

CRISTINA ALBA LALLI

***ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO
INSULÍNICA EM FÍGADO E MÚSCULO
DE RATOS ALIMENTADOS COM
DIETA HIPERLIPÍDICA***

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

Orientador: *Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad*

***Campinas
1997***



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	L156e
V.	Ex.
TOMBO BC/	32960
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	01/03/98
N.º CPD	

CM-00106332-2

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

L156e
L156e

Lalli, Cristina Alba

Etapas iniciais da ação insulínica em fígado e músculo de ratos alimentados com dieta hiperlipídica / Cristina Alba Lalli. Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador: Mario José Abdalla Saad

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

1. Insulina. 2. Insulina - Receptores. 3. *Resistência à insulina. I. Mario José Abdalla Saad. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IIalli.docII. Título.

Banca Examinadora da Tese de Mestrado:

Orientador: Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad

Membros:

1. Mário José Abdalla Saad
2. Regina Célia Infante Moura
3. Ador Lambarini - Mauro A. Lambasini
4. _____
5. _____

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

Data: 19/12/97

Agradecimento

Agradeço ao Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad por sua orientação brilhante e pelo exemplo de competência profissional.

Ao Prof. Dr. Ronan José Vieira pela oportunidade de realizar este trabalho e por dividir sua sabedoria médica.

À amiga Prof. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho por sua colaboração em todas as etapas desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro pelo auxílio no preparo das dietas e dosagens bioquímicas.

Ao Prof. Dr. Konradin Metze pelo estudo anatomopatológico.

Ao Prof. Dr. Flávio César de Sá pelas orientações de informática.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto de Madureira pela colaboração e estímulo.

Aos amigos Sra. Conceição Aparecida da Silva e Sr. Luiz Janeri, imprescindíveis e competentes.

Ao amigo Prof. Dr. Sigisfredo Luiz Brenelli pela ajuda diária e constante estímulo.

À todos os colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular pela colaboração.

Ao meu irmão Marcos Rodolfo Lalli por todo o apoio e companheirismo.

SUMÁRIO

RESUMO	i
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Sinal insulínico.....	2
1.2. Efeitos da composição da dieta e do conteúdo lipídico na sensibilidade à insulina.....	8
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Animais.....	15
3.2. Materiais.....	16
3.2.1. Tampão de extração A (extrato totao).....	16
3.2.2. Tampão de Laemmli (5X).....	16
3.2.3. Solução tampão para eletroforese em gel (SDS-PAGE).....	17
3.2.4. Solução tampão para transferência.....	17
3.2.5. Solução tampão para SDS-PAGE, gel de resolução (“resolving”).....	17
3.2.6. Solução tampão para SDS-PAGE, gel de empilhamento (“stacking”).....	17
3.2.7. Solução Basal.....	17
3.2.8. Solução bloqueadora.....	18
3.2.9. Solução para anticorpos.....	18
3.2.10. Tampão de extração B (imunoprecipitação).....	18

3.2.11. Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado.....	18
3.2.12. Solução com proteína A marcada com ^{125}I	18
3.3. Métodos.....	19
3.3.1. Procedimentos com animais.....	19
3.3.2. Acesso e retirada dos tecidos.....	19
3.3.3. Manuseio do extrato total.....	20
3.3.4. <i>Immunoblotting ou Westernblotting</i>	20
3.3.5. Imunoprecipitação.....	21
3.3.6. Determinações bioquímicas.....	22
3.3.6.1. Glicose sérica.....	22
3.3.6.2. ácidos graxos livres (AGL).....	22
3.3.6.6. Dosagem de insulina.....	22
3.3.7. Teste de tolerância à insulina.....	23
3.3.8. Retirada de tecidos para estudo anátomo-patológico.....	24
3.3.9. Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Características gerais dos animais.....	26
4.2. Caracterização da sensibilidade à insulina: velocidade de desaparecimento da glicose (K_{it}).....	27
4.3. caracterização anatomopatológica.....	27
4.4. Efeito da dieta hiperlipídica nas etapas iniciais da ação insulínica em ratos.....	27

4.4.1. Efeito da dieta hiperlipídica na regulação do receptor de insulina e do IRS-1 em tecido hepático.....	27
4.4.2. Efeito da dieta hiperlipídica na regulação do receptor de insulina e do IRS-1 em tecido muscular.....	36
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÕES.....	53
7. SUMMARY.....	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA.....	57
9. ANEXOS.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

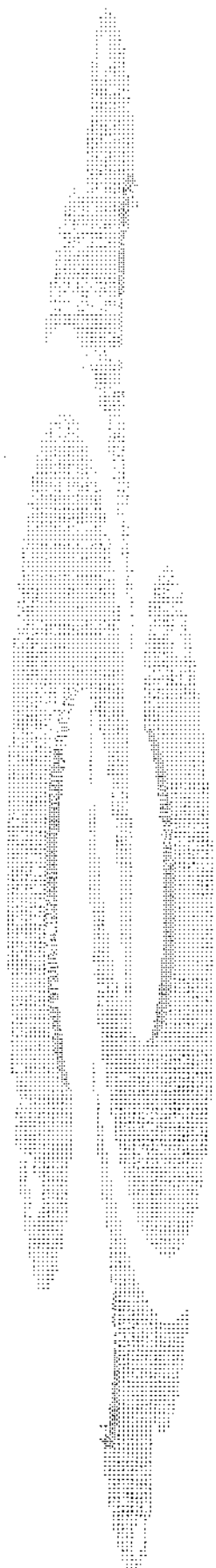
AGL	ácidos graxos livres
μCi	microCuri
ATP	adenosina trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendinitrilotetracético
GH	growth hormone
GLUT	transportador de glicose
^{125}I	iodo marcado radioativamente na posição 125
IR	receptor de insulina
IRS-1	substrato 1 do receptor de insulina
IRS-2	substrato 2 do receptor de insulina
ITT	teste de tolerância à insulina
K_{itt}	velocidade de desaparecimento da glicose
MAP	proteína ativadora da mitogênese
mRNA	mensageiro do ácido ribonucleico
PI 3-k	fosfatidilinositol 3-quinase
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoreto
pp60	proteína fosforilada de 60 kDa
pp185	proteína fosforilada de 185 kDa
RNA	ácido ribonucleico
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida e sódio dodecil-sulfato para eletroforese
SH2	segunda homologia ao Src
SH3	terceira homologia ao Src
Src	oncogene originalmente definido como produto do sarcoma vírus Rous
Tris	tri (hidroximetil)-aminometano

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	26
Tabela 2.....	43
Tabela 3.....	75
Tabela 4.....	76
Tabela 5.....	77
Tabela 6.....	78
Tabela 7.....	79
Tabela 8.....	80
Tabela 9.....	81
Tabela 10.....	82
Tabela 11.....	83
Tabela 12.....	84
Tabela 13.....	85
Tabela 14.....	86
Tabela 15.....	87

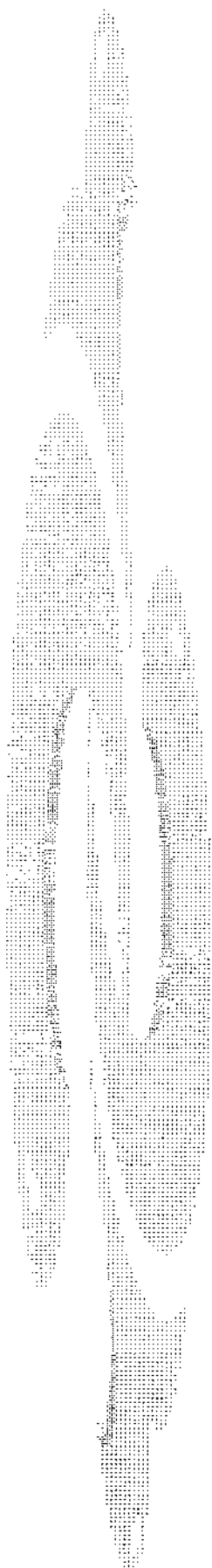
LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	29
Figura 2.....	30
Figura 3.....	31
Figura 4.....	32
Figura 5.....	33
Figura 6.....	34
Figura 7.....	35
Figura 8.....	37
Figura 9.....	38
Figura 10.....	39
Figura 11.....	40
Figura 12.....	41
Figura 13.....	42



RESUMO

A insulina estimula a capacidade quinase de seu receptor, que se autofosforila e estimula a fosforilação de substratos citoplasmáticos, IRS-1 e IRS-2. Estes, por sua vez, associam-se e ativam a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase), que é importante no transporte de glicose. Animais alimentados com dietas ricas em lipídeos apresentam resistência à ação insulínica, ainda que os mecanismos moleculares dessa alteração não estejam esclarecidos. Esse estudo avaliou as etapas iniciais da ação insulínica em fígado e músculo de ratos alimentados durante 4 semanas com uma dieta hiperlipídica, contendo 59% de lipídeos saturados. Utilizou-se extração de tecidos hepático e muscular após estimulação com insulina e imunoprecipitação seguida de "immunoblotting" com anticorpos anti receptor de insulina anti-IRS-1, antifosfotirosina e anti-PI 3-quinase. Os resultados mostraram que tanto a concentração como a autofosforilação do receptor de insulina estimulada pela insulina em tecidos hepático e muscular, permaneceram inalteradas nos dois grupos, alimentados com a dieta hiperlipídica e com ração convencional. Em fígado, a concentração do IRS-1 aumentou $51 \pm 17\%$ ($p < 0,05$) nos animais alimentados com a dieta hiperlipídica e a fosforilação desse substrato, avaliada através da imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1 e *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina, aumentou $64 \pm 22\%$ ($p < 0,05$) no mesmo grupo. Ao contrário, em tecido muscular observou-se diminuição de $50 \pm 12\%$ ($p < 0,05$) na fosforilação do IRS-1 estimulada pela insulina no grupo da dieta hiperlipídica, ainda que a concentração do substrato não tenha apresentado alteração significativa. Os níveis protéicos da PI 3-quinase não se alteraram em ambos os tecidos hepático e muscular dos dois grupos, mas a associação IRS-1/PI 3-quinase no músculo dos animais tratados com a dieta rica em lipídeos diminuiu para $52 \pm 11\%$ ($p < 0,05$). Em tecido hepático não houve alteração na associação IRS-1/PI 3-quinase. Tais resultados sugerem que alterações nas etapas iniciais da ação da insulina, principalmente em tecido muscular esquelético, podem estar envolvidas na resistência insulínica apresentada nesse modelo animal.



1. INTRODUÇÃO

1.1. SINAL INSULÍNICO

A insulina é um importante hormônio cujos efeitos podem ser divididos em dois grandes grupos: metabólicos e de crescimento.

Dentre os efeitos metabólicos, é o principal responsável pela homeostase da glicose., atuando, principalmente nos tecidos periféricos, músculo e tecido adiposo, e no fígado. No fígado a insulina inibe a glicogenólise e a gliconeogênese, diminuindo a produção hepática da glicose e estimula seu armazenamento na forma de glicogênio. Nos tecidos periféricos, estimula o transporte de glicose para o interior da célula, assim como sua utilização e armazenamento. Atua também no metabolismo protéico e lipídico, estimulando a lipogênese, inibindo a lipólise, estimulando a captação de aminoácidos e o fluxo iônico.(FELIG & BERGMAN, 1990. Esses efeitos metabólicos ocorrem em baixas concentrações do hormônio (KAHN, 1985).

Os efeitos indutores do crescimento e diferenciação celulares vão manifestar-se em altas concentrações de insulina (KAHN,1985) e dão-se através da regulação da expressão e atividade de várias enzimas, levando à síntese de RNA e DNA e ao estímulo à síntese e degradação protéicas (KAHN, 1985; MOLLER & FLIER, 1991; CHEATAM & KAHN, 1995).

No início deste século, a purificação da molécula de insulina, além de representar um avanço definitivo no tratamento do *diabetes mellitus*, desencadeou uma série de estudos com o objetivo de esclarecer seu mecanismo de ação e seu papel em várias outras doenças, incluindo obesidade, hipertensão, hiperandrogenismo ovariano, etc.

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

O receptor de insulina está presente em todos os animais vertebrados, embora sua concentração em cada tecido seja diferente, podendo variar de aproximadamente 40

receptores por célula em eritrócitos circulantes a mais de 200.000 em adipócitos e hepatócitos (GINSBERG 1977). Os níveis plasmáticos normais de insulina variam de 10^{-11} a 10^{-9} M e são menores que a média de afinidade de ligação da mesma. Assim, a maior concentração de receptores nos tecidos alvo, proporciona uma cinética de ligação mais rápida (CHEATAM & KAHN, 1995).

O receptor de insulina é uma estrutura tetrâmera composta de duas subunidades α , cada uma ligada covalentemente a uma subunidade β através de pontes dissulfeto, resultando na estrutura final de β - α - α - β , cujo peso molecular é estimado através de eletroforese não redutora em gel de dodecil-sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE) em 350.000 (MASSAGUE et al., 1981; KASUGA et al., 1982 a). Cada subunidade α tem peso molecular de 135.000, é exclusivamente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade β é uma proteína transmembrana com peso molecular de 95.000 e é responsável pela tradução do sinal insulínico (KASUGA et al., 1982 a, 1982 b).

A subunidade α possui alta afinidade à ligação da insulina. Modificações químicas e estudos de mutações sugerem que domínios específicos como os que são codificados pelos exons 2 e 3 sejam fundamentais para a ligação da insulina (DEMEYTS et al., 1990). As pontes dissulfetos que fazem a ligação entre a subunidade α e a porção extracelular da subunidade β ocorrem em aminoácidos cisteína.

Em 1982, foi dado um grande passo na compreensão da transmissão do sinal insulínico, com a descoberta que a subunidade β do receptor de insulina é uma proteína com atividade quinase. As proteínas-quinases são enzimas envolvidas na transferência de radicais fosfato do ATP para aminoácidos específicos de proteínas. Portanto, o receptor de insulina é uma enzima da família das tirosina-quinase, pois, após sua ligação com a insulina, é capaz de se autofosforilar e fosforilar outros substratos em aminoácidos tirosina. Este receptor comporta-se, funcionalmente, como uma enzima alostérica, com uma subunidade α regulatória e uma subunidade β catalítica (KASUGA et al, 1982 b, 1982 c). Quando a insulina se liga à subunidade α ocorre uma alteração conformacional na

molécula do receptor e a atividade quinase é ativada na subunidade β (HERRERA & ROSEN, 1986; PERLMAN et al., 1989; WHITE et al., 1988). Este fato determina a transferência de grupos fosfato do ATP que se ligou à lisina na posição 1030 na subunidade β , para vários aminoácidos tirosina do receptor e desencadeia a fosforilação de substratos protéicos intracelulares.

A subunidade β pode ser dividida em quatro partes com ações diferentes e específicas: porção justamembrana, relacionada à ligação dos substratos e à interiorização do receptor (CARPENTIER et al., 1993); região catalítica que contém o sítio de ligação do ATP (Lisina 1030), sendo esta a região que apresenta maior semelhança com outras proteínas tirosina-quinase; a região que promove a regulação da atividade quinase e a porção COOH-terminal. Nesta última, encontram-se as maiores diferenças entre os receptores de insulina e do “insulin-like growth factor-1” (IGF-1). O IGF-1 é um polipeptídeo que apresenta estrutura semelhante à da insulina, mas com efeitos sobre o crescimento celular mais relevantes que os metabólicos. Portanto, em função de sua diversidade com a estrutura do IGF-1, a porção COOH-terminal tem sido implicada como responsável pela diferenciação entre os efeitos metabólicos e os de crescimento (TAKATA et al., 1988). Há pelo menos seis locais de fosforilação das tirosinas (Tyr): área justamembrana com uma tirosina na posição 972, porção média, com tirosinas nas posições 1158, 1162 e 1163 e na porção COOH-terminal, que apresenta tirosinas nas posições 1328 e 1334 (WHITE et al., 1988).

Consideráveis evidências têm demonstrado que a atividade tirosina-quinase do receptor é essencial para a sinalização insulínica (MAEGAWA et al., 1988). Uma delas é originária de experimentos realizados *in vitro* que induziram mutagênese na lisina da posição 1030 do receptor, que foi substituída por vários outros aminoácidos (metionina, arginina ou alanina). Baseando-se na analogia com outras quinases, este resíduo corresponde ao sítio de ligação do ATP. Quando tais mutantes foram expressos em células, a ligação insulínica manteve-se normal, mas os receptores mostraram-se totalmente inativos como quinases e ineficazes na mediação dos estímulos da insulina no metabolismo celular (EBINA et al., 1987; CHOU et al., 1987). A perda da atividade

tirosina-quinase é acompanhada da 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 a perda da atividade quinase do receptor e a resposta biológica. Além do mais, o receptor de insulina possui sítios de fosforilação de serina e treonina, os quais, quando fosforilados, parecem determinar diminuição ou inibição da sua atividade quinase (BOLLAG et al., 1986). Esta fosforilação em treonina ou serina pode ser estimulada pelo tratamento prolongado com insulina, por esteroides de forbol e análogos de AMP cíclico, e, provavelmente, é o resultado da ação das proteínas quinase C ou A sobre o receptor (TAKAYAMA et al., 1984; TAKAYAMA et al., 1988). Esta regulação da atividade quinase do receptor por fosforilações em outros aminoácidos e não em tirosina, pode ser um potencial mecanismo de regulação do receptor de insulina e da transmissão do sinal em situações fisiológicas e patológicas.

Concomitantemente à transmissão do sinal, o receptor de insulina medeia a interiorização do hormônio e sua consequente degradação. Sob estímulo insulínico prolongado, o receptor é degradado e ocorre atenuação do sinal (BACKER et al., 1989).

Um outro importante avanço no entendimento da sinalização insulínica foi originário de vários estudos demonstrando que a autofosforilação do receptor induzida pela insulina e a ativação da sua capacidade tirosina-quinase desencadeia uma cascata de fosforilações de um ou mais dos seus substratos intracelulares (WHITE, 1985; BERNIER, 1987; KARASIK et al., 1988; SUN et al., 1991).

Dentre as proteínas que podem ser fosforiladas pelo receptor de insulina, a primeira a ser identificada e a mais estudada foi inicialmente denominada pp185, por seu padrão de migração eletroforético, entre 165-185 kDa. (WHITE et al., 1985). Em células transfectadas com o receptor de insulina humano ocorre acentuação da fosforilação desta pp185, coincidente com o aumento da ação insulínica (SUN et al., 1991). Células expressando receptores com mutações no sítio de ligação do ATP, apresentam redução na fosforilação da pp185, proporcional à redução que ocorre na capacidade quinase do

fosforilação da pp185, proporcional à redução que ocorre na capacidade quinase do receptor (WILDEN et al., 1992). Outras evidências do papel desempenhado pela pp185 na transmissão do sinal insulínico, vieram de um estudo em que se induziu mutações *in vitro* na tirosina na posição 972 do receptor, que manteve ligação normal à insulina e total ativação da capacidade tirosina-quinase. No entanto, quando este receptor mutante foi transfectado em células, não foi capaz de fosforilar a pp185 e de transmitir o sinal insulínico (WHITE et al., 1988 b).

