

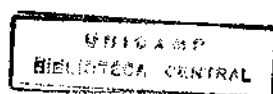
Carla Roberta de Oliveira Carvalho

**RESISTÊNCIA À INSULINA E
ENVELHECIMENTO: REGULAÇÃO DAS
ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA
E EFEITO DO CAPTOPRIL**

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

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

*Campinas
1997*



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	1/UNICAMP
	C253e
V.	Ex.
T. MBO BC/	31.301
PROC.	281.197
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/02/97
N.º CPD	

CM-00099611-2

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

C253e Carvalho, Carla Roberta de Oliveira
 Resistência à insulina e envelhecimento: regulação das etapas iniciais
 da ação insulínica e efeito do captopril / Carla Roberta de Oliveira
 Carvalho. Campinas, SP : [s.n.], 1997.

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

 1. Insulina - receptores. 2. Inibidores da enzima conversora da
 angiotensina. 3. Envelhecimento. I. Mario José Abdalla Saad. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
 III. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof.Dr. Mario José Abdalla Saad

Co-orientador:

Membros:

1. Prof. Dr. Maria Lúcia Zarella *Maria Lúcia Zarella*
2. Prof. Dr. Ubiratan Fátima *Ubiratan Fátima*
3. Prof. Dr. Antonio Carlos Gomes - *A. C. Gomes*
4. Prof. Dr. Lino Augusto Vitorino *Lino Augusto Vitorino*
5. Prof. Dr. Mário José Abdalla *Mário José Abdalla*

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

Data:

15.07.1997.

Dedico o significado da finalização deste trabalho a meus pais:

Théo e Vania

AGRADECIMENTOS

Um trabalho bem feito é o resultado de uma atividade em equipe, em que há uma figura central que ensina a arte com paciência e entusiasmo, acompanhado, na bancada, do auxílio bem feito e esmerado, do bom humor e disponibilidade dos colegas, da presença de material básico e 'ácido'. Enfim, da boa vontade de um grupo.

Meu muito obrigada a:

Meu orientador, prof. Mário José Abdalla Saad, pelo entusiasmo com que ensina e transmite a expectativa de um novo dia, ainda mais divertido e sério;

Sr. Luiz Janeri e sra. Conceição Aparecida da Silva, no auxílio incalculável na bancada, no trato com os animais e bom humor contínuos;

Aos amigos colegas e colegas amigos, pela disponibilidade, ajuda e companheirismo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	<i>i</i>
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4. RESULTADOS.....	21
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÕES.....	68
7. SUMMARY.....	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
9. ANEXOS.....	91
10. PUBLICAÇÕES.....	115

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	31
Figura 2:	31
Figura 3:	32
Figura 4:	33
Figura 5:	33
Figura 6:	34
Figura 7:	35
Figura 8:	36
Figura 9:	37
Figura 10:	38
Figura 11:	38
Figura 12:	39
Figura 13:	40
Figura 14:	41
Figura 15:	42
Figura 16:	43
Figura 17:	44

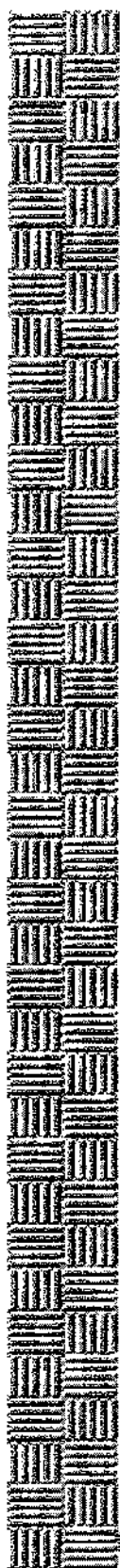
Figura 18:	45
Figura 19:	46
Figura 20:	47
Figura 21:	48
Figura 22:	49
Figura 23:	50
Figura 24:	51
Figura 25:	52
Figura 26:	53
Figura 27:	54
Figura 28:	55

LISTA DE ABREVIATURAS:

μ Ci	microCuri
Ang	angioensina II
ATP	adenosina trifosfato
BK	bradicinina
DMNID	<i>Diabetes Mellitus</i> não insulino dependente
DNA	ácido desoxiribonucleico
DTT	ditiotretol
ECA	enzima conversora da angiotensina
EDTA	ácido etilendinitrilotetracético sal dissódico
EGF	epidermal growth factor
ERKs	quinases reguladoras da sinalização extracelular
FAK	proteína quinase de adesão focal
FGF	fibroblast growth factor
GH	growth hormone
GLUT	transportador de glicose
GRB2	proteína ligadora do receptor para fator de crescimento
GTP	guanosina trifosfato

HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
I ¹²⁵	iodo marcado radioativamente na posição 125
IECA	inibidor da enzima conversora da angiotensina
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IR	receptor de insulina
IRS-1	substrato 1 do receptor de insulina
ITT	teste de tolerância à insulina
JAK1 e 2	proteínas citoplasmáticas quinases da família Janus
Kitt	constante de desaparecimento da glicose
Ln	logaritmo neperiano
MAPK	proteína quinase ativadora da mitogênese
PDGF	plated-derived growth factor
PI 3-k	fosfatidilinositol 3-quinase
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoreto
pp120	proteína fosforilada de 120 kDa
pp185	proteína fosforilada de 185 kDa
pp95	proteína fosforilada de 95 kDa
Raf	serina quinase citoplasmática ativada pelo Ras e ativadora das MAPKs
Ras	proteína originalmente identificada como um oncogene, tem participação na regulação do metabolismo e crescimento celular

RIE	radioimunoensaio
RNA	ácido ribonucleico
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida e sódio dodecil-sulfato para eletroforese
SH2	segunda homologia ao Src
SH3	terceira homologia ao Src
Shc	molécula adaptadora e substrato do receptor de insulina
SHPTP2	fosfotirosina fosfatase ativada pelo IRS-1 fosforilado em tirosina
SHR	ratos espontaneamente hipertensos
SOS	fator ativador do Ras, apresenta homologia à Drosophila Son-of-sevenless
Src	oncogene originalmente definido como produto do sarcoma virus Rous
Tris	tri(hidroximetil)-aminometano



Resumo

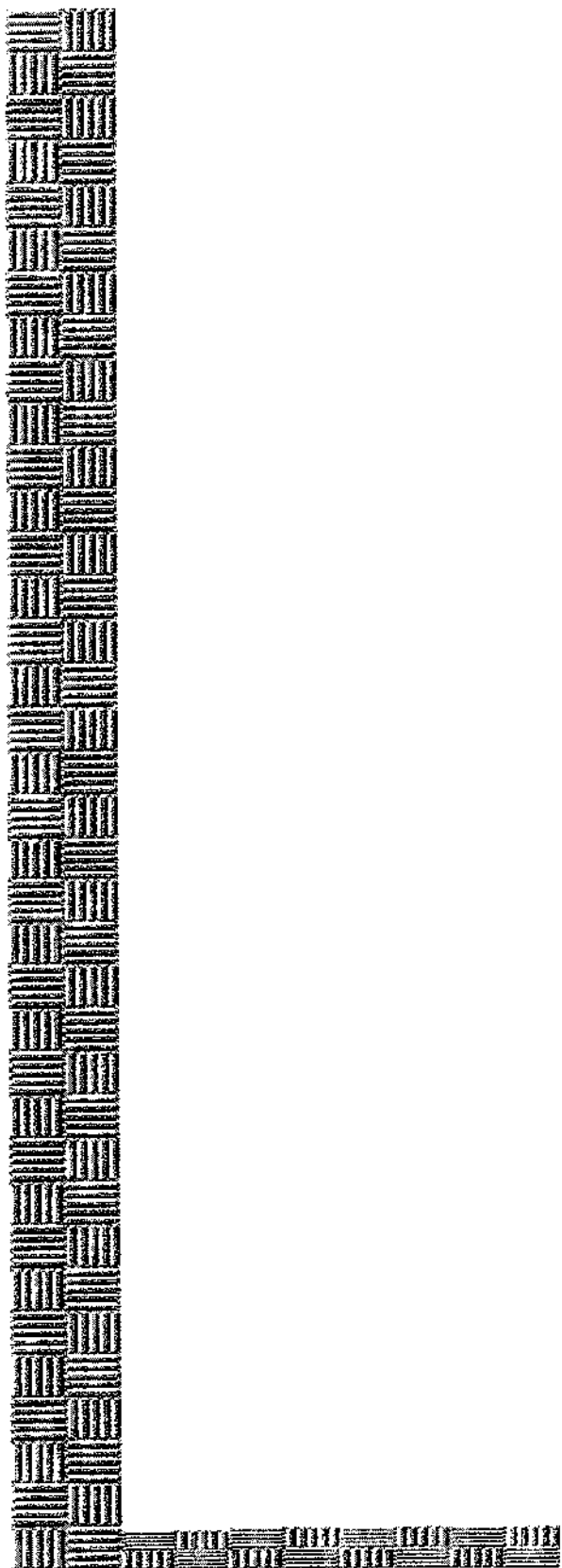
A insulina estimula a atividade tirosina quinase de seu receptor, resultando na fosforilação de substratos citosólicos, IRS-1 e IRS-2, que se associam à fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase), ativando-a. A resistência à insulina é uma condição fisiopatológica associada ao envelhecimento. Entretanto, o mecanismo molecular envolvido nesta situação de resistência não é conhecido.

Neste estudo, examinamos a regulação das proteínas envolvidas nas etapas iniciais da ação insulínica em fígado e músculo de ratos com diferentes idades, 2, 5, 12 e 20 meses.

