nefrectomia contralateral tiveram seu tecido renal remanescente estudado no 2º, 7º e 28º dia após a cirurgia, não havendo diferença na quantidade de receptor de insulina nestes diferentes tempos. O nível protéico do IRS-1 apresentou significativa diminuição para $57 \pm 12\%$, $p < 0,05$ ($n=04$) nos operados há 28 dias. O grau de fosforilação da subunidade β do receptor de insulina reduziu-se para $76 \pm 10\%$, $p < 0,05$ ($n=04$); $79 \pm 5\%$, $p < 0,05$ ($n=05$) e $63 \pm 11\%$, $p < 0,05$ ($n=06$), e o da pp185 para $63 \pm 6\%$, $p < 0,0001$ ($n=08$); $58 \pm 6\%$, $p < 0,0001$ ($n=06$) e $46 \pm 5\%$, $p < 0,0001$ ($n=07$) nos animais nefrectomizados há 2, 7 e 28 dias respectivamente. Com relação à associação IRS-1/PI 3-quinase, demonstrou-se uma redução para $50 \pm 5\%$, $p < 0,0001$ ($n=04$), nos operados há 7 dias.

Em conclusão, os resultados deste estudo demonstram que, em situações de hipoinsulinemia há um aumento e, durante o envelhecimento, há uma redução nos níveis e graus de fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1 e na interação deste com a PI 3-quinase, em tecido renal. Em situações de crescimento renal, há um comportamento heterogêneo no grau de fosforilação destas proteínas, reduzindo-se no crescimento renal compensatório à uninefrectomia e aumentando no *diabetes mellitus*.

1. Introdução

A insulina é um potente hormônio com efeito metabólico e promotor do crescimento que atua no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, bem como na síntese de RNA e DNA, em praticamente todas as células, através da modificação da expressão ou atividade de uma série de enzimas e sistemas de transporte. Em mamíferos, é o principal hormônio controlador da glicemia: age estimulando a captação de glicose e seu metabolismo no tecido muscular e adiposo e inibindo a neoglicogênese no tecido hepático (FELIG & BERGMAN, 1990).

Desde a purificação relativa da insulina, no início deste século, e a demonstração de que comumente poderia melhorar o diabetes, o conhecimento do seu papel na sinalização celular e nas doenças metabólicas passou a ter grande importância (SHAFIR, BERGMAN, FELIG, 1987).

Como outros hormônios, a insulina não apresenta capacidade intrínseca para modificar funções celulares; pode, porém, exercer seu efeito através da ligação a um receptor específico, uma glicoproteína presente na membrana celular (FREYCHET, ROTH, NEVILLE, 1971; CUATRECASAS, 1972; KAHN, 1985).

O receptor de insulina está virtualmente presente em todos os tecidos de animais vertebrados, embora as concentrações variem de aproximadamente 40 receptores por célula, em eritrócitos circulantes a mais de 200.000 em adipócitos e hepatócitos (GINSBERG, 1977). É uma estrutura tetramérica composta de duas subunidades α , cada uma ligada a uma subunidade β . Uma ponte dissulfeto faz as ligações inter e intra subunidades, resultando a estrutura final de β - α - α - β . Cada subunidade α tem peso molecular de 135.000, é exclusivamente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina, enquanto a subunidade β é uma proteína transmembrana, cada uma com peso molecular de 95.000 e responsável pela tradução do sinal insulínico (KASUGA et al, 1982; KASUGA, KARLSSON, KAHN, 1982b). A família a que pertence o receptor de insulina contém duas outras moléculas estruturais relacionadas: o receptor do “insulin-like growth factor” (I-IGF) e o receptor relacionado ao de insulina (“insulin related receptor”- IRR) sem nenhum ligante ainda identificado (SHIER & WATT, 1989). Sabe-se, através da estequiometria, que 1 a 2 moléculas de insulina se ligam a cada receptor.

Em 1982, deu-se grande avanço na compreensão da transmissão do sinal insulínico, com a descoberta de que a subunidade β do receptor de insulina é uma proteína quinase, estimulada pela insulina, capaz de autofosforilar-se e fosforilar outros substratos em resíduos tirosina. Na verdade, o receptor de insulina é também uma enzima, da família das tirosinaquinases. Comporta-se, funcionalmente, como uma enzima alostérica, com uma subunidade α regulatória e uma subunidade β catalítica (KASUGA et al., 1982a, b). Quando a insulina se liga à subunidade α ou esta subunidade é retirada, ocorre uma alteração na conformação do receptor e a atividade quinase na subunidade β é estimulada (HERRERA & ROSEN, 1986; PERLMAN et al., 1989; WHITE et al., 1988). Este fato determina a transferência de grupos fosfato do ATP para vários resíduos tirosina do receptor e há a fosforilação de substratos protéicos intracelulares.

A região citoplasmática da subunidade β pode ser dividida em quatro partes relacionadas à ação: porção justamembrana, relacionada à ligação dos substratos e à internalização do receptor (CARPENTIER et al., 1993); região catalítica que contém o sítio de ligação do ATP (Lisina 1030), sendo, estruturalmente, a mais semelhante entre as várias proteínas tirosinas-quinases; região que promove a regulação da atividade quinase e a porção COOH-terminal, onde se encontram as maiores diferenças entre os receptores de insulina e IGF-1 e, por isso, tem sido implicada como responsável pela diferenciação entre os efeitos metabólicos e de crescimento da insulina (TAKATA, WEBSTER, OLEFSKY, 1988). Há, pelo menos, seis locais de fosforilação da tirosina (Tyr): um na área justamembrana, que contém tirosina na posição 972; três na porção média, que apresenta tirosina nas posições 1158, 1162 e 1163; e, dois na porção COOH-terminal, nas posições 1328 e 1334 (WHITE et al., 1988).

Consideráveis evidências têm sido acumuladas indicando que a atividade tirosina quinase é essencial para a sinalização insulínica. Experimentos realizados *in vitro*, que induzem mutações tais como a substituição da tirosina por fenilalanina, na região regulatória do receptor, afetam a capacidade de autofosforilação. A substituição da lisina por alanina da posição 1030, sitio de ligação do ATP, determina a perda da capacidade tirosina quinase do receptor de insulina (CHOU et al.,1987). A perda da atividade tirosina quinase é acompanhada de redução da capacidade do receptor de sinalizar os efeitos insulínicos metabólicos e de crescimento (WILDEN et al.,1992). Embora estudos ocasionais tenham reportado que receptores com baixa atividade quinase podem exercer efeitos biológicos em algumas enzimas intracelulares (SUNG et al.,1989), para a maioria das ações insulínicas há uma estreita relação entre atividade quinase do receptor e resposta biológica. Além do mais, o receptor de insulina tem sítios de fosforilação de serina e treonina, os quais, quando fosforilados, parecem determinar uma diminuição ou inibição da atividade quinase do receptor (BOLLAG et al.,1986).

Após a transmissão do sinal, o receptor de insulina medeia a internalização do hormônio, que sofre, então, degradação e receptores não-ocupados reciclam para a membrana plasmática. Sob estímulo insulínico prolongado, o receptor é degradado e ocorre atenuação do seu sinal (BACKER, KAHN, WHITE, 1989). Receptores de insulina internalizados na célula são capazes de ativar cataliticamente outras quinases, sugerindo que este fato seja importante na transmissão do sinal.(KAHN, 1985).

O substrato do receptor de insulina - IRS-1

Sabe-se que o estímulo insulínico pode fosforilar uma série de proteínas citoplasmáticas *in vitro*. Porém, por vários anos, o significado fisiológico deste fato permaneceu incerto, não se definindo qualquer substrato específico para o receptor de insulina. Os estudos de WHITE, TAKAYAMA, KAHN (1985), em cultura de células, demonstraram que, após estímulo insulínico, algumas proteínas fosforiladas poderiam ser identificadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida.

Na ausência do estímulo insulínico, na maioria dos tecidos estudados, apenas uma banda contendo tirosina fosforilada é significante de peso molecular de 120 kDa. Com o estímulo de insulina, aparecem rapidamente duas outras proteínas contendo tirosinas fosforiladas: uma de 95 kDa, correspondente à subunidade β do receptor, e outra banda que migra entre os pesos moleculares de 165 kDa a 185 kDa, foi inicialmente denominada -pp 185 (fosfoproteína 185), baseada na sua mobilidade eletroforética (WHITE et al., 1985) e, nos últimos cinco anos, demonstrou-se que pelo menos duas proteínas migram nesta banda: o substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) (SUN et al., 1991) e o IRS-2 (TAMEMOTO et al., 1994; ARAKI et al., 1994; SUN et al., 1995).

O IRS-1 é uma proteína citoplasmática de peso molecular de 131 kDa, que migra entre 160-190 kDa em gel de poliacrilamida, provavelmente devido a modificações pós-transdução e incorporação de fósforo. É o substrato mais extensivamente caracterizado do receptor de insulina; é rapidamente fosforilado e desfosforilado em resíduos de tirosina em resposta à estimulação com insulina; associa-se com a enzima PI 3-quinase quando ativado por insulina; é fosforilado em serina e treonina no estado basal e, finalmente, tem sua fosforilação regulada na diferenciação celular, nos estados fisiológicos e patológicos (SAAD et al., 1993). Além disso, o IRS-1 é o substrato específico para os receptores de insulina e IGF-1. Todavia, demonstrou-se, recentemente, que pode também ser fosforilado quando estimulado por interleucina-4 (MYERS et al., 1993), hormônio do crescimento (GH) (SOUZA et al., 1994) e angiotensina II (SAAD, VELLOSO, CARVALHO, 1995).

A capacidade que o IRS-1 tem de autofosforilar-se após o estímulo insulínico e de participar na transmissão do sinal depende da presença de múltiplos sítios de fosforilação de tirosinas em sua estrutura. São 22 sítios potenciais; destes, dez mantêm a seqüência Tyr-Met-X-Met (YMXM), três apresentam a seqüência Tyr-X-X-Met (YXXM), e um tem a seqüência Glu-Tyr-Tyr-Glu (EYYE). Peptídeos que apresentam esta seqüência de aminoácidos possuem maior afinidade entre os substratos conhecidos do receptor de insulina (SHOELSON et al., 1992). Em células transfectadas com cDNA do receptor de insulina humana, há uma acentuada fosforilação da pp185 após estímulo insulínico (SUN et al., 1991). Estudo realizado por WILDEN et al., (1990) demonstrou que a diminuição da

fosforilação do IRS-1 em células intactas, apresentando uma mutação no receptor de insulina, era diretamente proporcional à diminuição da atividade quinase do receptor de insulina. Embora o IRS-1 apresente também vários sítios de potencial fosforilação em serina e treonina, o papel fisiológico desse evento não é ainda bem esclarecido.

As tirosinas especificadas da molécula do IRS-1 são rapidamente fosforiladas após estimulação insulínica. Estes multisítios de fosforilação resultam numa ligação não covalente do IRS-1 com proteínas envolvidas em sinalizações intracelulares, caracterizadas pela presença de uma porção que se liga ao YMXM, denominada SH2 (homologia com o src 2, que é um oncogene).

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

A PI 3-quinase apresenta uma subunidade regulatória de 85 kDa, que contém dois segmentos SH2, responsáveis pela ligação de alta afinidade com o IRS-1 (BACKER, et al., 1992). Estudos recentes demonstram que a associação da PI 3-quinase com o IRS-1 ativado é essencial para o transporte de glicose em tecido muscular (TSAKIRIDIS et al., 1995) e em tecido adiposo (CLARKE et al., 1994), para a síntese de glicogênio e controle do crescimento celular na maioria dos tecidos (TSAKIRIDIS et al., 1995).

Além da PI 3-quinase, pelo menos três outras proteínas com porção SH2 associam-se ao IRS-1: a SH-PTP2 (Syp) - tirosina fosfatase, que contém duas cadeias SH2, potencialmente capaz de desfosforilar o receptor de insulina e o IRS-1; a GRB-2 proteína adaptadora, que compõe um complexo ativador da proteína *ras* que culminará com a ativação da MAP quinase (proteína de ativação da mitogênese), e a *Nck*, que também conecta o IRS-1 a vias de crescimento.

Assim sendo, a ação insulínica envolve uma cascata de interações covalentes e não covalentes centralizadas, num primeiro nível, no IRS-1. A ligação da insulina ao seu receptor, na superfície celular, determina a fosforilação do IRS-1. Este serve, então, como uma proteína ancoradora para várias enzimas intracelulares e adaptadores moleculares. Tais ligações determinam múltiplos sinais na cascata da ação insulínica. Como resultado, o IRS-1 é um ponto importante nos vários caminhos desta ação, onde cada um deles irá determinar a multiplicidade dos efeitos biológicos finais.

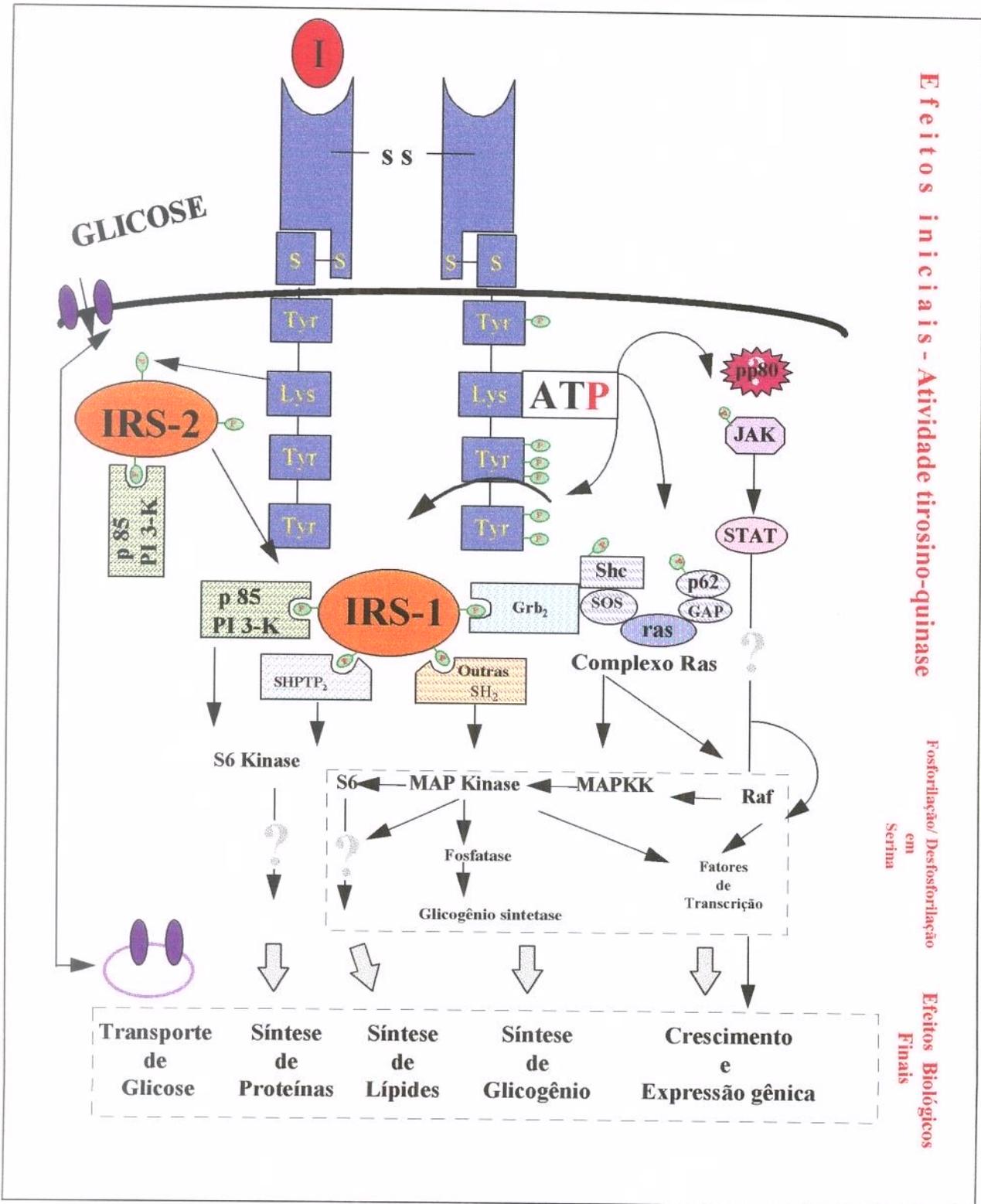
A regulação do grau de fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1, bem como a associação e ativação entre IRS-1 e PI 3-quinase foram bem caracterizadas em tecidos insulino-sensíveis clássicos como o hepático e o muscular. Nestes tecidos, a hipoinsulinemia é acompanhada de um aumento no grau de fosforilação em tirosina do receptor e do IRS-1 e da associação IRS-1 e PI 3-quinase (SAAD et al., 1992; FOLLI et al., 1993). Por outro lado, a hiperinsulinemia induz uma redução marcante na atividade das etapas iniciais da ação insulínica após a ligação deste hormônio em seu receptor (SAAD et al., 1992; FOLLI et al., 1993; SAAD et al., 1994; SAAD, FOLLI, KAHN, 1995). Ainda nestes estudos, demonstrou-se que os níveis de IRS-1 apresentam uma regulação tecido-específica, alterando-se de maneira diversa em tecido muscular, em comparação a tecido hepático, em função da hipo ou hiperinsulinemia. Assim, a caracterização e regulação das proteínas envolvidas nas etapas iniciais em outros tecidos são fundamentais para a compreensão integrada das ações insulínicas.

Em várias circunstâncias e por vários anos, considerou-se, inadvertidamente, pequeno papel do rim no metabolismo da glicose. CAHILL, HERRERA, MORGAN (1966) demonstraram que a produção renal de glicose no estado pós-absortivo era negligenciável. Estudos realizados em animais demonstraram capacidade renal de aumentar significativamente a produção de glicose em condições de deficiência insulínica (ADROGUE et al., 1990); porém, mais recentemente, CERSOSIMO, JUDD, MILES (1994) demonstraram ser o rim responsável por ~30% do “turnover” da glicose nos estados pós-absortivos, e que a hiperinsulinemia fisiológica suprime a produção e estimula a captação de glicose neste órgão.

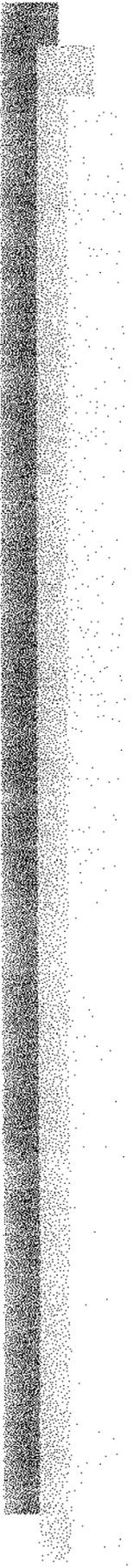
A insulina exerce efeitos específicos em tecido renal, como o estímulo à reabsorção tubular de sódio (DEFRONZO et al., 1975; DEFRONZO, 1981; SKOTT, 1989). Isto tem sido utilizado para explicar a associação entre resistência à insulina acompanhada de hiperinsulinemia e hipertensão arterial (ROCCHINI et al., 1989). Entretanto, as vias de transmissão do sinal insulínico bem como a modulação destas vias não foram ainda investigadas em tecido renal.

Assim sendo, é importante a caracterização e regulação das etapas iniciais da ação insulínica em tecido renal, frente a situações de hiperinsulinemia e hipoinsulinemia. Dentro deste contexto, o objetivo inicial do estudo foi investigar os níveis e grau de fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1, bem como a associação IRS-1 e PI 3-quinase em tecido renal em dois modelos animais: ratos em jejum, por setenta e duas horas, (hipoinsulinêmicos), e ratos velhos, com vinte meses de idade (hiperinsulinêmicos), procurando correlacionar a regulação destas etapas iniciais da ação insulínica no rim com as alterações nos níveis séricos deste hormônio.

FIGURA 1



Atribuiu-se, recentemente, ao fator de crescimento IGF-1 (insulin like growth factor) um importante papel no crescimento renal, em ratos diabéticos (FLYVBJERG et al., 1990) e também na hipertrofia e hiperplasia renal contralateral, em animais jovens uninefrectomizados (STILES et al., 1985; FAGIN & MELMED, 1987; FLYVBJERG, MARSHALL, FRYSTYK, 1992). Além da homologia existente entre insulina e IGF-1, os receptores de membrana específicos para cada um destes peptídeos também são homólogos (ULLRICH et al., 1986). O receptor de IGF-1, como o de insulina, é uma proteína heterotetramérica com duas alfa e duas subunidades beta. As subunidades beta de ambos os receptores são proteínas tirosina quinase, que se ativam através da autofosforilação. MYERS et al. (1993) demonstraram que o IRS-1 é um substrato também do receptor de IGF-1, evidenciando ser um elemento comum nas vias de transmissão do sinal insulínico e de IGF-1. Assim, como o IRS-1 é o principal substrato do receptor de IGF-1, e este parece desempenhar um importante papel em situações de crescimento renal, outro objetivo deste trabalho foi investigar os níveis e o grau de fosforilação do IRS-1 e a associação IRS-1/PI 3-quinase em tecido renal, em duas situações de crescimento renal: ratos diabéticos (induzidos por estreptozotocina), e ratos com hipertrofia contralateral compensatória secundária à uninefrectomia.



2. Objetivos

Os objetivos do presente estudos foram:

Investigar os níveis e grau de fosforilação do receptor de insulina, do IRS-1, bem como a interação deste com PI 3-quinase em tecido renal, nos seguintes modelos fisiopatológicos:

- ratos em jejum de 72 horas; ratos diabéticos; ratos senescentes e ratos com hipertrofia secundária à unifrectomia, estudados 2, 7 e 28 dias após tal cirurgia.

3. Material e Métodos

Foram utilizados, nos experimentos, ratos (*Rattus norvegicus*, variedade albina), da linhagem Wistar-Hannover, machos, adultos ou senis, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, Campinas-SP. Após o desmame, os animais recebiam como alimentação apenas ração para ratos marca Purina, que contém 0,3 a 0,5g de sódio/100g de ração (85% do sódio na forma de Cloreto de Sódio) e 0,75 g de potássio/100g de ração, superior, portanto, ao nível mínimo recomendado para se promover crescimento e reprodução dos animais, que é de 0,05g/% (REEVES, NIELSEN, HAHEY, 1993).

Uma semana antes de qualquer experimento, os animais foram acomodados em gaiolas plásticas, contendo, cada uma, no máximo seis espécimes, e mantidos em condições de fotoperíodo (12 x 12h), com ração e água fornecidos *ad libitum*. Permaneceram em jejum por período de 12 a 14 horas antes dos experimentos, exceto quando indicado.

Foram, então, realizadas quatro séries de experimentos, a saber: (1) controle x diabéticos; (2) controle x jejum prolongado; (3) controle x animais senis e (4) controle x ratos nefrectomizados há 2, 7 e 21 dias. Em cada série, foram estudados animais estimulados com insulina regular (+) e os não-estimulados (-), nos quais se infundiu somente solução salina a 0,9%. As soluções empregadas nos diversos experimentos serão descritas, a seguir:

1. MATERIAIS

1.1. Tampão de extração (extrato total) (Tampão A):

Solução utilizada para a extração das proteínas celulares do tecido renal, contém: trisma base pH 7,5 (hidroximetil aminometano) 100 mM, SDS (dodecil sulfato de sódio) 1%, EDTA (ácido etilenodiamino tetracético), fluoreto de sódio 10 mM e ortovanadato de sódio 10 mM.

1.2. Tampão de Laemmli (5X):

Utilizada para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de policrilamida para eletroforese de sódio dodecil-sulfato (SDS-PAGE) a 6%. Contém: azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50%, SDS 20%.

1.3. Solução tampão para eletroforese em gel (SDS - PAGE):

Utilizada para a realização da eletroforese no SDS-PAGE, das proteínas extraídas. A solução deve ser diluída 1:4 e contém trisma base 0,2M, glicina 1,52M, EDTA 7,18M, SDS 0,4%.

1.4. Solução tampão para transferência:

Utilizada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Contém: trisma base 25mM, glicina 129mM, metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Deve ser estocada a 4°C.