A pp185 foi clonada e denominada substrato 1 do receptor de insulina ou IRS-1 em 1991 (SUN et al., 1991). Recentemente, descreveu-se uma segunda proteína que migra na mesma banda do pp185 e que foi denominada IRS-2 (TAMEMOTO et al., 1994; ARAKI et al., 1994; SUN et al., 1995).

O DNA complementar do IRS-1 de fígado de rato codifica uma proteína com 1235 aminoácidos. Esta proteína apresenta algumas características peculiares: é uma proteína de localização exclusivamente citoplasmática, possui uma sequência de aminoácidos compatível com as de ligação para nucleotídeos (ATP ou GTP), embora não apresente nenhuma homologia com proteínas quinases conhecidas, e apresenta múltiplos sítios de fosforilação em serina, treonina e tirosina. São 22 sítios potenciais de fosforilação em tirosina. Dentre eles, dez mantêm a sequência YMXM, onde Y é o aminoácido tirosina, M é metionina e X corresponde a qualquer outro aminoácido; três desses sítios apresentam a sequência YXXM e um tem a sequência EYYE, onde E corresponde à glutamina. A sequência YMXM está presente em várias proteínas com atividade tirosina-quinase, ainda que não no receptor de insulina. Nessas proteínas, o sítio YMXM, quando fosforilado, tem a propriedade de ligar-se, não covalentemente, a determinadas porções denominadas SH2 (homologia 2 ao Src), presentes em moléculas sinalizadoras (SHOELSON et al., 1992).

O peso molecular estimado do IRS-1 é de 131 kDa, porém esta proteína migra entre 160-190 kDa em gel de poliacrilamida, provavelmente devido a modificações pós-transducionais e à incorporação de fósforo.

Estudos *in vivo* em cultura de células e em sistemas reconstituídos *in vitro*, demonstraram que o IRS-1 fosforilado associa-se e ativa a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) (BACKER et al., 1992; FOLLI et al., 1992). Recentemente foi demonstrado que esta associação e ativação também ocorre em dois importantes tecidos sensíveis à insulina em ratos, fígado e músculo, a concentrações fisiológicas deste hormônio (FOLLI et al., 1992; SAAD et al., 1993). A enzima PI 3-quinase possui duas subunidades, uma catalítica, de 110 kDa, e outra regulatória, de 85 kDa. Esta última contém duas porções SH2 e uma SH3 (CARPENTER & CANTLEY, 1990). A ligação e ativação envolvem as tirosinas fosforiladas do IRS-1 nos sítios YMXM e a porção SH2 da subunidade regulatória da enzima PI 3-quinase. A insulina aumenta a concentração intracelular de fosfatidilinositol 3-fosfato, sugerindo que a PI 3-quinase é realmente ativada durante a estimulação com este hormônio. Embora a subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase seja fosforilada após estímulo com outros fatores de crescimento, isto não parece ocorrer após estímulo com insulina e a ativação da enzima parece ser consequente à sua ligação com o IRS-1.

Estudos recentes demonstram que a associação da PI 3-quinase com o IRS-1 fosforilado é essencial para o transporte de glicose em tecido muscular (TSAKIRIDIS et al., 1995) e em tecido adiposo (CLARKE et al., 1994), e 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-: SH-PTP2, GRB-2 e Nck. Tais proteínas estão envolvidas com o crescimento celular.

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 et al., 1995).

Portanto, após a ligação ao seu receptor, a insulina desencadeará um sinal que se inicia com a auto-fosforilação do receptor e as conseqüentes fosforilações do IRS-1 e IRS-2. Estas duas proteínas fosforiladas terão então o papel de “âncoradouros” de várias enzimas e adaptadores moleculares, determinando uma cascata de reações intracelulares covalentes e não covalentes, que multiplicarão o sinal e os efeitos biológicos finais. Portanto, o estudo da regulação do IRS-1 em tecidos hepático e muscular de modelos animais de resistência à insulina, pode contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos em tais modelos. Sabe-se, também, que em tais tecidos, a hipoinsulinemia é acompanhada de aumento na fosforilação em tirosina do receptor e do IRS-1, assim como sua associação à PI 3-quinase (SAAD et al., 1992; FOLLI et al., 1993). A hiperinsulinemia, por sua vez, leva à acentuada diminuição na intensidade das etapas iniciais da ação insulínica (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.

1.2. EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DA DIETA E DO CONTEÚDO LIPÍDICO NA SENSIBILIDADE À INSULINA

Em 1972 foi proposto por Singer e Nicolson o modelo do mosaico fluido para explicar a estrutura da membrana celular, que consiste de uma dupla camada lipídica, composta por fosfolípides polares e colesterol, onde encontram-se “dissolvidas” algumas proteínas importantes, tais como enzimas e receptores (SINGER & NICOLSON, 1972). Deste então, têm-se estudado o papel da composição desses lípidos na fisiologia celular.

Vários estudos com cultura de diferentes linhagens de células, têm demonstrado que alterações na composição dos ácidos graxos dos fosfolípides de membrana e do conteúdo de colesterol podem levar à modificações na fluidicidade da mesma, assim como alterar algumas de suas propriedades, tais como transporte ativo, ligação à receptores, fagocitose, endocitose e outras (SPECTOR & YOREK, 1985). Essas alterações na composição dos fosfolípides podem ser induzidas por alterações na composição dos ácidos graxos da dieta (CLANDININ et al, 1991).

Fatores nutricionais têm sido relacionados com o desenvolvimento de resistência à insulina, principalmente relacionados à concentração de lipídeos na dieta e à composição desses lipídeos quanto ao tipo de ácidos graxos. Já em 1978, foi demonstrada a associação entre resistência à insulina e utilização de dieta hiperlipídica (OLEFSKI & SAEKOW, 1978). Com a descoberta que o receptor de insulina é uma molécula de localização transmembrana, formulou-se a hipótese que alterações na composição dos fosfolípidos induzidas por dietas poderiam estar envolvidas na resistência insulínica observada nessas situações.

Estudos tanto *in vitro* como *in vivo*, têm evidenciado que dietas ricas em lipídeos levam à diminuição das ações biológicas da insulina tanto em fígado, como nos tecidos adiposo e muscular (GRUNDLEGER & THENEN, 1982; SUSINI & LAVAU, 1978; KRAEGEN et al., 1986; STORLIEN et al., 1986). Mais do que a concentração de lipídios em relação aos demais componentes da dieta, a composição desses lipídios quanto ao tipo de ácidos graxos, demonstrou-se ser fundamental no desenvolvimento da resistência à insulina. Em estudo feito com adipócitos, alterações na relação da concentração de ácidos graxos poliinsaturados e saturados (P/S) determinou maior ligação da insulina quanto maior esta relação (FIELD et al., 1989). Em adipócitos de ratos estudados *in vitro*, observou-se que a maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados determinou alterações na composição dos fosfolípidos de membrana e incremento no transporte de glicose (SANDRA et al., 1984). Storlien e colaboradores estudaram ratos tratados com dietas contendo 59% de lipídeos, com variação na composição dos ácidos graxos quanto à saturação, através de *clamp* hiperinsulinêmico euglicêmico e observaram diferenças no grau de resistência à insulina apresentada por esses animais, tendo sido mais grave a resistência no grupo que recebeu a dieta composta por ácidos graxos saturados (STORLIEN et al., 1991). Avaliando-se o transporte de glicose em vesículas de membrana citoplasmática extraídas de músculo esquelético de ratos tratados com dietas com 60% ou 10% do conteúdo calórico em lipídeos, após exercício ou estímulo insulínico, observou-se menor velocidade no transporte de glicose no grupo tratado com a dieta hiperlipídica em ambas as situações de estímulo (ROSHOLT et al., 1994). Em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, a dieta hiperlipídica

ocasionou piora da doença, através de maior produção hepática de glicose, evidenciada pela técnica do *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico (TRAIANEDES, PROJETTO & O'DEA, 1992).

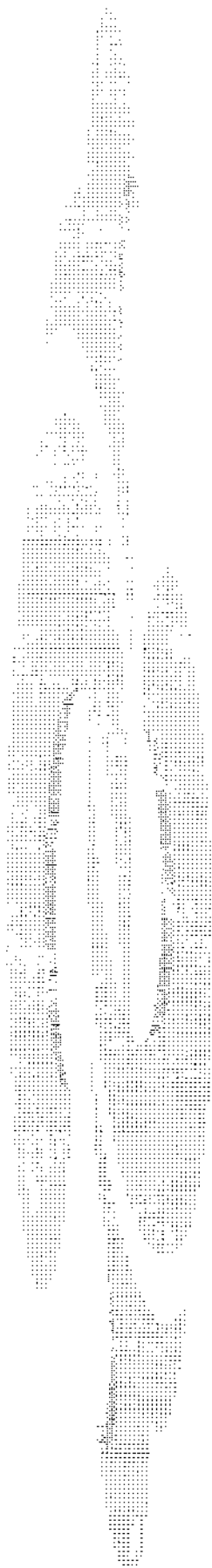
Também em humanos os efeitos de uma dieta hiperlipídica são evidentes. Uma grande amostra de indivíduos não diabéticos, participantes do “Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study” foi estudada quanto à composição de seus ácidos graxos plasmáticos e observou-se forte correlação positiva entre a concentração de insulina plasmática no jejum e a presença de ácidos graxos saturados, moderada correlação inversa entre a insulinemia de jejum e a porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados e nenhuma associação com a porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados (FOLSON et al., 1996). Em pacientes diabéticos do tipo 1, previamente bem controlados metabolicamente, submetidos à uma dieta hiperlipídica e pobre em carboidratos complexos durante 2 semanas, evidenciou-se resposta exacerbada da glicose plasmática à uma refeição usual (IRELAND, O'DEA & NANKERVIS, 1992). Entretanto, o mecanismo molecular de resistência à insulina induzida por dietas hiperlipídicas não está completamente elucidado.

O GLUT-4 é um transportador de glicose expresso em tecidos adiposo e muscular (FUKUMOTO et al., 1989) e portanto, fundamental na homeostase da glicose. Assim, outros estudos procuraram avaliar se o uso de dieta rica em lipídes poderia levar à menor utilização periférica de glicose por alterar a expressão ou a cinética do GLUT-4. Em adipócitos de ratos alimentados com uma dieta contendo 80% de lipídes por 7 semanas, observou-se redução de 94% no RNA mensageiro do GLUT-4 e de 92% na proteína (PEDERSEN et al., 1991). Quando se estudou o músculo esquelético do mesmo grupo de animais, a expressão do GLUT-4 foi suprimida em 34% (KAHN & PEDERSEN, 1992). No entanto, quando a dieta utilizada apresentava menor concentração de lipídes que a anterior (60%) e o período de tratamento também foi menor (3-4 semanas), não houve alteração na expressão do GLUT-4 em tecido muscular (ROSHOLT, KING & HORTON, 1994), sugerindo que tal efeito é específico para adipócitos. Em outro estudo os autores compararam a utilização periférica de glicose através do método da

2-deoxi-D-glicose, em músculo soleus de ratos tratados com duas dietas cujo conteúdo lipídico foi de 40% e 5%, respectivamente, durante 10 semanas. Os resultados demonstraram que no grupo tratado com a dieta com maior concentração lipídica, houve menor utilização de glicose, diminuição significativa no mRNA do GLUT-4 e nenhuma alteração no mRNA do receptor de insulina (KIM et al., 1994).

Em músculo esquelético a translocação das vesículas de GLUT-4 localizadas no citoplasma até a membrana celular onde se processa o transporte de glicose, ocorre tanto por estímulo insulínico (KLIB et al., 1987), como por estímulo da contração muscular, que é cálcio-dependente (HIRSHMAN et al., 1990; LUND et al., 1995). Em um estudo em que se investigou a utilização periférica de glicose em músculo soleus de camundongos tratados durante 3-4 semanas ou 8 semanas com uma dieta hiperlipídica (55% de lipídeos, 24% de carboidratos e 21% de proteínas), após estímulo insulínico, houve diminuição de 35-40% na utilização da glicose, independente do tempo de duração da dieta. A atividade da hexoquinase I e II e a expressão do GLUT-4 nestes animais permaneceu normal. Após o estímulo com insulina, a translocação do GLUT-4 para a superfície celular diminuiu 50% e a ativação da PI 3-quinase diminuiu em 36%. A expressão das duas subunidades da PI 3-quinase (pp85 e pp110) foi normal. Estes resultados sugerem que a dieta hiperlipídica diminui a captação periférica de glicose induzida pela insulina provavelmente por um defeito na ativação da PI 3-quinase e na translocação das vesículas contendo GLUT-4 (ZIERATH et al., 1997).

Como descrito anteriormente, a ativação da PI 3-quinase é distal à fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1. Entretanto essas duas etapas iniciais da ação insulínica não foram ainda investigadas em tecidos hepático e muscular de ratos tratados com dieta hiperlipídica. O estudo deste modelo de resistência é importante, já que a dieta alimentar tem papel fundamental no controle metabólico do diabetes, e dietas ricas em lipídeos, semelhante ao padrão alimentar ocidental, relacionam-se com obesidade, diabetes do tipo 2, dislipidemia e macroangiopatia.



2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi:

Estudar a concentração tecidual e o grau de fosforilação após estímulo insulínico do receptor de insulina e do IRS-1, assim como a associação desse substrato com a PI 3-quinase em fígado e músculo de ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, variedade albina), da linhagem *Wistar-Hannover*, machos, com 30 ± 2 dias de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, Campinas-SP. Inicialmente os animais eram divididos em dois grupos iguais denominados *controle* e *dieta hiperlipídica*, conforme fossem receber a dieta padrão ou a dieta a ser estudada, com concentração de lipídes correspondendo a 59% do conteúdo calórico total da dieta, compostos por ácidos graxos saturados. Cada grupo foi tratado durante 30 ± 2 dias com as dietas e água *ad libitum*. A dieta padrão é semelhante à que comumente é utilizada em biotérios, apenas com a apresentação modificada para assemelhar-se à dieta em estudo. Ambas as dietas foram preparadas no Departamento de Fisiologia da Faculdade de Educação Físicas da UNESP-SP. A tabela abaixo especifica a composição de cada uma das dietas:

Componentes	Dieta hiperlipídica (g/Kg)	Dieta controle (g/Kg)
Gordura de porco	330,0	0,0
Amido	123,5	202,0
Sacarose	100,0	100,0
Dextrina	132,0	130,5
Casema	200,0	397,0
L-cistina	3,0	3,0
Cloridrato de colina	2,5	2,5
Oleo de soja	0,0	70,0
Mistura de Sais	35,0	35,0
Mistura de Vitaminas	30,0	30,0
Fibras	50,0	50,0

Durante o período de alimentação, os animais foram acomodados em gaiolas plásticas, contendo, cada uma, no máximo seis espécimes, e mantidos em condições de fotoperíodo (12 x 12h).

Os animais foram mantidos em jejum de 12-14 horas antes de cada experimento.

3.2. MATERIAS

Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE) foram da Bio-Rad (Richmond, CA). Metanohidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotimina e ditioneitol (DTT) foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo). Insulina Mista regular procedente da Biobrás. Proteína A com iodo radioativo (^{125}I) fornecida pela Amersham (UK) e proteína A Sepharose 6 MB da Pharmacia (Uppsala, Suécia). A membrana de nitrocelulose BA 85, 0,2 μm) foi proveniente de Schleider e Schuell. O anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina e o anticorpo policlonal anti-PI 3-quinase (p85) foram obtidos da Upstate Biotechnology Incorporated (UBI, Lake Placid, NY). Também foi utilizado anticorpo anti-fosfotirosina monoclonal adquirido da Santa Cruz Biotechnology. Inc.. Os anticorpos anti-IRS-1 e anti-receptor de insulina foram obtidos em coelho (Saad et al, 1993) e gentilmente cedidos pelos Drs. C. Ronald Kahn, Morris F. White e Xiao Jian Sun (Joslin Diabetes Center). A insulina foi dosada por RIE usando *kit* da Diagnostic Systems Laboratories (Webster, Texas).

As soluções empregadas nos experimentos estão descritas abaixo.

3.2.1. Tampão de extração A (extrato total)

Utilizada para a extração das proteínas celulares dos tecidos estudados. Contém: Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100 mM, EDTA (Ácido etileno-diamino tetracético) 10 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 10mM. O ortovanadato deve ser adicionado à solução imediatamente antes do uso.

3.2.2. Tampão de Laemmli (5X)

Utilizado para estocar o material extraído e para aplicação no gel de poliacrilamida. Contém: Azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 20%.

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

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

3.2.4. 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.

3.2.5. Solução tampão para SDS-PAGE, gel de resolução (“resolving”)

Utilizada para o preparo do SDS-PAGE, gel de resolução. É um tampão composto de : EDTA 4mM, SDS 25% e trisma base 1,5M. O pH da solução deve ser ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

3.2.6. Solução tampão para SDS-PAGE, gel de empilhamento (“stacking”)

Utilizada no preparo do SDS-PAGE, gel de empilhamento das proteínas. Contém: EDTA 4mM, SDS 2% e trisma base 10 mM .O pH deve ser ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

3.2.7. 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%.

3.2.8. Solução bloqueadora

Utilizada para incubar 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.

3.2.9. Solução para anticorpos

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

3.2.10. Tampão de extração B (imunoprecipitação)

Utilizado na extração de proteínas que serão imunoprecipitadas. Contém: trisma base 100mM, EDTA 10mM, pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2mM (diluído em álcool etílico), triton X 100 1%, aprotimina 10 3% (0,1 mg/ml). Esta solução deve ser mantida a 4°C. O ortovanadato, PSMF e a aprotimina devem ser acrescentados no momento do uso.

3.2.11. Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado

Contém: Trisma base 100mM, EDTA 1mM, ortovanadato de sódio 2mM e triton X-100 0,5%.

3.2.12. Solução com proteína A marcada com ^{125}I

Solução que contém a proteína A com ^{125}I , o que permite a marcação dos anticorpos específicos e sua visualização através de auto-radiografias. Contém 0,1% de albumina dissolvida em solução basal com 0,01 μCi de proteína A marcada com ^{125}I .

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Procedimentos com animais

Após o período de tratamento com as diferentes dietas, os animais foram mantidos em jejum alimentar, não hídrico, por 12-14 horas e submetidos à retirada dos tecidos conforme descrito à seguir. Tanto o grupo controle como o tratado com a dieta hiperlipídica foram divididos em dois subgrupos: *negativo*, sem estímulo insulínico e *positivo*, com estímulo insulínico.