Não houve mudanças na concentração do receptor de insulina, em ambos os tecidos, em ratos com 2 e 20 meses de idade (idosos), determinado pelo “immunoblotting” com anticorpo anti-receptor de insulina. Entretanto o grau de fosforilação, refletindo a autofosforilação do receptor, mostrou uma especificidade tecidual, diminuindo em fígado, para $66\pm7\%$ ($p<0,05$), mas não em músculo, nos ratos com 20 meses. Curiosamente, os níveis protéicos teciduais de IRS-1 diminuíram precocemente (5 meses) para $51\pm9\%$ ($p<0,001$) e permaneceram em níveis reduzidos, em músculo, porém não em fígado. Nas amostras de animais com 2 e 20 meses, previamente imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1 e anti-IRS-2 e incubadas com anticorpo antifosfotirosina, houve redução do grau de fosforilação para $39\pm9\%$ ($p<0,001$) e $55\pm12\%$ ($p<0,001$) respectivamente em fígado e para $13\pm2\%$ ($p<0,01$) e $10\pm3\%$ ($p<0,05$) em músculo, respectivamente. A associação IRS-1/PI 3-quinase diminuiu significativamente para $27\pm14\%$ ($p<0,01$) e $20\pm10\%$ ($p<0,005$) em fígado e músculo de ratos senis, respectivamente. A associação IRS-2/PI 3-quinase apresentou uma variação tecido específica, sem alteração no tecido hepático e diminuindo significativamente para $50\pm21\%$ ($p<0,05$) em músculo dos ratos com 20 meses. Estes dados sugerem que alterações, nas etapas iniciais da transmissão do sinal insulínico, podem contribuir para a resistência à insulina observada em animais senis.

A seguir, constou também dos objetivos deste estudo investigar o efeito do captopril, inibidor da enzima conversora da angiotensina, que aumenta a sensibilidade à insulina, nas etapas iniciais da ação insulínica, em ratos senescentes.

Os animais com 20 meses que receberam o captopril apresentaram um aumento da sensibilidade à insulina, demonstrado pelo teste venoso de tolerância à insulina, acompanhado de um aumento na autofosforilação, induzido pela insulina de seu receptor de $462 \pm 253\%$ ($p < 0,05$) em fígado e de $697 \pm 78\%$ ($p < 0,001$) em músculo dos ratos. Houve, concomitantemente, um aumento no grau de fosforilação do IRS-1 para $250 \pm 17\%$ ($p < 0,001$) e $280 \pm 50\%$ ($p < 0,05$) no fígado e músculo respectivamente. E a associação IRS-1/PI 3-quinase aumentou para $305 \pm 20\%$ ($p < 0,001$) em fígado e para $267 \pm 48\%$ ($p < 0,05$) em músculo. Como o captopril age, tanto diminuindo os níveis de angiotensina II como elevando os níveis de bradicinina, estes efeitos foram simulados, na tentativa de isolar o efeito predominante nas etapas iniciais da ação insulínica. A administração de losartan, um inibidor do receptor de angiotensina II, não induziu efeitos no grau de fosforilação do IRS-1, nos tecidos estudados. A administração aguda de bradicinina aumentou o grau de fosforilação, induzido pela insulina, em seu receptor e no IRS-1 de fígado e músculo dos ratos senis. Tais dados demonstram que o captopril modula as etapas iniciais da ação insulínica e que estes efeitos podem ser simulados pela administração de bradicinina.



1. Introdução

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

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

O receptor de insulina está virtualmente presente em todos os tecidos de animais vertebrados, embora as concentrações variem de aproximadamente 40 receptores por célula em eritrócitos circulantes a mais de 200.000 em adipócitos e hepatócitos (GINSBERG 1977). É uma estrutura tetrâmera composta de duas subunidades α , cada uma ligada a uma subunidade β . Pontes dissulfeto fazem as ligações inter- e intra-subunidades, resultando a estrutura final de β - α - α - β (MASSAGUE, , 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, enquanto a subunidade β é uma proteína transmembrana, cada uma com peso molecular de 95.000 e responsável pela transmissão do sinal insulínico (KASUGA *et al.*, 1982 a, 1982 b).

A subunidade α confere alta afinidade à ligação de insulina, "binding". Modificações químicas e estudos de mutações sugerem que domínios específicos como as regiões codificadas pelos exons 2 e 3 sejam críticas para o "binding" (DEMEYTS *et al.*, 1990). Aminoácidos cistina na subunidade α e na parte extracelular da subunidade β participam da ligação de pontes dissulfetos entre as subunidades α e β . O componente transmembrana da subunidade β é responsável pela transmissão do sinal insulínico para sua região citoplasmática.