1.5. Solução tampão para SDS-PAGE, gel de resolução (resolving):

Utilizada para a manufatura do SDS-PAGE, gel de resolução, um tampão composto de : EDTA 4mM, SDS 25, (trisma base) 1,5m e tem o pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

1.6. Solução tampão para SDS-PAGE, gel de empilhamento (Stacking):

Utilizada na confecção do SDS-PAGE, gel de empilhamento das proteínas. Contém: EDTA 4mM, SDS 2%, trisma base 10 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

1.7. Solução Basal:

Solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas. Contém cloreto de sódio 0,15M, trisma base 0,01M, *Tween 20* 0,05%

1.8. Solução bloqueadora:

Utilizada para encubar a membrana de nitrocelulose logo após a transferência. Contém 5% de leite em pó desnatado (Molico®) e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal.

1.9. Solução para anticorpos:

Solução onde se diluem os anticorpos específicos. Contém 0,3% de soro albumina bovino (BSA) e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal.

1.10. Solução tampão de extração para imunoprecipitação (Tampão B):

Utilizada para a extração de proteínas para imunoprecipitação do tecido renal. Contém: trisma base 100mM, EDTA 10mM, pirofosfato de sódio 10mM, fluoreto de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2mM (diluído em álcool etílico), trítion X 100 a 1%, aprotinina 10 a 3% (0,1 mg/ml). Esta solução deve ser mantida a quatro graus. O ortovanadato, PSMF e a aprotinina devem ser acrescentados no momento do uso.

1.11. Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado:

Contém: trisma base 100mM., EDTA 1mM, ortovanadato de sódio 2mM, trítion X-100 a 0,5%.

1.12. Solução com proteína A marcada com ¹²⁵I:

Solução que contém a proteína A com iodo 125 para a marcação dos anticorpos específicos e que se prestam à visualização em auto-radiografia. Contém 0,1% de albumina dissolvida em solução basal, com 0,01 µCi de proteína A fornecida pela *Armesham UK*.

1.13. Anticorpos

Anticorpo antifosfotirosina, monoclonal, U.B.I.;

Anticorpo anti-receptor de insulina e antiIRS-1 produzido pela Research Division, Joslin Diabetes Center, Boston, MA.

Anticorpo antiPI 3-quinase, policlonal, U.B.I.

2. MÉTODOS

2.1. Procedimentos com animais:

Os animais, nas condições anteriormente descritas, foram classificados em alimentados & jejum, controle & diabetes, jovens (2 meses) & velhos (20 meses) e controles & nefrectomizados. Quando controle, apresentavam peso aproximado de 140 a 220g, com idade de seis a nove semanas. Para as séries de experimentos, outros grupos foram preparados, como se descreve, a seguir:

2.1.1. Indução do Diabetes:

Para indução de diabetes nos ratos foi utilizada estreptozotocina (Sigma Chemical Company) (RAKIETEN, RAKIETEN, NADKARNI, 1963.) dissolvida em tampão citrato 2%, 0,01 M, com pH 4,5. Utilizou-se esta solução até cinco minutos após seu preparo. A dose de 100mg/Kg de peso foi injetada por via intraperitoneal dos animais, mantidos em jejum alimentar prévio, não-hídrico, de 14 horas. As injeções

foram realizadas entre 8 e 9 horas da manhã, permanecendo os animais, ainda por mais uma hora, em jejum.

2.1.2. Nefrectomia:

Sempre pela manhã (7 - 8 h), com os animais em jejum de 12 horas, procedeu-se à cirurgia de retirada do rim esquerdo: os animais foram anestesiados por via inalatória com éter. Após tricotomia dorsal, foram colocados em mesa cirúrgica, em decúbito lateral esquerdo. Procedeu-se à abertura da pele e tecido subcutâneo em região lombar, paravertebral, através de incisão de aproximadamente 2 cm de extensão. A seguir, abriu-se a aponevrose e, afastando-se a musculatura paravertebral, encontrava-se a gordura perirenal. O rim foi assim exposto, retirado o peritônio visceral e individualizado o pedículo renal. Este foi ligado com fio de algodão e cortado com conseqüente exerece de todo o rim. Realizou-se, então, o fechamento, em três planos e, após antissepsia, manteve-se o animal aquecido por cerca de 30 minutos, retornando às gaiolas para as condições basais. Os experimentos foram realizados dois, sete e vinte e um dias após tal procedimento, de acordo com o grupo estudado.

2.1.3. Jejum:

Neste grupo de experimento, ratos mantidos em gaiolas de plástico, por 72 horas, em jejum para alimentos e sem restrição hídrica, foram comparados com os controles, mantidos nas mesmas condições, com livre acesso a alimentação até o momento do experimento.

2.1.4. Animais senis:

Neste experimento, ratos controles (8 semanas de idade) foram comparados a ratos de 80 semanas, idade em que são considerados velhos. As condições de armazenamento, aclimatação e jejum foram as mesmas dos outros grupos experimentais.

2.2. Via de acesso e retirada do tecido:

Os experimentos iniciaram-se entre 7 e 8 horas. Foram utilizados ratos machos, com a idade descrita, apresentando peso conforme a TABELA 01. Após, 12 a 14 horas de jejum alimentar, e livre acesso à ingestão hídrica, foram submetidos à anestesia intraperitonealmente com tionembutal na dose 15mg/Kg de peso. Iniciou-se o procedimento cirúrgico quando os reflexos corneano e de retirada da pata à dor estavam abolidos; os animais foram colocados em decúbito dorsal e, após tricotomia da região abdominal anterior, realizou-se uma incisão de aproximadamente 3 cm de extensão, longitudinal, subapófise xifóide, atingindo pele e tecido subcutâneo. A seguir, após rebater lateralmente, à direita, a musculatura reto-abdominal, expôs-se a cavidade abdominal. Afastando-se as alças intestinais, foi possível visualizar e individualizar a veia cava inferior e o rim direito. Nos animais do grupo controle negativo (sem insulina), foram injetados 0,5 ml de solução salina 0,9%. Para os animais positivos (+), administrou-se, através da veia cava inferior, 0,5 ml de insulina regular, na concentração de 10^{-5} diluída em salina 0,9%, a fim de se obter homogeneidade do volume. A determinação desta quantidade de insulina foi definida por um experimento dose-resposta (FIGURA 03). Após 90 segundos da injeção, tempo este determinado através do experimento demonstrado na FIGURA 04, o rim direito era descapsulado e um fragmento cortical de tecido retirado do seu pólo superior. Este pedaço de tecido renal era, então, homogeneizado pelo *polytron* em tampão de extração, à temperatura de aproximadamente 100 °C. Após ferver por mais 10 minutos, o material foi transferido para tubos e mantido em gelo (aproximadamente 0 °C) até a fase seguinte.

A seguir, fez-se a toracotomia para coleta de sangue por punção direta do ventrículo direito, para dosagem de glicemia e insulinemia nos animais que não receberam insulina. O rim contralateral (esquerdo) era, então, retirado, descapsulado, e mantido por 15 minutos em papel de filtro, com conseqüente pesagem em balança analítica.

2.3. Manuseio do extrato total:

O material extraído foi centrifugado em microcentrífuga refrigerada a 4°C (Bioanalytical) a 12.000 rpm por 40 minutos; parte do sobrenadante foi utilizada para determinação da concentração de proteínas extraídas por fragmento de tecido e outra para aplicação no SDS-PAGE.

Realizou-se pelo método do biureto (BRADFORD, 1976) a dosagem da quantidade de proteína. Neste método fotocolorimétrico usou-se reagente da *Bio Rad*.

Para aplicação no SDS-PAGE, armazenou-se o sobrenadante em alíquotas com tampão de *Laemmli* (LAEMMLI, 1970) acrescido de DTT 200mM, numa proporção de 1:5 (400 µl do sobrenadante em 100µl do tampão de *Laemmli* com DDT). Fervia-se, então, este material a 100°C, por 5 minutos e imediatamente era aplicado no gel.

2.4. “Immunoblotting” ou “Westernblotting”:

Duzentos microgramas do sobrenadante de extrato tecidual foram aplicados no SDS-PAGE, de 2 mm de espessura e o gel é balizado por marcador de alto peso molecular da *Bio Rad* que contém: miosina (205 kDa), β galactosidade (17 kD), BSA (89 kDa) e ovalbumina (47 kDa). Realizou-se a eletroforese em cuba de minigel da *Bio Rad*, com solução tampão para eletroforese previamente diluída. O SDS-PAGE foi sempre submetido a 20 volts inicialmente até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (“stacking”) e 100 volts até o final do gel de resolução (“resolving”). A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Para isto, utilizou-se o equipamento de eletrotransferência do minigel da *Bio Rad*. Manteve-se a cuba constantemente a 120 volts por 2 horas, como o descrito por TOWBIN, STAEHLIN & GORDON, 1979. A fim de manter a temperatura não muito alta, foram efetuadas sucessivas trocas da forma de gelo.

As membranas com as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por duas horas, à temperatura ambiente e a seguir, lavadas em solução basal por três sessões de dez minutos, para subsequente incubação com anticorpo específico.

Após a incubação, que era feita "overnight" a 4°C por período de 14 a 16 horas, sob agitação constante, a membrana era novamente lavada com solução basal por quatro sessões de dez minutos. A seguir, novamente incubada, agora em 10 ml de solução basal com 2 µCi de proteína A marcada com iodo ¹²⁵ (30µCi/µg), durante quatro horas, à temperatura ambiente, a membrana era novamente lavada com solução basal por cinco sessões de dez minutos, seca e exposta em filme de RX (Eastman Kodak, Rochester, NY), usando-se intensificador (Cronex Lightning Plus intensifying screens - DuPont, Wilmington, DE) e o cassete, mantido à temperatura de -80°C. Após 12 a 48 horas, o filme era revelado de forma convencional.

Uma vez identificadas as bandas das auto-radiografias, procedeu-se à leitura por densitometria óptica (optical densitometry model GS 300, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA), quantificando suas áreas. A partir de então, foi realizada a análise dos dados, comparando-se a densidade das bandas obtidas por auto-radiografia, no grupo experimental, com aquela verificada no grupo controle. Sempre houve controle intra-experimento. Os resultados foram descritos como variação percentual entre a intensidade ou o nível de uma banda, correspondente a uma determinada proteína de um animal em experimento, com as de outro controle (100%).

2.5. Imunoprecipitação:

Em alguns experimentos, o tecido renal de animais foi extraído e homogeneizado em tampão extração (B) a 4 °C. Após centrifugação por 35 min, a 12.000 rpm a 4 °C, usou-se a solução sobrenadante dos tecidos para imunoprecipitação com anticorpo antiIRS-1. Aqui também se normalizou o volume das amostras por concentração protéica, como o realizado para o extrato total dos tecidos; as referidas amostras foram incubadas com o anticorpo antiIRS-1 e permaneceram sob agitação contínua, a 4 °C, por

espaço de 12 a 14 horas. A seguir, foram acrescentados 50 µl de proteína A-Sepharose 6 MB para precipitação do complexo proteína - anti IR-1 (IRS-1 - antiIRS-1), sob agitação contínua a 4°C, por duas horas. Então, foram novamente centrifugadas por 15 minutos, a 12.000 rpm a 4 °C, desprezou-se o sobrenadante, e lavou-se, por três vezes, o precipitado com a solução tampão para lavagem e, após ressuspensão, em tampão de Laemmli, foi submetido à eletroforese em SDS-PAGE 6%, e “immunoblotting” com anticorpos antifosfotirosina e antiPI 3-quinase.

2.6. Outros

Dosagem da glicemia:

A determinação da glicose plasmática foi realizada através de método enzimático colorimétrico, (Glicose E enzimática, Reactoclin) segundo TRINDER (1969) (HENRY, CANNON, WINKILMAN, 1974; LOTT & TURNER, 1975) e os resultados expressos em mg/dl. As amostras de um mesmo experimento e de experimentos correspondentes foram realizados num mesmo ensaio e sempre em triplicata.

Dosagem da insulina plasmática:

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

Análise estatística:

Experimentos foram sempre realizados possibilitando o estudo de todos os grupos de animais em paralelo. Para análise estatística dos resultados, utilizou-se o Teste T de Student, pareado e não pareado, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), sendo os resultados expressos como média \pm erro padrão da média ($X \pm E.P.M.$).

4. Resultados

1. Características gerais dos animais:

As características gerais dos animais utilizados nos diferentes experimentos são apresentadas nas tabelas I e II. As determinações da glicose plasmática e insulina sérica descritas a seguir, foram coletadas de animais em jejum de 12 a 14 horas, exceto o grupo alimentado e em jejum de 72 horas.

Os animais que ficaram em jejum de três dias apresentaram uma perda de peso de 40 ± 1 g, em relação aos animais alimentados (J: 146 g X A: 186 g, $p < 0,0001$) [TABELA 02]. Os níveis plasmáticos de glicose e insulina também foram significativamente menores no grupo com restrição alimentar (J: 74 ± 1 mg/dl X A: 158 ± 4 mg/dl, $p < 0,001$ e 13 ± 2 μ U/ml X 38 ± 4 μ U/ml, $p < 0,001$ respectivamente) [TABELA 01].

O grupo de animais com 20 meses de idade (V) apresentou peso significativamente maior que o grupo com 02 meses (Jo) (V: 438 ± 16 g X Jo: 154 ± 4 g, $p < 0,001$ respectivamente), mas o nível de glicose plasmática era semelhante nos dois grupos (V: 116 ± 11 mg/dl X Jo: 116 ± 7 mg/dl), enquanto a insulina sérica foi maior nos ratos velhos que nos jovens (V: 52 ± 5 μ U/ml X Jo: 18 ± 5 μ U/ml $p < 0,001$) [TABELAS 01 e 02].

Os animais submetidos à nefrectomia unilateral não apresentaram variações importantes do peso nos grupos aos 2º, 7º e 28º dias pós cirurgia, em relação a animais do grupo controle (C: 159 ± 1 g X Nfx 02d: 159 ± 1 g, $p = 0,90$; C: 204 ± 5 g X Nfx 07d: 203 ± 5 g, $p = 0,94$; C: 230 ± 4 g X Nfx 28d: 228 ± 5 g, $p = 0,71$ respectivamente) [TABELA 02]. A comparação dos níveis glicêmicos dos animais controle e nefrectomizados há 07 dias não apresentou diferença (C: 93 ± 3 mg/dl X Nfx: 88 ± 5 mg/dl, $p = 0,383$) enquanto que os níveis de insulina sérica foram significativamente maiores (C: $26 \pm 0,5$ μ U/ml X Nfx: 55 ± 3 μ U/ml, $p < 0,0001$) [TABELA 01].

Finalmente, os animais com *diabetes mellitus* (DM) induzido por estreptozotocina, após 7 dias da injeção desta droga, apresentaram peso corporal significativamente menor que o daqueles do grupo controle (DM: 98 ± 4 g X C: 141 ± 4 g

p<0,0001 respectivamente) [TABELA 02]. Como esperado, houve uma elevação marcante nos níveis glicêmicos dos animais diabéticos em relação ao controle (DM: 362 ± 16 mg/dl X 122 ± 6 mg/dl, p<0,001), acompanhada de uma redução significativa nos níveis de insulina sérica (C: 29 ± 4 μ U/ml X DM: 6 ± 2 μ U/ml, p< 0,0001) [TABELA 01].

2. Caracterização das proteínas envolvidas nas etapas iniciais da ação insulínica:

2.1. Fosforilação de proteínas em tirosina após estímulo com insulina em tecido renal:

A FIGURA 2 demonstra o efeito da insulina sobre a fosforilação em tirosinas de proteínas celulares, em tecido hepático e renal de ratos normais. No estado basal, uma banda ampla com peso molecular entre 110 e 130 kDa foi observada em extratos de tecido renal, sendo denominada fosfoproteína 120 (pp120), nomenclatura esta que utilizaremos para descrevê-la. Em uma análise de dezesseis experimentos realizados, após a infusão de insulina, esta banda apresentou mudanças inconsistentes e não-significativas. Após infusão de insulina na veia cava inferior, uma banda de 95 kDa foi evidenciada no “immunoblotting” com anticorpos antifosfotirosina. Estudos em outros tecidos e experimentos nossos preliminares demonstraram que esta banda corresponde à subunidade β do receptor de insulina. Adicionalmente, após o estímulo insulínico, uma banda migrando entre 165 e 185 kDa foi também detectada. Estudos utilizando tecidos muscular e hepático demonstraram que o substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), embora não seja exclusivo, é o mais abundante e primeiro componente descrito desta banda. Recentemente, descreveu-se que outra proteína com peso molecular discretamente mais elevado que o IRS-1 migra também nesta ampla banda, e foi denominada como IRS-2. Em alguns dos nossos experimentos, a banda entre 165 e 180 kDa, estimulada por insulina, aparecia como dupla, possivelmente caracterizada pelo IRS-1 e IRS-2. Esta banda é denominada de pp 185 e é esta nomenclatura que utilizaremos para descrevê-la.

Em diversos experimentos detectou-se outra banda, de peso molecular de 80 kDa, que apresentou aumento no grau de fosforilação após estímulo com insulina, sugerindo que esta fosfoproteína (pp 80) possa ser um substrato do receptor de insulina no tecido renal. Entretanto, uma análise pormenorizada desta banda ficou prejudicada em função do comportamento inconsistente frente a diferentes lotes do anticorpo antifosfotirosina, sugerindo que as tirosinas fosforiladas desta proteína devam ter particularidade de interação que as difere das tirosinas do receptor de insulina e da pp 185.

2. 2. Efeito dose - resposta:

Com o objetivo de investigar o efeito de diferentes concentrações de insulina nos níveis de fosforilação do receptor de insulina e da pp 185, realizaram-se experimentos onde eram injetadas, na veia cava inferior, doses crescentes de insulina regular diluídas em solução fisiológica 0,9 % (10^{-11} M; 10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M). Observa-se, na FIGURA 3, que houve aumento gradual de fosforilação do receptor de insulina e da pp 185, atingindo um máximo com 10^{-5} M que é também a dose máxima quando se avalia o grau de fosforilação do IRS-1 em tecido muscular (SAAD et al., 1992). A dose infundida que produziu metade do efeito máximo foi próximo a 10^{-7} M. Embora seja difícil calcular a dose de insulina que atingiu o tecido renal, em função da diluição do hormônio e da perfusão renal, em experimentos preliminares realizamos determinação de insulina sérica, colhida na veia cava 90 segundos após infusão de 0,5 ml de 10^{-7} M do hormônio, e os resultados revelaram níveis entre 80 e 110 μ U/ml, o que é discretamente mais elevado que níveis fisiológicos pós-prandiais. Para cada dose, o grau de fosforilação foi proporcionalmente crescente, e com a dose de 10^{-5} M, em três experimentos, o incremento na fosforilação da pp 185, em relação ao basal, foi de aproximadamente 30% ($382 \pm 45\%$, $p < 0,001$) e da fosforilação da subunidade β do receptor, de aproximadamente 200% ($290 \pm 40\%$, $p < 0,05$) [TABELA 13].

2.3. Relação entre a fosforilação das proteínas e o tempo pós-infusão da insulina:

A fim de determinarmos o tempo em que haveria um grau máximo de fosforilação das proteínas: receptor de insulina, pp 185, e pp80, realizamos experimentos onde o tecido renal era retirado 30, 60, 90 segundos, 2, 3, 5 e 15 minutos após injeção de insulina regular na veia cava inferior. Obtivemos um maior nível de fosforilação tanto da pp 185, quanto da subunidade β do receptor, aos 90 segundos (FIGURA 04). A fosforilação ocorreu de maneira crescente até os 90 segundos sendo que, numa média de três experimentos, observamos um aumento de $110 \pm 2\%$, $p < 0,005$; $132 \pm 12\%$, $p < 0,05$; $203 \pm 9\%$, $p < 0,001$ no grau de fosforilação do receptor de insulina (RI) aos 30, 60 e 90 segundos, respectivamente em relação ao basal. Nos mesmos experimentos o aumento no grau de fosforilação da pp185 foi de $171 \pm 17\%$, $p < 0,05$; $440 \pm 61\%$, $p < 0,005$; $511 \pm 33\%$, $p < 0,001$ aos 30, 60 e 90 segundos [TABELA 14]. O comportamento da pp 80 foi similar ao do receptor de insulina e ao da pp185, aumentando de $117 \pm 12\%$, $p = 0,21$; $196 \pm 7\%$, $p < 0,001$; $312 \pm 20\%$, $p < 0,001$ aos 30, 60 e 90 minutos, respectivamente [TABELA 14]. Após os 90 segundos, houve uma redução gradativa no grau de fosforilação da pp 80, do receptor de insulina e da pp185, sugerindo a ação de fosfoproteínas fosfatases, que passam então a desfosforilar estas proteínas. (FIGURA 04). Assim sendo, em todos os experimentos realizados nesse trabalho, o tecido renal foi sempre retirado 90 segundos após o estímulo com a insulina.

3. Efeito do jejum prolongado na fosforilação do receptor de insulina e do seu substrato 1 (IRS-1) no tecido renal:

O protocolo que utilizamos para avaliação do efeito do jejum na transmissão do sinal insulínico no tecido renal de ratos *in vivo* contou com animais de 08 semanas divididos em 2 grupos. Os animais do grupo controle (A) alimentavam-se normalmente e a ração era mantida até o momento do experimento, enquanto os animais do grupo experimental (jejum), mantiveram-se em dieta zero, sem restrição hídrica, por 72 horas prévias ao experimento. Após anestesia e abertura da cavidade abdominal, os

tiveram injetados 10^{-5} M de solução salina ou de insulina regular e tiveram um fragmento de tecido renal retirado 90 segundos após a injeção. O tecido foi extraído e homogeneizado conforme o descrito em Material e Métodos. Os extratos totais foram submetidos a separação protéica no SDS-PAGE e as proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Desta forma puderam ser analisadas com anticorpos anti-receptor de insulina (subunidade β), antiIRS-1 e antifosfotirosina.

Os filtros de nitrocelulose tratados com anticorpo anti-receptor de insulina (C-terminal), demonstraram uma banda de 95 kDa caracterizada como o receptor de insulina (FIGURA 05-A). A intensidade desta banda era maior nos animais em jejum, sugerindo um aumento no número de receptores de insulina no tecido renal, neste grupo. A quantificação por densitometria óptica desta banda em quatro experimentos, demonstrou um aumento significativo ($189 \pm 9\%$, $p < 0,0001$) nos animais em jejum em relação aos alimentados (FIGURA 07-A). Em relação à concentração do IRS-1, obtida através do tratamento do filtro com o anticorpo antiIRS-1(C-terminal) também se observou um aumento nos animais em jejum, embora menos marcante que o evidenciado para o receptor (FIGURA 05-B). A densitometria óptica de 9 experimentos demonstrou um aumento para $134 \pm 9\%$, $p < 0,001$ nos níveis protéicos de IRS-1 nos animais em jejum, quando comparados com animais alimentados (FIGURA 07-A).

Após a estimulação *in vivo* com insulina e procedendo ao “imunoblotting” com o anticorpo antifosfotirosina, evidenciou-se uma banda de 95 kDa, previamente identificada como a subunidade β do receptor de insulina. O nível de fosforilação em tirosina dessa banda foi maior nos animais em jejum (FIGURA 06), apresentando um aumento para $163 \pm 7\%$, $p < 0,0001$ ($n=5$). No mesmo experimento, após estímulo com insulina, detectamos outra banda que migra entre os pesos moleculares de 165 e 185 kDa. Esta banda é conhecida como pp 185 e contém o IRS-1 como um de seus componentes (TAMEMOTO et al., 1994 e ARAKI et al., 1994). O grau de fosforilação da pp 185, após infusão de insulina, foi significativamente maior (FIGURA 06) nos animais em jejum [$211 \pm 18\%$, $p < 0,0001$ ($n=8$)], em relação ao grupo alimentado (FIGURA 07-B).

Ainda neste mesmo experimento, nota-se que uma proteína de peso molecular de 80 kDa (pp 80) é fosforilada em tirosina. Antes da estimulação com insulina, o grau de fosforilação desta banda é maior nos animais em jejum. Após infusão de insulina houve um aumento no grau de fosforilação em tirosina da pp80 nos dois grupos, embora mais marcante nos animais com restrição alimentar.