3.3.2. Acesso e retirada dos tecidos

Os experimentos foram realizados pela manhã, sendo os animais anestesiados por inalação com éter, até que os reflexos corneano e de retirada da pata à dor estivessem abolidos. Foram então colocados em decúbito ventral e, após tricotomia da região abdominal foi feita uma incisão de aproximadamente 3 cm de extensão, longitudinal, abaixo da apófise xifóide, abrangendo pele e tecido celular subcutâneo. A seguir, abriu-se com tesoura cirúrgica a musculatura retoabdominal, via linha alba, atingindo-se a cavidade abdominal e a veia porta sendo então individualizada. Em seguida procedeu-se à exposição do músculo gastrocnêmio da pata traseira. Nos animais do grupo *negativo* a veia porta foi puncionada e foi injetada 0,5ml de solução salina 0,9%. No grupo *positivo* foi realizada a injeção de insulina regular 60µg, diluída em solução salina de forma que o volume total injetado nos dois casos foi equivalente.

Após 30 e 60 minutos, respectivamente, foram retirados pequenos fragmentos de fígado e músculo gastrocnêmio. Os fragmentos foram homogeneizados com um polytron PTA 20s (Brinkmann Instruments modelo PT 10/35) em 10 volumes de tampão de extração e mantidos à 4°C. Em experimentos anteriores (SAAD et al, 1992) demonstrou-se que a fosforilação máxima do IRS-1, após infusão de insulina na veia porta, à concentrações de 10^{-5} e 10^{-6} M, ocorre entre 30 e 60 segundos no fígado e entre 1 e 4 minutos em músculo.

3.3.3. 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 por fragmento de tecido extraído e outra para aplicação no SDS-PAGE.

A determinação da concentração protéica foi feita pelo método fotolorimétrico do biureto (BRADFORD, M.M., 1976), onde foi utilizado 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 DTT). Este material foi então fervido a 100°C por 5 minutos e imediatamente era aplicado no gel.

3.3.4. Immunoblotting ou Westernblotting

Foram aplicados no SDS-PAGE de 2mm, 200µg de proteína por amostra, tendo sido o gel balizado por marcador de alto peso molecular, para gel de poliacrilamida, da *Bio Rad*, e que contém: miosina (206 kDa), β galactosidase (117 kDa), BSA (89 kDa) e ovalbumina (47 kDa).

A eletroforese foi efetuada em cuba de minigel Mini -PROTEAN® II Cell da *Bio Rad*, com solução tampão para eletroforese previamente diluída. O SDS-PAGE foi inicialmente submetido a 20 volts, 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, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência do minigel da *Bio Rad*. Durante a transferência a cuba foi mantida a 120 volts por 150 minutos.(TOWBIN, SRAEHLIN, GORDON,1979). Para evitar-se aumento excessivo da temperatura, foram efetuadas trocas sucessivas da forma de gelo durante a transferência.

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

Tal incubação era feita *overnight* a 4°C por 14-16 horas, sob agitação constante e, novamente, as membranas eram lavadas com solução basal por quatro sessões de dez minutos. A seguir, novamente incubadas, agora em 10 ml de solução basal com 2 µCi de proteína A marcada com ¹²⁵I (30µCi/µg), durante 4 horas, à temperatura ambiente. Após a incubação, novamente lavadas com solução basal por cinco sessões de dez minutos, secas e expostas em filme de RX (Eastman Kodak, Rochester, NY) , usando-se intensificador (Cronex Lightning Plus intensifying screens - DuPont, Wilmington, DE) O cassete foi mantido à temperatura de -80°C. Após 12 a 48 horas, o filme foi revelado de forma convencional.

Uma vez identificadas as bandas das auto-radiografias, procedeu-se à leitura por densitometria óptica, quantificando suas áreas. A partir de então, realizou-se a análise dos dados, comparando-se o valor obtido no tecido do animal controle com o experimental, de forma que sempre houvesse controle dentro de um experimento.

3.3.5. Imunoprecipitação

Para a imunoprecipitação, os tecidos dos animais foram extraídos e homogeneizados em tampão de extração (B) a 4 °C. Em seguida, amostras foram submetidas a centrifugação por 35 min, a 12.000 rpm, sempre a 4 °C. Usou-se a solução sobrenadante das amostras para imunoprecipitação com anticorpos específicos após a normalização do volume por concentração protéica, como o descrito previamente para o extrato total, e as referidas amostras foram incubadas com o anticorpo anti-receptor de insulina e anti-IRS-1, permanecendo sob agitação contínua, a 4 °C, por 12 - 14 horas. A seguir, foram acrescentados 50 µl de proteína A-Sepharose 6 MB para precipitação do complexo proteína/anti-RI ou proteína/anti-IRS-1, mantendo-se 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. No final do procedimento de lavagem do precipitado este foi novamente suspenso, agora em tampão de Laemmli, fervido por 5 minutos e submetido à eletroforese em SDS-PAGE 6%. Os passos seguintes foram os mesmos já descritos para o *immunoblotting*.

3.3.6. Determinações bioquímicas

3.3.6.1. Glicose sérica

As concentrações de glicose séricas foram determinadas por método enzimático da glicose-oxidase.

3.3.6.2. Ácidos graxos livres (AGL)

Para determinação das concentrações de AGL, foram adicionadas a 0,3ml de soro, 7ml de uma mistura de solventes composta por: clorofórmio, heptano e metanol, na proporção de 28:21:1. Em seguida a mistura foi fortemente agitada e centrifugada a 700 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e a ele acrescentada uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0,05mM, trietanolamina 0,10 mM, NaOH 0,35 mM e NaCl 35% a pH 8,1, seguida de nova agitação e centrifugação. A 3ml do sobrenadante foram adicionados 0,5ml de solução de dietilditiocarbonato de sódio e a concentração de AGL foi medida a 435nm contra curva de calibração de ácido palmítico (REGOW et al., 1971).

3.3.6.6. Dosagem de insulina

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

curva padrão, controle com 0,2ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada com (^{125}I) e anticorpo anti-insulina e 0,1ml de tampão fosfato.

Em seguida preparou-se em triplicata uma curva padrão com 0,1ml de insulina nas seguintes concentrações: 0,02; 0,039; 0,078; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5 e 5,0 ng/ml. Cada amostra dessa série recebeu 0,2ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I e anticorpo anti-insulina. No final da preparação, todas as amostras foram agitadas em vortex e estocadas a 4°C, durante 48 h.

No final do período de incubação, todos os tubos receberam 0,2ml de solução contendo 2,5% de carvão (Norit A) e 0,5% de albumina e 0,25% de dextran T 70, exceto as amostras para avaliação da radiação máxima. Após repouso de 20 minutos, procedeu-se a centrifugação a 2800 rpm, por 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade de cada amostra avaliada por contador gama. As concentrações desconhecidas foram calculadas a partir da curva padrão e os resultados expressos em ng/ml (HERBERT et al., 1965).

3.3.7. Teste de tolerância à insulina

Quatro animais do grupo controle e sete do grupo experimental foram submetidos ao teste de tolerância à insulina endovenosa (ITT). Através da punção da veia porta, foram colhidas amostras de sangue para dosagem de glicemia e insulina basais. Após infusão de insulina na concentração de 10^{-5}M , foram colhidas novas amostras para dosagem de glicemia, nos tempos 4, 8, 12 e 16 minutos, através de corte na extremidade distal da cauda dos animais. A velocidade constante de desaparecimento da glicose (K^{th}) foi calculada pela fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima, durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose (BONORA et al, 1989).

3.3.8. Retirada de tecidos para estudo anátomo-patológico

Em dois animais do grupo controle e em três do grupo submetido à dieta hiperlipídica procedeu-se à retirada de fragmentos de ~5mm de fígado, fixados em álcool 70%. Os cortes foram feitos em parafina e corados em hematoxilina-eosina (HE).

3.3.9. Análise estatística

Para comparação dos valores foram utilizados o teste t de Student para dados pareados e não pareados conforme indicado. O nível de significância empregado foi $p < 0,05$. Os resultados são expressos como unidades arbitrárias, representando a Média $\pm$ ESM da variação percentual em relação ao controle, que foi sempre 100%.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS

A TABELA 1 demonstra as características gerais dos animais utilizados nos experimentos, tais como peso, dosagens de glicemia e insulina plasmática em jejum e após alimentação e dosagem de ácidos graxos livres (AGL).

A média do peso dos animais tratados com a dieta hiperlipídica foi significativamente maior do que a dos animais controles ($297,38 \pm 10,16\text{g}$ vs $265,58 \pm 7,18\text{g}$, $p < 0,05$), correspondendo a 12%. Esta diferença foi semelhante à observada em outro estudo em que utilizou-se dieta de composição semelhante por 10 semanas (CHEN et al, 1992), embora em outros trabalhos isto não tenha sido observado (STEVENSON et al, 1996; ZIERATH et al, 1997).

A média das glicemias apresentadas pelos animais em estudo não diferiu dos controles tanto em situação de jejum ($118,40 \pm 6,42$ vs $95,33 \pm 11,68$ mg/dl), como alimentados ($112,80 \pm 4,97$ vs $122,5 \pm 5,92$ mg/dl). A insulinemia dos animais tratados com a dieta hiperlipídica, tanto no jejum, como alimentados, apresentou tendência à ser mais baixa, mas sem significado estatístico (Jejum: $0,75 \pm 0,17$ vs $2,27 \pm 0,37$ ng/ml, $p = 0,126$; alimentados: $0,60 \pm 0,29$ vs $1,09 \pm 0,27$ ng/ml, $p = 0,305$).

Tabela 1: Características gerais dos animais

Grupos	Peso (g)	G.J. (mg/dl)	G.A. (mg/dl)	I.J. (ng/ml)	I.A. (ng/ml)	AGL ($\mu\text{Eq/l}$)
Controle	$265 \pm 7(12)$	$95 \pm 11(3)$	$122 \pm 5(4)$	$2,27 \pm 0,37(3)$	$1,09 \pm 0,27(4)$	$246 \pm 20(4)$
Hiperlipídica	$297 \pm 10(13)^*$	$118 \pm 6(5)$	$112 \pm 4(5)$	$0,75 \pm 0,17(5)$	$0,60 \pm 0,29(5)$	$519 \pm 32(9)^*$

* $p < 0,05$

Os resultados são expressos como Média $\pm$ SEM (erro padrão). O número de animais é mostrado entre parênteses.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DA SENSIBILIDADE À INSULINA: VELOCIDADE DE DESAPARECIMENTO DA GLICOSE (K_{it})

A FIGURA 1 demonstra, graficamente, a velocidade de desaparecimento da glicose (K_{it}) em teste curto de tolerância à insulina, realizado nos primeiros 16 minutos após administração do hormônio. A K_{it} apresenta-se significativamente menor nos animais tratados com a dieta hiperlipídica comparada aos controles ($1,65 \pm 0,43$ %/min vs $4,26 \pm 0,71$ %/min, $p < 0,05$), caracterizando-se assim, a resistência à insulina neste modelo animal. A TABELA 2 mostra as velocidades de desaparecimento de glicose em ambos os grupos: controle e tratado com a dieta hiperlipídica.

4.3. CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA

O aspecto macroscópico do fígado dos animais tratados com a dieta hiperlipídica era de discretamente amarelado e a observação por microscopia óptica dos fragmentos de tecido hepático corados em hematoxilina-eosina (HE), evidenciou esteatose microgoticular de grau leve a moderado, naqueles provenientes dos animais tratados com a dieta hiperlipídica.

4.4. EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA NAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA EM RATOS

4.4.1. Efeito da dieta hiperlipídica na regulação do receptor de insulina e do IRS-1 em tecido hepático

As amostras de tecido hepático foram submetidas ao *immunoblotting* com anticorpo contra a porção COOH-terminal do receptor de insulina e não observou-se alteração significativa na concentração protéica deste receptor nos animais tratados com a

dieta hiperlipídica, quando comparada com a dos animais que receberam a dieta controle (Fig. 2 A). A representação gráfica da análise por densitometria óptica das auto-radiografias de 6 experimentos, evidenciou que o nível protéico do receptor de insulina correspondeu a 87 ± 37 % do controle ($p=0,818$) (Fig. 2-B).

Quando se realizou a imunoprecipitação das amostras de tecido hepático com anticorpo anti- receptor de insulina e *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina, não houve nenhuma diferença na fosforilação da subunidade β de 95kDa do receptor induzida pela insulina entre os grupos estudados (Fig. 3-A). A fosforilação do receptor nos animais tratados com a dieta hiperlipídica foi 99 ± 21 % da observada nos controles (Fig. 3-B).

Para se estudar a concentração do IRS-1 em fígado, procedeu-se ao *immunoblotting* das amostras com anticorpo específico contra o IRS-1 e observou-se aumento na concentração deste substrato nos animais tratados com a dieta hiperlipídica em relação aos controles (Fig.4-A). A Figura 4-B é a representação gráfica deste resultado, após análise por densitometria óptica de 8 experimentos, evidenciando que este aumento foi da ordem de 51 ± 17 % em relação ao controle (* $p=0,05$).

A fosforilação do IRS-1 foi então estudada através da imunoprecipitação das amostras com anticorpo contra IRS-1 e, a seguir *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina. Observou-se um aumento evidente na fosforilação após estímulo insulínico, semelhante ao encontrado na concentração protéica (Fig.5-A). A análise de 9 experimentos, demonstrou que a fosforilação do IRS-1 nos animais tratados com a dieta hiperlipídica foi 64 ± 22 % superior à observada nos animais controles (* $p<0,05$) (Fig. 5-B).

Tendo em vista a importância da associação do IRS-1 com a enzima PI 3-quinase no transporte de glicose, estudou-se esta associação através da incubação das membranas de nitrocelulose que continham amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo contra IRS-1 com anticorpo específico contra a subunidade de 85kDa da PI 3-quinase. Este procedimento foi possível já que estudos anteriores (BACKER *et al.*, 1992; FOLLI *et al.*, 1993; ARAKI *et al.*, 1994; GIORGETTI *et al.*, 1993; HADARI *et al.*, 1992; KELLY & RUDERMAN, 1993) sugerem a existência de uma interação relativamente

estável e de alta afinidade entre o IRS-1 e a subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase, de tal forma que ambas as proteínas podem ser co-precipitadas com anticorpos específicos contra qualquer uma delas. Nas amostras hepáticas observou-se uma discreta banda correspondente à PI 3-quinase no estado basal, que tornou-se bastante evidente após estímulo com insulina, embora sem diferença significativa entre os grupos estudados. A associação IRS-1/PI 3-quinase nos animais tratados com a dieta hiperlipídica correspondeu a $89 \pm 17\%$ quando comparada aos controles (Fig. 6-A,B). Para determinar qual o papel da concentração desta enzima nos resultados acima relatados, efetuou-se *immunoblotting* das amostras com anticorpo contra a sua subunidade de 85kDa e o resultado foi semelhante, ou seja, não houve diferença entre os grupos (dieta controle=100% e dieta hiperlipídica= 107 ± 17) (Fig. 7-A,B).

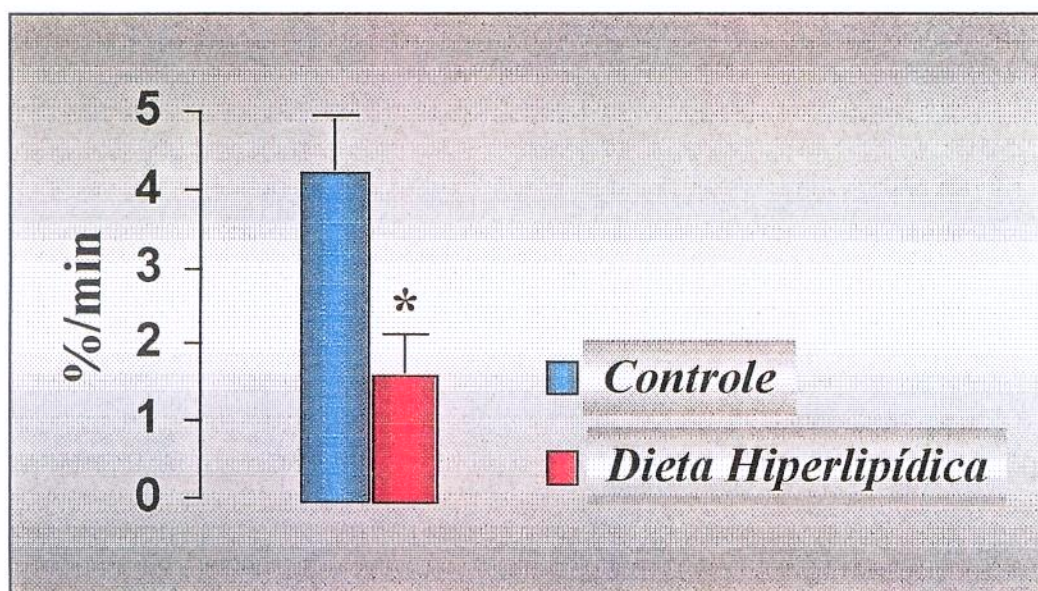
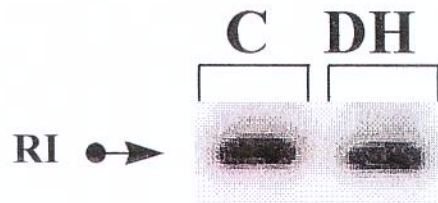


Figura 1: Velocidade de desaparecimento da glicose (K_{ITT}) em ratos controles e tratados com a dieta hiperlipídica. Os animais foram submetidos ao teste curto de tolerância à insulina, tendo sido administrada 6µg de insulina endovenosa e as amostras coletadas nos tempo 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção. O K_{ITT} foi calculado como esta previamente descrito em Métodos e os resultados são expressos como a Média $\pm$ EPM. A significância estatística é expressa como * P<0,05.