Em 1982, deu-se grande avanço na compreensão da transmissão do sinal insulínico, com a descoberta de que a subunidade β do receptor de insulina é uma proteína com atividade quinase, estimulada pela insulina, capaz de se autofosforilar e fosforilar outros substratos em aminoácidos tirosina. De fato, o receptor de insulina é uma enzima, da família das tirosina-quinases. 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 na conformação do receptor e a atividade quinase, na subunidade β , é estimulada (HERRERA & ROSEN 1986; PERLMAN *et al.*, 1989; WHITE *et al.*, 1988). Este fato determina a transferência de grupos fosfato do ATP para vários aminoácidos tirosina do receptor e promove a fosforilação de substratos protéicos intracelulares.

A subunidade β pode ser dividida em quatro partes relacionadas às suas ações: 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), com maior semelhança entre as várias proteínas tirosina-quinases; a região que promove a regulação da atividade quinase e a porção COOH-terminal, onde estão as maiores diferenças entre os receptores de insulina e do “insulin like growth factor-1” (IGF-1) e, por isso, tem sido implicada como responsável pela diferenciação entre os efeitos metabólicos e de crescimento da insulina (TAKATA, 1988). Há, pelo menos, seis locais de fosforilação das tirosinas: área justamembrana com uma tirosina na posição 972; porção média com tirosinas nas posições 1158, 1162 e 1163; e, COOH-terminal com tirosinas nas posições 1328 e 1334 (WHITE *et al.*, 1988).

Consideráveis evidências têm sido acumuladas, indicando que a atividade tirosina-quinase é essencial para a sinalização insulínica (EBINA *et al.*, 1985; ULLRICH *et al.*, 1985; EBINA *et al.*, 1987; WILDEN *et al.*, 1992). A manifestação mais convincente deriva de estudos de mutações *in vitro*, por substituição do aminoácido lisina da posição 1030 do receptor de insulina, por vários outros aminoácidos (metionina, arginina ou alanina). Com base na analogia a outras proteínas da mesma família quinase, este aminoácido é o sítio de ligação do ATP nas quinases (EBINA *et al.*, 1985; ULLRICH *et al.*,

1985). Quando tais mutações são expressas em células, a ligação da insulina ocorre normalmente, porém estes receptores são totalmente inativos como proteínas quinases e são totalmente ineficientes em mediar a ação metabólica da insulina destas células (EBINA *et al.*, 1987). Isto é verdadeiro para todos os efeitos da insulina, incluindo efeitos metabólicos e promotores de crescimento. Mutações, em um dos sítios de autofosforilação (tirosinas 1158, 1161, 1162), produzem efeitos semelhantes, todavia menos intensos (WILDEN *et al.*, 1992).

Embora estudos ocasionais tenham descrito 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 perda da atividade quinase do receptor e redução da resposta biológica. Além do mais, o receptor de insulina possui sítios de fosforilação de serina e treonina, os quais, quando fosforilados, parecem determinar uma diminuição ou inibição da atividade quinase do receptor (BOLLAG *et al.*, 1986). Esta fosforilação em treonina ou serina pode ser estimulada pelo tratamento prolongado com insulina, por ésteres 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, 1988). Esta regulação da atividade quinase do receptor por fosforilações, em aminoácidos distintos, tem um potencial importante como mecanismo de regulação do receptor de insulina, em situações fisiológicas e patológicas.

O mecanismo pelo qual o receptor quinase transmite seu sinal não é completamente compreendido. O modelo aceito atualmente demonstra que há uma cascata de fosforilações onde a insulina induz a autofosforilação do seu receptor, ativando a capacidade tirosina-quinase do mesmo, o qual fosforila um ou mais dos seus substratos intracelulares (WHITE, 1985; BERNIER, 1987; KARASIK *et al.*, 1988; SUN *et al.*, 1991).

O primeiro e mais estudado substrato do receptor de insulina é uma proteína de aproximadamente 185 kDa, denominada pp185, pela sua mobilidade eletroforética (WHITE *et al.*, 1985). Em células transfectadas com o receptor de insulina humano há um marcante aumento da fosforilação desta pp185 coincidente com aumento da ação insulínica (SUN *et al.*, 1991). A fosforilação desta proteína está reduzida em células, expressando receptores

com mutações nos sítios de ligação do ATP e (ou) de autofosforilação, proporcional à redução da ativação da capacidade quinase do receptor (WILDEN *et al.*, 1992). Evidências adicionais da função da pp185, vieram através de achados inesperados, com mutações *in vitro*, no aminoácido tirosina da posição 972 do receptor de insulina. Nesta situação, o receptor apresenta ligação à insulina normal com total ativação da capacidade tirosina-quinase *in vitro*, porém, quando transfectado em células, este receptor mutante não é capaz de fosforilar a pp185 e é incapaz de transmitir o sinal insulínico (WHITE *et al.*, 1988b).