Num dos experimentos deste grupo, infundimos insulina na veia porta e retiramos um fragmento de tecido hepático aos 30 segundos e de tecido renal aos 90 segundos, objetivando comparar as alterações nas fosfoproteínas nestes dois tecidos. A FIGURA 06 demonstra que o jejum de 72 horas exerce efeito similar nas fosfoproteínas em tecido renal e hepático, ou seja, um aumento significativo no grau de fosforilação do receptor de insulina e da pp 185. Estes resultados em tecido hepático foram previamente demonstrados (SAAD et al. 1992).

Com o objetivo de investigar exclusivamente o grau de fosforilação do IRS-1 em animais alimentados e em jejum prolongado, imunoprecipitamos com anticorpos antiIRS-1 extratos de tecido renal destes animais, estimulados ou não com insulina. A seguir realizamos o "immunoblotting" com anticorpos antifosfotirosina (FIGURA 08-A). Demonstrou-se que, após infusão de insulina, a banda correspondente ao IRS-1 torna-se evidente, com grau de fosforilação maior nos animais em jejum. A densitometria óptica de 4 experimentos demonstrou um aumento de $192 \pm 8\%$, $p < 0,005$ após estímulo insulínico nos animais em jejum em relação aos animais alimentados (FIGURA 09-A).

Estudos anteriores sugeriram haver uma interação relativamente estável e de alta afinidade entre o IRS-1 fosforilado e a subunidade de 85 kDa da fosfatidilinositol 3 quinase (PI 3-quinase), tal que ambas podem ser co-precipitadas com anticorpos contra qualquer uma destas duas proteínas. Utilizamos as mesmas membranas de nitrocelulose, que continham amostras de rim previamente imunoprecipitadas com anticorpo antiIRS-1 e após, incubamos estas membranas de nitrocelulose com anticorpo anti PI 3-quinase. Nota-se nas linhas correspondentes aos animais inoculados com salina 0,9% pouca ou nenhuma associação. Após estímulo com insulina, uma banda correspondente à subunidade regulatória da PI 3-quinase fica evidente nas amostras imunoprecipitadas dos animais

alimentados e em jejum, sugerindo associação entre IRS-1 fosforilado e a enzima PI 3-quinase. Comparativamente, nas amostras de animais estimulados com insulina, nota-se um aumento na associação IRS-1 / PI 3-quinase de $232 \pm 9\%$, $p < 0,0001$ ($n=4$) nos animais em jejum (FIGURA 09-B), sugerindo que um aumento no grau de fosforilação do IRS-1 é acompanhado de um aumento na associação IRS-1/ PI 3-quinase (FIGURA 08-B).

4. Efeito do envelhecimento sobre a fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1 no tecido renal de ratos

A FIGURA 10-A apresenta os valores dos experimentos realizados com os ratos controles (08 semanas) e ratos senis (20 meses). Demonstra que não houve diferença nos níveis de proteína do receptor de insulina em tecido renal de ratos com 2 e 20 meses de idade ($V: 97 \pm 3\%$, $p=0,29$; $n=4$), determinado por “immunoblotting” com anticorpo anti-RI. De maneira semelhante (FIGURA 10-B), os níveis de IRS-1 também não foram estatisticamente diferentes em animais com 20 meses, quando comparados aos de animais com dois meses de idade ($V: 101 \pm 10\%$, $p=0,90$; $n=4$) (FIGURA 12-A).

Por outro lado, após infusão de insulina, observou-se uma diminuição no grau de fosforilação do receptor de insulina nos animais senis (FIGURA 11). A densitometria óptica em 06 experimentos evidenciou uma diminuição para $58 \pm 12\%$ ($p < 0,5$) em relação aos animais com dois meses. A pp 185 apresentou um comportamento similar, com uma redução para $66 \pm 6\%$ ($p < 0,0001$) em tecido renal de animais com 20 meses, quando comparados aos jovens (FIGURA 12-B).

Ainda neste mesmo “immunoblotting”, ficou evidente um aumento de fosforilação de pp 80 em animais jovens e um aumento apenas discreto nos animais idosos (não quantificada). A densitometria óptica revelou que a redução no grau de fosforilação da pp 80 em animais idosos, após estímulo com insulina, foi para $69 \pm 8\%$, $p < 0,005$, $n=5$, em relação aos animais com dois meses (FIGURA 11).

Quando os extratos de tecido renal foram submetidos à imunoprecipitação com o anticorpo contra IRS-1 e posteriormente submetido ao “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina, também se observou uma diminuição para $60 \pm 5\%$, ($p < 0,0001$, $n = 5$) no grau de fosforilação do IRS-1, após infusão de insulina, no tecido de animais velhos (FIGURA 13-A). Tratando-se essa membrana com o anticorpo antiPI 3-quinase, notamos uma diminuição para $40 \pm 4\%$, ($p < 0,0001$; $n = 5$) na associação IRS-1 / PI 3-quinase em tecido renal de animal idoso, após estímulo com insulina (FIGURA 13-B). Estes dados sugerem que a redução de fosforilação do IRS-1 é acompanhada de diminuição na interação IRS-1/PI 3-quinase no tecido renal de ratos senis (FIGURA 14).

5. Efeito da nefrectomia parcial sobre a fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1 no tecido renal remanescente

Os animais, submetidos a nefrectomia contralateral, tiveram seu tecido renal remanescente estudado 2, 7 e 28 dias após a cirurgia realizada pelas técnicas previamente descritas. No “immunoblotting” com anticorpo anti-receptor de insulina, a intensidade da banda de 95 kDa foi semelhante à dos controles nos animais operados há 2, 7 e 28 dias (FIGURA 15-A). A quantificação desta proteína, através da leitura por densitometria óptica da banda referente, mostrou variações não significativas de $120 \pm 9\%$, $p = 0,7$ ($n = 4$); $113 \pm 10\%$, $p = 0,86$ ($n = 4$) e de $112 \pm 9\%$, $p = 0,24$ ($n = 4$) para os nefrectomizados há 2, 7 e 28 dias, respectivamente, em relação aos controles (não operados) (FIGURA 17-A). Com o “immunoblotting”, utilizando-se anticorpo antiIRS-1, os valores demonstram resultado semelhante ao dos controles para os animais operados há 02 e 07 dias ($94 \pm 18\%$, $p = 0,76$ $n = 4$ e $105 \pm 27\%$, $p = 0,86$ $n = 5$) respectivamente. Surpreendentemente, após 28 dias da cirurgia, houve um decréscimo neste nível protéico para $57 \pm 12\%$, ($p < 0,05$; $n = 5$) (FIGURA 17-A).

No “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina, observamos que o grau de fosforilação da subunidade β do receptor reduziu-se no rim contralateral de animais nefrectomizados. A densitometria óptica de cinco experimentos demonstrou que o grau de fosforilação do receptor reduziu-se para $76 \pm 10\%$ ($p < 0,05$), $79 \pm 5\%$, ($p < 0,005$) e $63 \pm 11\%$, ($p < 0,05$) nos animais nefrectomizados há 2, 7 e 28 dias, respectivamente (FIGURA 16).

De maneira semelhante, neste mesmo “immunoblotting” também houve uma redução nos níveis de fosforilação da pp 185 para $63 \pm 6\%$, $p < 0,0001$ ($n=8$); $58 \pm 6\%$, $p < 0,0001$ ($n=6$); e $46 \pm 5\%$, $p < 0,0001$ ($n=7$) nos animais nefrectomizados há 2, 7 e 28 dias, respectivamente (FIGURA 17-B).

Nos extratos de tecido renal contralateral de ratos uninefrectomizados há 07 dias, quando imunoprecipitadas com anticorpo antiIRS-1 e posteriormente submetidas ao “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (FIGURA 18-A), houve uma redução para $41 \pm 5\%$, $p < 0,0001$ ($n=4$), no grau de fosforilação do IRS-1 em relação ao controle (FIGURA 19-A). Quando estas mesmas membranas de nitrocelulose foram tratadas com anticorpos antiPI 3-quinase (FIGURA 18-B), houve uma redução para $50 \pm 12\%$, $p < 0,0001$ ($n=4$) na associação entre IRS-1 e PI 3-quinase (FIGURA 19-B).

6. Efeito do *diabetes mellitus* induzido pela estreptozotocina sobre a fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1 no tecido renal de ratos

Os animais com *diabetes mellitus* induzido pela estreptozotocina tiveram seu tecido renal estudado 07 dias após a injeção desta droga. A FIGURA 20-A demonstra que, quando o material foi tratado com anticorpo anti-receptor de insulina, numa média de 8 experimentos, o nível do receptor de insulina aumentou significativamente no rim destes animais para $186 \pm 9\%$ ($p < 0,0001$) em relação ao controle (ratos normais) (FIGURA 22-A). De maneira semelhante (FIGURA 20-B), no “immunoblotting” com anticorpo específico, o nível do IRS-1 apresentou um aumento para $146 \pm 8\%$, $p < 0,0001$ em relação ao controle, numa média de 8 experimentos (FIGURA 22-A).

A FIGURA 21 demonstra que, após estímulo insulínico e com o material sendo tratado com anticorpo antifosfotirosina, houve um aumento marcante no grau de fosforilação da subunidade β do receptor de insulina e da pp 185 para $141 \pm 7\%$ ($p < 0,0001$) $n=5$ e $238 \pm 42\%$, ($p < 0,01$) ($n=6$), respectivamente, em tecido renal de animais diabéticos em comparação aos controles (FIGURA 22-B). Ainda nos animais diabéticos, observou-se um aumento no grau de fosforilação em tirosina da banda que migra ao redor de 120 kDa, denominada pp 120, independente do estímulo com insulina. Na média de cinco experimentos, na situação basal (sem estímulo com insulina), esse acréscimo foi para $180 \pm 15\%$ ($p < 0,05$) e $220 \pm 20\%$ ($p < 0,05$) após o estímulo, em relação aos controles.

Nas amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo antiIRS-1 e após procedimento de “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (FIGURA 23-A), houve um aumento significativo no grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 nos animais diabéticos para $230 \pm 13\%$, $p < 0,0001$ $n=5$ em relação ao controle (FIGURA 24-A), estudo este concordante com o grau de fosforilação do pp 185, em extrato total de tecido renal de animal diabético. E, tratando-se esse material imunoprecipitado com anticorpo antiPI 3-quinase (FIGURA 23-B) houve aumento para $210 \pm 15\%$, $p < 0,0001$ $n=5$ na intensidade da banda, demonstrando uma maior associação IRS/PI 3-quinase em tecido renal de animais com Diabetes Mellitus.

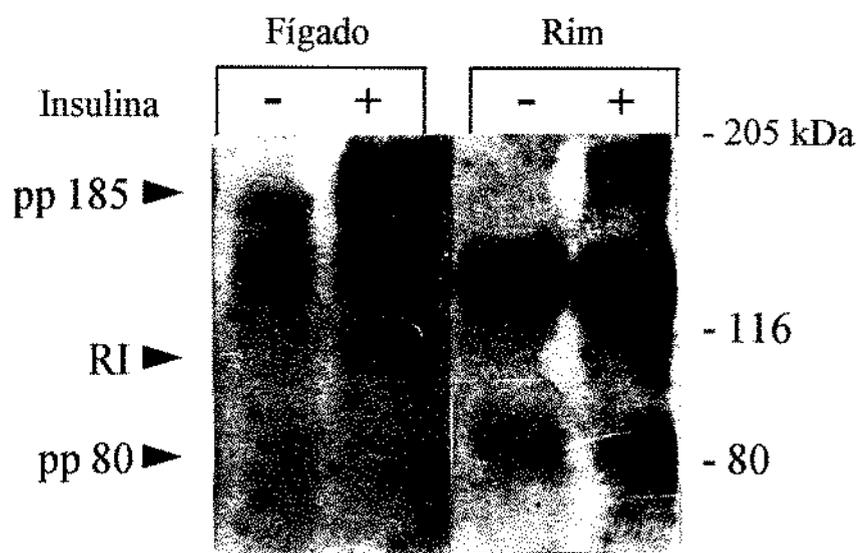


Figura 2: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina, da pp 185 e da pp 80 em tecido hepático e renal, antes (-) e após (+) infusão de insulina. As proteínas foram extraídas em tampão, separadas em gel e, após transferência para membrana de nitrocelulose, foi realizado "immunoblotting" com anticorpo antifosfotirosina e ¹²⁵I-proteína A. A membrana foi então submetida à auto-radiografia, conforme a descrição em Material e Métodos.

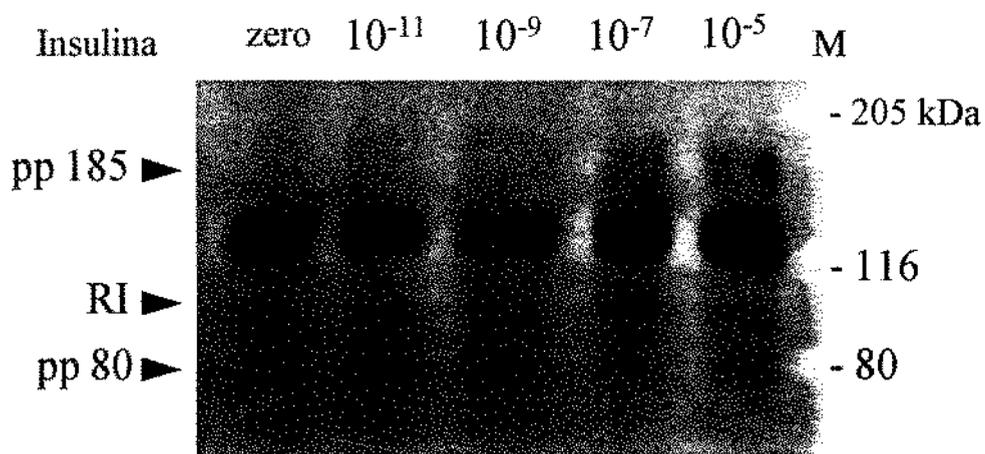


Figura 3: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina, da pp 185 e da pp 80 em tecido renal, antes (zero) e após infusão de diferentes doses de insulina (10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-5} M). As proteínas foram extraídas e homogeneizadas conforme descrição na figura 1 e o "immunoblotting" realizado com anticorpo antifosfotirosina.

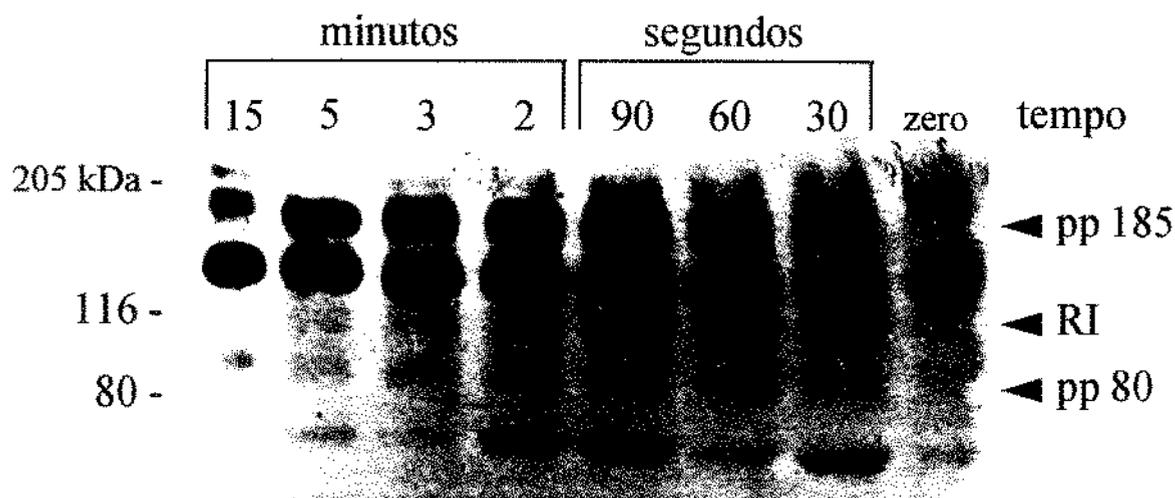


Figura 4: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina, da pp 185 e da pp 80 em tecido renal extraídos em diferentes tempos (30 segundos a 15 minutos), após infusão de 10^{-5} M de insulina. As proteínas foram extraídas e homogeneizadas conforme descrição na figura 1 e o "immunoblotting" realizado com anticorpo antifosfotirosina.

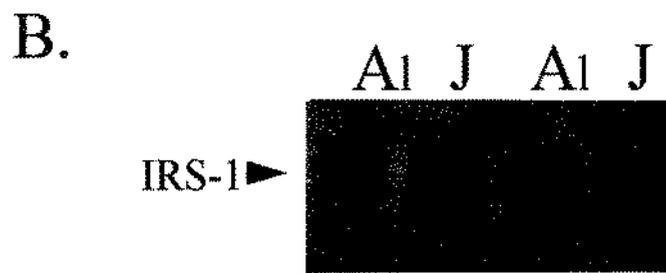


Figura 5: Avaliação do nível protéico do receptor de insulina, em tecido renal de animais alimentados (A1) e em jejum de 72 horas (J). As proteínas foram extraídas e homogeneizadas como descritas na figura 1, porém o "immunoblotting" foi realizado com anticorpos (A) anti-receptor de insulina (RI) e (B) antiIRS-1.

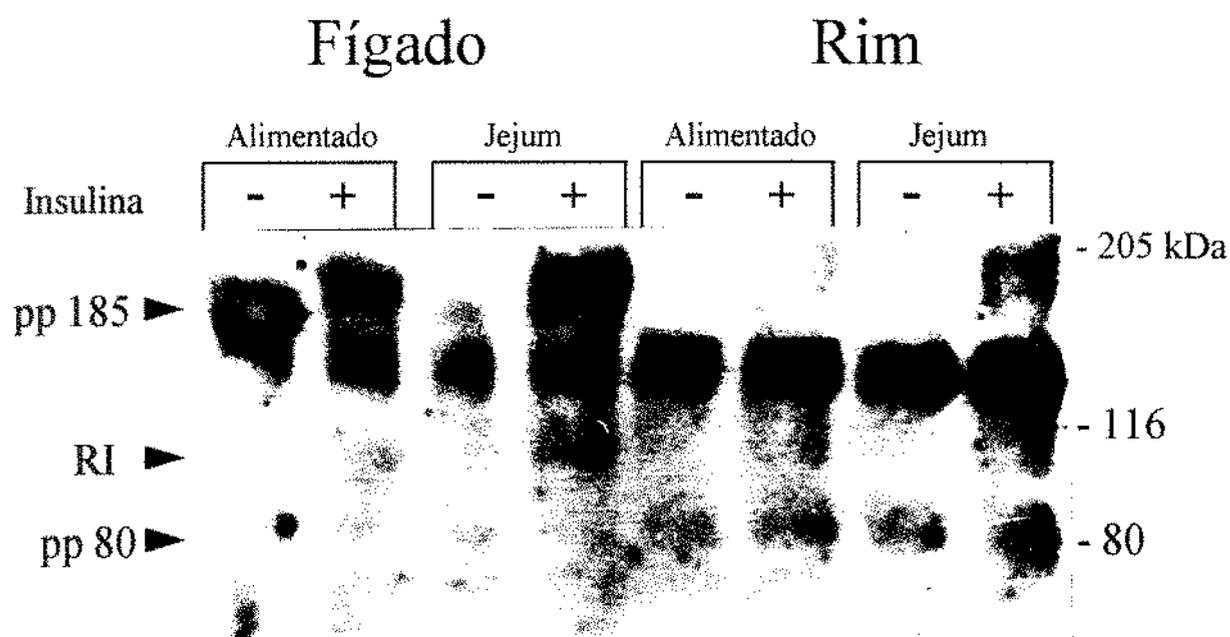


Figura 6: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina, da pp 185 e da pp 80, em tecido hepático e renal, antes (-) e após (+) infusão de insulina em animais alimentados e em jejum de 72 horas. As proteínas foram extraídas e homogeneizadas como descritas na figura 1, e o "immunoblotting" realizado com anticorpo antifosfotirosina.

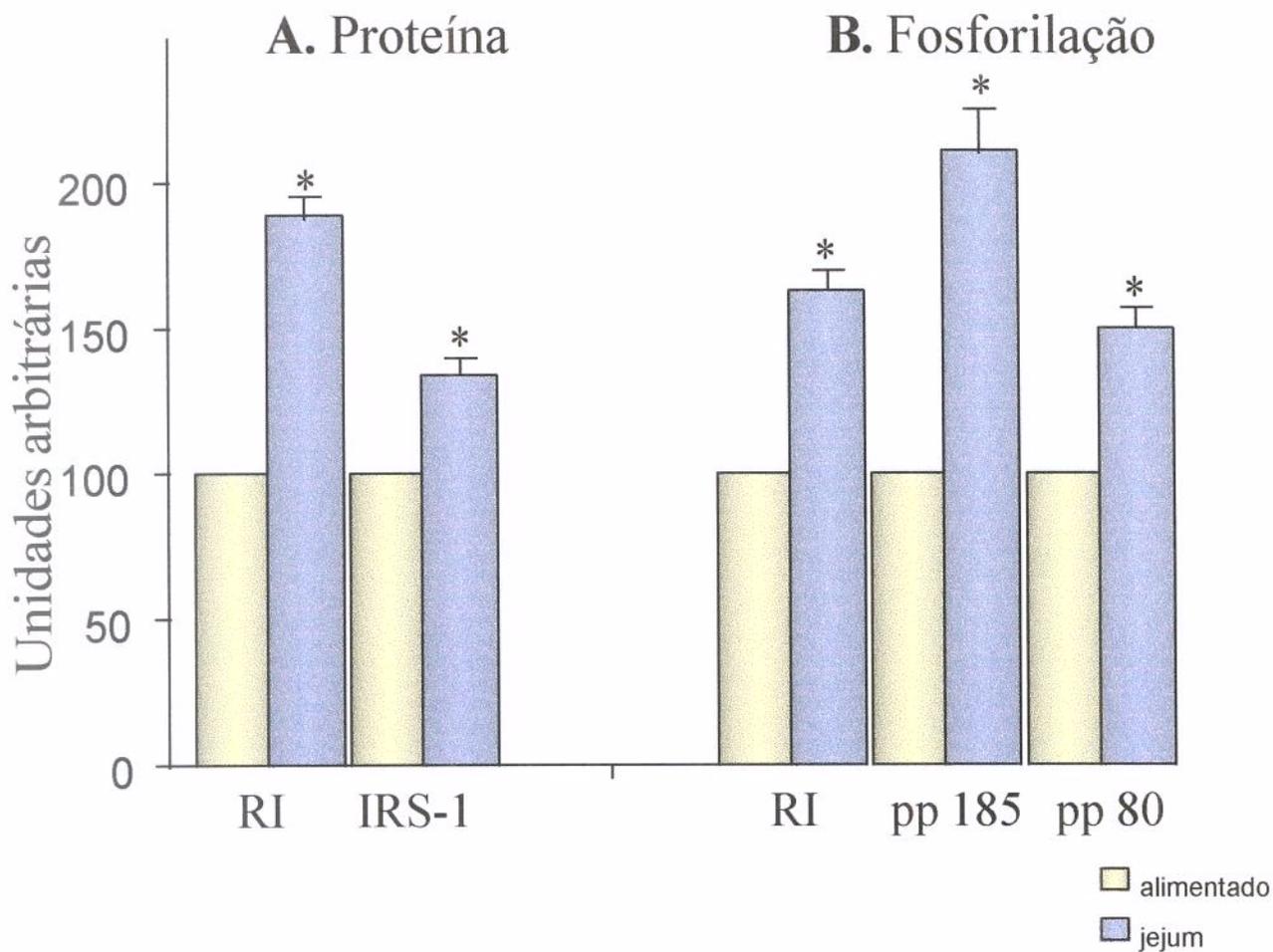
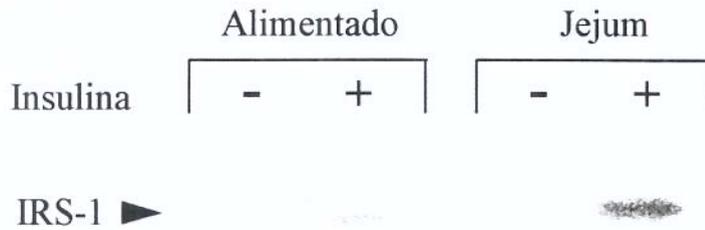


Figura 7: Efeito do jejum sobre a concentração protéica (A) do receptor de insulina (RI) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e do grau de fosforilação (B) do RI, pp 185 e pp 80, em tecido renal de ratos. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 5 experimentos como os das figuras 5 (A e B) e 6. Os valores são expressos como média \pm EPM * $p < 0.05$

A. Fosforilação do IRS-1



B. Associação IRS-1/PI 3-quinase

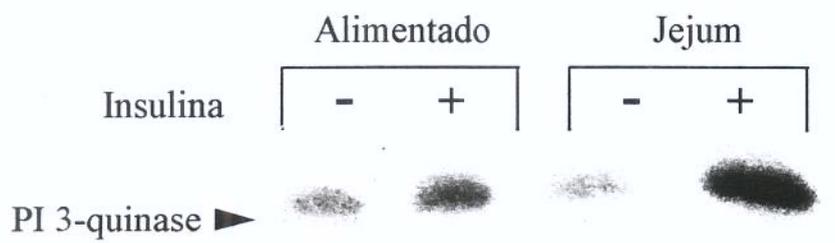


Figura 8: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato 1 do receptor de insulina, em tecido renal, antes (-) e após (+) infusão de insulina, em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo antiIRS-1 de ratos submetidos a jejum de 72 horas. As proteínas foram extraídas e separadas em gel, conforme descrição em Material e Métodos. Foi realizado "immunoblotting" com anticorpos antifosfotirosina (A) e antiPI 3-quinase (B).