A) Blot.: α RI



B)

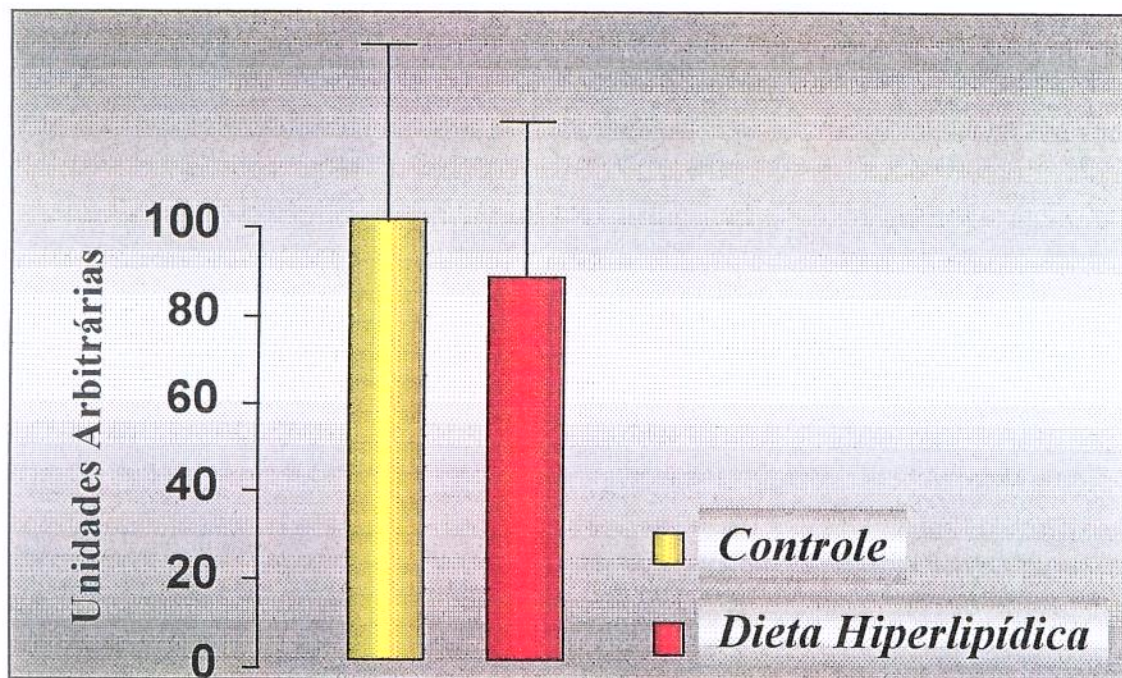
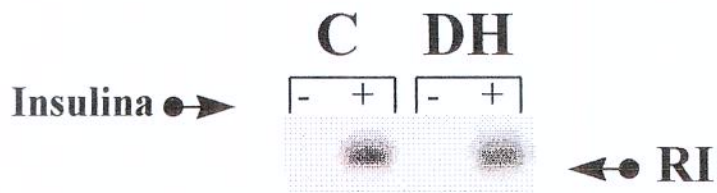


Figura 2: Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas à *immunoblotting* com anticorpo anti-receptor de insulina (**RI**). **A:** a banda **C** refere-se aos controles e a banda **DH** aos animais tratados com a dieta hiperlipídica. **B:** nível protéico do receptor de insulina expresso como a média $\pm$ EPM da densitometria óptica realizadas nas auto-radiografias de 5 e 7 experimentos, respectivamente.

A) IP: α RI

Blot.: α PY



B)

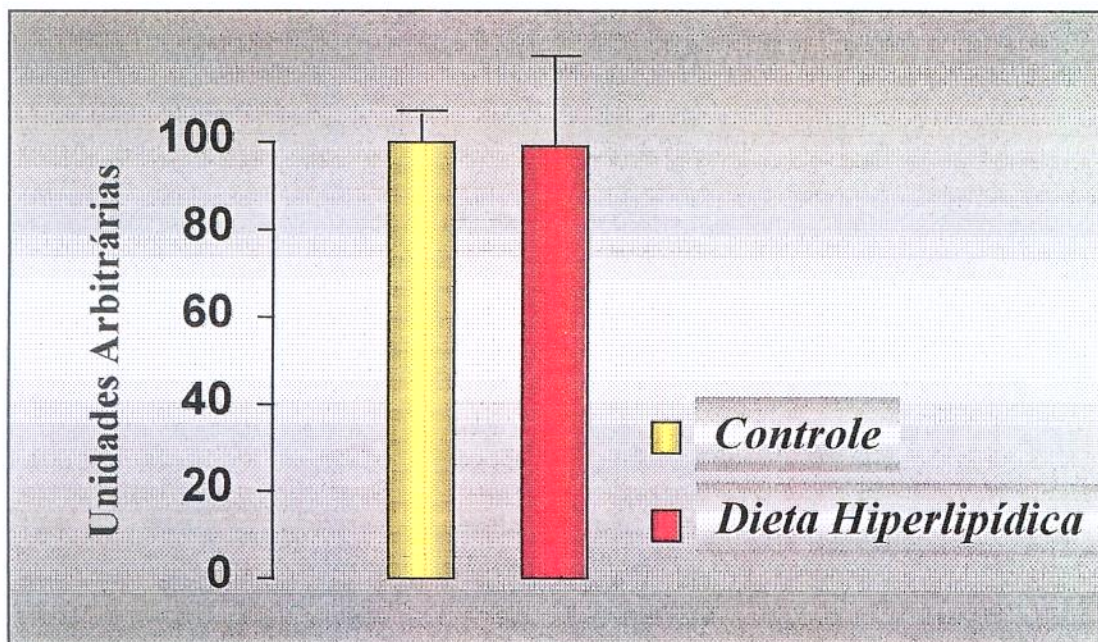
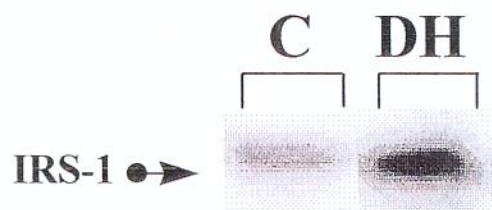


Figura 3: Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpo anti-receptor de insulina e *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina. **A:** a banda **C** refere-se aos controles e a banda **DH** aos animais tratados com a dieta hiperlipídica, antes (-) e após (+) estímulo insulínico. **B:** o grau de fosforilação do receptor de insulina é expresso pela média $\pm$ EPM da densitometria óptica realizada nas auto-radiografias de 6 experimentos.

A) Blot.: α IRS-1



B)

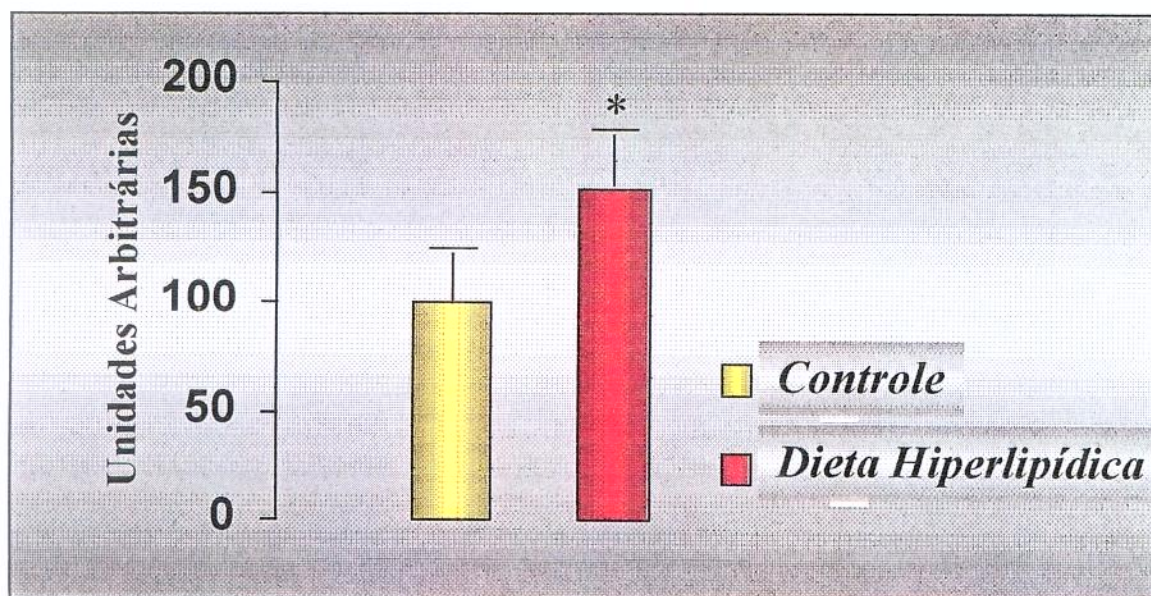
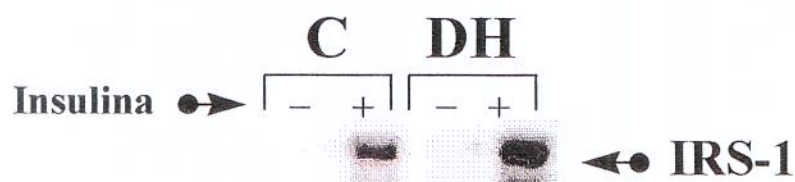


Figura 4: Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas à *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1. **A:** a banda **C** corresponde aos controles e a banda **DH** aos animais tratados com a dieta hiperlipídica. **B:** nível protéico do IRS-1 expresso como a média $\pm$ EPM da densitometria óptica realizada nas auto-radiografias de 8 experimentos (* $p < 0,05$).

A) IP: α IRS-1
Blot.: α PY



B)

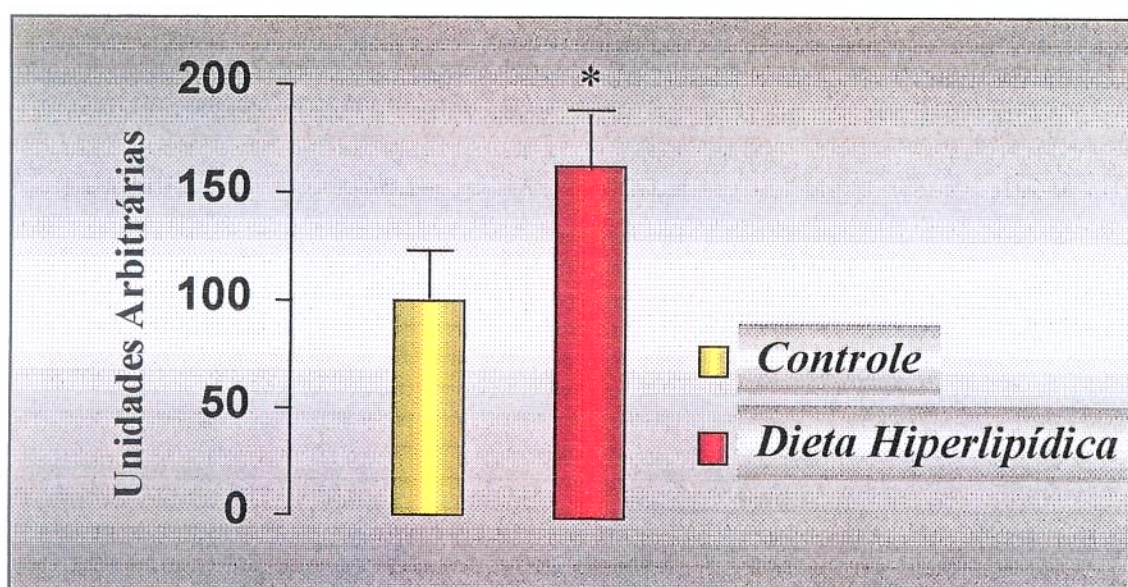
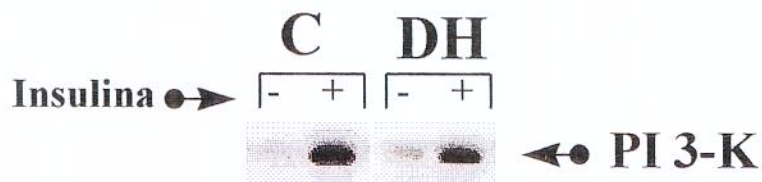


Figura 5: Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1 e imunoblotting com anticorpo anti-fosfotirosina (PY). **A:** a banda **C** corresponde aos controles e a banda **DH** aos animais tratados com a dieta hiperlipídica. **B:** grau de fosforilação do IRS-1 expresso como a média $\pm$ EPM da densitometria óptica realizada nas auto-radiografias de 9 experimentos (* $p < 0,05$).

A) IP: α IRS-1
Blot.: α PI 3-K



B)

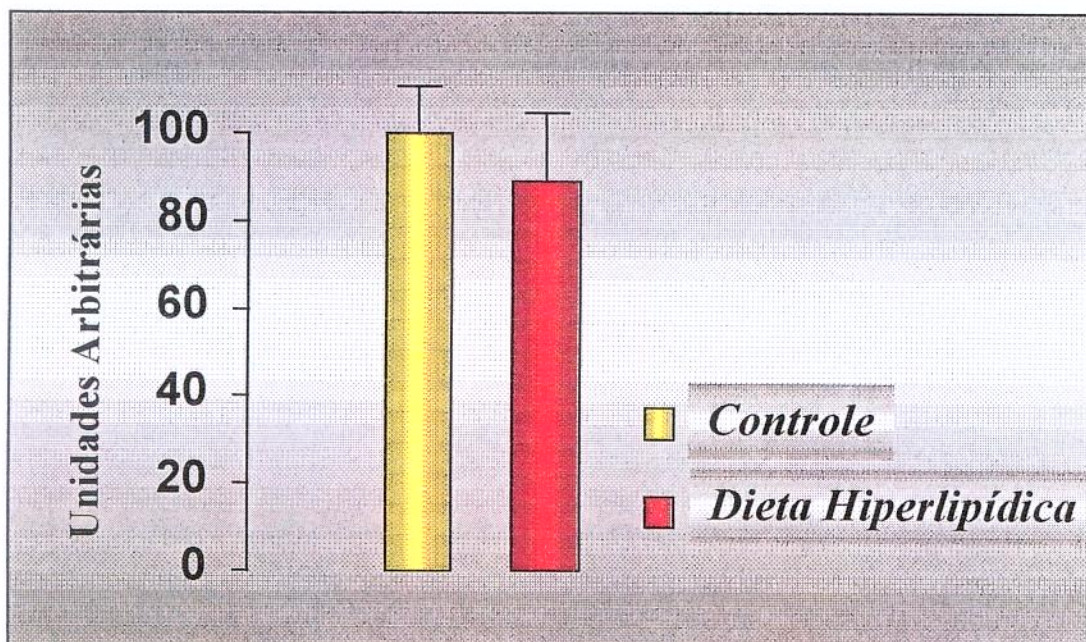


Figura 6: Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1 e *immunoblotting* com anticorpo anti-PI 3-K. **A:** a banda **C** refere-se aos controles e a banda **DH** aos animais tratados com a dieta hiperlipídica após estímulo insulínico (+). **B:** o grau de associação IRS-1/PI 3-K é expresso pela média $\pm$ EPM da densitometria óptica realizada nas auto-radiografias de 6 experimentos.

A) Blot.: α PI 3-K



B)

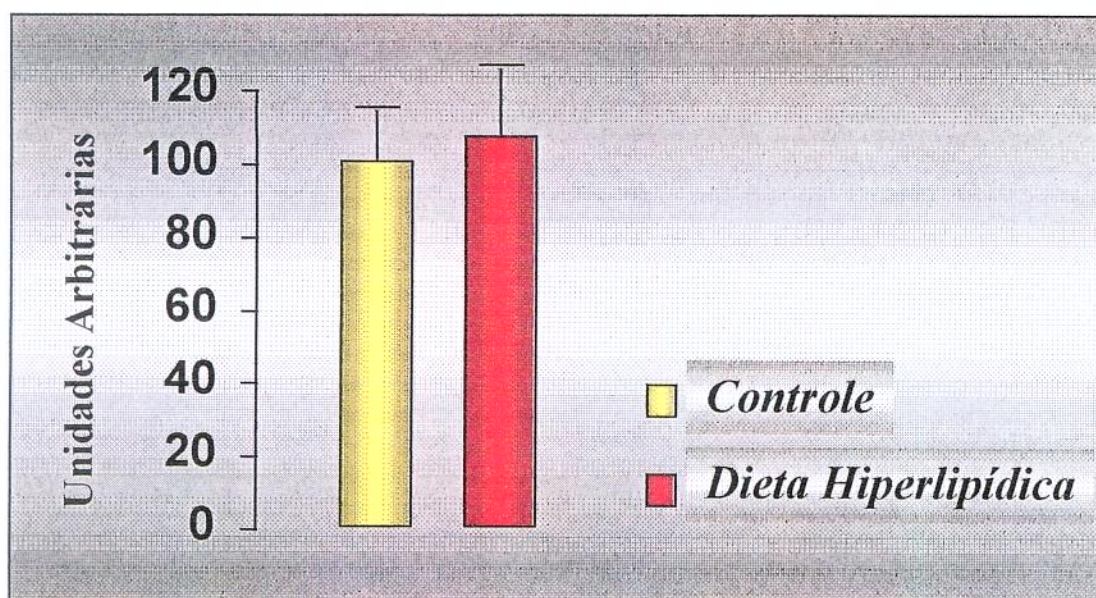


Figura 7: Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas à *immunoblotting* com anticorpo anti-PI 3-K. **A:** a banda **C** refere-se aos controles e a banda **DH** aos animais tratados com a dieta hiperlipídica. **B:** o nível protéico é expresso graficamente como a média $\pm$ EPM das densitometria óptica realizada nas auto-radiografias de 8 experimentos.

4.4.2. Efeito da dieta hiperlipídica na regulação do receptor de insulina e do IRS-1 em tecido muscular

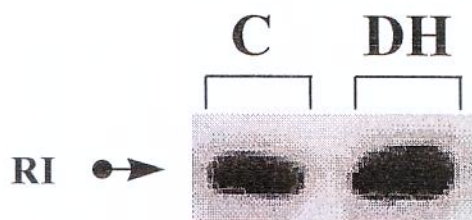
O receptor de insulina foi inicialmente avaliado quanto à sua concentração em músculo, realizando-se *immunoblotting* dos extratos com anticorpo específico. A Figura 8-A demonstra que não houve diferença entre os níveis do receptor de insulina neste tecido entre os grupos estudados. A análise das auto-radiografias de 7 experimentos por densitometria óptica evidenciou que, no grupo que recebeu a dieta experimental, o nível protéico correspondeu a $106 \pm 24\%$ do controle (Fig. 8-B). A fosforilação do receptor de insulina foi avaliada pela imunoprecipitação prévia dos extratos com anticorpo contra o mesmo e, em seguida *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina. Observou-se que houve diminuição na fosforilação do receptor após estímulo insulínico (Fig. 9-A), embora a análise das auto-radiografias de 6 experimentos tenha demonstrado que a fosforilação do grupo experimental correspondeu a $73 \pm 18\%$ da observada nos controles, valor sem significado estatístico ($p=0,216$) (Fig. 9-B).