A pp185 foi clonada e denominada substrato 1 do receptor de insulina ou IRS-1 (SUN *et al.*, 1991), e nos últimos dois anos, demonstrou-se que outra proteína também migra nesta banda, que foi então denominada de IRS-2 (TAMEMOTO *et al.*, 1994; ARAKI *et al.*, 1994; SUN *et al.*, 1995). O DNA complementar (cDNA) do IRS-1 prevê uma proteína de 1235 aminoácidos com diversas características interessantes. Primeiro, não há porção transmembrana, é uma proteína de localização citoplasmática. Há uma sequência de aminoácidos compatível com a sequência de ligação para nucleotídeos (ATP ou GTP), embora não haja nenhuma homologia com proteínas quinases conhecidas. Ainda em relação à homologia de sequências de aminoácidos, há múltiplos sítios de fosforilação em serina, treonina e tirosina. São 22 sítios potenciais de fosforilação em tirosina, desses, dez mantêm a sequência YMXM onde Y é o aminoácido tirosina, M é o aminoácido metionina e X corresponde a qualquer aminoácido, três apresentam a sequência YXXM, e um tem a sequência EYYE, onde E é o aminoácido glutamina. A sequência de aminoácidos YMXM não existe no receptor de insulina, porém tem sido observada em várias outras proteínas tirosina-quinases. Nestas proteínas, a sequência YMXM está envolvida em interações não covalentes com moléculas sinalizadoras. Estas moléculas sinalizadoras são caracterizadas pela presença de sequências de aminoácidos, denominada SH2 (homologia 2 ao src) que se ligam às sequências YMXM, quando o aminoácido tirosina está fosforilado (SHOELSON *et al.*; 1992).

Através de estudos *in vivo*, em cultura de células e em sistemas reconstituídos *in vitro*, o IRS-1 fosforilado associa-se a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) ativando-a (BACKER *et al.*, 1992; FOLLI *et al.*, 1992). Demonstrou-se que esta associação

e ativação também ocorrem em dois importantes tecidos insulino-sensíveis de ratos, fígado e músculo, em concentrações fisiológicas de insulina (FOLLI *et al.*, 1992; SAAD *et al.*, 1993). A enzima PI 3-quinase possui duas subunidades, uma catalítica de 110 kDa e outra regulatória de 85 kDa que contêm duas porções SH2 e uma SH3 (CARPENTER & CANTLEY, 1990). A ligação e ativação descritas envolvem as tirosinas fosforiladas do IRS-1 próximas a metioninas, YMXM, e à 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. Ao invés disso, a ativação parece advir como consequência da ligação do IRS-1 à PI 3-quinase.

Estudos recentes demonstram que a associação do IRS-1 com a PI 3-quinase é essencial para o transporte de glicose em tecido muscular (TSAKIRIDIS *et al.*, 1995) e em tecido adiposo (CLARKE *et al.*, 1994), para a síntese de glicogênio e controle do crescimento celular, na maioria dos tecidos (TSAKIRIDIS *et al.*, 1995).

Além da PI 3-quinase, pelo menos três outras proteínas com porção SH2 associam-se ao IRS-1: SH-PTP2, GRB-2 e Nck. Estas associações, potencialmente, podem ter um importante papel no crescimento celular.

Assim sendo, a ação insulínica envolve uma cascata de interações covalentes e não covalentes centralizadas, num primeiro nível, no IRS-1 e IRS-2. A ligação da insulina ao seu receptor, na superfície celular, determina a fosforilação do IRS-1 e IRS-2. Estes servem, então, como proteínas ancoradoras para várias enzimas intracelulares e adaptadores moleculares. Tais ligações determinam múltiplos sinais na cascata da ação insulínica. Como resultado, o IRS-1 e o IRS-2 são pontos importantes nas vias de ação insulínica, que contribuirão para determinar a multiplicidade dos efeitos biológicos finais. Portanto, o estudo da regulação destes, em tecidos hepático e muscular, de modelos animais de resistência à insulina, pode contribuir para a compreensão de mecanismos moleculares pós-receptores de alteração da sensibilidade a este hormônio. Neste sentido, nos últimos 4 anos, demonstraram-se alterações, nestas etapas iniciais da ação insulínica em tecidos

insulino-sensíveis, dos seguintes modelos animais de resistência à insulina: ratos submetidos a jejum prolongado (SAAD *et al.*, 1992), ratos com hipertensão espontânea - SHR (KAHN & SAAD, 1992), tratados cronicamente com dexametazona (SAAD *et al.*, 1993), tratados com GH (THIRONE *et al.*, 1997), tratados agudamente com adrenalina (SAAD *et al.*, 1995 a), tratados agudamente com glucagon (SAAD *et al.*, 1995 b), ratas grávidas (SAAD *et al.*, 1997), ratos urêmicos (MAEDA *et al.*, 1996), ratos septicos (NUNES *et al.*, 1994). Entretanto, ainda não se investigou a regulação destas etapas iniciais da ação insulínica em um modelo animal de resistência à insulina, associada ao envelhecimento.

Procurando caracterizar mecanismos de resistência à insulina em ratos senescentes e utilizando-se ratos com 2, e 20 meses de idade. NISHIMURA *et al.*, 1988, demonstraram que estes apresentavam resistência à insulina com o envelhecimento e que o “binding” de insulina em músculos esqueléticos isolados era semelhante nas diferentes idades estudadas, sugerindo que o defeito celular associado à resistência insulínica do envelhecimento, seria pós-receptor.