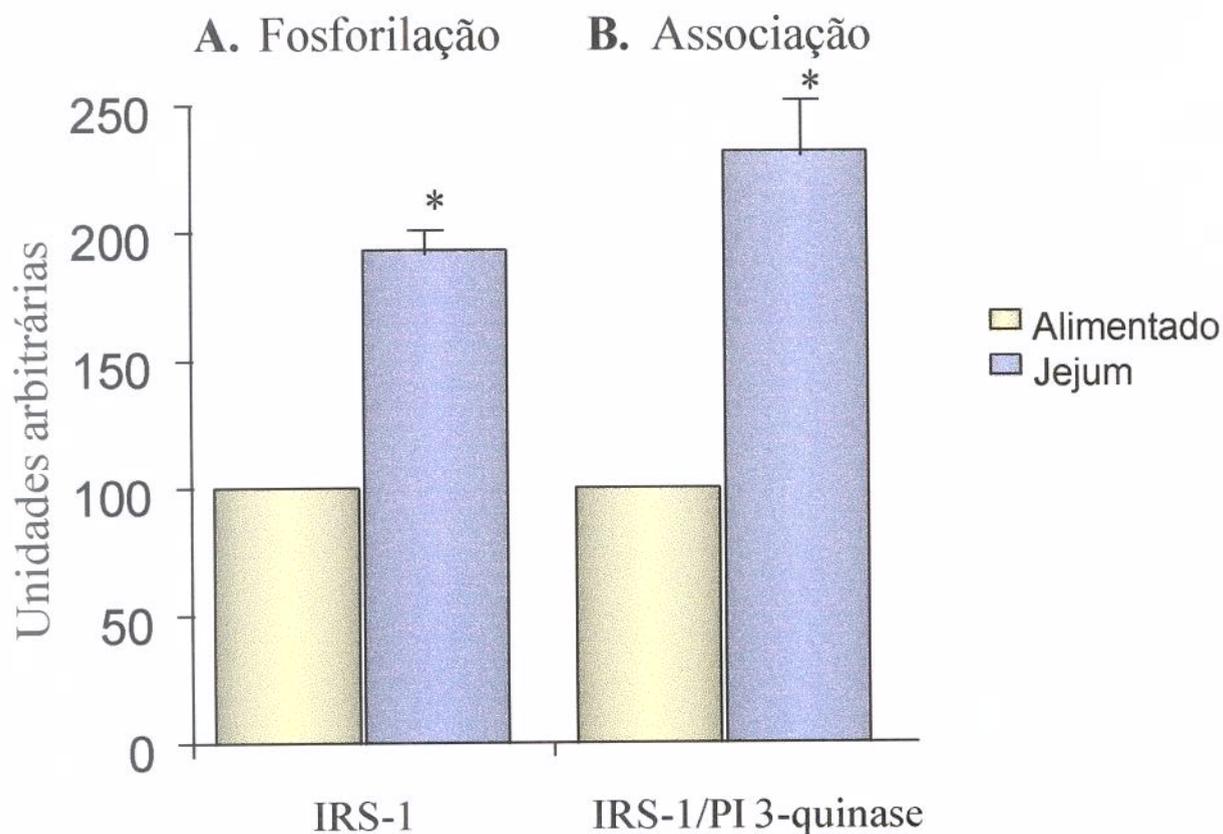


Figura 9: Efeito do jejum sobre o grau de fosforilação (A) do IRS-1 e a associação IRS-1/PI 3-quinase, em amostras de tecido renal de ratos submetidos ao jejum de 72 horas, previamente imunoprecipitadas com anticorpo antiIRS-1. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 4 experimentos como os da figura 8 (A e B). Os valores são expressos como média \pm EPM * $p < 0.05$

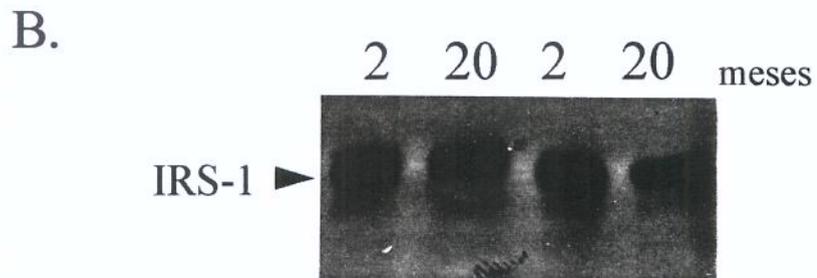
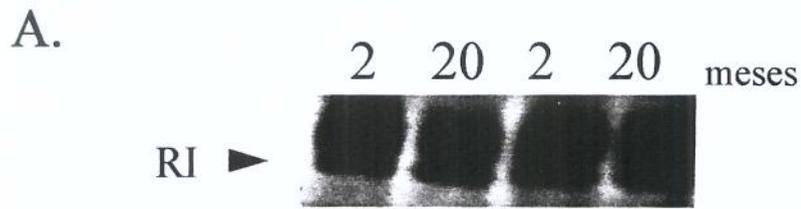


Figura 10: Avaliação dos níveis protéicos do receptor de insulina e do seu substrato 1 (IRS-1), em tecido renal de animais com 2 e 20 meses de idade. As proteínas foram extraídas e homogeneizadas como descritas na figura 1, e o "immunoblotting" realizado com anticorpos (A) anti-receptor de insulina (RI) e (B) antiIRS-1.

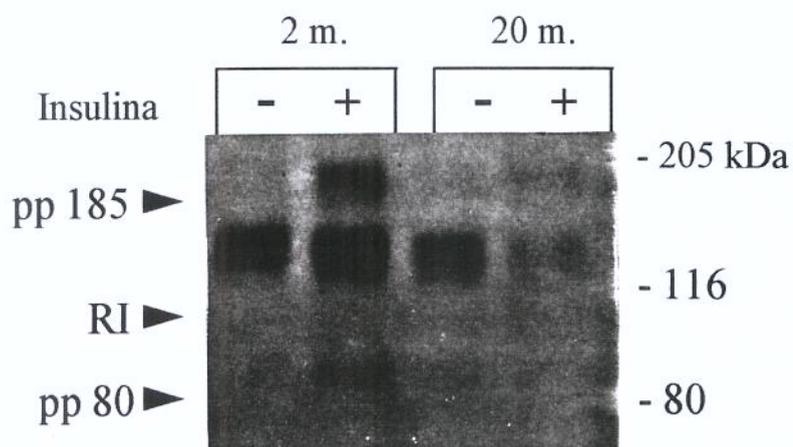


Figura 11: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina, da pp 185 e da pp 80, em tecido renal de ratos com 2 e 20 meses de idade, antes (-) e após (+) infusão de insulina. As proteínas foram extraídas e homogeneizadas conforme Figura 1. O "immunoblotting" foi realizado com anticorpo antifosfotirosina.

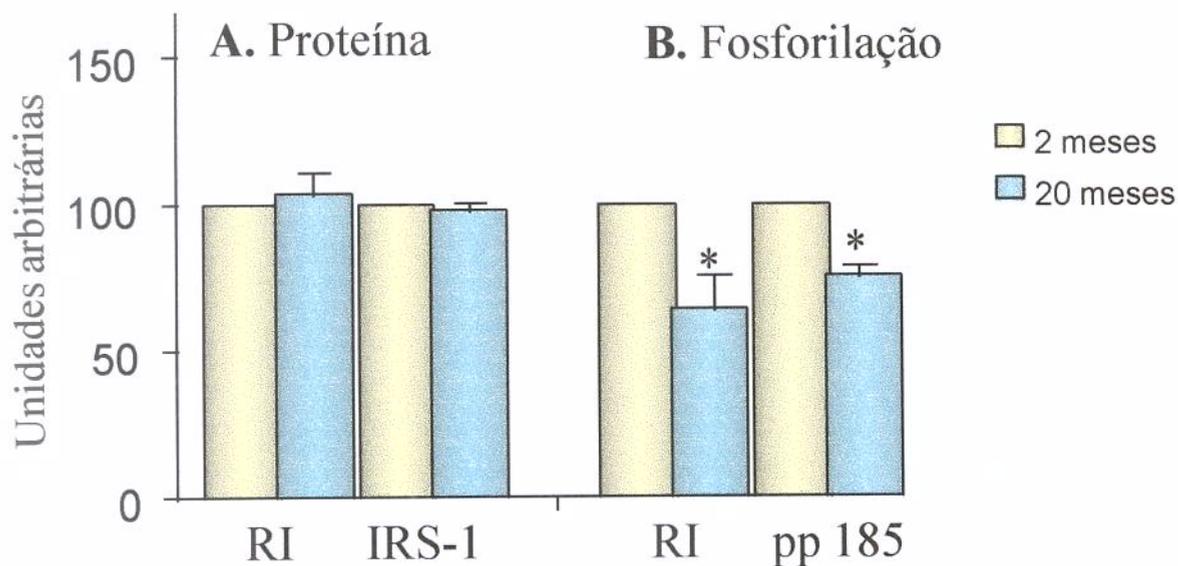
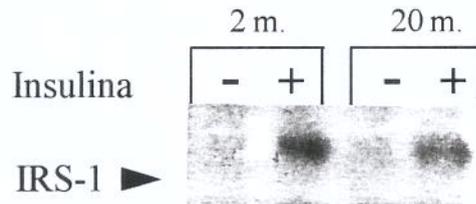


Figura 12: Efeito do envelhecimento sobre a concentração protéica (A) do receptor de insulina (RI) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e sobre o grau de fosforilação (B) do RI e da pp 185, em tecido renal de ratos. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 6 experimentos, como os das figuras 10 (A e B) e 11. Os valores são expressos como média \pm EPM * $p < 0.05$.

A. Fosforilação do IRS-1



B. Associação IRS-1/PI 3-quinase

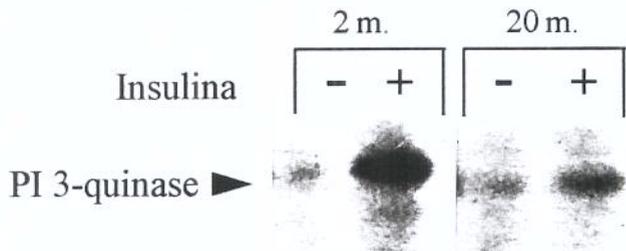


Figura 13: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), em tecido renal, antes (-) e após (+) infusão de insulina em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo antiIRS-1, em animais com 2 e 20 meses de idade. As proteínas foram extraídas e homogeneizadas conforme descrito na figura 1, realizado "immunoblotting" com anticorpos antifosfotirosina (A) e antiPI 3-quinase (B).

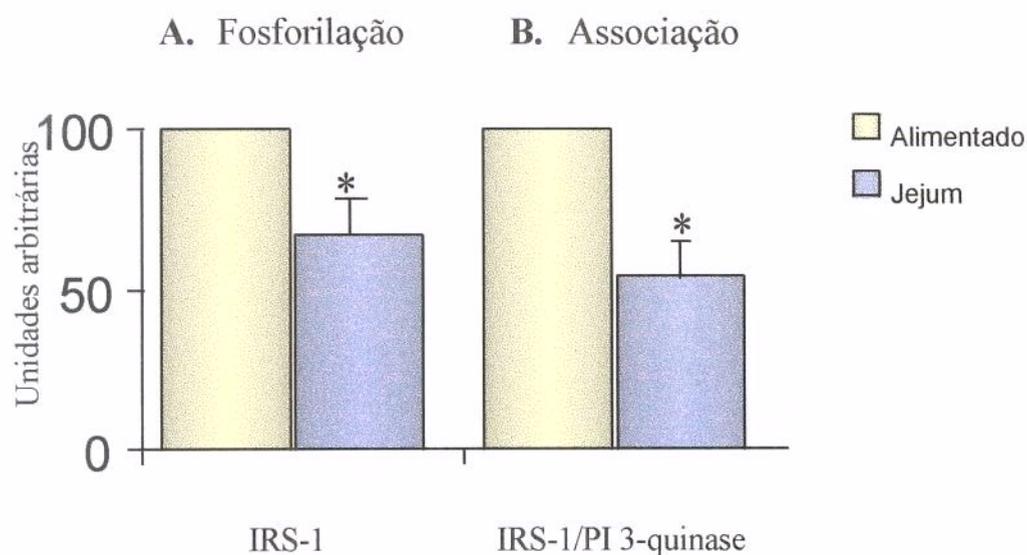


Figura 14: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), em tecido renal, antes (-) e após (+) infusão de insulina em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo antiIRS-1, em animais com 2 e 20 meses de idade. As proteínas foram extraídas e homogeneizadas conforme descrito na figura 1, realizado "immunoblotting" com anticorpos antifosfotirosina e antiPI 3-quinase. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 4 experimentos, como os da figura 13 (A e B) e os resultados são expressos como média \pm EPM * $p < 0,05$.

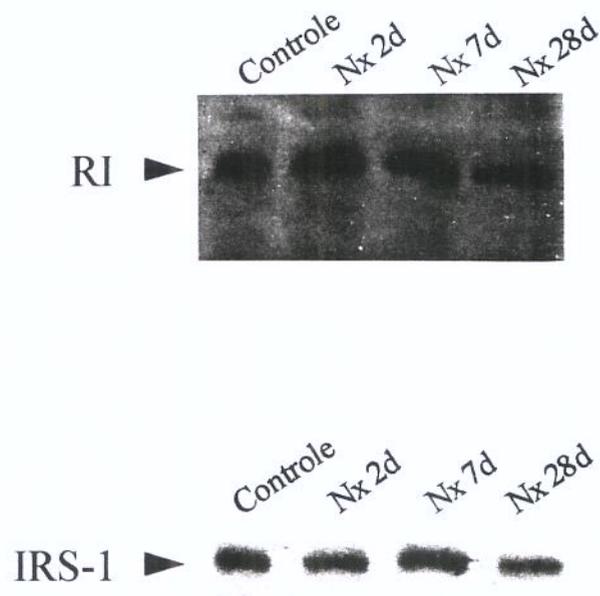


Figura 15: Avaliação do nível protéico do receptor de insulina, em tecido renal remanescente de ratos uninefrectomizados há 2, 7 e 28 dias. As proteínas foram extraídas e homogeneizadas como descritas na figura 1, e o "immunoblotting" realizado com anticorpos (A) anti-receptor de insulina (RI) e (B) antiIRS-1.

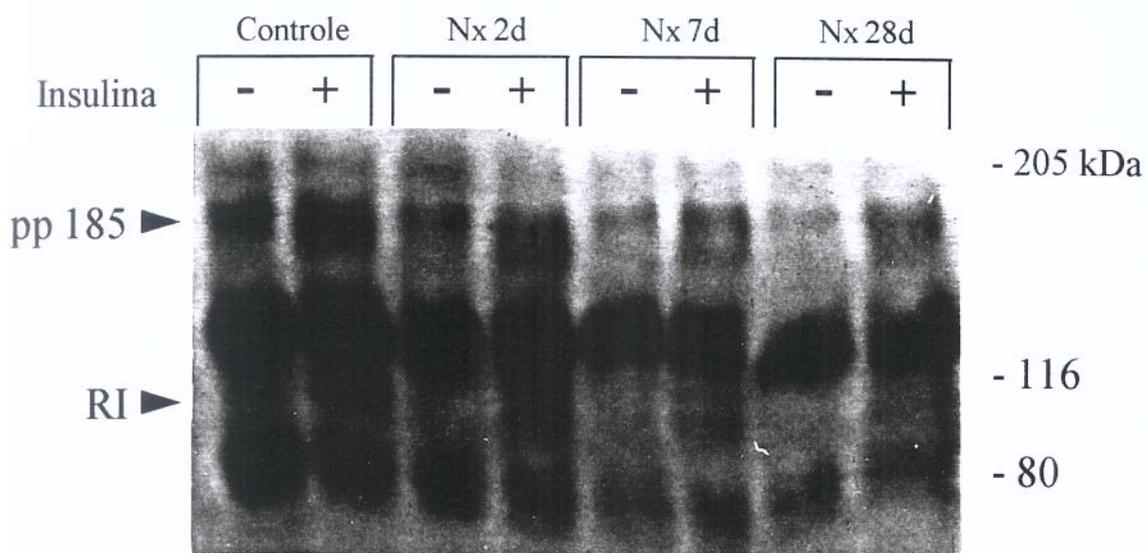


Figura 16: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina e da pp185, em tecido renal, antes (-) e após (+) infusão de insulina em animais uninefrectomizados há 2, 7 e 28 dias. O "immunoblotting" foi realizado com anticorpo antifosfotirosina.

A. Proteína

B. Fosforilação

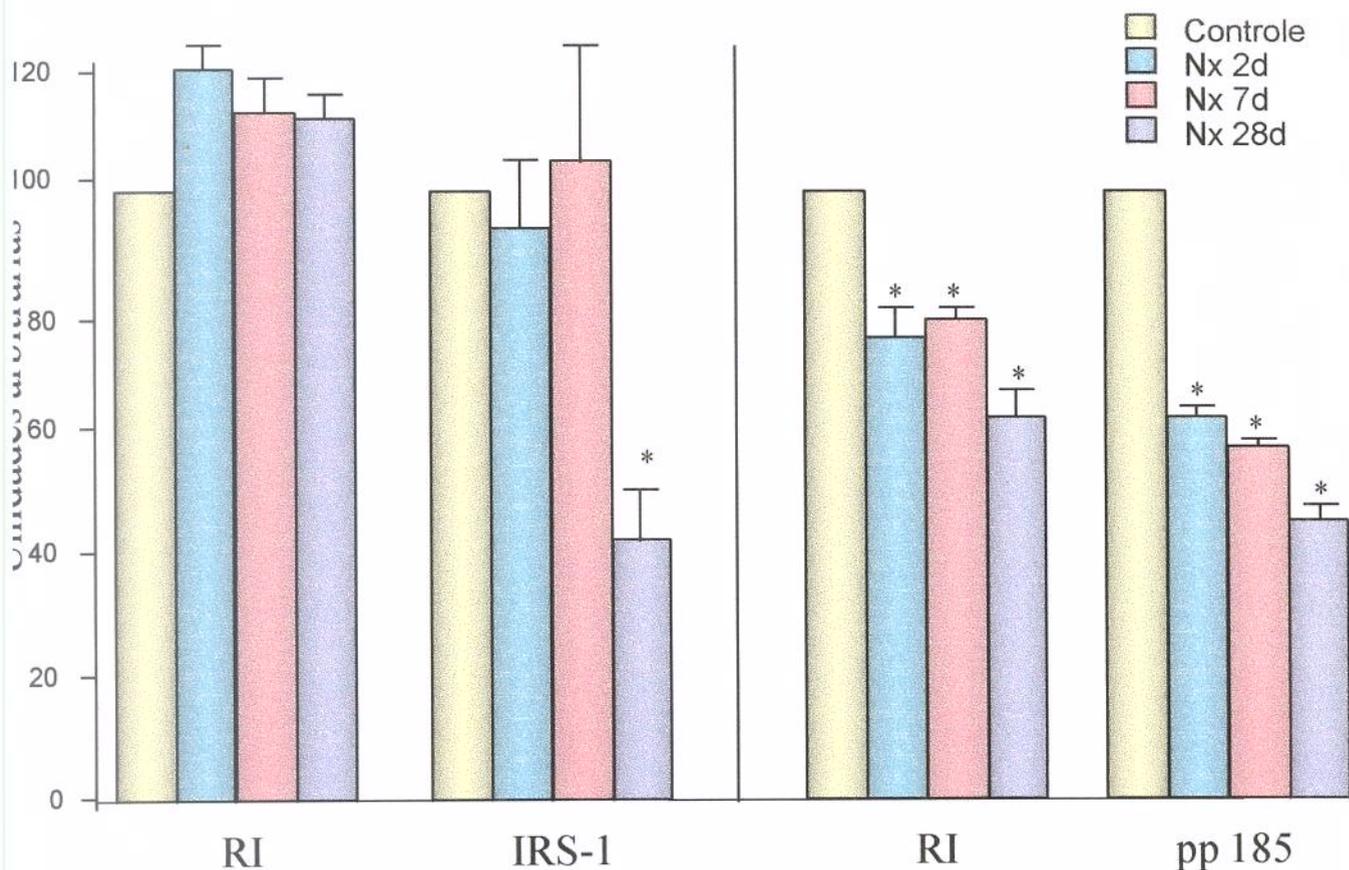
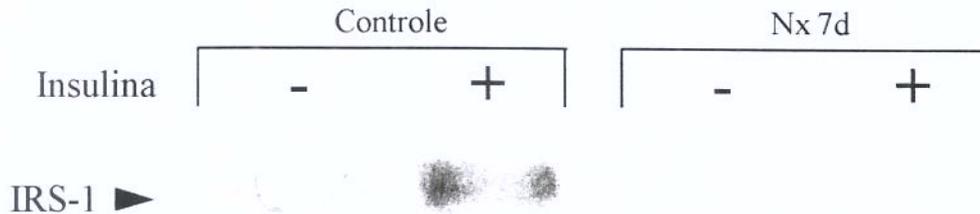


Figura 17: Efeito da nefrectomia unilateral, realizada há 2 (Nx 2d), 7 (Nx 7d) e 28 (Nx 28d) dias, sobre o nível protéico (A) do receptor de insulina (RI) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e sobre o grau de fosforilação (B) do RI e da pp 185, em tecido renal remanescente de ratos. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 7 experimentos, como os das figuras 15 (A e B) e 16. Os valores são expressos como média \pm EPM * $p < 0.05$.

A. Fosforilação do IRS-1



B. Associação IRS-1/PI 3-quinase

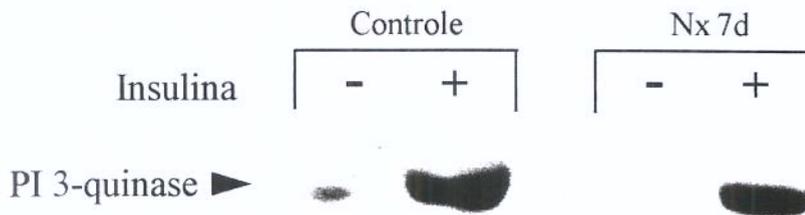


Figura 18: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e da associação IRS-1/PI 3-quinase, antes (-) e após (+) infusão de insulina em amostras de tecido renal remanescente, 7 dias após uninefrectomia, previamente imunoprecipitadas com anticorpo antiIRS-1. As proteínas foram extraídas e homogeneizadas conforme descrito na figura 1, realizado "immunoblotting" com anticorpos antifosfotirosina (A) e antiPI 3-quinase (B).