Para caracterizar a regulação do IRS-1, as amostras foram inicialmente submetidas à *immunoblotting* com anticorpo contra IRS-1 e não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (Fig. 10-A-B). No entanto, quando se efetuou a imunoprecipitação prévia com anticorpo contra IRS-1 e posterior *immunoblotting* com anticorpo contra fosfotirosina, para avaliar a fosforilação desse substrato induzida pela insulina, observou-se diminuição acentuada da fosforilação do IRS-1 nos animais tratados com a dieta experimental em relação aos controles (Fig. 11-A). A análise de 8 experimentos mostrou que a fosforilação no grupo experimental foi de $50 \pm 11\%$ do controle, diferença estatisticamente significativa: $p < 0,05$ (Fig. 11-B).

A associação IRS-1/PI 3-quinase também mostrou-se claramente diminuída no grupo experimental. A análise das auto-radiografias de 6 experimentos por densitometria óptica evidenciou que a associação IRS-1/PI 3-quinase correspondeu a $52 \pm 11\%$ do controle ($p < 0,05$) (Fig. 12-A,B). A concentração da enzima PI 3-quinase no músculo dos animais tratados com a dieta hiperlipídica mostrou-se inalterada, sendo $99 \pm 8\%$ da observada nos animais controles (Fig. 13-B). Assim, esta redução na associação IRS-1/PI 3-quinase provavelmente é consequência da menor fosforilação do Irs-1 e independe de alterações na concentração da PI 3-quinase.

A Tabela 2 resume os resultados encontrados.

A) Blot.: α RI



B)

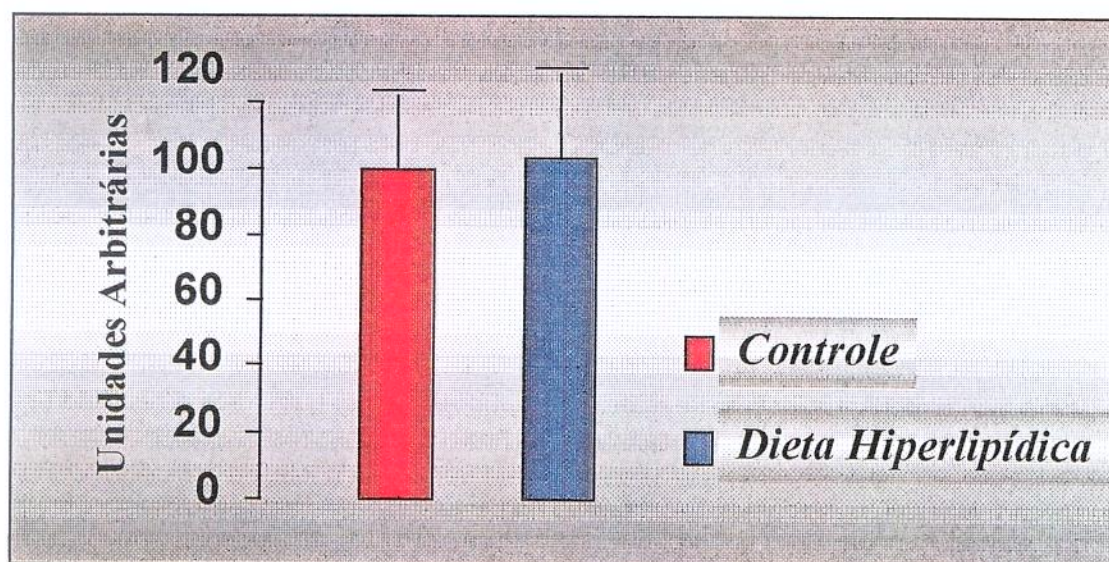
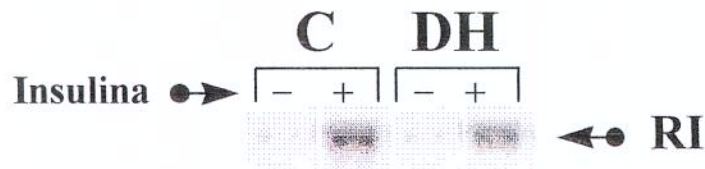


Figura 8: Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a imunoblotting com anticorpo anti-receptor de insulina (**RI**). **A:** a banda **C** corresponde aos controles e a banda **DH** aos animais tratados com a dieta hiperlipídica. **B:** nível protéico do receptor de insulina expresso como a média $\pm$ EPM da densitometria óptica realizada nas auto-radiografias de 6 experimentos.

A) IP: α RI
Blot.: α PY



B)

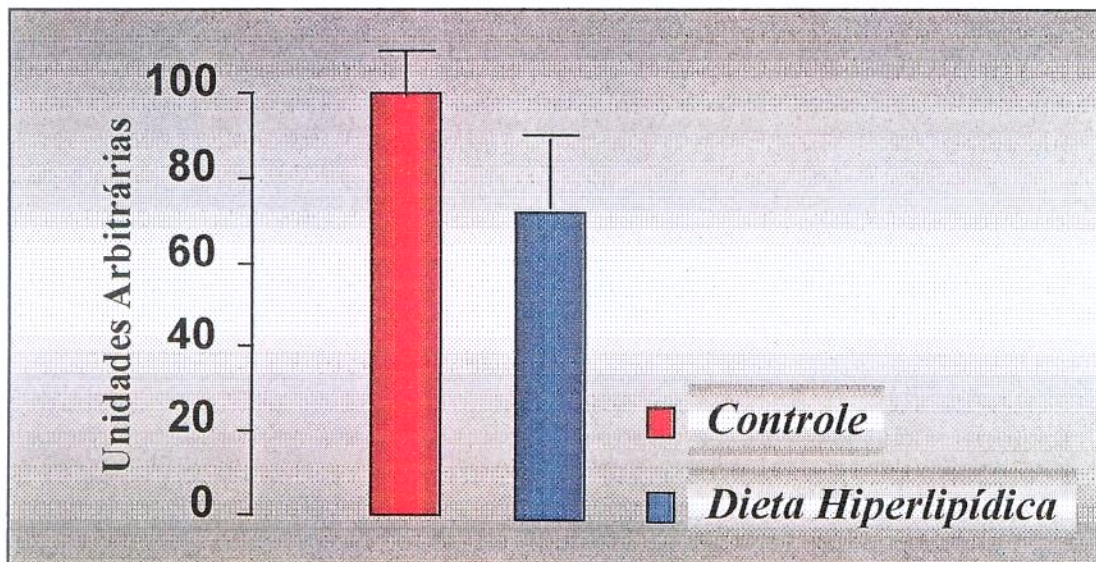
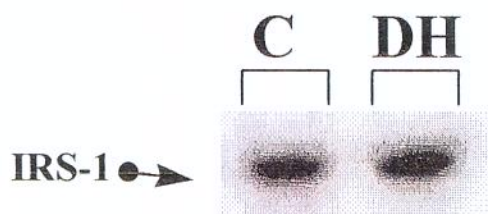


Figura 9: Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpo anti-receptor de insulina (RI) e imunoblotting com anticorpo anti-fosfotirosina (PY). **A:** a banda C corresponde aos controles e a banda DH aos animais tratados com a dieta hiperlipídica após estímulo insulínico (+). **B:** grau de fosforilação do receptor de insulina expresso como a média $\pm$ EPM da densitometria óptica realizada nas auto-radiografias de 8 e 7 experimentos, respectivamente.

A) Blot.: α IRS-1



B)

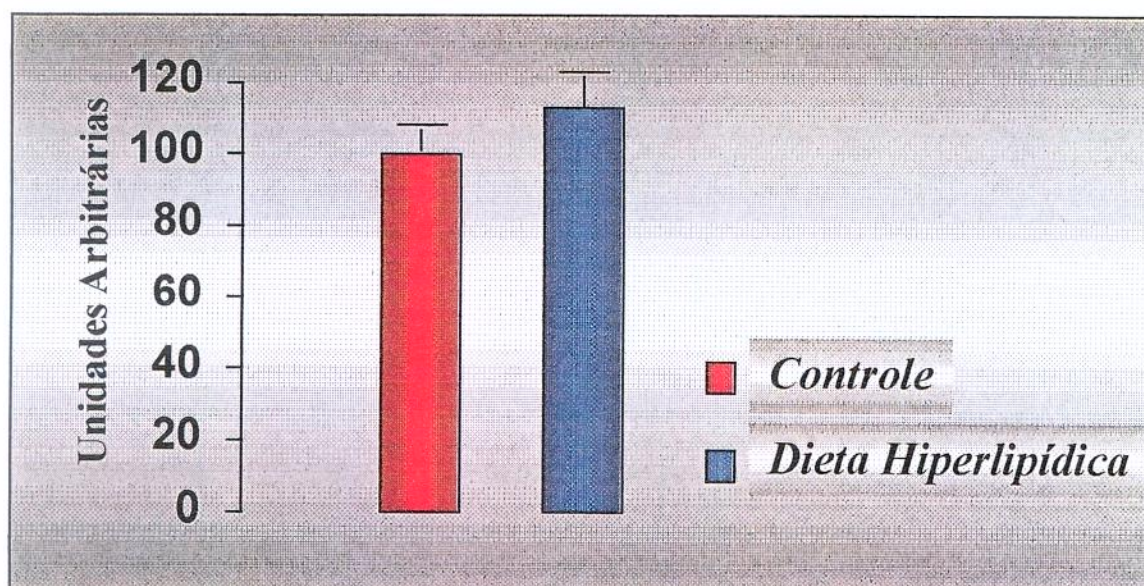
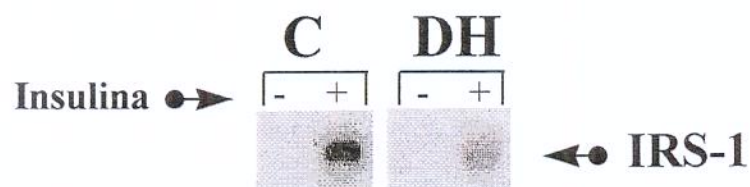


Figura 10: Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas à *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1. **A:** a banda **C** refere-se aos controles e a banda **DH** aos animais tratados com a dieta hiperlipídica. **B:** nível protéico do IRS-1 expresso graficamente como a média $\pm$ EPM da densitometria óptica realizada nas autoradiografias de 8 experimentos.

A) IP: α IRS-1
Blot.: α PY



B)

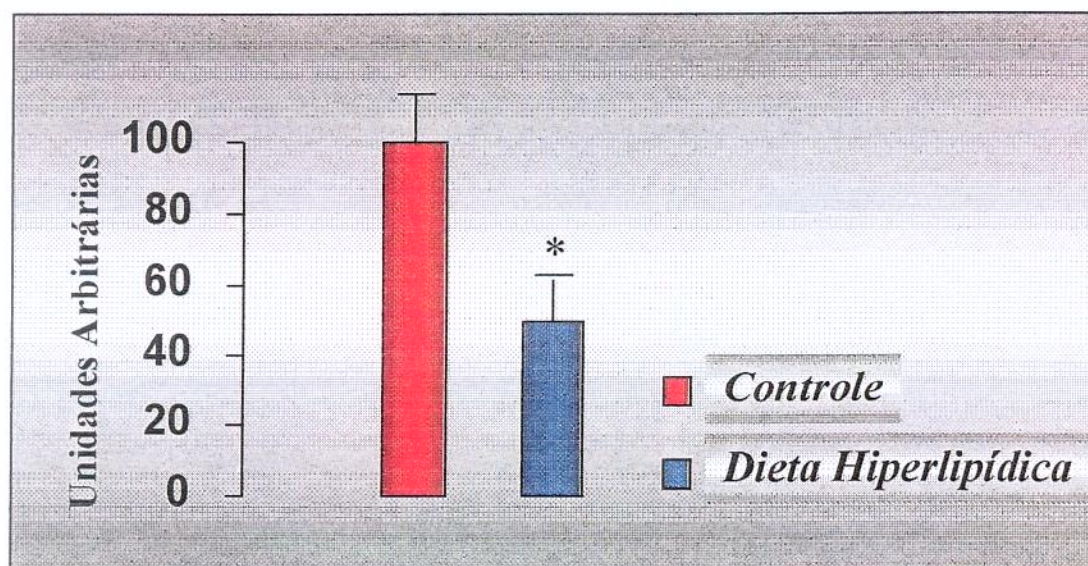
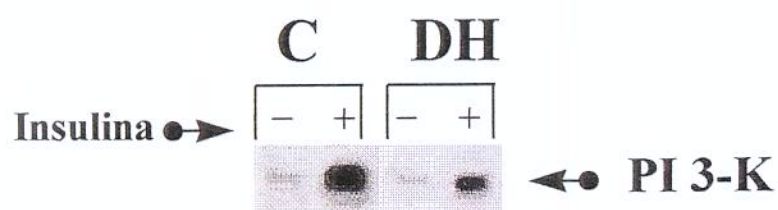


Figura 11: Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1 e imunoblotting com anticorpo anti-fosfotirosina (PY). **A:** a banda **C** refere-se aos controles e a banda **DH** aos animais tratados com a dieta hiperlipídica, antes (-) e após (+) estímulo insulínico. **B:** o grau de fosforilação do IRS-1 é expresso como a média $\pm$ EPM da densitometria óptica realizada nas auto-radiografias de 8 experimentos. (* $p < 0,05$).

A) IP: α IRS-1
Blot.: α PI 3-K



B)

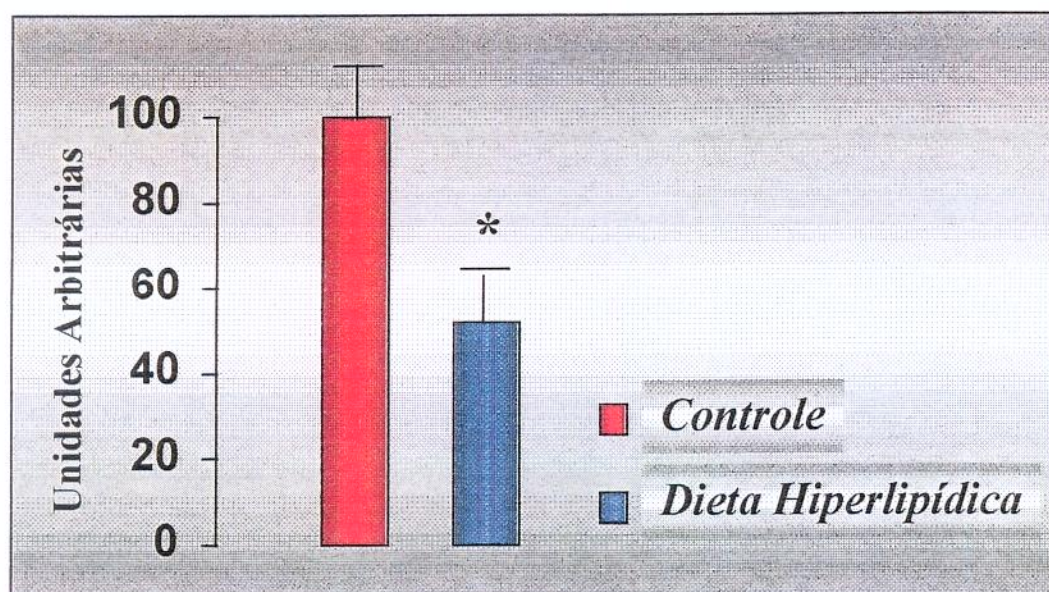
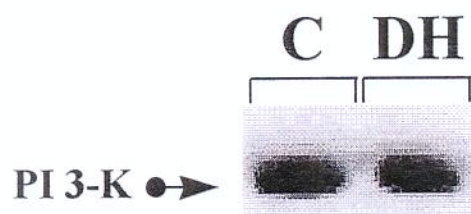


Figura 12: Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1 e *immunoblotting* com anticorpo anti-PI 3-K. **A:** a banda **C** refere-se aos controles e a banda **DH** aos animais tratados com a dieta hiperlipídica, antes (-) e após (+) estímulo insulínico. **B:** grau de associação IRS-1/PI 3-K expresso pela média $\pm$ EPM da densitometria óptica realizada em 6 experimentos. * $p < 0,05$.

A) Blot.: α PI 3-K



B)

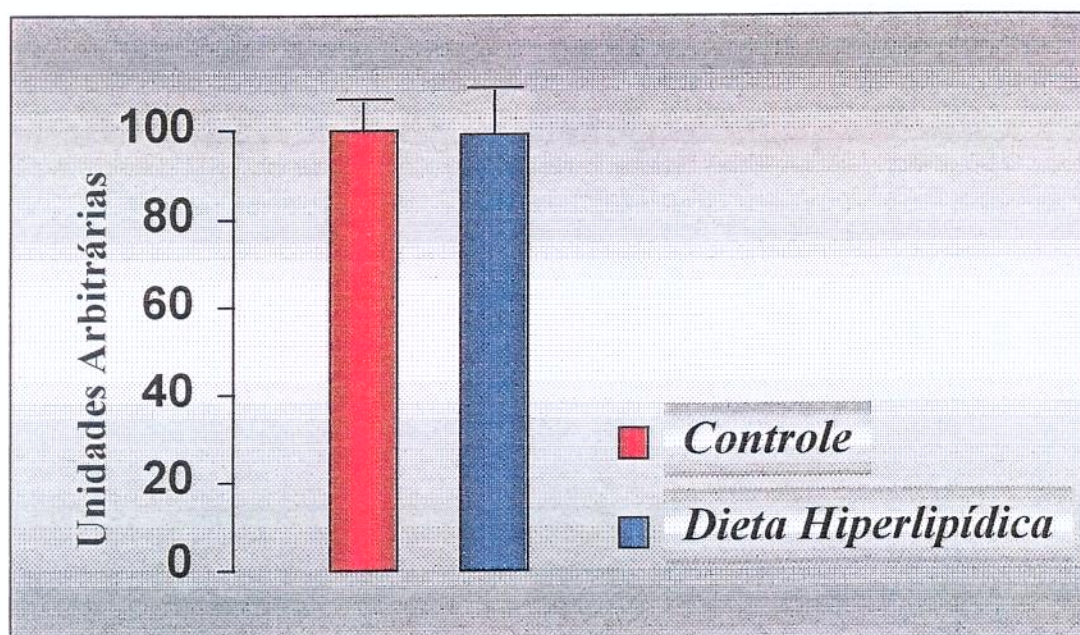


Figura 13: Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas à *immunoblotting* com anticorpo anti-PI 3-K. **A:** a banda **C** refere-se aos controles e a banda **DH** aos animais tratados com a dieta hiperlipídica. **B:** o nível protéico é expresso graficamente como a média $\pm$ EPM dadensitometria óptica realizada nas auto-radiografias de 8 experimentos.