Estudos *in vitro* de atividade quinase do receptor de insulina, em direção a substratos exógenos, apresentaram resultados tecido-específicos e dependentes do substrato exógeno utilizado. CARRASCOSA *et al.*, 1989, usando receptores isolados de adipócitos de ratos, demonstraram uma diminuição da autofosforilação destes receptores, induzida pela insulina e concomitante diminuição da fosforilação do substrato histona em animais com 24 meses de idade, comparados a ratos com 3 meses. KONO *et al.*, 1990, usando receptores isolados de músculo esquelético e fígado de ratos demonstraram que, nos receptores de tecido hepático, não foram detectadas alterações de autofosforilação, induzida pela insulina, ou fosforilação nos substratos utilizados e, nos receptores isolados do tecido muscular, houve diminuição da fosforilação do substrato exógeno utilizado, poli(Glu⁴Tyr¹) nos animais com 20 meses. BARNARD *et al.*, 1992, utilizando da mesma forma receptores isolados de tecido muscular, obtiveram resultado semelhante. Entretanto, esses estudos acima descritos utilizaram metodologia *in vitro* e substratos exógenos para avaliação do receptor de insulina. Embora informativa, essa metodologia é sujeita a artefatos bioquímicos e os resultados podem não corresponder aos fenômenos *in vivo*.

Dentro deste contexto, o primeiro objetivo deste trabalho foi estudar *in vivo* o efeito do envelhecimento em ratos, nos níveis teciduais e no grau de fosforilação do receptor de insulina, dos substratos endógenos IRS-1 e IRS-2 e na associação IRS-1/PI 3-quinase e IRS-2/PI 3-quinase em fígado e músculo destes animais, antes e após o estímulo insulínico agudo.

Efeito do captopril nas etapas iniciais da ação insulínica

O inibidor da enzima conversora da angiotensina, captopril, tem sido descrito como eficaz não só no tratamento de hipertensão arterial mas também na melhora da sensibilidade insulínica em diferentes situações de resistência a este hormônio (JAUCH *et al.*, 1987; FERRANNINI *et al.*, 1987; PACHECO *et al.*, 1990; PAOLISSO *et al.*, 1991; BERNE, 1991; NATALI *et al.*, 1991; DONNELLY, 1992; NEVES *et al.*, 1994; HENRIKSEN & JACOB, 1995; HERINGS *et al.*, 1995; HENRIKSEN *et al.*, 1996; ZANELLA *et al.*, 1996).

Diversos estudos em pacientes com hipertensão arterial sistêmica (HAS) essencial e(ou) diabetes mellitus não-insulino dependente (DMNID) têm relatado que os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) interferem sobre o metabolismo intermediário, levando a uma melhora da homeostasia de carboidratos e do perfil lipídico (BERNE, 1991; LITHELL *et al.*, 1990).

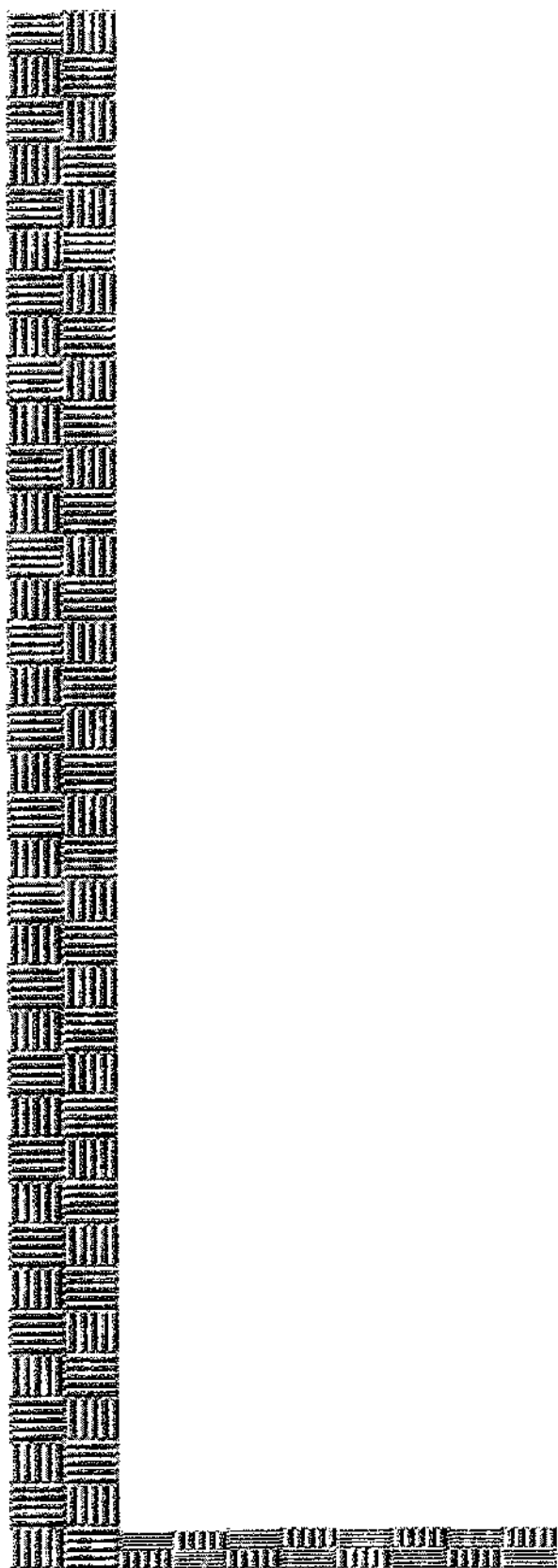
Nos pacientes com HAS essencial fazendo uso dos IECA observa-se, uma redução da glicemia de jejum e, em estudos de “clamp” euglicêmicos de insulina, um aumento na sensibilidade à insulina tanto em nível hepático quanto muscular. Nestes indivíduos foi observada uma redução na resposta tardia (30 a 90 min.) da insulina, com elevação no pico precoce (2 a 6 min.) ao teste da tolerância à glicose venosa (TTGiv). Adicionalmete a concentração plasmática de glicose diminuiu nos últimos 60 minutos do teste (BERNE, 1991; LITHELL *et al.*, 1990). E ainda, alguns estudos mostraram que o