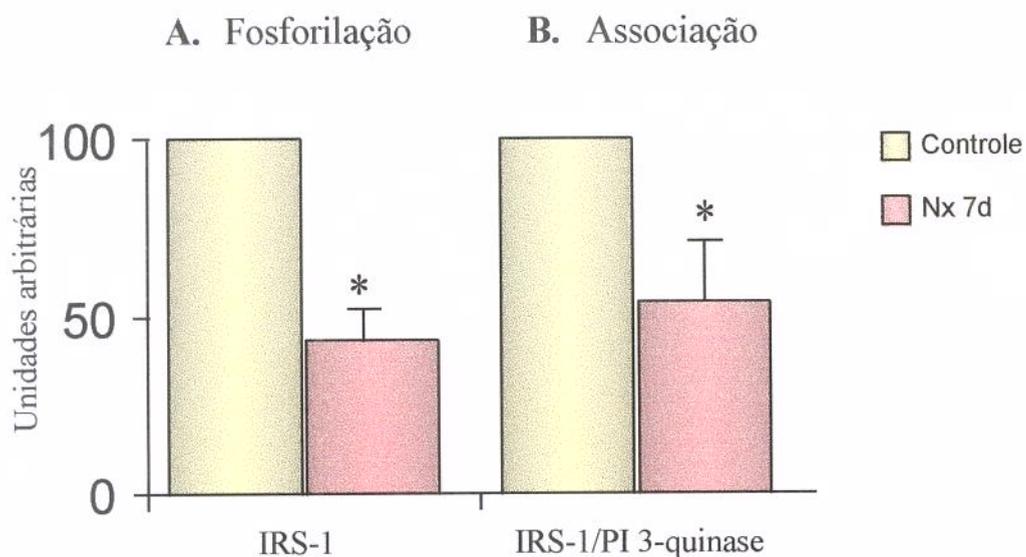


Figura 19: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato 1 do receptor de insulina, e a associação IRS-1/PI 3-quinase, antes (-) e após (+) infusão de insulina em amostras de tecido renal remanescente, 7 dias após uninefrectomia, previamente imunoprecipitadas com anticorpo antiIRS-1. As proteínas foram extraídas e homogeneizadas conforme descrito na figura 1, realizado "immunoblotting" com anticorpos antifosfotirosina e antiPI 3-quinase. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 4 experimentos iguais aos da figura 18 (A e B) e os resultados são expressos como média \pm EPM * $p < 0,05$.

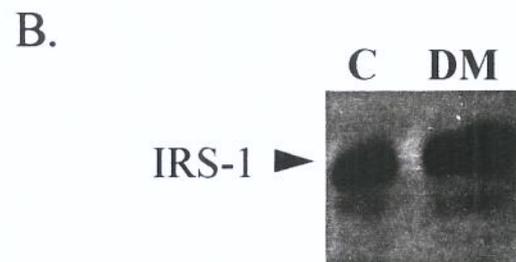
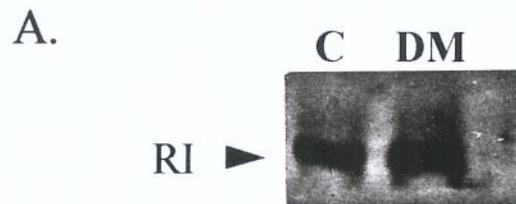


Figura 20: Avaliação do nível protéico do receptor de insulina, em tecido renal de animais com *diabetes mellitus* (DM) e controles normais (C). As proteínas foram extraídas e homogeneizadas como descritas na figura 1, e o "immunoblotting" com anticorpos (A) anti-receptor de insulina (RI) e (B) antiIRS-1.

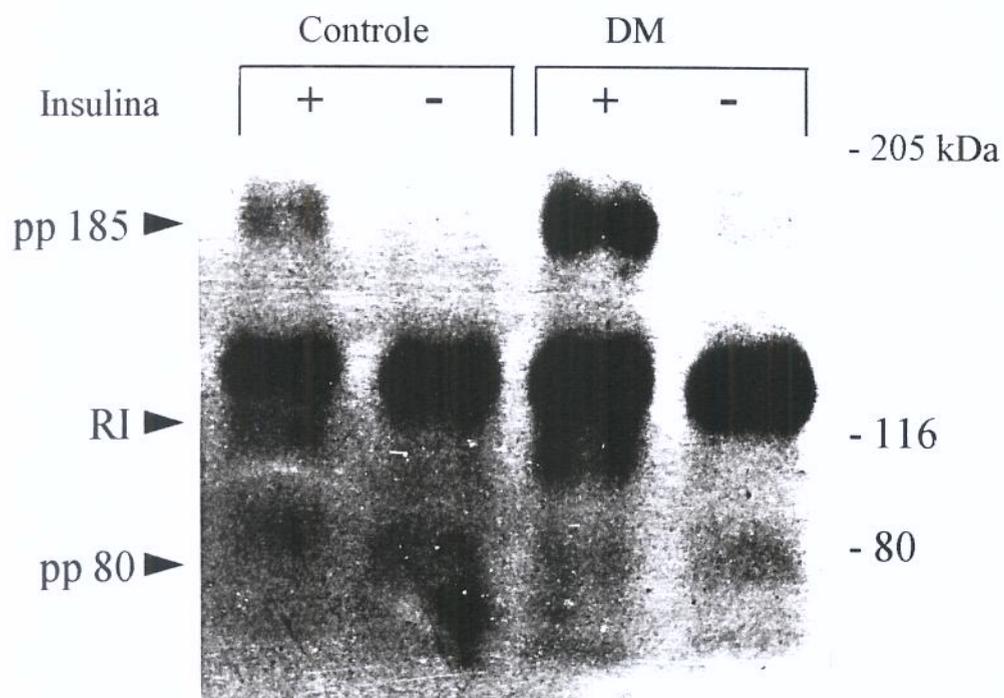


Figura 21: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina, da pp 185 e da pp 80 em tecido renal antes (-) e após (+) infusão de insulina, em animais com *diabetes mellitus* (DM). O "immunoblotting" foi realizado com anticorpo antifosfotirosina.

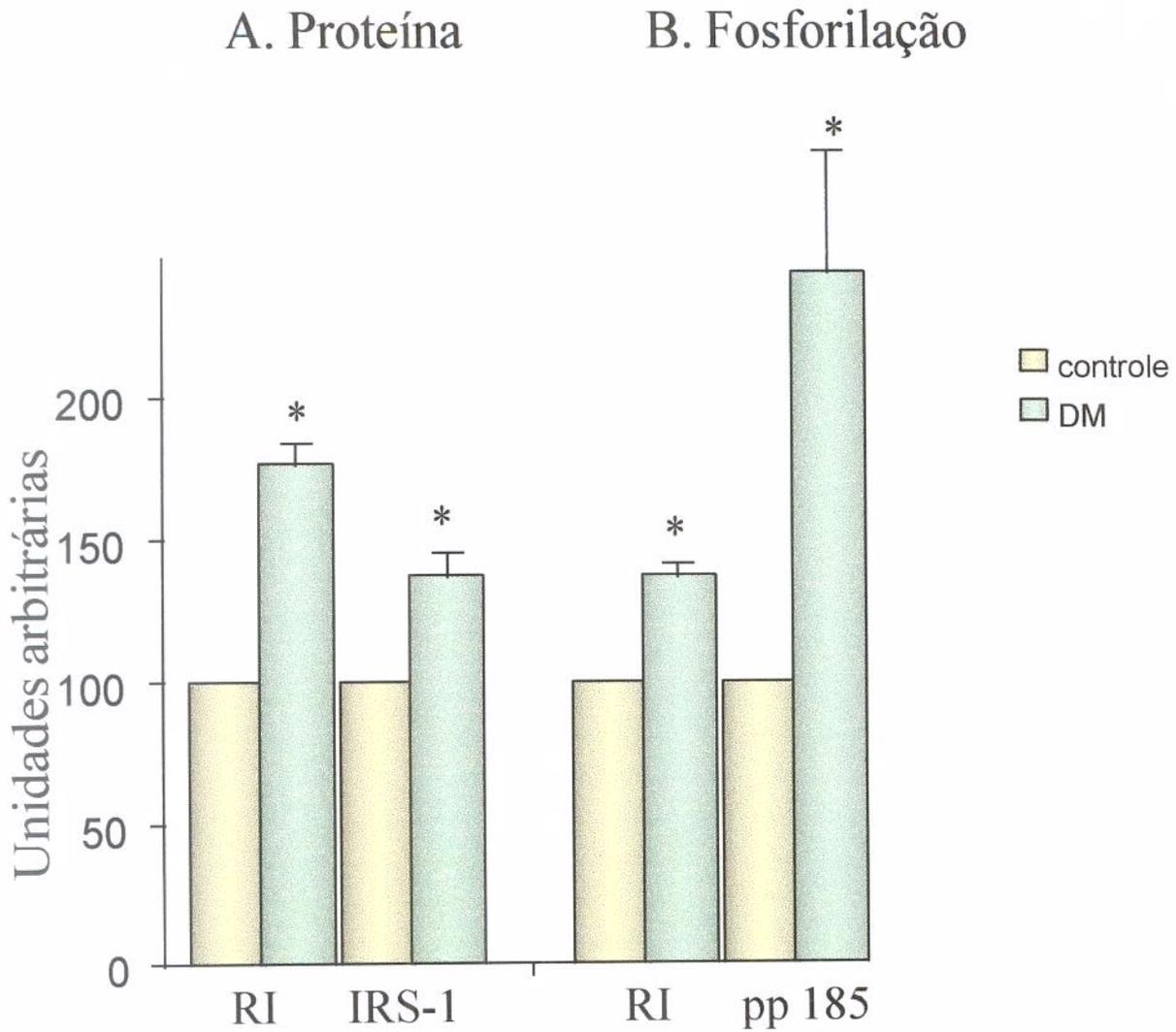
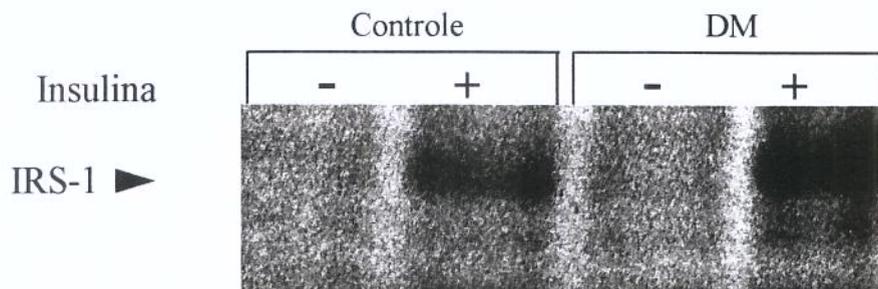


Figura 22: Efeito do *diabetes mellitus* (DM) sobre a concentração protéica (A) do receptor de insulina (RI) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e sobre o grau de fosforilação (B) do RI, e pp 185 em tecido renal de ratos. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 5 experimentos como os das figuras 20 (A e B) e 21. Os valores são expressos como média \pm EPM * $p < 0.05$.

A. Fosforilação do IRS-1



B. Associação IRS-1/PI 3-quinase

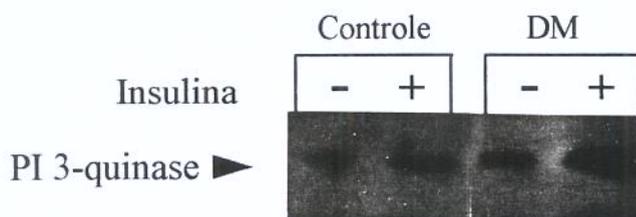


Figura 23: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato 1 do receptor de insulina, e da associação IRS-1/PI 3-quinase em tecido renal, antes (-) e após (+) infusão de insulina em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo antiIRS-1, em animais controles e com DM. As proteínas foram extraídas e homogeneizadas conforme descrito na figura 2, sendo realizado “immunoblotting” com anticorpos antifosfotirosina (A) e antiPI 3-quinase (B).

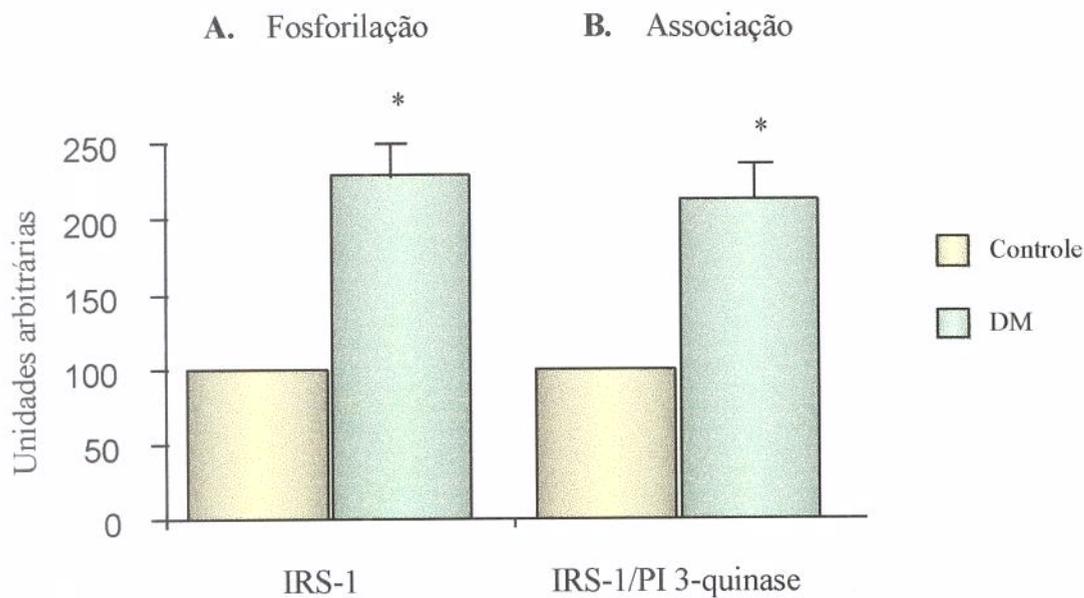


Figura 24: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato 1 do receptor de insulina, e da associação IRS-1/PI 3-quinase em tecido renal, antes (-) e após (+) infusão de insulina em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo antiIRS-1, em animais controles e com DM. As proteínas foram extraídas e homogeneizadas conforme descrito na figura 1, sendo realizado “immunoblotting” com anticorpos antifosfotirosina e antiPI 3-quinase. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 4 experimentos semelhantes aos da figura 23 (A e B) e os resultados são expressos como média \pm EPM * $p < 0,05$.

5. Discussão

A insulina inicia suas ações metabólicas e indutoras do crescimento ligando-se à subunidade α de seu receptor tetramérico, ativando assim a capacidade tirosina quinase na subunidade β . Isto catalisa a autofosforilação intramolecular de tirosinas específicas na subunidade β , aumentando a atividade tirosina quinase dirigida a substratos endógenos (WHITE & KAHN, 1994). Na maioria dos tecidos, este evento primário induz a fosforilação de uma proteína citoplasmática com peso molecular entre 165-185 kDa, chamada substrato 1 do receptor de insulina (WHITE, 1985; SUN, 1991). Evidências oriundas de diversas fontes, e utilizando metodologia variada, demonstram que a atividade tirosina-quinase do receptor e a fosforilação do IRS-1 são essenciais para a maioria dos efeitos biológicos da insulina (ROSEN, 1987). Em cultura de células e em tecidos muscular e hepático de ratos, o IRS-1 fosforilado liga-se à enzima fosfatidilinositol 3-quinase, ativando-a (BACKER et al., 1992). Desse modo, o receptor de insulina, o IRS-1 e a PI 3-quinase representam três das etapas iniciais da ação insulínica, e estão presentes em tecidos clássicos da mesma. Estudos recentes demonstraram marcantes diferenças entre fígado e músculo em relação à regulação destas três etapas iniciais. Assim, é importante a investigação do receptor de insulina (IR), do IRS-1 e da PI 3-quinase em diferentes tecidos, quando se pretende compreender a generalização e a especificidade das ações insulínicas sistêmicas.

O papel do rim na homeostase de glicose foi, por longo tempo, considerado de menor relevância. CAHILL et al. (1966) demonstraram que a produção renal de glicose era desprezível no estado pós-absortivo e só aumentava consideravelmente após 4 a 6 semanas de jejum, quando passa a contribuir com aproximadamente 50% da produção sistêmica de glicose. ADROGUE et al. (1990) demonstraram que animais em condições de hipoinsulinemia têm capacidade de aumentar, de maneira significativa, a produção renal de glicose. Embora estas observações sustentem um papel potencial do rim na regulação da homeostase de glicose em condições específicas, considera-se que, na maioria das situações, este papel é pouco importante. Os estudos *in vivo* que avaliaram o metabolismo de glicose no estado pós-absortivo (CAHILL et al., 1966; OWEN et al., 1969; FELING et al., 1969; ADROGUE et al., 1990.), fizeram-no através da técnica do balanço arteriovenoso, um

método com limitações nem sempre enfatizadas. Considera-se que a produção e a utilização renal de glicose ocorram em locais anatômicos separados no órgão. Desta forma, estes processos tendem a se cancelar, levando à interpretação errônea de que o rim é um local pouco importante de produção e utilização de glicose.

Evidências *in vitro* indicam que o rim produz glicose no túbulo proximal (KREBS, HEMS, GASCOYNE, 1963; KREBS, 1980) e, ao mesmo tempo, células do néfron distal e da medula intersticial são capazes de captar e oxidar esta hexose (WEIDEMANN & KREBS, 1969; GUDER & ROSS, 1984). A regulação diferencial da produção ou utilização de glicose no tecido renal é potencialmente importante para a homeostase de glicose.

CERSOSIMO et al. (1994), utilizando métodos isotópicos associados à cateterização de artéria e veia renais, demonstraram que a produção e utilização renal de glicose são responsáveis por aproximadamente 30% do "turnover" de glicose em cães no estado pós-absortivo. Ainda neste estudo, demonstrou-se que a hiperinsulinemia fisiológica suprime a produção e estimula a captação renal de glicose, sugerindo que a ação insulínica em tecido renal é importante para a homeostase de glicose.

Além desta ação no metabolismo de glicose, o tecido renal responde a incrementos nos níveis insulinêmicos com respostas específicas, como o aumento da reabsorção tubular de sódio (DEFRONZO et al., 1975). O rim também desempenha um papel central no "clearance" de insulina da circulação sistêmica (RUBENSTEIN, MAKO, HOROWITZ, 1976). Duas vias são utilizadas para isto: os capilares glomerulares, representando a via principal, e os capilares peritubulares, responsáveis por pouco mais de 1/3 do "clearance" renal total de insulina (CHAMBERLAIN & STIMMLER, 1967).

É provável que a filtração da insulina no glomérulo ocorra de maneira inespecífica, por difusão simples, porém a insulina pode interagir com as células glomerulares através de seu receptor específico (MEEZAN & FREYCHET, 1982). Embora a via dos capilares peritubulares seja a menos estudada, sabe-se que o "clearance" peritubular é mediado através do receptor de insulina. Em células onde a degradação da

insulina é mediada pelo receptor, a autofosforilação e a atividade tirosina-quinase do receptor são essenciais para o processo de internalização do hormônio (GONÇALVES et al., 1993). Assim, considerando-se a regulação tecido específica das etapas iniciais da ação insulínica e a importância do tecido renal na homeostase da glicose e na degradação da insulina, investigamos, no presente estudo, a modulação das referidas etapas iniciais em rim de ratos em quatro situações fisiopatológicas: o jejum prolongado, ratos diabéticos, ratos senescentes e durante a hipertrofia renal compensatória à uninefrectomia.

Os primeiros trabalhos que avaliaram o receptor de insulina em diferentes tecidos utilizaram métodos que necessitavam da purificação parcial prévia deste receptor e, então, substratos exógenos aceptores de fosfato eram adicionados *in vitro* para análise da atividade quinase. (KADOWAKI et al., 1984; OKAMOTO et al., 1986). Essa metodologia, embora informativa, está muito sujeita a artefatos bioquímicos resultantes dos procedimentos de homogeneização dos tecidos e da purificação dos receptores, como por exemplo, proteólise (KATHURIA et al., 1986) e desfosforilação do receptor pela contaminação por fosfoproteínas fosfatases (SWEET et al., 1987). Outra limitação deste método é que, pela remoção do receptor da membrana plasmática, perde-se a interação deste com outros componentes celulares que podem influenciar na atividade do próprio receptor (FEHLMAN et al., 1985). E ainda, diferenças na atividade quinase do receptor podem ser manifestas *in vitro* com alguns substratos protéicos específicos aceptores de fosfato, porém, não manifestando com outros (FRIEDENBERG et al., 1985.) A metodologia utilizada neste estudo não está sujeita a tais complicações e permite uma avaliação direta da fosforilação em tirosinas do receptor de insulina e de seu principal substrato endógeno, o IRS-1, em pequenas amostras de tecidos. (ROTHENBERG et al., 1991; SAAD et al., 1992).

1. Animais mantidos em jejum prolongado:

O jejum prolongado (72 horas), tanto em ratos, como em humanos, é caracterizado por deficiência e resistência à insulina (BALAGE et al., 1990). Estudos utilizando "clamp" de glicose (PENICAUD, KANDE, LE MAGNEN, 1985) demonstraram resistência à insulina sobre o metabolismo de carboidratos em tecidos periférico e hepático. Estudos demonstram que a insulina estimula o transporte elétrico de sódio, ativando rapidamente os canais de sódio sensíveis à amilorida, na membrana celular apical, de maneira similar à ação da vasopressina e esta ação insulínica, pelo menos em parte, também depende da ação tirosina quinase do receptor e requer um aumento no cálcio intracelular, para tornar a membrana permeável ao sódio (RODRIGUES-COMMES et al., 1994). Entretanto nenhum estudo descreveu resistência à ação da insulina na reabsorção de sódio em tecido renal durante o jejum prolongado. Na realidade, descreveu-se natriurese durante o jejum e retenção de sódio com edema quando se elevam os níveis insulinêmicos com a realimentação (KOLANOWSKI et al., 1972; HOFFMAN et al., 1960; KOLANOWSKI, 1981), sugerindo que o tecido renal mantém sensibilidade normal ao efeito de retenção de sódio da insulina. A obesidade, que é caracterizada pela resistência à ação insulínica no metabolismo de carboidratos, é acompanhada da sensibilidade normal ao efeito natriurético deste hormônio, sugerindo a existência de resistências específicas às suas ações. Tais dados também justificam a investigação das etapas iniciais da ação insulínica em tecido renal, procurando alterações moleculares que pudessem contribuir para explicar resistência hormonal específica.

Os resultados deste estudo demonstraram um aumento nos níveis e grau de fosforilação, tanto do receptor de insulina quanto do IRS-1, sugerindo uma regulação similar à que ocorre no tecido hepático. Em tecido renal, a fosforilação do IRS-1 aumentou provavelmente como consequência do aumento na fosforilação da subunidade β do receptor de insulina. A elevação dos níveis de IRS-1 não é suficiente para justificar o incremento no grau de fosforilação desta proteína. Existe, em outros tecidos, um paralelismo entre fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1 e não entre níveis protéicos e grau de fosforilação de cada uma dessas proteínas separadamente. Contudo, o fato de ser o aumento

na fosforilação do IRS-1 de maior magnitude que o do receptor sugere que também no rim ocorra uma amplificação do sinal estimulado pela insulina (isto é, atividade tirosina-quinase), entre a autofosforilação da subunidade β e a fosforilação do IRS-1.

A elevação dos níveis do receptor de insulina em tecido renal é um resultado esperado, porque em todos os tecidos estudados a hipoinsulinemia do jejum levou a esta "*up-regulation*" (SAAD et al., 1992). Interessante que, o IRS-1 também apresentou uma elevação em seus níveis durante o jejum, de maneira semelhante ao que ocorre no fígado, mas oposta ao que ocorre em tecido muscular. Estudos em modelos animais de resistência à insulina e em cultura de células demonstraram que a hiperinsulinemia reduz e a hipoinsulinemia eleva os níveis de IRS-1, talvez por maior ou menor degradação desta proteína, respectivamente (SAAD et al., 1992, 1993, 1994, 1995b).

A etapa seguinte da ação insulínica, a ligação/ativação do IRS-1 fosforilado com a enzima fosfatidil inositol 3-quinase, também estava aumentada no rim de ratos em jejum por 72 horas, após estímulo com insulina. O aumento na interação IRS-1/PI 3-quinase foi paralelo ao aumento no grau de fosforilação do IRS-1, de maneira similar ao que ocorre em outros tecidos.