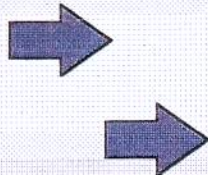
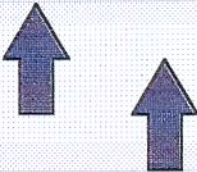
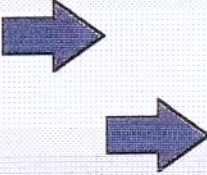
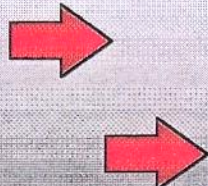
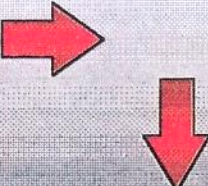
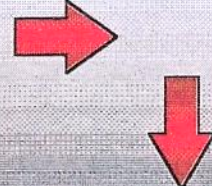
	RI	IRS-1	PI 3-K
	Conc. Fosfor.	Conc. Fosfor.	Conc. Assoc.
Fígado			
Músculo			

Tabela 2: Resumo dos resultados encontrados em fígado e músculo..

5. DISCUSSÃO

A transmissão do sinal insulínico inicia-se com a ligação do hormônio à subunidade α de seu receptor específico cuja localização é transmembrana. Tal ligação ativa a capacidade tirosina quinase da subunidade β do receptor, levando à autofosforilação da mesma e à fosforilação de substratos endógenos como o IRS-1 (SUN et al., 1992) e IRS-2 (SUN et al., 1995), ambos constituintes da pp185. Estes substratos possuem vários sítios de fosforilação em serina, treonina e tirosina. Na molécula de IRS-1, nove dos sítios de fosforilação em tirosina apresentam uma sequência de aminoácidos, YMXM OU YXXM, onde o Y é tirosina, X corresponde a qualquer aminoácido e M é metionina. Quando ocorre fosforilação de tirosina nestes sítios, dá-se uma interação não covalente entre a molécula de IRS-1 e outras proteínas sinalizadoras, principalmente aquelas que apresentam domínios SH2 (BACKER et al., 1992; FOLLI et al., 1993; KUHNE et al., 1993; PAWSOM T., 1995). Uma dessas moléculas é a PI 3-quinase que é ativada após a associação com o IRS-1. Outras proteínas que também são fosforiladas após o estímulo insulínico são: ecto-ATPase (LIN & GUIDOTTI, 1989), a pp60 (LAVAN & LIENHARD, 1993), o Shc (KOVACINA & ROTH, 1993) e o JAK2 (SAAD et al., 1996).

O estudo das etapas iniciais da ação insulínica têm sido feito tanto *in vitro*, através da utilização de receptores de insulina parcialmente purificados e substratos exógenos e *in vivo*, após a administração de insulina, em diferentes modelos animais.

Os métodos *in vitro* foram inicialmente empregados no estudo da sinalização insulínica, fazendo uso de receptores parcialmente purificados e determinando-se a atividade quinase em direção a alguns substratos exógenos, tais como histonas (ROTHENBERG, WHITE & KAHN, 1990). Ainda que tenham sido úteis na compreensão da fisiologia do receptor, tais procedimentos estão sujeitos à uma série de artefatos bioquímicos resultantes da homogeneização do tecido e purificação do receptor, tais como proteólise e desfosforilação conseqüente à presença de fosfatases que podem contaminar o meio (KATHURIA et al., 1986). Por outro lado, a remoção do receptor da membrana plasmática interfere nas suas interações com outros componentes celulares e na sua atividade tirosina quinase (FEHLMAN et al., 1985). A atividade quinase, quando estudada *in vitro*, também varia dependendo do substrato exógeno utilizado (ROTHENBERG et al., 1990).

O método de estudo utilizado neste trabalho, consiste da estimulação *in vivo* com insulina, extração e homogeneização dos tecidos hepático e muscular em condições desnaturantes ou em condições próprias para imunoprecipitação e posterior “immunoblotting” com anticorpos específicos. Esta metodologia permite avaliar a fosforilação e portanto, a atividade quinase do receptor de insulina e de seus substratos, neste dois tecidos fundamentais na homeostase da glicose (SAAD et al., 1989).

Foram então estudadas as etapas iniciais da ação da insulina em ratos alimentados com uma dieta cujo conteúdo calórico foi predominantemente de lípidos compostos por ácidos graxos saturados, que constitui um modelo de resistência insulínica.

Para caracterizar a resistência à insulina neste grupo de animais, realizamos o teste curto de tolerância à insulina (ITT). A técnica do *clamp* euglicêmico ou hiperglicêmico (DeFRONZO, TOBIN & ANDRES, 1979) tem sido tradicionalmente utilizada na determinação de ação da insulina *in vivo* em humanos e em animais e, ainda que seja um método bastante sensível, é de difícil execução. BONORA e colaboradores demonstraram em indivíduos obesos e diabéticos, que o teste curto de tolerância à insulina (ITT) com a determinação da velocidade de desaparecimento da glicose pode ser um método alternativo de avaliação da sensibilidade à insulina, apresentando boa correlação com os resultados obtidos com o *clamp*, e sendo mais facilmente executado (BONORA et al, 1989). Uma crítica que poderia ser feita à utilização do ITT como forma de avaliação da ação insulínica viria da influência dos hormônios contrarreguladores (glucagon, catecolaminas, cortisol e GH), retardando o decaimento da glicose. No entanto, a resposta contrarregulatória ocorre 15-20 minutos após a injeção de insulina (GARBER et al., 1976; RIZZA et al., 1979; GERICH et al., 1980) e portanto, o teste de curta duração não apresenta tal inconveniente.

Nossos resultados demonstraram diminuição significativa da velocidade de desaparecimento da glicose no grupo experimental, confirmando nesse modelo a resistência insulínica amplamente documentada na literatura.

É interessante destacar que os animais alimentados com dietas hiperlipídicas, apesar da resistência à insulina, não apresentaram hiperinsulinemia. Esses resultados estão em concordância com outros estudos que também utilizaram esse modelo animal (KAHN & PEDERSEN, 1992; KIM et al., 1994).

Várias hipóteses têm sido formuladas com o objetivo de explicar o mecanismo de resistência induzida por dietas hiperlipídicas. Uma delas considera que a concentração e composição dos lipídeos da dieta poderiam alterar a constituição dos fosfolípidos e a concentração de colesterol da membrana celular, modificando a cinética de proteínas nela localizadas, dentre elas o receptor de insulina, cuja capacidade de ligação e atividade quinase poderiam ser afetadas (CLANDININ et al., 1991). Esses efeitos foram observados em membranas extraídas de adipócitos de ratos alimentados com dieta hiperlipídica, em que houve sensível diminuição da ligação da insulina (FIELD, 1988). Também em cultura de células (linfócitos IM-9 e fibroblastos NIH 3T3) foram demonstradas variações no grau de fosforilação do receptor e da pp185 dependendo da composição lipídica da membrana (ZOPPINI & KAHN, 1992). No entanto, em nosso estudo não observamos alteração significativa na concentração ou na autofosforilação do receptor de insulina em tecidos hepático ou muscular, sugerindo que o defeito possa estar em uma etapa mais distal da transmissão do sinal.

Ao contrário do que foi observado em outros modelos de resistência à insulina, tais como tratamento com dexametasona (KARASIK & KAHN, 1988; SAAD et al., 1993), camundongos ob/ob (SAAD et al., 1992), envelhecimento (CARVALHO et al., 1996), tratamento crônico com GH (THIRONE et al., 1997), em que houve diminuição da concentração e da fosforilação do IRS-1 em tecido hepático, no modelo da dieta hiperlipídica encontramos aumento de ~50% na concentração e de ~60% na fosforilação desse substrato nesse tecido.

Aumentos dos níveis e grau de fosforilação do IRS-1 no tecido hepático, também foram observados em outros modelos animais de resistência à insulina sem hiperinsulinemia. SAAD e colaboradores demonstraram que ratos submetidos à jejum de 72 horas ou com diabetes induzido por estreptozotocina, situações de menor ação insulínica,

apresentaram aumento moderado nos níveis teciduais desse substrato do receptor de insulina nesse tecido (SAAD et al., 1992). Nosso modelo de resistência, assim como os acima descritos, apresentam clara tendência à hipoinsulinemia e, como observado em cultura de células, a hiperinsulinemia induz “down-regulation” e a hipoinsulinemia “up-regulation” do IRS-1, provavelmente por maior ou menor degradação dessa proteína (SUN et al., 1992). Essa regulação do IRS-1 pela insulinemia é exclusiva do fígado, não tendo sido demonstrada em músculo, em nenhum modelo animal de resistência à insulina, confirmando a modulação tecido-específica dessa proteína.

Esse aumento da concentração e fosforilação do IRS-1 não significa, especificamente, melhor transmissão do sinal insulínico em tecido hepático, podendo inclusive, contribuir para a resistência à insulina, como foi observado em cultura de células (SUN et al., 1992; YAMAUCHI & PESSIN, 1994). O IRS-1 possui várias porções YMXM/YXXM que se associam com diferentes proteínas sinalizadoras e assim, quando hiperfosforilado, pode ligar-se à algumas dessas proteínas em detrimento de outras, favorecendo vias da transmissão do sinal, não relacionadas ao metabolismo da glicose (YAMAUCHI & PESSIN., 1994).

Nesse sentido, o fato de não se encontrar aumento na associação IRS-1/PI 3-quinase em fígado, sugere uma dificuldade de interação dessas proteínas, já que seria esperado aumento na associação IRS-1/PI 3-quinase, proporcional à elevação na fosforilação do IRS-1 (SAAD et al., 1992; SAAD et al., 1993; SAAD et al., 1994; SAAD et al., 1995). Portanto, seria importante a investigação da ativação da PI 3-quinase em tecido hepático desse modelo de resistência à insulina, porque existe a possibilidade desta interação IRS-1/PI 3-quinase não ser acompanhada de ativação da última. É possível também que defeitos distais à interação IRS-1/PI 3-quinase possam contribuir para a menor sensibilidade à insulina em fígado de animais tratados com dieta hiperlipídica.

O ciclo glicose/ácidos graxos tem sido usado para explicar resistência à insulina em diversas situações fisiopatológicas, uma vez que, em tecido hepático, a metabolização de ácidos graxos pode regular o metabolismo de glicose (RANDLE et al., 1963). A maior ingestão de lípidos ocasiona acúmulo de triglicérides no fígado (OAKES et al., 1994), e

ensaios *in vitro* têm demonstrado que a maior oxidação de ácidos graxos aumenta a gliconeogênese (RUDERMAN, TOEWS & SHAFRIR, 1969). Alguns dos estudos com dietas hiperlipídicas têm evidenciado aumento na produção hepática de glicose. Através da técnica do *clamp* euglicêmico, STORLIEN e colaboradores demonstraram tal efeito em ratos tratados por 30 dias com dietas contendo 59% de lipídeos com composição variada (STORLIEN et al., 1991). Em recente estudo também com *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, OAKES e colaboradores constataram menor efeito supressor da insulina sobre a produção hepática de glicose nos animais submetidos a dieta hiperlipídica. A produção hepática de glicose é conseqüente à neoglicogênese e glicogenólise. Esses autores demonstraram que a elevada oxidação de ácidos graxos tinha um papel na menor supressão da neoglicogênese, mas com pouca ou nenhuma influência na elevada produção hepática de glicose. A menor capacidade de supressão da produção hepática de glicose induzida pela insulina, é conseqüência de alterações na glicogenólise, com menor bloqueio da G-6-Pase (glicose-6 fosfatase) e menor atividade da glucoquinase (OAKES et al., 1997).

No entanto, o tecido mais importante no metabolismo de glicose, responsável por ~90% da captação dessa hexose induzida pela insulina, é o tecido muscular esquelético (DeFRONZO et al., 1981) e também no modelo da dieta hiperlipídica, é nele que observamos as alterações mais relevantes. Ainda que não tenhamos evidenciado diferenças na concentração e na fosforilação do receptor de insulina em tecido muscular nesse modelo, quando comparadas aos controles, alterações na composição dos lipídeos constituintes da membrana celular, poderiam alterar a capacidade tirosina-quinase do receptor ou a interação deste com seu substrato. Nossos resultados demonstraram que a concentração do IRS-1 manteve-se inalterada, mas a fosforilação e a associação IRS-1/PI 3-quinase apresentaram diminuição de ~50% nesse tecido, comparando-se aos controles. ZOPPINI & KAHN, utilizando cultura de células, demonstraram variações significativas no grau de fosforilação do receptor de insulina e da pp185 induzidas pela insulina, sugerindo que alterações no conteúdo lipídico de membrana alteram a transmissão do sinal insulínico.

Em animais tratados com a dieta hiperlipídica, a maior disponibilidade de lípidos pode aumentar a síntese de diacilglicerol que ativa a proteína-quinase C (PKC). Um mecanismo importante na regulação das etapas iniciais da ação insulínica atua através da fosforilação do IRS-1 em serina e treonina (MAYERS & WHITE, 1996). Essa regulação, que foi descrita recentemente, pode ser evidenciada em cultura de células utilizando-se metodologia variada (TANTI, et al., 1994). Foi demonstrado que a fosforilação do IRS-1 em serina ou treonina reduz significativamente a capacidade do receptor de insulina fosforilar esse substrato em tirosina, dificultando a transmissão do sinal insulínico. Diversas enzimas, que apresentam capacidade serina-quinase, tais como a própria PI 3-quinase, a MAP quinase, a proteína quinase C e a proteína quinase A, podem fosforilar o IRS-1 em serina ou treonina, induzindo estes efeitos. Assim, a ativação da PKC, fosforilando o IRS-1 em serina, poderia ser um mecanismo para explicar a menor fosforilação em tirosina e a menor interação deste com a PI 3-quinase.

Deve-se considerar também a ação de fosfotirosina fosfatases, como um outro mecanismo regulatório, que induziria maior desfosforilação do IRS-1 e portanto, menor associação deste com a PI 3-quinase. Ainda que não haja dados na literatura referentes a estas enzimas na dieta hiperlipídica, tal efeito merece investigação futura.

A insulina induz a captação de glicose em tecidos periféricos, especialmente no músculo através da translocação de vesículas contendo GLUT4 do citoplasma para a membrana plasmática (STEPHENS & PILCH, 1995; RICE & GARNER, 1994; QUON et al., 1995). O GLUT4 é o transportador de glicose específico do músculo e tecido adiposo. Vários métodos experimentais têm evidenciado o papel da PI 3-quinase na translocação do GLUT4 estimulada pela insulina (CHEATAM et al., 1994; HARA et al., 1994; OKADA et al., 1994; HARUTA et al., 1995). Em um estudo em que se determinou uma mutação na PI 3-quinase com deleção no sítio de ligação na subunidade p110, demonstrou-se que a captação de glicose estimulada pela insulina diminuiu (HARA et al., 1994).

Também utilizando-se inibidores da enzima tais como o wortmannin e o LY294002, foi observado que a captação de glicose induzida pela insulina diminuiu (CLARKE et al., 1994; YEH et al., 1995; SANCHES-MARGALET et al., 1994). Essas evidências são bastante significativas e sugerem que a ativação da PI 3-quinase é necessária para a captação de glicose induzida pela insulina.

Sendo assim, a diminuição da associação IRS-1/PI 3-quinase pode estar relacionada à menor captação de glicose presente nesse modelo, ainda que não tenhamos estudado diretamente a ativação da PI 3-quinase.

A regulação dos níveis teciduais e da translocação do GLUT4 também já foram investigadas nesse modelo animal de resistência insulínica. Enquanto alguns estudos têm demonstrado que o uso da dieta rica em lipídes resulta na diminuição da concentração do mRNA de GLUT4 em músculo de ratos (KIM et al., 1994; KAHN & PEDERSEN, 1993), outros não observaram esse efeito (HAN et al., 1997; KUSUMOKI et al., 1993; WAKE et al., 1991). Por outro lado, a translocação do GLUT4 para a membrana celular e o transporte de glicose no músculo podem ser estimulados por duas vias distintas, uma desencadeada pela insulina e outra por contração muscular e anóxia. Há controvérsia também à respeito dos efeitos da dieta hiperlipídica nessas duas vias, alguns sugerindo que a via da contração muscular permanece normal (KUSUMOKI et al., 1993; LIU, et al., 1996) enquanto outros sugerem que tal via é inibida tanto quanto a via dependente de insulina (ROSHOLT, KING & HORTON, 1994). ZIERATH e colaboradores, estudando ambas as vias de estímulo da captação de glicose em ratos submetidos à dieta contendo 55% de lipídes, evidenciaram alteração somente na via de estímulo insulínico, sugerindo, ainda, que tal efeito seria secundário à menor ativação da PI 3-quinase (ZIERATH et al., 1997).

Deve-se considerar também que animais tratados com a dieta hiperlipídica apresentam acúmulo de triglicérides no músculo, o que poderia levar à maior oxidação de ácidos graxos, inibindo a captação de glicose via ciclo da glicose/ácido graxo (RANDLE et al., 1963). O mecanismo pelo qual tal efeito poderia ocorrer seria um aumento na concentração de glicose-6-fosfato levando à inibição da hexoquinase. Para avaliar tal possibilidade, HAN e colaboradores efetuaram experimento em que inicialmente

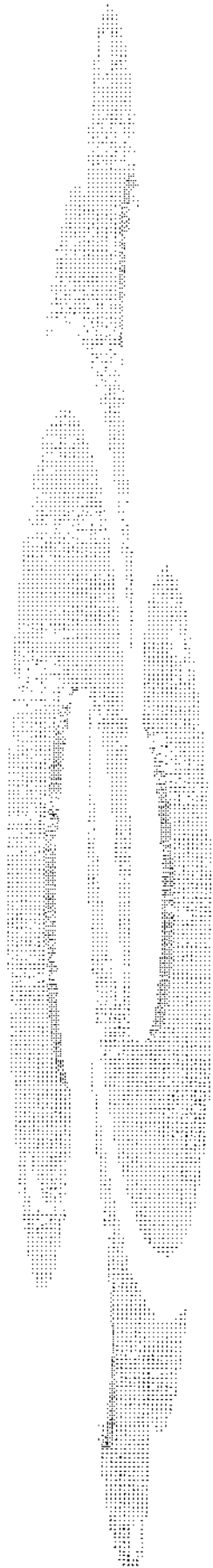
promoveram a captação de 3-O-metilglicose por tecido muscular esquelético em animais tratados ou não com dieta hiperlipídica e observaram diminuição de 47% na captação após estímulo insulínico nos ratos tratados. A 3-O-metilglicose é um análogo da glicose que é transportado no músculo pelo mesmo processo, mas que não é fosforilado, sendo assim, tal resultado excluiu a hipótese de inibição da hexoquinase. Em seguida, com o intuito de avaliar a ação direta da oxidação dos ácidos graxos, realizaram o mesmo experimento em situação de anóxia e o resultado foi diminuição de 41% na captação da 3-O-metilglicose no mesmo grupo. Para os autores, esses resultados tornam menos provável a possibilidade de que a oxidação de ácidos graxos possa desempenhar um papel relevante no mecanismo de resistência observado nesse modelo (HAN, 1997).