captopril atenua a hiperglicemia induzida pelos tiazídicos, bem como outras de suas alterações metabólicas adversas (BERNE, 1991).

Em pacientes com DMNID associada ou não à HAS em uso de IECA foram relatados uma redução pequena nas concentrações da glicose de jejum, pós-prandial e média diária, bem como da fração A1c da glico-hemoglobina (BERNE, 1991; KODOMA *et al.*, 1990). Nestes mesmos pacientes foi identificado um aumento na utilização da glicose corporal e (ou) pelos músculos esqueléticos (UEHARA *et al.*, 1994). Este efeito também foi observado em indivíduos normais (GANS *et al.*, 1991).

Em modelo animal de resistência à insulina como o rato Zucker, o captopril também aumenta a sensibilidade à insulina. Entretanto, o efeito desta droga na resistência à insulina em outros modelos animais como o envelhecimento, não foi investigado ainda.

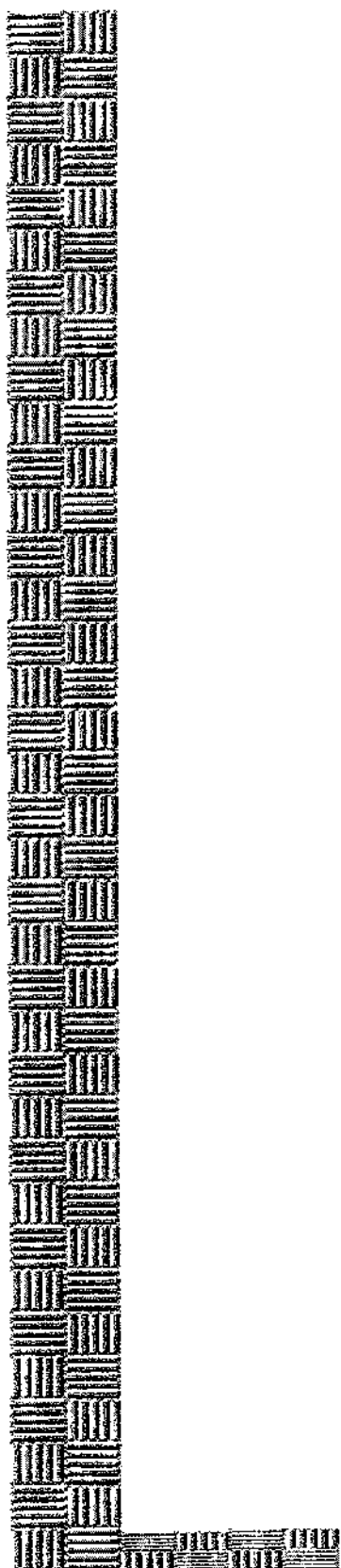
Diante deste fato o outro objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do captopril na sensibilidade periférica à insulina e no grau de fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1 bem como a associação IRS-1/PI 3-quinase induzida pela insulina, em fígado e músculo esquelético de ratos senis (20 meses).



2. Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram:

- Estudar o nível tecidual e o grau de fosforilação após o estímulo insulínico do receptor de insulina, do IRS-1 e do IRS-2, bem como a associação destes substratos com a PI 3-quinase em fígado e músculo de ratos com 2, 5, 12 e 20 meses de idade.
- Estudar o efeito do captopril sobre o grau de fosforilação do IRS-1 e sua associação com a PI 3-quinase em fígado e músculo de ratos senis (20 meses de idade).