O aumento no grau de fosforilação do receptor de insulina, do IRS-1 e a maior associação IRS-1/PI 3-quinase durante o jejum, em tecido muscular, hepático e renal, sugerem que esta deve ser uma adaptação fisiológica sistêmica à hipoinsulinemia e não a um mecanismo provável de resistência à insulina. A resistência à ação insulínica no metabolismo de glicose, em tecido muscular e hepático, pode ser consequência da elevação dos níveis circulantes de ácidos graxos livres, que antagonizam o metabolismo desta hexose nestes tecidos (CHARRON & KAHN, 1990).

O efeito da insulina sobre a produção e utilização de glicose em tecido renal, bem como a interação glicose/ácidos graxos livres neste tecido de animais mantidos em jejum por 72 horas não foram ainda investigados, mas são, certamente, importantes para a regulação e merecem futura investigação. Assim sendo, torna-se difícil estabelecer correlações dos nossos resultados com os efeitos biológicos finais da insulina em tecido renal, sob estas condições.

	Figado	Músculo	Rim
Conc. receptor	↑	↑	↑
Conc. IRS-1	↑	↓	↑
Fosforilação receptor	↑	↑	↑
Fosforilação IRS-1	↑	↑	↑

2. Ratos idosos

Além do jejum prolongado, outra situação comum de resistência à ação da insulina é o envelhecimento. Esta forma de resistência hormonal foi bem estabelecida em humanos por diferentes técnicas (FINK et al., 1983.; REED et al., 1993). Em animais foi também previamente demonstrada através de técnicas de "clamp" normoglicêmico, estudando-se ratos de 2 a 20 meses de idade (YOSHIMASA, et al, 1988). Diversas alterações nos efeitos biológicos da insulina são descritas em animais idosos. A síntese de glicogênio, em resposta à estimulação com insulina, é marcadamente diminuída no tecido muscular esquelético de ratos Wistar com 85 semanas (GOODMAN et al., 1983). A captação de glicose estimulada pela insulina está prejudicada em relação direta com a depleção do "pool" de transportadores de glicose (MATHAEI et al., 1990.). Demonstrou-se, ainda, uma diminuição na inibição da produção hepática de glicose por concentrações fisiológicas de insulina em animais senescentes (YOSHIMASA et al., 1988).

Os defeitos primários deste fenômeno ainda são pouco conhecidos, embora vários estudos concordem que a idade determine uma forma de resistência à insulina, provavelmente por alteração, após sua ligação ao receptor (KONO et al., 1990). Estudo recente em nosso laboratório demonstrou que, em tecido muscular e hepático de ratos idosos (20 meses), os níveis do receptor de insulina não se alteram, mas ocorre uma redução de aproximadamente 30 % na autofosforilação deste receptor. Em relação à

concentração de IRS-1, demonstrou-se uma regulação tecido-específica, com redução no tecido muscular e níveis normais no tecido hepático. No grau de fosforilação em tirosina desta proteína, notou-se uma redução de aproximadamente 70% em ambos os tecidos, concordante com a diminuição na autofosforilação do receptor de insulina.

No tecido renal de ratos, observamos não ter havido diferença nos níveis de receptor de insulina quando comparamos animais com 2 e 20 meses, bem como no nível do IRS-1, similar ao que ocorreu em tecido hepático. O estímulo com a insulina endovenosa, evidenciou uma diminuição significativa na fosforilação do receptor e do IRS-1, acompanhado de uma diminuição em 60 % na associação IRS-1/PI 3-quinase. Assim, esta redução na atividade das etapas iniciais da ação insulínica parece ser um fenômeno sistêmico, observado em todos os tecidos estudados até o momento.

A redução na fosforilação do receptor de insulina e no IRS-1 observada em ratos de 20 meses pode estar relacionada a alterações da membrana plasmática, na atividade de proteínas tirosino-fosfatases (PTPases) ou em outros fatores ainda não descritos. Demonstrou-se, recentemente, que ratos velhos têm, na membrana plasmática, lípidos diferentes dos encontrados nas membrana de ratos jovens (NADIV et al., 1994). Nesse sentido, é importante destacar que, alterando-se qualitativamente os lípidos da membrana plasmática, altera-se a sensibilidade à insulina. Também demonstrou-se que o tipo de fosfolípido que compõe a membrana plasmática é um importante modulador da fosforilação do receptor de insulina e do substrato do receptor (ZOPPINI & KAHN, 1992).

As enzimas que desfosforilam o receptor e o IRS-1 também devem ser consideradas quando se procura explicar as alterações encontradas nas etapas iniciais da ação insulínica renal de ratos idosos. Demonstrou-se um aumento da atividade de fosfotirosinas fosfatases que atuam sobre o receptor de insulina, em tecido hepático de ratos idosos (NADIV et al., 1994). Embora nenhum estudo tenha, ainda, procurado investigar a atividade destas fosfatases em tecido renal de ratos idosos, é possível que estejam com atividade aumentada, como em tecido hepático, por serem estes os tecidos com concentração mais elevadas destas enzimas (SALE, 1991).

	Fígado	Músculo	Rim
Conc. receptor	≡	≡	=
Conc. IRS-1	≡	↓	=
Fosforilação receptor	↓	↓	↓
Fosforilação IRS-1	↓	↓	↓
Assoc. IRS-1/PI 3-K	↓	↓	↓

3. Ratos diabéticos

A investigação das etapas iniciais da ação insulínica em tecido renal de ratos diabéticos demonstrou aspectos interessantes, porque contribuiu para a compreensão da regulação do receptor de insulina, do IRS-1 e da PI 3-quinase em situação de hipoinsulinemia e hiperglicemia, e também pelo crescimento renal que se observa nestes animais.

A análise dos resultados demonstrou um aumento nos níveis e grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina, do IRS-1 e da interação IRS-1/PI 3-quinase em tecido renal de ratos diabéticos, similar ao que ocorre no jejum, sugerindo serem estas alterações consequência da hipoinsulinemia e completamente independentes dos níveis glicêmicos. Em concordância com estes resultados, GRUNBERGER et al.(1990) demonstraram um aumento no número de receptores de insulina, na autofosforilação e na atividade tirosina-quinase destes, em membranas basolaterais de rim de ratos com diabetes hipoinsulinêmicos. Confirmou-se, também, a ampliação do sinal insulínico pelo aumento progressivo da fosforilação em tirosina do receptor para o IRS-1.

A regulação das etapas iniciais da ação insulínica, muito similar em tecido renal de animais em jejum prolongado e animais com diabetes induzido por estreptozotocina, também foi observada em músculo e fígado, sugerindo um efeito sistêmico da hipoinsulinemia.

O início do *diabetes mellitus* em humanos e em animais experimentais é acompanhado por um rápido aumento na massa renal e um incremento na taxa de filtração glomerular e fluxo plasmático renal (MOGENSEN & ANDERSEN, 1973). O rim de ratos diabéticos é caracterizado morfologicamente por hipertrofia glomerular precoce, seguido por um aumento de tamanho de células do túbulo proximal (SEYER-HANSEN, 1976). Os níveis circulantes de GH e IGF-1 estão reduzidos em ratos diabéticos, dificultando a implicação destes hormônios na hiperfunção e hipertrofia renal deste estado patológico. Evidências oriundas de diferentes fontes, demonstraram, porém, um aumento renal de IGF-1 em ratos diabéticos, sugerindo que este hormônio possa exercer um papel no crescimento renal destes animais por um efeito parácrino (D'ERCOLE, STILES, UNDERWOOD, 1984; MATHEWS, NORSTEDT, PALMITER, 1986; MURPHY, BELL, FRISEN, 1987).

FLYVBJERY et al. (1990) demonstraram um aumento renal de IGF-1, 24 horas após a indução do *diabetes mellitus* em ratos, com retorno a níveis basais após uma semana de diabetes. O aumento tecidual nos níveis de IGF-1, bem como o crescimento do rim, podem ser prevenidos pelo tratamento dos animais diabéticos com insulina ou pela administração de análogos da somatostatina, consistente com uma relação causal entre aumento da expressão renal de IGF-1 e crescimento deste órgão. Os níveis de receptor do IGF-1 também se mostraram elevados em membranas renais de ratos diabéticos (WERNER et al, 1990).

A atividade tirosina quinase, o evento bioquímico inicial no processo de geração da resposta biológica à ligação da insulina ou do IGF-1 em seus respectivos receptores, é seguida da fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1). MYERS et al. (1993) demonstraram que o IRS-1 funciona como uma via citoplasmática para facilitar a interação entre o receptor de insulina ou de IGF-1 e a subunidade regulatória da PI 3-quinase.

Dentro deste contexto, nossos resultados, demonstrando um aumento nos níveis renais de IRS-1 em ratos diabéticos, são relevantes, por ser esta proteína o principal substrato do receptor de IGF-1. A associação desse resultado com estudos prévios demonstra um aumento nos níveis de IGF-1, do receptor de IGF-1 e do IRS-1 em tecido renal de ratos diabéticos, sugerindo que as condições bioquímicas favorecem a ação do IGF-1 no crescimento do rim destes ratos.

Além do aumento na fosforilação do receptor e do IRS-1, observou-se também um aumento no grau de fosforilação em tirosina da pp120 nos animais diabéticos, independente do estímulo insulínico. A pp120 é uma banda ampla e provavelmente deve conter mais de uma proteína. Um componente importante desta banda foi clonado e seqüenciado, e recebeu a denominação de FAK (quinase de adesão focal). Esta proteína tem 125 kDa e é fosforilada em tirosina. Embora sua função precisa não esteja completamente elucidada, ela parece desempenhar um importante papel na conexão entre ligação de fibroelastina e vias intracelulares que aumentam a produção de prostaglandinas, bem como as interações entre matriz extracelular e células (DUNLOP, KEOGH, LARKINS, 1993). CLARK et al. (1995) recentemente demonstraram um aumento no grau de fosforilação em tirosina da FAK no glomérulo de ratos diabéticos. São fatos bem estabelecidos e precoces no rim de animais diabéticos as alterações na matriz extracelular de glomérulos e o aumento na produção de prostaglandinas. A associação destes dados sugere que um aumento no grau de fosforilação e atividade quinase da FAK pode ter um papel etiopatogênico na fase inicial da nefropatia diabética. Nossos resultados, demonstrando um aumento no grau de fosforilação da pp120 em rim de animais diabéticos, indiretamente confirmam a maior fosforilação da FAK recentemente descrita.

	Fígado	Músculo	Rim
Conc. receptor	↑	↑	↑
Conc. IRS-1	↑	↓	↑
Fosforilação receptor	≡	↑	↑
Fosforilação IRS-1	≡	↑	↑

4. Hipertrofia renal

Crescimento renal compensatório do rim contralateral em seguida à nefrectomia unilateral é demonstrável em 24 e 48 horas. Este crescimento envolve primariamente os glomérulos e túbulos proximais. O papel de fatores de crescimento como EGF/TGF- α (epidermal growth factor / transforming growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor), IGF-II, PDGF (Platelet-derived growth factor), TGF- β , FGF (fibroblast growth factors) e NGF (nerve growth factor) vem sendo intensamente investigado nos últimos anos. O crescimento renal compensatório é acompanhado de um aumento nos níveis renais de IGF-1 (D'ERCOLE et al., 1984; FLYVBERG, THORLACIUS-USSING, NAERAA, 1988) e a administração de análogos da somatostatina previne o incremento tecidual deste peptídeo e o crescimento compensatório (FLYVBERG, et al., 1991). MULRONEY et al. (1992) demonstraram também aumento no número de receptores de IGF-1 nesta situação.

O IRS-1, que é substrato do receptor de IGF-1, tem sido implicado como essencial no crescimento de diversos tecidos, e também na regeneração hepática (SASAKI, 1993). Animais transgênicos que não expressam IRS-1, apresentam redução importante do crescimento e, na fase adulta, pesam 40% menos que os controles. Estes fatos demonstram que o IRS-1 é essencial para o crescimento, mas o papel desta proteína no crescimento renal compensatório não tinha ainda sido investigado.

Nossos resultados, demonstrando que os níveis de IRS-1 não se alteram numa fase inicial e que até decrescem após 28 dias, sugerem que esta proteína deve ter um papel menor ou não está envolvida no crescimento renal compensatório à uninefrectomia. O mecanismo responsável por esta redução não está claro, mas deve-se considerar a possibilidade de uma maior degradação, porque este parece ser o principal mecanismo de diminuição nos níveis teciduais desta proteína (SAAD et al, 1994). Dentro deste contexto, a maior degradação do IRS-1 poderia ser consequência de uma estimulação contínua no seu grau de fosforilação, como ocorre em cultura de células sob tratamento crônico com insulina, e diversos fatores de crescimento como IGF-1, angiotensina II e hormônio do crescimento poderiam estar envolvidos (WHITE & KAHN, 1994; SAAD et al, 1995).

O encontro de redução nos níveis de fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1, bem como da interação IRS-1/PI 3-quinase após estímulo insulínico, foi interessante e surpreendente. Redução nestas etapas iniciais de ação insulínica em tecidos muscular e hepático foi demonstrada em diversos modelos animais de hiperinsulinemia (SAAD et al., 1992; FOLLI et al., 1993), hipercortisolemia (SAAD et al., 1993), após injeção de adrenalina (SAAD et al., 1995a) ou glucagon (SAAD et al., 1995b) e GH (THIRONE, CARVALHO, SAAD, 1995), e em ratos idosos (CARVALHO et al., 1996). No entanto, o mecanismo responsável pela diminuição na fosforilação em tirosina do receptor de insulina e do IRS-1 não está elucidado, mas algumas considerações devem ser feitas. Estudos recentes sugerem que enzimas que desfosforilam proteínas em tirosinas, as fosfoproteínas fosfatases, podem estar elevadas em algumas situações de crescimento tecidual. Desta maneira, é possível que fosfatases pudessem estar em concentrações e (ou) atividade aumentada no rim com crescimento compensatório, e atuar reduzindo o grau de fosforilação de receptor de insulina e do IRS-1. Um resultado que reforça esta possibilidade é a redução no grau de fosforilação da pp 120, que é uma fosfoproteína constitutivamente fosforilada, e não está envolvida nas vias de transmissão do sinal insulínico, por ser inespecífica a ação das fosfatases em geral.

Outra possibilidade a ser considerada é o aumento sistêmico ou renal de fatores de crescimento que, paralelamente, podem exercer antagonismo nas vias de ação da insulina. Nesse interim, a angiotensina II se apresenta como um possível candidato, porque seus níveis se elevam em animais com crescimento renal compensatório (JOHNSON et al., 1992), e nós demonstramos recentemente que a infusão de AII prévia reduz o grau de fosforilação do receptor de insulina e de IRS-1 em tecido renal.

Deve-se considerar, ainda, a possibilidade de dissociação dos dois fenômenos, com as causas de alteração nas etapas iniciais da ação insulínica, ser independente dos fatores que levam ao crescimento renal.

Um ponto que merece ser estudado em futuras investigações é se estas alterações, no receptor de insulina, no IRS-1 e na interação IRS-1/PI 3-quinase no tecido renal com hipertrofia compensatória, também são observadas em outros tecidos, o que poderia contribuir para a compreensão deste fenômeno como exclusivamente renal ou sistêmico, o que certamente facilitaria a interpretação. Estudos a este respeito, estão sendo realizados em nosso laboratório.

	Nfx 02 dias	Nfx 07 dias	Nfx 28 dias
Conc. receptor	≡	≡	≡
Conc. IRS-1	≡	≡	↓
Fosforilação receptor	↓	↓	↓
Fosforilação IRS-1	↓	↓	↓

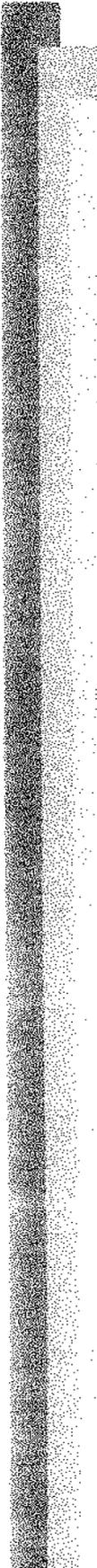
6. Conclusão

1- Em situações de hipoinsulinemia, como no jejum prolongado e *diabetes mellitus*, induzido pela estreptozotocina, as etapas iniciais da ação insulínica, no tecido renal, apresentaram uma regulação similar a do tecido hepático, caracterizada pelo aumento no nível protéico do receptor de insulina e do IRS-1, do aumento do grau de fosforilação da pp 185 e do RI bem como no aumento da fosforilação do IRS-1 e no nível da associação IRS-1/PI3 quinase.

2- Nos animais idosos, com hiperinsulinemia, houve também uma modulação em tecido renal semelhante ao do tecido hepático e ao caracterizado por manutenção dos níveis protéicos do receptor de insulina e do IRS-1, porém com importante decréscimo no grau de fosforilação do receptor e da pp185. O grau de fosforilação do IRS-1 e o nível de associação IRS-1/PI3 - quinase sofreu sensível decréscimo nos animais senis.

3- Na situação de crescimento renal, estimulada pela uninefrectomia, o nível protéico do RI e do IRS-1 mantiveram-se iguais ao controle, para animais operados há 2 e 7 dias, sendo que após 28 dias da cirurgia houve, surpreendentemente, um decréscimo no nível protéico de IRS-1. O grau de fosforilação do RI e da pp185 também diminuiu para os animais operados há 2, 7 e 28 dias, em relação ao controle. Nos animais operados há 7 dias, observamos uma diminuição no grau de fosforilação do IRS-1 bem como da interação IRS-1 /PI3 quinase.

4- Além do receptor de insulina e da pp185, após estímulo insulínico, pode se observar uma banda fosforilada em tirosina, de peso molecular de 80 kDa. Esta banda apresentou variações similares as da pp185 frente a diferentes situações fisiopatológicas e pode ser um substrato específico do receptor de insulina em tecido renal.



7. Summary

Insulin stimulates the tyrosine kinase activity of its receptor, resulting in the phosphorylation of its cytosolic substrate IRS-1, which, in turn, associates with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase). In the last few years it has been shown that the first steps of insulin action have a tissue-specific regulation in different physiopathologic situations. These studies have been done in muscle, liver and adipose tissue but not in kidney. In the present study we have examined the levels and phosphorylation status of the receptor, IRS-1, and PI 3-Kinase in kidney using four animal models: fasting, diabetes (STZ), aging and kidney hypertrophy.

In the methodology used there was insulin infusion into cava vein and kidney was removed and used for immunoprecipitation and immunoblotting with antiphosphotyrosine, anti-insulin receptor, anti IRS-1 and anti PI 3-kinase antibodies.

After stimulation with insulin three broad bands appeared in antiphosphotyrosine immunoblotting: A band of ~ 80 kDa (probably tissue-specific insulin receptor substrate), a band 95 kDa (β -subunit of insulin receptor) and a band of 165-185 kDa (it contains IRS-1 and IRS-2). A time course and dose-response experiments were performed and showed that the maximal phosphorylation of IRS-1 occurs between 60-90 seconds after 10^{-5} M insulin infusion.

In the fasting group there was an increase to $189 \pm 9\%$ ($p < 0.0001$) and to $134 \pm 9\%$ ($p < 0.001$) in IR and IRS-1 protein levels, respectively. There was a simultaneous increase in insulin receptor, pp 185 and pp 80 after insulin stimulation phosphorylation, to $163 \pm 7\%$ ($p < 0.0001$), $211 \pm 18\%$ ($p < 0.0001$) and $150 \pm 9\%$ ($p < 0.0001$) respectively determined by immunoblotting with antiphosphotyrosine antibody. In samples previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and blotted with antiphosphotyrosine antibody, there was a $92 \pm 8\%$ ($p < 0.005$) increase in phosphorylation levels, accompanied by an increase to $232 \pm 9\%$ ($p < 0.0001$) in insulin stimulated IRS-1 association with PI 3-kinase.

In the STZ diabetes rats there was an increase of $186 \pm 9\%$ ($p < 0.0001$) and $146 \pm 8\%$ ($p < 0.0001$) in IR and IRS-1 protein levels, respectively. There was a simultaneous increase after insulin stimulation of insulin receptor and pp 185 phosphorylation

to $141 \pm 7\%$ ($p < 0.0001$) and $238 \pm 42\%$ ($p < 0.01$) respectively determined by immunoblotting with antiphosphotyrosine antibody. In the basal state a closely spaced doublet band with molecular mass between 110 and 120 kDa has an increase in phosphorylation status in the kidney of STZ-diabetes rats. The increase in IRS-1 protein level in STZ diabetes rats maybe important because this protein is a substrate of number of polypeptide growth factors. Taken together the results these data suggest that in hypoinsulinemic animal (fasting and STZ-diabetes) the regulation of IR and IRS-1 in kidney is similar to liver.

There were no changes in insulin receptor and IRS-1 protein levels in kidney of 2-20 months-old rats, as determined by immunoblotting using antibody to the COOH-terminus of the receptor and to IRS-1. However, insulin stimulation of the insulin receptor, IRS-1 and pp80 phosphorylation, as determined by immunoblotting with antiphosphotyrosine antibody, was reduced by $58 \pm 12\%$ ($p < 0.05$), $66 \pm 6\%$ ($p < 0.0001$) and $69 \pm 8\%$ ($p < 0.005$) respectively in the kidney of rats at 20 months. These data suggest that changes in the early steps of insulin signal transduction in kidney tissue are also similar to what happened in the liver tissue in aging.

In remaining kidney after 2, 7 and 28 days unilateral nephrectomy, there were no changes in insulin receptor concentration. IRS-1 protein levels decreased to $57 \pm 12\%$ ($p < 0.05$) after 28 days of nephrectomy. After insulin stimulation there was a reduction in insulin receptor phosphorylation to $76 \pm 10\%$ ($p < 0.05$), $79 \pm 5\%$ ($p < 0.005$), $63 \pm 11\%$ ($p < 0.05$) and of pp 185 to $63 \pm 6\%$ ($p < 0.0001$), $58 \pm 6\%$ ($p < 0.0001$), $46 \pm 5\%$ ($p < 0.0001$) to 2, 7 and 28 respectively. In samples previous immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and blotted with antiphosphotyrosine antibody, there were 50 % decrease in the insulin-stimulated IRS-1 association with PI 3-kinase after 7 days later nephrectomy.

In conclusion, our results showed that in hypoinsulinemic animal there were an increase in the phosphorylation levels of insulin receptor, IRS-1 and IRS-1/PI 3-K association, while in the aging model there were a reduction in the phosphorylation status of these proteins in kidney.

In situations of kidney growth there is a heterogenous behaviour of the phosphorylation of these proteins, increasing in STZ-diabetes and decreasing in compensatory renal hypertrophy after uninefrectomy.

8. Referências Bibliográficas

Normas adotadas Herani, M. L. G. - Normas para apresentação de dissertações e teses. São Paulo, Bireme, 1990, 45p.

- ARAKI, E.; LIPES, M. A.; PATTI, M. A.; BRUNING, J. C.; HAAG, B.; JOHNSON, R. S.; KAHN, C. R. - Alternative pathway of insulin signaling in mice with target disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, 372: 186-190, 1994.
- ADROGUE, H. J.; COMSTOCK, J. P.; PENA, J.; HARRTLEY, C.; ENTMAN, M.; RASHAD, M. N. - Large renal glucose production (RGP) in concius diabetic dogs without acidosis. **Diabetes**, 39:24A. (Abstr.)
- BACKER, J. M.; KAHN, C. R.; WHITE, M. F. - Tyrosine phosphorylation of the insulin receptor during insulin-stimulated internalization in rat hepatoma cells. **J. Biol. Chem.**, 264:1694-1701,1989.
- BACKER, J. M.; MYERS JR., M. G.; SHOELSON, S. E.; CHIN, D. J.; SUN, X. J.; MIRALPEIX, P.; HU, B.; MARGOLIS, B.; SKOLNIK, E. Y.; SCHLESSINGER, J.; WHITE, M. F. - The phosphatidylinositol 3-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **EMBO J.**, 11:3469-3479, 1992.
- BALAGE, M.; GRIZARD, J.; SORNET, C.; SIMON, J.; DARDEVET, D.; MANIN. M. - Insulin binding and receptor tyrosine kinase activity in rat liver and skeletal muscle: effect of starvation. **Metab. Clin. Exp.**, 39:366-373, 1990.
- BERNARD, R. J.; LAWANI, L. O.; MARTIN, D. A.; YOUNGREN, J. F.; SINGH, R.; SCHECK, S. H. - Effects of maturation and aging on the skeletal glucose transport system. **Am. J. Physiol.**, 262:E619-E626, 1992.
- BOLLAG, G. E.; ROTH, R. A.; BEAUDOIN, J.; MOCHLY-ROSEN, D.; KOSHLAND JR., D. E. - Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor *in vitro* and reduces its protein-tyrosine kinase activity. - **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 83: 5822-5824, 1986.