Em conclusão, os resultados desse estudo demonstram que animais alimentados com dieta hiperlipídica durante 4 semanas, apresentam resistência insulínica acompanhada de maior concentração e fosforilação do IRS-1 em fígado e menor fosforilação e associação IRS-1/PI 3-quinase em músculo. É provável que tais alterações nas etapas iniciais da ação insulínica, principalmente em tecido muscular, possam contribuir para a resistência observada nesse modelo.

6. CONCLUSÃO

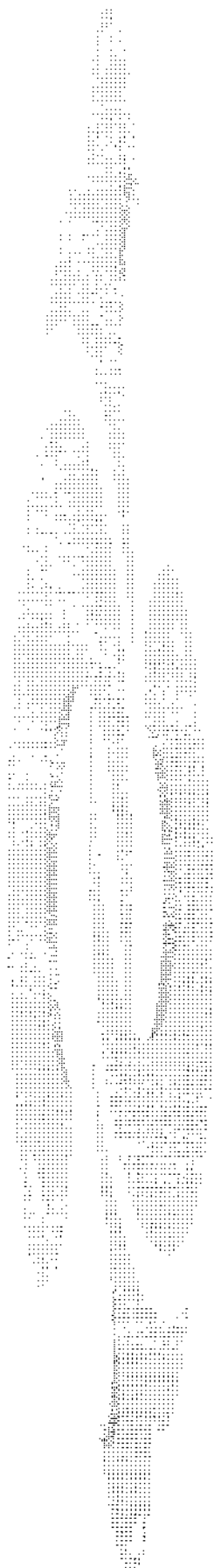
Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem as seguintes conclusões:

- A alimentação com dieta hiperlipídica induziu resistência à insulina, comprovada pelo ITT de curta duração.
- Tanto a concentração como a fosforilação do receptor de insulina permaneceu inalteradas em ambos os tecidos, hepático e muscular, nos animais tratados com a dieta hiperlipídica.
- A concentração e a fosforilação do IRS-1 em fígado aumentaram significativamente, ainda que não tenha havido alteração na associação do IRS-1 com a PI 3-quinase.
- Em músculo, a concentração de IRS-1 não mudou nos animais submetidos à dieta hiperlipídica, mas a fosforilação desse substrato, assim como sua associação com a PI 3-quinase diminuíram significativamente.
- É provável que tais alterações nas etapas iniciais da ação insulínica, principalmente em tecido muscular, possam contribuir para a resistência observadas nesse modelo.



7. SUMMARY

Insulin stimulates the tyrosine kinase activity of its receptor resulting in the tyrosine phosphorylation of the cytosolic substrate, insulin receptor substrate-1 (IRS-1), which in turn associates with and activates phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase). Feeding diets high in fat content causes insulin resistance. However, the exact molecular mechanism is unknown. In the present study we have examined the levels and phosphorylation status of the insulin receptor, IRS-1, as well as the association between IRS-1/PI 3-kinase, in the liver and muscle of rats fed high-fat diet (59% saturated fat) by immunoblotting with specific antibodies. The levels and the insulin-stimulated autophosphorylation of the insulin receptor, as determined by immunoblotting with an antiphosphotyrosine antibody, are similar in the liver and muscle in both the high fat-diet fed and chow-diet fed rats. In the liver, the IRS-1 protein levels increased $51 \pm 17\%$ ($p < 0,05$) and in samples previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and blotted with antiphosphotyrosine antibody, there was a increase in the insulin stimulated IRS-1 phosphorylation levels to $64 \pm 22\%$ ($p < 0,05$) in the high fat-diet fed animals. In contrast, the insulin-stimulated phosphorylation of IRS-1 in muscle of high fat-diet fed rats was reduced to $50 \pm 12\%$ ($p < 0,05$), although there was no change in protein levels. The insulin-stimulated IRS-1 association with PI 3-kinase decreased to $52 \pm 11\%$ ($p < 0,05$) in muscle of the rats fed high fat-diet, but was no change in the liver. These data suggest that changes in the early steps of insulin signal transduction may have a role in the insulin resistance observed in high fat-fed animals.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAKI, E.; LIPES, M.A.; PATTI, M.A.; BRUNING, J.C.; HAAG, B.; JOHNSON, R.S. & KAHN, C.R. - Alternative pathway of insulin signalling in mice with target disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, 372: 186-190, 1994.
- BACKER, J.M.; KAHN, C.R. & WHITE, M.F. - Tyrosine phosphorylation of the insulin receptor during insulin-stimulated internalisation 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.
- BERNIER, M.; LAIRD, D.M. & LANE, M.D. - Insulin-activated tyrosine phosphorylation of a 15-kilodalton protein in intact 3T3-L1 adipocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 84: 1844-1848, 1987.
- 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.
- BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIOTORI, V.; CORGNATI, A. & MUGGEO, M. - Estimates of *in vivo* insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J. Clin. Endocrinol. Metabol.**, 68(2): 374-378, 1989.
- BRADFORD, M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, 72:248-254, 1976.

- CARPENTIER, C.L. & CANTLEY, L.C. - Phosphoinositide kinases. **Biochem.**, 29: 11147-11156, 1990.
- 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.C.; NUNES, A.L. B.; VELLOSO, L.A.; SSAD, 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.
- 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.
- CHEATHAM, B., KAHN, C.R. - Insulin action and the insulin signaling network. **Endocr Rev**, 16:117-142, 1995.
- CHEATHAM, B.; VLAHOS, C.J.; CHEATHAM, L.; WANG, L.; BLENIS, J.; KAHN, C.R. - Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 s6 kinase, DNA synthesis and glucose transporter translocation. **Mol. Cell Biol.**, 14:4902-4911, 1994.
- CHEN, M-T.; KAUFMAN, L.N.; SPENNETTA, T.; SHRAGO, E. - Effects of high fat-feeding to rats on the interrelationship of body weight, plasma insulin, and fatty acyl-coenzyme A esters in liver and skeletal muscle. **Metabolism**, 41:564-569, 1992.
- 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.

- CLANDININ, M.T.; CHEEMA, S.; FIELD, C.I.; GARG, M.L.; VENKATRAMAN, J.; CLANDININ, T.R. - Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. **FASEB J.** 5:2761-2769, 1991.
- 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.; FERRAMNINI, E.; HENDLER, R. ET AL. - Regulation of splanchnic and peripheral glucose uptake by insulin and hyperglycemia in man. **Diabetes**, 32: 32-45, 1983.
- DeFRONZO, R.A.; FERRAMNINI, E.; SATO, Y.; FELIG, P.; WAHRE, J. - Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake. **J. Clin. Invest.** 68:1468-1474, 1981.
- DeFRONZO, R.A.; TOBUN, J. & ANDRES, R. - The glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. **Am. L. Physiol.** 237:E214, 1979.
- DEMEYTS, P. GU, J.L.; SHYMKO, R.M.; KAPLAN, B.E.; BELL, G.I.; WHITTAKER, J. - Identification of a ligand-binding region of the human insulin receptor encoded by the second exon of the gene. **Mol. Endocrinol.**, 4:409-416, 1990.
- EBINA, Y.; ARAKI, E.; TAIRA, M., et al. - Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 84:704-708, 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.
- FIELD, C.J.; RYAN, E.A.; THONSON, B.R.; CLANDININ, M.T. - Dietary fat and the diabetic state alter insulin binding and the fatty acyl composition of the adipocyte plasma membrane. **Biochem. J.**, 253:417-424, 1988.
- 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.
- FOLSON, A.R.; MA, J.; McGOVERN, P.G.; ECKFELDT, J.H. - Relation between plasma phospholipid saturated fatty acids and hyperinsulinemia. **Metabolism**, 45:223-228, 1996.
- 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.
- GARBER, A.J.; CRYER, P.E.; SANTIAGO, J.V.; HAYMOND, M.W.; PAGLIARA, A.S.; KINNIS, D.M. - The role of adrenergic mechanism in the substrate and hormonal response to insulin-induced hypoglycemia in man. **J. Clin. Invest.** 58:7, 1976.

- GERICH, J.; CRYER, P.; RIZZA, R. - Hormonal mechanism in acute glucose counterregulation: the relative roles of glucagon, epinephrine, norepinephrine, growth hormone and cortisol. **Metabolism**, (Suppl 1) 29:1164, 1980.
- GINSBERG, B.H. - in Biochemical Actions of Hormones, pp.313-349. **Academic Press**, New York, 1977.
- GIORGETTI, S.; BALLOTTI, R.; KOWALSKI-CHAUVEL, A.; TARTARE, S.; VAN OBBERGHEN, E. - The insulin and insulin-like growth factor-1 receptor substrate IRS-1 associates with and activates phosphatidylinositol 3-kinase in vitro. **J. Biol. Chem.**, 268:7358-7364, 1993.
- GRUNDLEGER, M.L. & THENEN, W.S. - Decreased insulin binding, glucose transport and glucose metabolism in soleus muscle of rats fed a high fat diet. **Diabetes**, 31:232-237, 1982.
- HADARI, Y.R.; TZAHAR, E.; NADIV, O.; ROTHENBERG, P.; ROBERTS, C.T.J.; LEROTH, D.; YARDEN, Y.; ZICK, Y. - Insulin and insulinomimetic agents induce activation of phosphatidylinositol 3-kinase upon its association with pp185 (IRS-1) in intact rat liver. **J. Biol. Chem.**, 267:17483-17486, 1992.
- HAN, D.H.; HANSEN, P.A.; HOST, H.H.; HOLLOSZY, J.O. - Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high-fat diet. A reevaluation. **Diabetes**, 46:1761-1767, 1997.
- HARA, K.; YONEZAWA, K.; SAKAUE, H.; ANDO, A.; KOTON, K.; KITAMURA, T.; KITAMURA, Y.; UEDA, H.; STEPHENS, L.; JACKSON, T.R.; HAWKINS, P.T.; DHAND, R.; CLARK, A.E.; HOLMAN, G.D.; WATERFIELD, M.D.; KASUGA, M. - Phosphoinositide 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for ras activation in CHO cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 91:7415-7419, 1994.

- HARUTA, M.T.; MORRIS, A.J.; ROSE, D.W.; NELSON, J.G.; MUCKLER, M.; OLEFSKY, J.M. - Insulin stimulated GLUT4 translocation is mediated by a divergent intracellular signaling pathway. **J. Biol. Chem.**, 270:27991-27994, 1995.
- HENRIKSEN, E.J.; BOUREY, R.E.; RODNICK, K.J.; ET AL. -Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles. **Am. J. Physiol.**, 259: E593-E598, 1990.
- HERBERT, V.; LAU, K.S.; GOTTLIER, C.W.; BLEICHER, S.J. - Coated-charcoal immunoassay of insulin. **J Clin. Endocrinol.**, 25:1375-1384, 1965.
- 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.
- HIRSHMAN, M.F.; WALLBERG-HENRIKSSON, H.; WARDZALA, L.J.; HORTON, E.D.; HORTON, E.S.; - Acute exercise increases the number of plasma membrane glucose transporters in rat skeletal muscle. **FEBS Lett**, 238:235-239, 1990.
- IRELAND, P.; O'DEA, K.; NANKERVIS, A. - Short-term effects of alterations in dietary fat on metabolic control in IDDM. **Diabetes Care**, 15:1499-1504, 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, B.B. & PEDERSEN, O. - Suppression of GLUT4 expression in skeletal muscle of rats that are obese from high fat feeding but not from high carbohydrate feeding or genetic obesity. **Endocrinology**, 132:13-22, 1993.
- KAHN, C.R. - Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. **Ann. Rev. Med.**, 36:429-451, 1985.

- KARASIK, A.; PEPINSKY, R.B.; SHOELSON, S.E. & KAHN, C.R. - Lipocortins 1 and 2 as substrates for the insulin receptor kinase in rat liver. **J. Biol. Chem.**, 263: 11862-11867, 1988.
- KASUGA, M.; HEDO, J.A.; YAMADA, K.M. & KAHN, C.R. - Structure 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.; CRETIAZ, 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.
- KELLY, K.L.; RUDERMAN, N. - Insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase. Association with a 185kDa tyrosine-phosphorylated protein (IRS-1) and localization in a low density membrane vesicle. **J. Biol. Chem.**, 268:4391-4398, 1993.
- KIM, Y.; TAMURA, T.; IWASHITA, S.; TOKUYAMA, K.; SUSUKY, M. - Effect of high-fat diet on gene expression of GLUT4 and insulin receptor in soleus muscle. **Bioch. Biophys. Res. Comm.**, 202:519-526, 1994.
- KLIB, A.; RAMIAL, T.; YOUNG, D.A.; HOLLOSZY, J.O. - Insulin-induced translocation of glucose transports in rat hindlimb muscle. **FEBS Lett**, 224:224-230, 1987.
- KOVACINA, K.S. & ROTH, R.A. - Identification of SHC as a substrate of the insulin receptor kinase distinct from the GAP-associated 62 kDa tyrosine phosphoprotein. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 192:1303-1311, 1993.

- KRAEGEN, E.W.; JAMES, D.E.; STORLIEN, L.H.; BURLEIGH, K.M.; CHISHOLM, D.J. - In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rats assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration. **Diabetologia**, 29:192-198, 1986.
- KUHNE, M.R.; PAWSON T.; LIENHARD, G.E.; FENG, G.S. - The insulin receptor substrate-1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. **J. Biol. Chem.**, 268:11479-11481, 1993.
- KUSUMOKI, M.; STORLIEN, L.H.; MacDESSE, J.; OAKES, N.D.; KENNEDY, C.; CHISHOLM, D.J.; KRAEGEN, E.W. - Muscle glucose uptake during and after exercise is normal in insulin resistant rats. **Am. J Physiol.** 264:E167-E172, 1993.
- LAEMMLI, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (Lond.)**, 227:680-685, 1970.
- LAVAN, B.E. & LIENHARD, G.E. - The insulin elicited 60 kDa phosphotyrosine protein in rat adipocytes is associated with phosphatidylinositol 3-kinase. **J. Biol. Chem.**, 268:5921-5928, 1993.
- LIN, S-H.; GUIDOTTI, G. - Cloning and expression of a cDNA coding for a rat liver plasma membrane ecto-ATPase. **J. Biol. Chem.** 264:14408-14414, 1989
- LIU, S.; BARACOS, V.E.; QUINNEY, A.; CLANDININ, M.T. - Dietary fat modifies exercise-dependent glucose transport in skeletal muscle. **J. Appl Physiol.** 80:1219-1224, 1996.
- LUND, S.; HOLMAN, G.D.; SCHMITZ, O.; PEDERSEN, O. - Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT 4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92:5817-5821, 1995.
- 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.

- MAEGAWA, H.; OLEFSKY, J.M.; THIES, S.; BOYD, D.; ULLRICH, A.; McCLAIN, D.A - Insulin receptors with defective tyrosine kinase inhibit normal receptor function at the level of substrate phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, 263:12629-12637, 1988.
- MASSAGUE, J.P.; PILCH, P.F. & CZECH, M.P. - Eletrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unit stoichiometries. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, 77: 7137-7141, 1981.
- MOLLER, D.E., FLIER, J.S.: Insulin resistance-mechanisms, syndromes and implications. **N. Engl. J. Med.**, 325:939-948, 1991.
- 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.
- MYERS, M.G. & WHITE, M.F. - Insulin signal transduction and the IRS proteins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 36:615-658, 1996.
- NESHER, R.; KARL, I.E. & KIPNIS, D.M. - Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. **Am. J. Physiol.**, 249: C226-C232, 1985.
- OAKES, N.D.; COONEY, G.J.; CAMILLERI, S.; CHISHOLM, D.; KRAEGEN, E.W. - Mechanism of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. **Diabetes**, 46:1768-1774, 1997.
- OAKES, N.D.; KENNEDY, C.K.; JENKINS, A.B.; LAYBUT, D.R.; CHISHOLM, D.J.; KRAEGEN, E. W. - A new antidiabetic agent BRL49653, reduces lipid availability and improves insulin action in the rat. **Diabetes**, 43:1203-1210, 1994.
- OLEFSKY, J.M. & SAEKOW, M. -The effects of dietary carbohydrate content on insulin binding and glucose metabolism by isolated rat adipocytes. **Endocrinology**, 103:2252-2263, 1978.

- PAWSON, T. - Protein modulates and signaling networks. **Nature**, 373:573-580, 1995.
- PEDERSEN, O.; KAHN, C.R.; FLIER, J.S.; KAHN, B.B. - High fat feeding causes insulin resistance and a marked decrease in the expression of glucose transporters (GLUT 4) in fat cells of rat. **Endocrinology**, 129:771-777, 1991.
- 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.
- PLOUG, T.; GALBO, H.; VINTEN, J; ET AL.- Kinetics of glucose transport in rat muscle: effects of insulin and contractions. **Am. J. Physiol.**, 253: E12-E20, 1987.
- QUON, M.J.; BUTTE, A.J. ZARNOWSKI, M.J.; SESTI, G.; CUSHMAN, S.W.; TAYLOR, S.I. - Insulin receptor substrate-1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4 translocation in transfected rat adipose cells. **J. Biol. Chem.**, 269:27920-27924, 1995.
- RANDLE, P.J.; GARLAND, P.B.; HALES, C.N. & NEWSHOLME, E.A. - The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, 1: 785-789, 1963.
- REGOW, B.J.M.; CORNELISSEN, P.J.H.C.; HELDER, A.P.; SPIJKERS, J.B.V.; WEEBER, Y.M. - Specific determination of free fatty acid in plasma. **Clin. Chim. Acta**, 31:187-195, 1971.
- RICE, K.M.; GARNER, G.R. - Correlation of the insulin receptor substrate-1 with insulin-responsive deoxyglucose transport in 3T3-11 adipocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 198:523-530, 1994.
- RIZZA, R.A.; CRYER, P.E.; GERICH, J.E. - Role of glucagon, catecholamines and growth hormone in human glucose counterregulation. Effects of somatostatin and combined alfa and beta adrenergic blockade on plasma glucose recovery and glucose flux rates after insulin induced hypoglycemia. **J. Clin. Invest.** 64:591, 1979.

- ROSEN, O.M. - After insulin binds. **Science**, 237:1452-1458, 1987.
- ROSHOLT, M.N.; KING, P.A.; HORTON, E.S. - High-fat diet reduces glucose transporter responses to both insulin and exercise. **Am. J. Physiol.**, 266:R95-R101, 1994.
- 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.
- ROTHENBERG, P.L.; WHITE, M.F. & KAHN, C.R. - The insulin receptor tyrosine kinase. In: Cuatrecasas p, Jacobs S, eds. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 92. Berlin: Springer-verlag, 209-243, 1990.
- RUDERMAN, N.B.; TOEWS, C.J.; SHAFRIR, E. - Role of free fatty acids in glucose homeostasis. **Arch Intern. Med.** 123:299-313, 1969.
- 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. Cline. 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.