- BRADFORD, M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, 72:248-154, 1976.
- CAHILL, G. F. JR.; HERRERA, M. G.; MORGAN, A. P. - Hormone-fuel interrelationships during fasting. **J. Clin. Invest.**, 45:1751-1769, 1966.
- CARPENTIER, J.L.; PACCAUD, J. P.; BACKER, J.; GILBERT, A.; ORCI, L.; KAHN, C. R. - Two steps of insulin receptor internalization depend on different domains of β -subunit. **J Cell Biol**, 122:1243-1252, 1993.
- CARVALHO, C. R. O.; BRENELLI, S. L.; SILVA, A. M.; NUNES, A. L. B.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. A. - Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. - **Endocrinology**, 137:151-159, 1996.
- CERSOSIMO, E.; JUDD, R. L.; MILES, J. M. - Insulin regulation of renal glucose metabolism in conscious dogs. **J. Clin. Invest.**, 93:2584-2589, 1994.
- CHAMBERLAIN, J. J. & STIMMLER, L. - The renal handling of insulin. **J. Clin. Invest.**, 46:911-916, 1967.
- CHARRON, J. M. & KAHN, B. B. - Divergent molecular mechanisms for insulin-resistant glucose transport in muscle and adipocyte cells *in vivo*. **J. Biol. Chem.** 265:7994-8000, 1990.
- CHOU, C. K.; DULL, T. J.; RUSSELL, D. S.; GHERZI, R.; LEBEVOHL, D.; ULLRICH, A.; ROSEN, O. M. - Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate post receptor effects of insulin. **J. Biol. Chem.**, 262:1842-1847, 1987.

- CLARK, S.; MUGGI, E.; LA GRECA, N.; DUNLOP, M. E.- Increased phosphorylation of focal adhesion kinase in diabetic rat kidney glomeruli. **Diabetologia**, 38:1131-1137, 1995.
- CLARKE, J. F.; YOUNG, P. W.; YONEZAWA, K.; KASUGA, M.; HOLMAN, G. D.- Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. **Biochem. J.**, 300:631-635, 1994.
- CUATRECASAS, P. - Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 69:1277-1281, 1972.
- DEFRONZO, R. A. - The effect of insulin on renal sodium metabolism. **Diabetologia**, 30:165-171, 1981.
- DEFRONZO, R. A.; COOKE, C. R.; ANDRES, R.; FALOONA, G. R.; DAVIS, P. J. - The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium and phosphate in man. **J. Clin. Invest.**, 55:845-855, 1975.
- D'ERCOLE, A. J.; STILES, A. D.; UNDERWOOD, L. E. - Tissue concentration of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 81:935-939, 1984.
- DUNLOP, M.; KEOGH, R.; LARKINS, R. - Fibronectin-induced increase in mesangial cell prostaglandin release: effect of hyperglycemia and PKC inhibition. **Diabetes**, 42:183-190, 1993.
- FAGIN, J. & MELMED, S. - Relative increase in insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid levels in compensatory renal hypertrophy. **Endocrinology**, 120:718-724, 1987.

- FEHLMAN, M.; PERYRON J.; SAMSON, M.; VAN OBBERGHEN, E.; BRANDENBURG, D.; BROSSETE, N.- Molecular association between major histocompatibility complex class I antigens and insulin receptors in mouse liver membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 82:8634-8637,1985.
- FELIG, P. & BERGMAN, M. - Integrated physiology of carbohydrate metabolism. In: Rifkin, H.; Porte, D.,eds. - **Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus.** 4.ed. Elsevier, New York, 1990.
- FELIG, P.; FELIG, O. E.; WAHREN, J.; CAHILL, G. F. Jr. - Amino acid metabolism during prolonged fasting. **J. Clin. Invest.**, 48:584-594., 1969.
- FINK, R. I.; KOLTERMAN, O. G., GRIFFIN, J.; BACKER, J. M.; OLEFSKY, J. M. - Mechanisms of insulin resistance in aging. **J. Clin. Invest.**, 71:1523-1535, 1983.
- FLYVBJERG, A.; THORLACIUS-USSING, O.; NAERAA, R. - Kidney tissue somatomedin C and initial renal growth in diabetic and uninephrectomized rats. **Diabetologia**, 31:310-314, 1988.
- FLYVBJERG, A.; BORNFELDT, K.; MARSHALL, S.; ARNQVIST, H.; ØRSKOV, H. - Kidney IGF-1 mRNA in initial renal hypertrophy in experimental diabetes in rats. **Diabetologia**, 33:334-338, 1990.
- FLYVBJERG, A.; JORGENSEN, K.D.; MARSHALL, S. M.; ØRSKOV, H. - Inhibitory effect of cotireotide on growth hormone-induced IGF-I generation and organ growth in hypophysectomized rats. **Am. J. Physiol.**, 260:E568-574, 1991.
- FLYVBJERG, A.; MARSHALL, S.; FRYSTYK, J. - Insulin-like growth factor I in initial renal hypertrophy in potassium depleted rats. **Am. J. Physiol.**, 262:F1023-1031, 1992.

- FOLLI, F.; SAAD, M. J. A.; BACKER, J. M.; KAHN, C. R. - Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with IRS-1 in liver and muscle of the intact rat. **J. Biol Chem.**, 267:22171-22177, 1992.
- FOLLI, F.; SAAD, M. J. A.; BACKER, J. M.; KAHN, C. R. - Regulation of phosphatidylinositol 3-Kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, 92:1787-1794, 1993.
- FREYCHET, P.; ROTH, J.; NEVILLE JR, D. M. - Insulin receptor in the liver: Specific binding of [¹²⁵ I] insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 68:1833-1837, 1971.
- FRIEDENBERG, G.; KLAEIN, H.; CORDERA, R.; OLEFSKY J. - Insulin receptor kinase activity in rat liver: regulation by fasting and high carbohydrate feeding. **J. Biol. Chem.** 260:12444-12453, 1985.
- GINSBERG, B. H. - in *Biochemical Actions of Hormones*, pp.313-349. **Academic Press**, New York, 1977.
- GONÇALVES, E.; YAMADA, K.; THATTE, H. S.; BACKER, J. M.; GOLAN, D. E.; KAHN, C. R.; SHOELSON, S. E. - Optimizing transmembrane domain helicity accelerates insulin receptor internalization and lateral mobility. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 90 (12):5762-5766, 1993
- GOODMAN, N. M.; DLUZ, S. M.; McELANEY, M. A.; BELUR, E.; RUDERMAN, N. B. - Glucose uptake and insulin sensitivity in rat muscle: Change during 3-96 weeks of age. **Am. J. Physiol.**, 244:E93-E100, 1983.
- GUDER, W. & ROSS, B. D. - Enzyme distribution along the nephron. **Kidney Int.** 26:101-111, 1984.

- GRUNBERGER, G.; NAGY, K. ; REMPINSKI, D.; LEVY, J. - Abnormal insulin receptor tyrosine kinase activity in kidney basolateral membranes from non-insulin-dependent diabetic rats. **J. Lab. Clin. Med.**, 115:704-711, 1990.
- HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WINKILMAN, I. - Clinical chemistry, Principles and Techniques, 2nd ed., Herper and Row Publisher, Ino N.Y., 1288, 1974.
- HERRERA, R. & ROSEN, O. M. - Autophosphorylation of the insulin receptor *in vitro*: Designation of phosphorylation sites and correlation with receptor kinase activation. **J. Biol. Chem.**, 261:11980-11985, 1986.
- HOFFMAN, R. S.; MARTINO, J. A.; WAHL, G.; ARKY, R. - Effects of fasting and refeeding. II Tubular sites of sodium reabsorption and effects of oral carbohydrate on potassium, calcium, and phosphate excretion. **J. Lab. Clin. Med.**, 74:915-926, 1960.
- JOHNSON, R. J.; ALPERS, C.E.; YOSHIMURA, A.; LOMBARDI, D.; PRITZL, P.; FLOEGE, J.; SCHWARTZ, S. - Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. **Hypertension**, 19:464-474, 1992.
- KADOWAKI, T. M.; KASUGA, M.; AKANUMO, Y.; EZAKI, O.; TAKAKUI, F. - Decreased autophosphorylation of the insulin receptor kinase in streptozotocin - diabetic rats. **J. Biol. Chem.**, 259: 14208 - 14216, 1984.
- KAHN, C. R. - Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. **Annu. Rev. Med.**, 36:429-451, 1985.
- KASUGA, M.; HEDO, J. A.; YAMADA, K. M.; KAHN, C. R. - Struture of insulin receptor and its subunits. **J. Biol. Chem.**, 257:10392-10399, 1982a.
- KASUGA, M.; KARLSSON, F. A.; KAHN, C. R. - Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science**, 215:185-187, 1982 b.

- KASUGA, M.; ZICK, Y.; BLITHE, D. L.; CRETZAZ, M.; KAHN, C. R.- Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. *Nature*, 298:667-669, 1982 c.
- KATHURIA, S.; HARTMAN S.; GRUNFELD C.; RAMACHANDRAN J.; FUJITA YAMAGUCHI, Y. - Differential sensitivity of two functions of the insulin receptor to the associated proteolysis: Kinase action and hormone binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83:8570-8574 ,1986.
- KOLANOWSKI, J. - Influence of insulin and glucagon on sodium balance in obese subjects during fasting and refeeding. *Int. J. Obes.* 5 (Suppl.1):105-114, 1981.
- KOLANOWSKI, J.; DEGASPARO, M.; DESMECHET, P.; CRABBE, J. - Further evaluation of the role of insulin in sodium retention associated with carbohydrate administration after a fast in the obese. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2:439-444, 1972.
- KONO, S.; KUZUZYA, H.; OKAMOTO, M.; NISHIMURA, H.; KOSAKI, A.; KAKEHI, T.; INOVE, G.; MAEDA, I.; IMURA, H. - Changes in receptor kinase with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.*, 259:E27-E35, 1990.
- KREBS, H. A.; HEMS, R.; GASCOYNE, T. - Renal gluconeogenesis from substrate combinations. *Acta Biol. Med. Ger.*, 11:607-615, 1963.
- KREBS, H. A. - Glutamine metabolism in the animal body. In: *Glutamine Metabolism, Enzymology and Regulation*. Academic Press, Ney York. 319-329, 1980.
- LAEMMLI, U. K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)*, 227:680-685, 1970.
- LOTT, J. A. & TURNER, K. - Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clin. Chem.*, 21:1754-1770, 1975.

- MADDUX, B. A. & GOLDFINE, I D. - Evidence that insulin plus ATO may induce a conformational change in the beta subunit of the insulin receptor without inducing receptor autophosphorylation. **J. Biol. Chem.**, 266:6731-6736, 1991.
- MATHEWS, L. S.; NORSTEDT, G.; PALMITER, R. D. - Regulation of insulin like growth factor I gene expression by growth hormone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 83:9343-9347, 1986.
- MATHAEI, S.; BENECKE, H.; KLEIN, H. H.; HAMANN, A.; KREYMANN, G.; GRETEN, G. - Potencial mechanism of insulin resistance in aging: impaired insulin-stimulated glucose transport due to a depletion of intracellular pool of glucose transporters in Fischer rat adipocytes. **J. Endocrinol.**, 126:99-107, 1990.
- MEEZAN, E. & FREYCHET, P. - Binding and degradation of ¹²⁵I-insulin by rat glomeruli and tubules isolated from rats. **Diabetologia**, 22: 276-279, 1982.
- MOGENSEN, C. E. & ANDERSON, M. J. F. - Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes. **Diabetes**, 22:705-712, 1973.
- MURPHY, L. J.; BELL, G. I.; FRISEN, H. G. - Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II ribonucleic acid in the adult rat. **Endocrinology**, 120:1279-1282.
- MULRONEY, S.; HARAMATI, A.; WERNER, H.; BONDY, C.; ROBERTS, C.; LEROITH, D. - Altered expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF receptor genes after unilateral nephrectomy in immature rats. **Endocrinology**, 130:249-256, 1992.
- MYERS, M. G.; SUN, X. J.; CHEATHAM, B.; JACHNA, B. R.; GLASHEEN, E. M.; BACKER, J. M.; WHITE, M. F. - IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor signaling to the phosphatidylinositol 3-kinase. **Endocrinology**, 132:1421-1430, 1993.

- NADIV, O.; SHINITZKY, M.; MANU, H.; HECHT, D.; ROBERTS JR, C. T.; LE ROITH, D.; ZICK, Y. - Elevated protein tyrosine phosphatase activity and increased membrane viscosity are associated with impaired activation of the insulin receptor kinase in old rats. **Biochem. J.**, 298:443-450, 1994.
- OKAMOTO, M.; WHITE, M. F.; MAROW, R.; KAHN, C. R. - Autophosphorylation and kinase activity of insulin receptor in diabetic rats. **Am. J. Physiol.**, 251: E542 - 550, 1986.
- OWEN, O. E.; FELING, P.; MORGAN, A. P.; WAHREN, J.; CAHILL, Jr., G. F. - Liver and kidney metabolism during prolonged fasting. **J. Clin. Invest.**, 45:574-583, 1969.
- PENICAUD, L.; KANDE, J.; LE MAGNEN, J. - Insulin action during fasting and refeeding in rat determined by euglycemic clamp. **Am. J. Physiol.** 249:E514-E518, 1985.
- PERLMAN, R.; BOTTARO, D.; WHITE, M. F.; KAHN, C. R. - Conformational changes in the α and β subunits of the insulin receptor identified by anti-peptide antibodies. **J. Biol. Chem.**, 264:8946-8950, 1989.
- RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M. N.; NADKARNI, M. V. - Studies on the diabetogenic actions of streptozotocin (NSC37919). **Can. Chemother. Rep.** 29: 91, 1963.
- REED, M. J.; REAVEN, G. M.; MONDON, C. E.; AZHAR, S. - Why does insulin resistance develop during maturation? **J. Gerontol.**, 48:B139-B144, 1993.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; HAHEY, G.C. - AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet., **J. Nutr.**, 123:1939-1951, 1993.
- ROCCHINI, A. P.; KATCH, V.; KVESELIS, D.; MOOREHEAD, C.; MARTIN, M.N.; LAMPMAN, R.; GREGORY, M. - Insulin and renal sodium retention in obese adolescents. **Hypertension**, 14: 367-374, 1989.

- ROSEN, O. M. - After insulin binds. **Science**, 237:1452-1458, 1987.
- ROTHENBERG, P. L.; LANE, W. S.; KARASIK, A.; BACKER, J.; WHITE, M. F.; KAHN, C. R. - Purification and partial sequence analysis of pp185, the major cellular substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. **J. Biol. Chem.**, 266:8302-8311, 1991.
- RUBENSTEIN, A. H.; MAKO, M. E.; HOROWITZ, D. L. - Insulin and the kidney. **Nephron**, 15:306-309, 1976.
- SAAD, M. J. A.; 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.**, 90:1839-1849, 1992.
- SAAD, M. J. A.; FOLLI, F.; KAHN, J.; KAHN, C. R. - 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, 1993.
- SAAD, M. J. A.; FOLLI, F.; ARAKI, E.; HASHIMOTO, N.; CSERMELY, P.; KAHN, C. R. - 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, 1994.
- SAAD, M. J. A.; FOLLI, F.; KAHN, C. R. - Insulin and dexamethasone regulate insulin receptors, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in Fao hepatoma cells. **Endocrinology**, 136:1579-1588, 1995.
- SAAD, M. J. A.; VELLOSO, L. A.; CARVALHO, C. R. O. - Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation in insulin receptor substrate 1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. **Biochem. J.**, 310 : 741-744, 1995.

- SAAD, M. J. A.; HARTMANN, L. G. C., CARVALHO, D. S., GALORO, C. A. O.; BRENELLI, S. L.; CARVALHO, C. R. O. - Modulation of early steps in insulin action in the liver and muscle of epinephrine treated rats. *Endocrine*, 3:755-759, 1995(a).
- SAAD, M. J. A.; HARTMANN, L. G. C., CARVALHO, D. S., GALORO, C. A. O.; BRENELLI, S. L.; CARVALHO, C. R. O. - Effect of glucagon on insulin receptor substrate-1 (IRS-1) phosphorylation and association with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase). *FEBS Letters*, 370:131-134, 1995(b).
- SALE, J.G. - Insulin receptor phosphotyrosyl protein phosphatase and the regulation of insulin receptor tyrosine kinase action. *Adv. Protein. Phosphatases*. 6:159-186, 1991.
- SASAKI, Y.; ZHANG, X.F.; NISHIYAMA, M.; AVRUCH, J.; WANBS, J.R. Expression and phosphorylation of insulin receptor substrate 1 during liver regeneration. *J. Biol. Chem.*, 268:3805-3808, 1993.
- SEYER-HANSEN, K. - Renal hypertrophy in streptozotocin diabetic rats. *Clin. Sci.*, 51: 551-555, 1976.
- SHAFIR, E.; BERGMAM, M.; FELIG, P. - The Endocrine Pancreas: Diabetes Mellitus. In: FELIG, P.; BAXTER, J.D.; BROADUS, A. E.; FROHMAN, L. A., eds. - *Endocrinology and Metabolism*. 2nd. Ed. New York, 1987.
- SHIER, P. & WATT, V. M. - Primary structure of a putative receptor for a ligand of the insulin family. *J Biol Chem*, 264, 14605-14608, 1989.
- SHOELSON, S. E.; CHATTERJEE, S.; CHAUDHURI, M.; WHITE, M.F. - YMXM motifs of IRS-1 define the substrate specificity of the insulin receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89:2027-2031, 1992.

- SKOTT, P.; HOTHER-NIELSEN, O.; BRUUN, N. E.; GIESE, J.; NIELSEN, M. D.; BECK-NIELSEN, H.; PARVING, H. H. - Effects of insulin on kidney function and sodium excretion in healthy subjects. **Diabetologia**, 32:694-699, 1989.
- SOUZA, S. C.; FRICK, G. P.; YIP, R.; LOBO, R. M.; LIH-RUEY, T.; GOODMAN, M. H. - Growth Hormone stimulates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. **J. Biol. Chem.**, 269:30085-30088, 1994.
- STILES, A. B.; SOSENKO, I., D'ERCOLE, A.; SMITH, B. - Relation of kidney tissue somatomedin C/insulin-like growth factor I to postnephrectomy renal growth in the rat. **Endocrinology**, 117:2397-2401, 1985.
- SUN, X.J.; ROTHENBERG, P.A.; KHAN, C. R.: Struture of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, 352:73-77, 1991.
- SUN, X. J.; WANG, L. M., PATTI, M. A.; BRUNING, J. C.; HAAG, B.; JOHSON, R. S.; KAHN, C. R. - Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. **Nature**, 337:173-177, 1995.
- SUNG, C. K.; MADDUX, B. A.; HAWLEY, D. M.; GOLDFINE, I. D. - Monoclonal antibodies mimic insulin activation of ribosomal protein S6 kinase without activation of insulin receptor tyrosine kinase. - **J. Biol. Chem.**, 264:18951-18959, 1989.
- SWEET, L. J.; DUDLEY, D. J.; PESSIN, J.; SPECTOR, A. - Phospholipid activation of the insulin receptor kinase: Regulation by phosphatidylinositol. **FASEB J.**, 1:55-59,1987.
- TAKATA, Y.; WEBSTER, N. J. G.; OLEFSKY, J. M. - Mutation of the two carboxyl terminal tyrosines results in an insulin receptor with normal metabolic signaling properties. **J. Biol. Chem.**, 263:8912-8917, 1988.

TAMEMOTO, H.; KADOWAKI, T.; TOBE, K.; YAGI, T.; SAKURA, H.; HAYAKAWA, T.; TERAUCHI, Y.; UEKI, K.; SATOH, S.; SEKCHARA H.; YOHIOKA, S.; HORLKOSHI, H.; FURUTA, Y.; IKAWA, Y.; KASUGA, M.; YAZAKI, Y.; AIZAWA, S. - Insulin resistance and growth retardation in mice lacking, insulin receptor substrate-1. *Nature*, 372: 182-186, 1994.

TOWBIN, H.; STAEBLIN, J.; GORDON, J. - Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350-4354, 1979.

THIRONE, A. C. P.; CARVALHO, C. R. O.; SAAD, M. J. A. - Regulação do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) em tecidos hepático e muscular de ratos tratados cronicamente com hormônio do crescimento (GH) - IX Congresso de la Asociación Latino-Americana de Diabetes Foz do Iguaçu - Br, Nov. 1995

TSAKIRIDIS, T.; McDOWELL, H. E.; WALKER, T.; PETER DOWNES, C.; HUNDAL, H. S.; VRANIC, M.; KLIP, A. - Multiple roles of phosphatidylinositol 3-kinase in regulation of glucose transport, amino acid transport, and glucose transporters in L6 skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 136:4315-4322, 1995.

ULLRICH, A.; BELL, J. R.; CHEN, E. Y.; HERRERA, R.; PETRUZZELLI, L.M.; DULL, T. J.; GRAY, A. COUSSENS, L.; LIAO, Y.C.; TSUBOKAWA, M.; MASON, A.; SCEBURG, P. H.; GRUNFELD, C.; ROSEN, O.M.; RAMACHANDRAN, J. -; TAM, A.W. - IGF-1 receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.*, 10:2503-2512, 1986.

VIEIRA, J. G. H.; RUSSO, E. M. K.; GERMEK, O. A.; CHACRA, A. R. - Desenvolvimento de um radioimunoensaio heterólogo para a dosagem de insulina humana no soro. *Am. Rev. Bras. Patol. Clin.*, 16: 108-114, 1980.

- VOGT, B.; CARRASCOSA, J. M.; ERMEL, B.; ULLRICH, A.; HÄRING, H-U. - The two isotypes of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 177: 1013-1018, 1991.
- WEIDMANN, M. J. & KREBS, H. A. - The fuel of respiration of rat renal cortex. **Biochem. J.** XX: 149-165, 1969.
- WERNER, H.; SHEN-ORR, Z.; STANNARD, B.; BURGUERA, B.; ROBERTS, C.T. - Experimental diabetes increases insulinlike growth factor I and II receptor concentration and gene expression in kidney. **Diabetes**, 39:1490-1497, 1990.
- WILDEN, P. A.; KAHN, C. R.; SIDDLE, K.; WHITE, M. F. - Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic functions. **J. Biol. Chem.**, 267: 16660-16668, 1992.
- WHITE, M. F. & KHAN, C. R. The insulin signaling system. **J. Biol. Chem**, 269:1-5, 1994
- WHITE, M.F.; MARON, R. KAHN, C.R. - Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of Mr=185,000 protein in intact cells. **Nature**, 318:183-186, 1985.
- WHITE, M. F.; SHOELSON, S.E.; KEUTMAN, H.; KAHN, C. R. - A cascade of tyrosine autophosphorylation in the β -subunit activates the insulin receptor. **J. Biol. Chem.**, 263:2969-2980, 1988.
- WHITE, M. F.; TAKAYAMA, S.; KAHN, C. R. - Differences in the sites of phosphorylation of the insulin receptor in vivo and in vitro. **J. Biol. Chem.**, 260:9470-9478, 1985.
- YOSHIMASA, Y.; YAMADA, K.; IDA, T.; KAKEHI, T.; IMURA, H. - Change of insulin action with aging in conscious rats determined by euglycemic clamp. **Am. J. Physiol.**, 254:E92-E98, 1988.

9. Anexos

ANEXO 1

TABELA 01 - Características gerais dos animais quanto à idade, peso, glicemia expressa em mg/dl e insulina sérica expressa em $\mu\text{U/ml}$ nos diferentes grupos dos protocolos estudados. Os resultados são expressos na média \pm erro padrão da média e a significância expressa em * p.

	Idade	Glicemia	Insulina sérica
Alimentado	08 semanas	158 \pm 4 mg/dl	38 \pm 4 $\mu\text{U/ml}$
Jejum	08 semanas	74 \pm 1 mg/dl	13 \pm 2 $\mu\text{U/ml}$
		*p<0,001	*p<0,001
Jovem	02 meses	116 \pm 7 mg/dl	18 \pm 5 $\mu\text{U/ml}$
Velho	20 meses	116 \pm 11 mg/dl	52 \pm 5 $\mu\text{U/ml}$
			*p<0,001
Controle	08 semanas	93 \pm 3 mg/dl	26 \pm 1 $\mu\text{U/ml}$
Nfx 07d	08 semanas	88 \pm 5 mg/dl	55 \pm 3 $\mu\text{U/ml}$
			*p<0,0001
Controle	07 semanas	122 \pm 6 mg/dl	29 \pm 4 $\mu\text{U/ml}$
Diabético	07 semanas	362 \pm 16 mg/dl	6 \pm 2 $\mu\text{U/ml}$
		*p<0,001	*p<0,0001

ANEXO 2

TABELA 02 - Peso dos animais, peso do rim esquerdo expresso em grama (g) e o peso relativo expresso por 100 gramas do peso total do animal nos diferentes protocolos estudados. Os resultados são expressos na média \pm erro padrão da média e a significância expressa em * p, entre o grupo experimental e o seu controle.

	Idade	Peso	Peso rim esq.	Peso rim/100 rato
Alimentado	08 semanas	186 \pm 1g	0,68 \pm 0,01g	0,36 \pm 0,01
Jejum	08 semanas	146 \pm 1 g	0,58 \pm 0,01g	0,4 \pm 0
		* p<0,0001	*p<0,0001	*p<0,0001
Jovem	02 meses	154 \pm 4g	0,56 \pm 0,03g	0,36 \pm 0,02
Velho	20 meses	438 \pm 16g	1,56 \pm 0,06g	0,34 \pm 0,01
		* p<0,001	* p<0,001	
Controle	07 semanas	159 \pm 1g	0,55 \pm 0,02 g	0,35 \pm 0,01
Nfx 02d	07 semanas	159 \pm 2g	0,63 \pm 0,01g	0,40 \pm 0,01
			* p<0,0001	* p<0,0001
Controle	08 semanas	204 \pm 5g	0,72 \pm 0,02g	0,35 \pm 0,01
Nfx 07d	08 semanas	203 \pm 5g	0,89 \pm 0,02g	0,43 \pm 0,01
			* p<0,0001	* p<0,0001
Controle	08 semanas	230 \pm 4 g	0,84 \pm 0,02g	0,37 \pm 0,01
Nfx 28d	08 semanas	228 \pm 5g	1,02 \pm 0,03g	0,45 \pm 0,01
			* p<0,0001	* p<0,0001
Controle	07 semanas	141 \pm 4g	0,50 \pm 0,03g	0,35 \pm 0,01
Diabético	07 semanas	98 \pm 4g	0,59 \pm 0,03g	0,61 \pm 0,02
		* p<0,0001	*p<0,05	*p<0,0001

ANEXO 3

TABELA 03 - Peso total, peso do rim esquerdo expressos em grama (g) e peso do rim esquerdo expresso por 100 g do peso total dos animais do grupo controle (alimentado) e do grupo em jejum por 72 horas. São expressas as médias, desvio padrão e erro padrão da média com o grau de significância entre os grupos.

CONTROLE (Alimentado)			JEJUM			
Peso rato(g)	Peso rim(g)	Rim/100g	Peso rato(g)	Peso rim (g)	Rim/100g	
183	0,681	0,372	149	0,553	0,371	
185	0,721	0,389	149,5	0,87	0,392	
192	0,728	0,379	143	0,542	0,379	
189	0,718	0,379	142	0,563	0,396	
184	0,698	0,373	150	0,567	0,378	
187	0,656	0,350	146	0,551	0,377	
182	0,636	0,349	147	0,597	0,406	
187	0,642	0,343	145	0,584	0,402	
189	0,658	0,348	147	0,612	0,416	
186	0,653	0,315	150	0,623	0,415	
			148	0,602	0,406	
			147	0,599	0,407	
			146	0,602	0,412	
186,4	0,68	0,36	146,5	0,58	0,4	M
3,06	0,03	0,01	2,52	0,03	0,02	DPM
0,9	0,01	0,01	0,7	0,01	0	EPM
			p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	P

ANEXO 4

TABELA 04 - Peso total, peso do rim esquerdo expressos em gramas (g) e peso do rim esquerdo expresso por 100 g do peso dos animais do grupo controle (06 semanas) e do grupo idoso (20 meses). São expressas as médias, desvio padrão e erro padrão da média com o grau de significância entre os grupos.

CONTROLE (Jovem)			IDOSO (20 meses)			
Peso rato(g)	Peso rim(g)	Rim/100g	Peso rato(g)	Peso rim (g)	Rim/100g	
142	0,458	0,322	430	1,515	0,352	
145	0,524	0,361	410	1,535	0,374	
158	0,621	0,393	380	1,164	0,306	
169	0,469	0,303	376	1,295	0,344	
130	0,395	0,353	476	1,646	0,345	
142	0,502	0,325	482	1,710	0,354	
170	0,554	0,277	495	1,564	0,315	
162	0,603	0,372	491	1,679	0,341	
155	0,715	0,461	517	1,820	0,352	
162	0,703	0,433	522	1,868	0,357	
165	0,658	0,398	484	1,412	0,291	
<hr/>						
154,5	0,56	0,36	460	1,56	0,34	M
13	0,10	0,06	52,4	0,21	0,02	DPM
3,9	0,03	0,02	15,8	0,06	0,01	EPM
			p<0,05	p<0,05	p=0,2	P

ANEXO 5

TABELA 05 - Peso total dos animais controles e dos animais submetidos à nefrectomia contralateral há 02 dias, bem como o peso total do rim remanescente e este mesmo peso expresso por 100 g do peso total do ratos. São expressas as médias, desvios padrões e erros padrões da média, com a significância estatística entre os grupos.

NFX 02 DIAS						
CONTROLE			NFX 02 DIAS			
Peso rato(g)	Peso rim(g)	Rim/100g	Peso rato(g)	Peso rim (g)	Rim/100g	
159	0,539	0,339	144	0,606	0,420	
163	0,566	0,347	160	0,638	0,398	
170	0,619	0,364	162	0,624	0,385	
158	0,522	0,330	167	0,620	0,371	
165	0,606	0,367	167	0,668	0,400	
155	0,532	0,343	161	0,665	0,413	
158	0,539	0,392	158	0,623	0,394	
154	0,522	0,339	168	0,620	0,369	
152	0,510	0,335	166	0,623	0,375	
164	0,602	0,367	160	0,660	0,412	
157	0,515	0,328	148	0,585	0,395	
152	0,518	0,341	150	0,625	0,416	
158,9	0,55	0,35	159,2	0,63	0,40	M
5,58	0,04	0,02	7,98	0,01	0,02	DPM
1,61	0,02	0,01	2,30	0,01	0,01	EPM
			p=0,90	p<0,0001	p<0,0001	P

ANEXO 6

TABELA 06 - Peso total dos animais controles e dos animais submetidos à nefrectomia contralateral há 07 dias, bem como o peso total do rim remanescente e este mesmo peso expresso por 100 g do peso total do ratos. São expressas as médias, desvios padrões e erros padrões da média, com a significância estatística entre os grupos.

NFX 07 DIAS						
CONTROLE			NFX 07 DIAS			
Peso rato(g)	Peso rim(g)	Rim/100g	Peso rato(g)	Peso rim(g)	Rim/100g	
186	0,658	0,353	182	0,826	0,453	
225	0,796	0,353	184	0,851	0,462	
182	0,678	0,372	190	0,857	0,451	
195	0,726	0,372	205	0,853	0,416	
192	0,721	0,375	207	0,874	0,422	
224	0,793	0,354	224	0,940	0,419	
217	0,719	0,331	232	0,963	0,394	
215	0,717	0,333	207	0,876	0,423	
200	0,728	0,364	208	0,960	0,461	
203	0,629	0,309	195	0,863	0,442	
203,9	0,72	0,35	203,4	0,89	0,43	M
15,57	0,05	0,02	16,25	0,05	0,02	DPM
4,92	0,02	0,01	5,14	0,02	0,01	EPM
			p=0,94	p<0,0001	p<0,0001	P

ANEXO 7

TABELA 07 - Peso total dos animais controles e dos animais submetidos à nefrectomia contralateral há 28 dias, bem como o peso total do rim remanescente e este mesmo peso expresso por 100 g do peso total do ratos. São expressas as médias, desvios padrões e os erros padrões da média, com a significância estatística entre os grupos.

CONTROLE			NFX 28 DIAS			
Peso rato(g)	Peso rim(g)	Rim/100g	Peso rato(g)	Peso rim(g)	Rim/100g	
235	0,835	0,355	238	0,909	0,382	
220	0,819	0,372	229	1,083	0,473	
235	0,856	0,364	225	0,962	0,427	
218	0,719	0,329	231	1,032	0,446	
220	0,825	0,375	245	0,958	0,391	
208	0,701	0,337	236	1,209	0,512	
253	0,942	0,372	250	1,215	0,486	
226	0,897	0,396	212	1,000	0,471	
243	0,921	0,379	209	0,919	0,423	
239	0,905	0,378	220	1,054	0,479	
246	0,915	0,372	217	0,910	0,419	
222	0,796	0,358				
230,42	0,84	0,37	228,3	1,02	0,45	M
13,45	0,08	0,02	13,25	0,11	0,04	DPM
3,88	0,02	0,01	4,8	0,03	0,01	EPM
			p=0,71	p<0,0001	p<0,0001	P

ANEXO 8

TABELA 08 - Peso total dos animais controles e dos animais com *Diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina, bem como o peso total do rim remanescente e este mesmo peso expresso por 100 g do peso total do ratos. São expressas as médias, desvios padrões e os erros padrões, com a significância estatística entre os grupos.

CONTROLE			DIABÉTICO			
Peso rato(g)	Peso rim (g)	Rim/100g	Peso rato(g)	Peso rim (g)	Rim/100g	
138	0,515	0,373	91	0,599	0,658	
142	0,518	0,364	94	0,531	0,564	
148	0,643	0,434	103	0,615	0,597	
170	0,602	0,354	110	0,732	0,665	
138	0,465	0,336	100	0,706	0,706	
130	0,415	0,319	94	0,525	0,558	
130	0,408	0,313	102	0,615	0,602	
137	0,406	0,296	110	0,631	0,573	
141	0,508	0,360	107	0,662	0,618	
			125	0,673	0,538	
			72	0,371	0,515	
			92	0,584	0,634	
			71	0,457	0,643	
141,5	0,50	0,35	97,7	0,59	0,61	M
12,06	0,08	0,04	14,9	0,10	0,06	DPM
4,02	0,03	0,01	4,1	0,03	0,02	EPM
			p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	P

ANEXO 9

TABELA 09 - Nível da glicose plasmática, expressa em mg/dl e da insulina sérica, expressa em μ U/ml dos animais alimentados (Controle) e em jejum por 72 horas prévias ao experimento (Jejum). São expressas as médias, desvios padrões da média e erros padrões da média, com a significância estatística entre os grupos.

ALIMENTADO		JEJUM		
Glicemia mg/dl	Insulina μ U/ml	Glicemia mg/dl	Insulina μ U/ml	
167	44	77	18	
168	29	74	11	
146	30	76	17	
162	46	72	10	
157	42	75	9	
149		76		
		71		
158,2	38	74,4	13	M
9,2	8	2,23	4	DPM
3,7	3,6	0,84	1,8	EPM
		p<0,05	p<0,05	P

ANEXO 10

TABELA 10 - Nível da glicose plasmática, expressa em mg/dl e da insulina sérica, expressa em μ U/ml dos animais jovem (com 2 meses de idade) e idosos (20 meses de idade). São expressas as médias, desvios padrão da média e os erros padrão da média, com a significância estatística entre os grupos.

CONTROLE (jovem)		IDOSO		
Glicemia mg/dl	Insulina μ U/ml	Glicemia mg/dl	Insulina μ U/ml	
154	24	76	64	
113	25	76	74	
105	29	154	64	
116	5,2	140	45	
104	4,7	131	37	
115		116	42	
104		121	42	
115,8	17,6	116,3	52,5	M
17,6	11,6	30,1	14,4	DPM
6,6	5,2	11,4	5,4	EPM
		p=0,97	p<0,001	P

ANEXO 11

TABELA 11 - Nível da glicose plasmática, expressa em mg/dl e da insulina sérica, expressa em μ U/ml dos animais do grupo controle e submetidos à uninefrectomia há 07 dias (Nfx 07). São expressas as médias, desvios padrões e erros padrões da média, com a significância estatística entre os grupos.

CONTROLE		NFX 07 DIAS		
Glicemia mg/dl	Insulina μ U/ml	Glicemia mg/dl	Insulina μ U/ml	
85	24	86	78	
91	25	79	45	
82	29	77	43	
104	29	73	48	
90	23	80	44	
87	26	85	78	
114	27	74	64	
82	28	101	59	
95	24	92	58	
102	25	96	47	
90	28	125	52	
	27		49	
93	26,2	88	55,4	M
10	2,05	15	12,3	DPM
3	0,5	5	3,5	EPM
		p=0,383	p<0,0001	P

ANEXO 12

TABELA 12 - Nível da glicose plasmática, expressa em mg/dl e da insulina sérica, expressa em μ U/ml dos animais do grupo controle e portadores de *Diabetes mellitus*. São expressas as médias, desvios padrões e erros padrões da média, com a significância estatística entre os grupos.

CONTROLE		DIABÉTICO		
Glicemia mg/dl	Insulina μ U/ml	Glicemia mg/dl	Insulina μ U/ml	
104	25	284	4,7	
137	24	371	4,2	
104	25	302	4,2	
157	29	333	4,0	
115	40	415	15	
127	52	381	6,0	
118	33	311		
114	35	436		
	15	412		
	13	300		
		476		
		277		
		397		
		368		
122	29	361,6	6,35	M
17,9	11,6	61,8	4,3	DPM
6,34	3,6	16,5	1,7	EPM
		p<0,0001	p<0,0001	P

ANEXO 13

TABELA 13 - Média, desvio padrão e erro padrão da média dos valores percentuais de densitometria óptica das bandas correspondentes à subunidade β do RI e da pp 185, em três experimentos realizados com material coletado no estado basal (sem insulina) e após a estimulação com 10^{-5} M de insulina; e submetido ao “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina.

subunidade β RI	pp 185	
360	152	
294	132	
223	106	
290	130	M
70	23	DPM
40	13	EPM
p<0,05	p<0,05	P

ANEXO 14

TABELA 14 - Média, desvio padrão e erro padrão da média dos valores percentuais de densitometria óptica do grau de fosforilação da banda correspondente à subunidade β do RI, pp 185 e pp 80, em três experimentos realizados com material coletado aos 30, 60 e 90 segundos após a estimulação com insulina e submetido ao “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina e comparados com as respectivas bandas no tempo zero da estimulação com insulina

RI			pp185			pp80			
30	60	90	30	60	90	30	60	90	
110	153	210	205	463	615	95	210	342	
113	110	185	156	532	533	123	184	274	
107	132	215	153	324	506	134	195	320	
110	132	203	171	440	511	117	196	312	M
3	21	16	29	106	57	20	13	35	DPM
2	12	9	17	61	33	12	7	20	EPM
p<0,005	p<0,05	p<0,001	p<0,05	p<0,005	p<0,001	p=0,21	p<0,001	p<0,001	P

ANEXO 15

TABELA 15 - Medida da densitometria óptica, em unidades arbitrárias, das bandas correspondentes à fosforilação da subunidade β do receptor de insulina (pp 95), da pp 185 e da pp 80, quando submetidas ao "immunoblotting" com anticorpo antifosfotirosina (antiPhy); do nível protéico do receptor (IR) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), quando submetidos ao "immunoblotting" com anticorpos anti-receptor e antiIRS-1; e das bandas correspondentes à fosforilação do IRS-1 de amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo antiIRS-1 e submetidas a "immunoblotting" com anticorpo antifosfotirosina e da banda correspondente à associação IRS-1/PI 3-quinase (PI 3-k), em tecido renal de ratos em jejum por 72 horas. Os resultados são expressos em valores percentuais, com média (M), desvio padrão da média (DPM) e erro padrão da média (EPM). A significância é expressa em p, comparando-se cada grupo com o controle (100%).

Experimento : RATOS ALIMENTADOS & RATOS JEJUM 72 HORAS

RI Proteína	IRS-1 Proteína	subunidade β AntiPhy	pp185 AntiPhy	pp 80 AntiPhy	IRS-1 AntiPhy	IRS-1 / PI3-k	
203	115	173	257	186	212	248	
195	162	149	260	142	198	237	
198	146	184	173	164	183	218	
162	115	167	138	125	171	228	
	132	144	172	135			
	105		192	145			
	104		209				
	178		288				
	152						
189,5	134,3	163,4	211	149,5	192	232	M
18,6	26,6	16,7	52,2	22	16,7	22	DPM
9,3	8,9	7,4	18,5	9	8,3	9	EPM
p<0,0001	p<0,001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,005	p<0,0001	p

ANEXO 16

TABELA 16 - Medida da densitometria óptica, em unidades arbitrárias, das bandas correspondentes à fosforilação da subunidade β do receptor de insulina (pp 95), da pp 185 e da pp 80, quando submetidas ao “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (antiPhy); do nível protéico do receptor (IR) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) quando submetidos ao “immunoblotting” com anticorpos anti-receptor e antiIRS-1; das bandas correspondentes à fosforilação do IRS-1 de amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo antiIRS-1 e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina e da banda correspondente à associação IRS-1/ PI 3-quinase (PI 3-k), em tecido renal de ratos jovens (controle com 06 semanas) e ratos senis (20 meses). Os resultados são expressos em valores percentuais, com média (M), desvio padrão da média (DPM) e erro padrão da média (EPM). A significância é expressa em p, comparando-se cada grupo com o controle (100%).

Experimento : RATOS JOVENS (6 semanas) & RATOS SENIS (20 meses)

RI	IRS-1	subunidade β	pp185	pp 80	IRS-1	IRS-1 /	
Proteína	Proteína	AntiPhy	AntiPhy	AntiPhy	AntiPhy	PI3-k	
95	83	111	62	68	60	38	
91	86	71	76	79	56	51	
99	116	28	75	93	45	29	
103	120	64	84	99	74	46	
		34	43	103	67	40	
		39	54				
97	101,2	57,8	65,6	69	60,4	40,8	M
5,2	19,4	31,1	15,4	18	11	8,3	DPM
2,6	9,7	12,7	6,3	8,1	4,9	3,7	EPM
p=0,289	p=0,902	p<0,05	p<0,0001	p<0,005	p<0,0001	p<0,0001	P

ANEXO 17

TABELA 17 - Medida da densitometria óptica, em unidades arbitrárias, das bandas correspondentes à fosforilação da subunidade β do receptor de insulina (pp 95), da pp 185 e da pp 80, quando submetidas ao “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (antiPhy); do nível protéico do receptor (IR) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), quando submetidos ao “immunoblotting” com anticorpos anti-receptor e antiIRS-1, em tecido renal remanescente de ratos submetidos, há 02 dias, à nefrectomia unilateral. Os resultados são expressos em valores percentuais, com média (M), desvio padrão da média (DPM) e erro padrão da média (EPM). A significância é expressa em p, comparando-se cada grupo com o controle não-operado (100%).

Experimento : Efeito da nefrectomia parcial de 02 dias sobre receptor de insulina e do IRS-1 em tecido renal remanescente

RI Proteína	IRS-1 Proteína	Subunidade β antiPhy	pp 185 antiPhy	
95	98	77	67	
131	140	97	45	
137	54	81	47	
120	84	40	83	
		87	50	
			55	
			72	
			86	
120,7	94	76,4	63,1	M
18,5	35,8	21,7	16,2	DPM
9,3	17,9	9,7	5,7	EPM
p=0,7	p=0,76	p<0,05	p<0,0001	P

ANEXO 18

TABELA 18 - Medida da densitometria óptica, em unidades arbitrárias, das bandas correspondentes à fosforilação da subunidade β do receptor de insulina (pp 95), da pp 185, e da pp 80, quando submetidas ao “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (antiPhy); do nível protéico do receptor (IR) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), quando submetidos ao “immunoblotting” com anticorpos anti-receptor e antiIRS-1 e das bandas correspondentes à fosforilação do IRS-1 de amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo antiIRS-1 e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina e da banda correspondente à associação IRS-1/ PI 3-quinase (PI 3-k), em tecido renal remanescente de ratos submetidos, há 07 dias, à nefrectomia unilateral. Os resultados são expressos em valores percentuais, com média (M), desvio padrão da média (DPM) e erro padrão da média (EPM). A significância é expressa em p, comparando-se cada grupo com o controle não-operado (100%).

Experimento : Efeito da nefrectomia parcial, há 07 dias, sobre receptor de insulina e do IRS-1 no tecido renal remanescente

IR Proteína	IRS-1 Proteína	Subunidade β antiPhy	pp185 antiPhy	IRS-1 antiPhy	IRS-1/ PI 3-k	
130	160	80	43	48	53	
110	140	82	45	37	46	
127	145	62	78	51	39	
86	49	84	59	28	64	
	30	90	48			
			75			
113,2	104,8	79,6	58	41	50,5	M
20,2	60,4	10,53	15,4	10,5	10,6	DPM
10,1	27,03	4,7	6,2	5,28	5,3	EPM
p=0,237	p=0,863	p<0,005	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	P

ANEXO 19

TABELA 19 - Medida da densitometria óptica, em unidades arbitrárias, das bandas correspondentes à fosforilação da subunidade β do receptor de insulina (pp 95), da pp 185 e da pp 80, quando submetidas ao “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (antiPhy) e do nível protéico do receptor (IR) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), quando submetidos ao “immunoblotting” com anticorpos anti-receptor e antiIRS-1, em tecido renal remanescente de ratos submetidos, há 28 dias, à nefrectomia unilateral, Os resultados são expressos em valores percentuais, com média (M), desvio padrão da média (DPM) e erro padrão da média (EPM). A significância é expressa em p, comparando-se cada grupo com o controle não-operado (100%).

Experimento : Efeito da nefrectomia parcial, há 28 dias, sobre receptor de insulina e do IRS-1 no tecido renal remanescente

IR Proteína	IRS-1 Proteína	Subunidade β antiPhy	pp185 antiPhy	
107	58	94	23	
93	55	94	37	
138	101	50	34	
111	40	72	55	
	30	37	53	
		30	57	
			63	
112,2	56,8	62,8	46	M
18,82	27,2	28,1	14,7	DPM
9,4	12,2	11,4	5,5	EPM
p=0,241	p<0,05	p<0,05	p<0,0001	P

ANEXO 20

TABELA 20 - Medida da densitometria óptica, em unidades arbitrárias, das bandas correspondentes à fosforilação da subunidade β do receptor de insulina (pp 95), da pp 185 e da pp 80, quando submetidas ao “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (antiPhy); do nível protéico do receptor (IR) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), quando submetidos ao “immunoblotting” com anticorpos anti-receptor e antiIRS-1; das bandas correspondentes à fosforilação do IRS-1 de amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina e da banda correspondente à associação IRS-1/ PI 3-quinase (PI 3-k) em tecido renal remanescente de ratos portadores de *Diabetes mellitus* induzido pela estreptozotocina. Os resultados são expressos em valores percentuais, com média (M), desvio padrão da média (DPM) e erro padrão da média (EPM). A significância é expressa em p, comparando-se cada grupo com o controle (100%).

Experimento : Efeito do *Diabetes mellitus* sobre receptor de insulina e do IRS-1 no tecido renal .

IR Proteína	IRS-1 Proteína	Subunidade β antiPhy	pp185 antiPhy	IRS-1 antiPhy	IRS-1/ PI 3-k	
144	136	149	240	252	243	
154	121	122	256	234	224	
205	153	163	226	264	234	
192	188	139	152	206	186	
208	140	134	135	194	165	
219	140		422			
190	122					
178	166					
186,2	145,7	141,4	238,5	230	210,4	M
26,3	22,3	15,5	102,3	29,7	33,4	DPM
9,3	8	6,9	41,7	13,3	14,9	EPM
p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,01	p<0,0001	p<0,0001	P