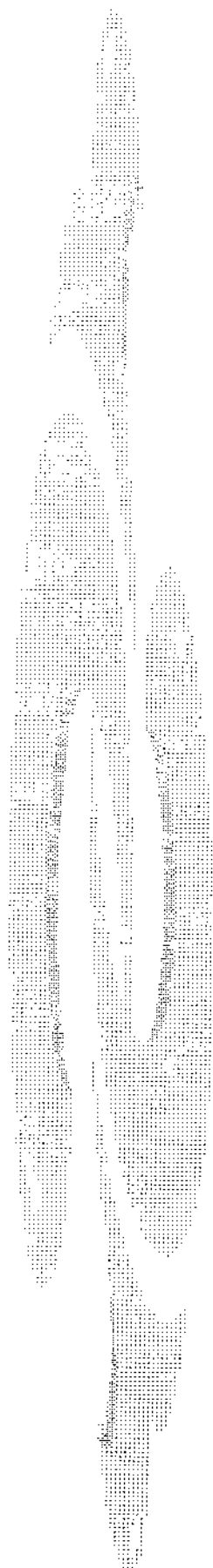
- SAAD, M.J.A.; HARTMANN, L.G.C., CARVALHO, D.S., GALORO, C.A.O.; BRENELLI, S.L. & CARVALHO, C.R.O. - Modulation of early steps in insulin action in the liver and muscle of epinephrine treated rats. **Endocrine**, 3:755-759, 1995(a).
- SAAD, M.J.A.; HARTMANN, L.G.C., CARVALHO, D.S., GALORO, C.A.O.; BRENELLI, 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).
- SAAD, M.J.A.; PIMENTA, W.P.; PACCOLA, G.M.G.F. - Effect of glucose ingestion on peripheral glucose metabolism in normal man. **Diabete & Met.** 15:5-10, 1989.
- SANCHES-MARGALET, V.; GOLDFINE, L.D.; VLAHOS, C.J.; SUNG, C.K. - Role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor LY294002. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 157:140-145, 1994.
- SANDRA, A.; FLYER, D.; MARSHALL, S.J. - Effects of lipids on the transport activity of the reconstituted glucose transport system from rat adipocyte. **Biochem. Biophys. Acta**, 778:511-515, 1984.
- 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.
- SINGER, S.J. & NICOLSON, G.L. - The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, 175:720-731, 1978.
- SOUZA, S.C.; FRICK, G.P.; YIP, R.; LOBO, R.B.; TAL, L-R.; GOODMAN, H. M.; - Growth hormone stimulates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. **J. Biol. Chem.**, 269:30085-30088, 1994.
- SPECTOR, A.A. & YOREK, M.A - Membrane lipid composition and cellular function. **J. Lipid. Res**, 26:1015-1035, 1985.

- STEPHENS, J.M.; PILCH, P.F. - The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT4, the major insulin-responsive glucose transporter. **Endocr. Rev.**, 16:529-546, 1995.
- STEVENSON, R.W.; McPHERSON, R.K.; PERSSON, L.M.; GENEREUX, P.E.; SWICK, A.G.; SPITZER, J.; HERBST, J.J.; ANDREWS, K.M.; KREUTTER, D.K.; GIBBS, E.M. - The antihyperglycemic agent euglitazone prevents the defect in glucose transport in rats fed a high-fat diet. **Diabetes**, 45:60-66, 1996.
- STORLIEN, L. H.; JAMES, D.E.; BURLEIGH, K.M.; CHISHOLM, D.J.; KRAEGEN, E.W. - Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure and obesity in the rat. **Am. J. Physiol.** 251:E576-83, 1986.
- STORLIEN, L.H.; JENKINS, A.B.; CHISHOLM, D.J.; PASCOE, W.S.; KHOURI, S.; KRAEGEN, E.W. - Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. **Diabetes**, 40:280-289, 1991.
- SUN, X.J.; WANG, L.M.; PATTI, M.A.; BRUNING, J.C.; HAAG, B.; JOHNSON, R.S. & KAHN, C.R. - Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. **Nature**, 337:173-177, 1995.
- SUN, X.J.; CRIMMINS, D.L.; MIRALPEIX, M.; MYERS, M.G. Jr. & WHITE, M.F. - Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. **Mol. Cell. Biol.**, 13: 7418-7428, 1993.
- SUN, X.J.; MIRALPEIX, M.; MYERS, M.G. Jr.; GLASHEEN, E.; BACKER, J.M.; KAHN, C.R. & WHITE, M.F. Expression and function of IRS-1 in signal transmission. **J. Biol. Chem.**, 266:22662-22672, 1992.
- SUN, X.J.; ROTHENBERG, P.A.; KAHN, C.R. & AL. - Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, 352:73-77, 1991.

- 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.
- SUSINI, C. & LAVAU, M. - In-vivo and in-vitro responsiveness of muscle and adipose tissue to insulin in rats rendered obese by a high fat diet. **Diabetes**, 27:114-120, 1978
- TAKATA, Y.; WEBSTER, N.J.G. & OLEFSKY, J.M. - Mutation of the two carboxyl terminal tyrosines results in an insulin receptor with normal metabolic signalling properties. **J. Biol. Chem.**, 263:8912-8917, 1988.
- TAKAYAMA, S.; WHITE, M.F. & KAHN, C.R. - Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. **J. Biol. Chem.**, 263: 3440-3477, 1988.
- TAKAYAMA, S.; WHITE, M.F.; LAURIS, V.; & KAHN, C.R. - Phorbol esters modulate insulin receptor phosphorylation and insulin action in hepatoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, 81: 7797-7801, 1984.
- 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.
- TANTI, J.F.; GREMEAUX, T.; VAN OBBERGHEN, E.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. - Insulin receptor substrate-1 is phosphorylated by serine kinase activity of phosphatidylinositol 3-kinase. **Biochem. J.**, 304:17-21, 1994.
- THIRONE, A.C.P.; CARVALHO, C.R.O.; BRENELLI, S.L.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.A. - Effect of chronic growth hormone treatment on insulin signal transduction in rat tissues. **Mol. Cellular Endocrinology**, 130:33-42, 1997.

- TOWBIN, H.; STAEBLIN, J. & GORDON, J. - Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitro-cellulose sheets. Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 76:4350-4354, 1979.
- TRAIANEDES, K.; PROJETTO, J.; O'DEA, K. - A high-fat diet worsens metabolic control in streptozotocin-treated rats by increasing hepatic glucose production. **Metabolism**, 41:846-850, 1992.
- 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.
- WALLBERG-HENRIKSSON, H.; CONSTABLE, S.H.; YOUNG, D. A.; ET AL. - Glucose transport into rat skeletal muscle: interactions between exercise and insulin. **J. Appl. Physiol.**, 65: 909-913, 1988.
- WAKE, S.A.; SOWDEN, J.A.; STORLIEN, L.H.; JAMES, D.E.; CLARK, P.W.; SHINE, J.; CHISHOLM, D.J.; KRAEGEN, E.W. - Effects of exercise training and dietary manipulation on insulin-regulatable glucose transporter mRNA in rat muscle. **Diabetes**, 40:275-289, 1991.
- 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.
- 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.

- YAMAUCHI, K. & PESSIN, J. - Enhancement or inhibition of insulin signalling by insulin receptor substrate 1 is cell context dependent. **Mol Cell Biol**, 14:4427-4434, 1994.
- YEH, J.I.; GULVE, E.A.; RAMEH, L.; BIRBAUM, M.J. - The effects of wortmannin on rat skeletal muscle. Dissociation of signaling pathways for insulin- and contraction-activated hexose transport. **J. Biol. Chem.**, 270:2107-2111, 1995.
- ZIERATH, J.R.; HOUSEKNECHT, K.L.; GNUDI, L.; KAHN, B.B. - High-fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT 4 recruitment via an early insulin-signaling defect. **Diabetes**, 46:215-223, 1997.
- ZOPPINI, G. & KAHN, C.R. - Effect of phospholipase treatment on insulin receptor signal transduction. **Diabetologia**, 35:109-115, 1992.



9. *ANEXOS*

ANEXO 01

TABELA 3: Tabela contendo as velocidades de desaparecimento da glicose, obtidas a partir do teste curto de tolerância à insulina (ITT), nos grupos controle e dieta hiperlipídica. Os resultados são expressos como Média±Erro Padrão da Média (M), Desvio Padrão da Média (DPM) e a significância estatística como *p.

K^{itt} (%/min)	Dieta controle	adieta hiperlipídica
	2,37	0,82
	4,10	0,16
	5,72	3,10
	4,85	1,74
		0,64
		2,29
		2,81
Média	4,26	1,65
Desvio padrão	1,42	1,14
Erro padrão da média	0,71	0,43
p		0,008

ANEXO 02

TABELA 4: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à subunidade β do receptor de insulina, detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo anti-receptor de insulina em amostras de tecido hepático de ratos nos dois grupos estudados. Os resultados são expressos como Média, Desvio Padrão da Média e Erro Padrão da Média. A análise estatística utilizada foi o teste t não pareado, sendo os resultados convertidos em unidades arbitrárias e a comparação feita através de percentual. A significância estatística é expressa como *p*.

Densitometria óptica	Controle	Dieta hiperlipídica
Negativos		2289
Positivos	1535	1055
	11138	5329
	10360	14458
	2379	1365
	2030	4190
N	5	6
Média	5488,48	4781,00
Desvio Padrão	4819,46	5021,08
Erro sobre a Média	2155,33	2049,85
Unidades arbitrárias	100 $\pm$ 39	87 $\pm$ 37
<i>p</i>		0,818

ANEXO 03

TABELA 5: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à fosforilação do receptor de insulina, detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY) em amostras de tecido hepático de ratos nos dois grupos estudados. Os resultados são expressos como Média, Desvio Padrão da Média e Erro Padrão da Média. A análise estatística utilizada foi o teste t não pareado, sendo os resultados convertidos em unidades arbitrárias e a comparação feita através de percentual. A significância estatística é expressa como *p*.

Densitometria óptica	Controle	Dieta hiperlipídica
	12514	9060
	13330	8769
	10524	14218
	13143	21618
		3127
		16735
N	4	6
Média	12377,75	12254,50
desvio Padrão	1284,18	6591,97
Erro sobre a Média	642,09	2691,16
Unidades arbitrárias	100±5	99±21
p		0,972

ANEXO 04

TABELA 6: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes ao substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1 em amostras de tecido hepático de ratos nos dois grupos estudados. Os resultados são expressos como Média, Desvio Padrão da Média e Erro Padrão da Média. A análise estatística utilizada foi o teste t não pareado, sendo os resultados convertidos em unidades arbitrárias e a comparação feita através de percentual. A significância estatística é expressa como *p*.

Densitometria óptica	Controle	Dieta hiperlipídica
Negativo	15248	43122
	20015	33713
	8357	31156
	29730	39539
Positivos	29085	30254
	34477	28120
	12040	8871
	14024	32469
N	8	8
Média	20372,00	30905,50
Desvio Padrão	9583,48	10197,14
Erro sobre a Média	3388,27	3605,23
Unidades arbitrárias	100±17	151±17
p		0,051

ANEXO 05

TABELA 7: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à fosforilação do IRS-1, detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY) em amostras de tecido hepático de ratos nos dois grupos estudados. Os resultados são expressos como Média, Desvio Padrão da Média e Erro Padrão da Média. A análise estatística utilizada foi o teste t não pareado, sendo os resultados convertidos em unidades arbitrárias e a comparação feita através de percentual. A significância estatística é expressa como *p*.

Densitometria óptica	Controle	Dieta hiperlipídica
	10173	17834
	1164	16176
	11070	12267
	14160	22959
	7104	10992
	5353	12179
	2189	4369
	8431	11976
	13163	10819
N	9	9
Média	8089,67	13286,00
Desvio Padrão	4571,25	5213,83
Erro sobre a Média	1523,75	1737,94
Unidades arbitrárias	100±19	164±22
p		0,039

ANEXO 06

TABELA 8: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à PI 3-quinase, detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo anti-PI 3-quinase em amostras de tecido hepático de ratos nos dois grupos estudados. Os resultados são expressos como Média, Desvio Padrão da Média e Erro Padrão da Média. A análise estatística utilizada foi o teste t não pareado, sendo os resultados convertidos em unidades arbitrárias e a comparação feita através de percentual. A significância estatística é expressa como *p*.

Densitometria Óptica	Controle	Dieta Hiperlipídica
Negativos	3932	4560
		5123
Positivos	2878	4496
	7852	18458
	13424	3604
	5210	5450
	3874	14538
	6186	5086
	6067	8203
	5481	4095
	6150	7538
	8027	9097
	15052	
N	12	12
Média	7011,08	7520,67
Desvio Padrão	3715,13	4600,12
Erro sobre a Média	1072,47	1327,94
Unidades arbitrárias	100±15	107±19
p		0,768

ANEXO 07

TABELA 9: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à fosforilação do IRS-1 em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e imunoblotting com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY) e anti-PI 3-quinase, para avaliar a associação IRS-1/PI 3-quinase em amostras de tecido hepático de ratos nos dois grupos estudados. Os resultados são expressos como Média, Desvio Padrão da Média e Erro Padrão da Média. A análise estatística utilizada foi o teste t não pareado, sendo os resultados convertidos em unidades arbitrárias e a comparação feita através de percentual. A significância estatística é expressa como *p*.

Densitometria Óptica	Controle	Dieta Hiperlipídica
	29994	39432
	36403	9576
	36426	17546
	18433	32830
		40929
		22082
N	4	6
Média	30314,00	27065,83
Desvio Padrão	8479,25	12646,70
Erro sobre a Média	4239,62	5162,99
Unidades arbitrárias	100±14	89±17
p		0,667

ANEXO 08

TABELA 10: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à subunidade β do receptor de insulina, detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo anti-receptor de insulina em amostras de tecido muscular de ratos nos dois grupos estudados. Os resultados são expressos como Média, Desvio Padrão da Média e Erro Padrão da Média. A análise estatística utilizada foi o teste t não pareado, sendo os resultados convertidos em unidades arbitrárias e a comparação feita através de percentual. A significância estatística é expressa como *p*.

Densitometria Óptica	Controle	Dieta Hiperlipídica
Negativo	9843	7199
Positive	11677	9842
	13391	8001
	12834	17452
	28603	38951
	20527	26222
	33781	27689
N	7	7
Média	18665,14	19336,57
desvio Padrão	9302,33	12051,36
Erro sobre a Média	3515,95	4554,99
Unidades arbitrárias	100 $\pm$ 19	103 $\pm$ 24
p		0,909

ANEXO 9

TABELA 11: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à fosforilação do receptor de insulina, detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY) em amostras de tecido muscular de ratos nos dois grupos estudados. Os resultados são expressos como Média, Desvio Padrão da Média e Erro Padrão da Média. A análise estatística utilizada foi o teste t não pareado, sendo os resultados convertidos em unidades arbitrárias e a comparação feita através de percentual. A significância estatística é expressa como *p*.

Densitometria Óptica	Controle	Dieta Hiperlipídica
	3949	3672
	4641	3837
	4562	697
	4110	729
	1596	1942
	5348	5049
	3443	5642
	5985	
N	8	7
Média	4204,25	3081,14
Desvio Padrão	1323,12	1994,38
Erro sobre a Média	467,79	753,80
Unidades arbitrárias	100±11	73±18
<i>p</i>		0,216

ANEXO 10

TABELA 12: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes ao substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1 em amostras de tecido muscular de ratos nos dois grupos estudados. Os resultados são expressos como Média, Desvio Padrão da Média e Erro Padrão da Média. A análise estatística utilizada foi o teste t não pareado, sendo os resultados convertidos em unidades arbitrárias e a comparação feita através de percentual. A significância estatística é expressa como *p*.

Densitometria Óptica	Controle	Dieta Hiperlipídica
Negativos	18156	22286
	16965	26993
	22162	28456
	24069	27402
Positivos	21446	21232
	18208	24494
	22613	15944
	24734	22811
N	8	8
Média	21044,12	23702,25
Desvio Padrão	2919,43	4085,42
Erro sobre a Média	1032,18	1444,42
Unidades arbitrárias	100±15	113±7
p		0,157

ANEXO 11

TABELA 13: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à fosforilação do IRS-1, detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY) em amostras de tecido muscular de ratos nos dois grupos estudados. Os resultados são expressos como Média, Desvio Padrão da Média e Erro Padrão da Média. A análise estatística utilizada foi o teste t não pareado, sendo os resultados convertidos em unidades arbitrárias e a comparação feita através de percentual. A significância estatística é expressa como *p*.

Densitometria Óptica	Controle	Dieta Hiperlipídica
	53140	7540
	21940	7540
	25260	7540
	48094	36925
	15535	34176
	39672	15336
	32139	9476
		20082
N	7	8
Média	34254,29	17326,87
Desvio Padrão	13595,53	12121,52
Erro sobre a Média	5138,56	4285,60
Unidades arbitrárias	100±15	50±12
P		0,024

ANEXO 12

TABELA 14: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à PI 3-quinase, detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo anti-PI 3-quinase em amostras de tecido muscular de ratos nos dois grupos estudados. Os resultados são expressos como Média, Desvio Padrão da Média e Erro Padrão da Média. A análise estatística utilizada foi o teste t não pareado, sendo os resultados convertidos em unidades arbitrárias e a comparação feita através de percentual. A significância estatística é expressa como *p*.

Densitometria Óptica	Controle	Dieta Hiperlipídica
Negativos	7211	6589
Positivos	10703	8037
	8913	9837
	10981	12252
	11767	14202
	8864	9140
	11159	8932
	7325	9895
		7395
N	8	9
Média	9615,37	9593,22
Desvio Padrão	1778,64	2369,23
Erro sobre a Média	628,84	798,78
Unidades arbitrárias	100±6	99±8
<i>p</i>		0,983

ANEXO 13

TABELA 15: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à fosforilação do IRS-1 em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e imunoblotting com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY) e anti-PI 3-quinase, para avaliar a associação IRS-1/PI 3-quinase em amostras de tecido muscular de ratos nos dois grupos estudados. Os resultados são expressos como Média, Desvio Padrão da Média e Erro Padrão da Média. A análise estatística utilizada foi o teste t não pareado, sendo os resultados convertidos em unidades arbitrárias e a comparação feita através de percentual. A significância estatística é expressa como *p*.

Densitometria Óptica	Controle	Dieta Hiperlipídica
	4847	4750
	11564	2089
	6791	6464
	4341	2966
	6260	4354
	7824	1050
N	6	6
Média	6937,83	3612,17
Desvio Padrão	2599,34	1963,68
Erro sobre a Média	1061,18	801,67
Unidades arbitrárias	100±15	52±11
p		0,031