3. Material e Métodos

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, variedade albina) da linhagem *Wistar-Hannover*, machos, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, Campinas-SP. Após o desmame, os animais receberam como alimentação ração para ratos Labina, marca Purina, que contém 0,3 a 0,5g de sódio/100g de ração (85% do sódio na forma de Cloreto de Sódio) e 0,75 g de potássio/100g de ração, superior, portanto, ao nível mínimo recomendado para se promover crescimento e reprodução dos animais que é de 0,05g/% (REEVES, NIELSEN, HAHEY, 1993). Foram divididos em 4 grupos pela faixa etária, com 2, 5, 12 e 20 meses de idade.

Uma semana antes de qualquer experimento, os animais foram acomodados em gaiolas plásticas, contendo, cada uma, no máximo cinco espécimes, e mantidos em condições de fotoperíodo (12 x 12h), com ração e água fornecidos *ad libitum*. Permaneceram em jejum noturno, por 12 - 14 horas, prévias aos experimentos.

Foram, então, realizadas as séries de experimentos, a saber: (1) ratos com 2 meses x demais idades (5, 12 e 20 meses); (2) ratos senis (20 meses) tratados ou não com captopril, tratados ou não com losartan e tratados ou não com bradicinina. Em cada série, foram estudados animais estimulados (+) ou não (-) com insulina regular.

As soluções empregadas nos diversos experimentos estão descritas a seguir.

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Tampão de extração A (extrato total):

Utilizado para a extração das proteínas celulares dos tecidos estudados. Contém: Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100 mM, SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, EDTA (Ácido etileno-diamino tetracético) 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM e ortovanadato de sódio 10 mM.

3.1.2. Tampão de Laemmli (5X):

Para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida. Contém: Azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50%, SDS 10%.

3.1.3. Solução Tampão para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE):

Empregada para a realização da eletroforese no SDS-PAGE. Para uso, a solução deve ser diluída 1:4. Contém: Trisma base 200 mM, glicina 1,5 M, EDTA 7 mM, SDS 0,4%.

3.1.4. Solução tampão para transferência:

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

3.1.5. Solução tampão para SDS-PAGE, Gel de resolução (“resolving”):

Empregada para a manufatura do SDS-PAGE, gel de resolução, um tampão composto de : EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 750 mM e tem o pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

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

Utilizada na confecção do SDS-PAGE, fase de empilhamento das proteínas. Contém: EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 50 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

3.1.7. Solução Basal:

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

3.1.8. Solução bloqueadora:

Utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose, após a transferência. Contém: 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02% dissolvidos em solução basal.

3.1.9. Solução tampão de extração B, para imunoprecipitação:

Para a extração de proteínas, para imunoprecipitação dos tecidos estudados. Contém: Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM (diluído em álcool etílico), triton X 100 1%, 0,1 mg/ml de aprotinina. Esta solução deve ser mantida a quatro graus. O ortovanadato, PMSF e a aprotinina devem ser acrescentados no momento do uso.

3.1.10. Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado:

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

3.1.12. Solução para anticorpos:

Solução contendo os anticorpos específicos que marcarão as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal. Os anticorpos utilizados foram os seguintes, nas diluições indicadas: anticorpo antifosfotirosina, diluído 1:200; anticorpo anti-receptor de insulina e anti-IRS-1, diluídos cada um 1:100 e anticorpo anti-PI 3-k, diluído 1:2000.

3.1.14. Solução com proteína A marcada com 125 I:

Contém a proteína A com Iodo 125 para a marcação dos anticorpos específicos, prestando-se à visualização em auto-radiografia. Contém 0,1% de leite desnatado, dissolvido em solução basal, com 2 μ Ci de proteína A I 125 (30 μ Ci/ μ g), fornecida pela *Armstrong UK*.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Procedimentos com animais para a extração das proteínas teciduais, após estímulo insulínico *in vivo*:

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental sódico, na dose de 25mg/100g de peso, e utilizados após a abolição dos reflexos corneano e retirada da pata à dor.

A veia porta foi exposta por laparotomia mediana e a incisão ampliada para expor a musculatura da pata traseira. Em 1/3 dos animais de cada grupo foi injetada na veia porta 0,5 ml de solução salina 0,9 % e nos 2/3 restantes foi injetada solução salina, contendo 1,5U de insulina regular ou 60 μ g de insulina.

SAAD *et al.*, 1992 demonstraram que a fosforilação máxima do IRS-1, após a infusão com insulina na veia porta, dava-se entre 30 e 60 segundos, no fígado, e entre 1 e 4

minutos em músculo, a concentrações de 6 e 60 µg de insulina, respectivamente. Uma vez que usamos os tempos descritos acima, nossas amostras foram colhidas no pico do evento de fosforilação.

Aos 30 segundos da injeção, foi retirado um fragmento de fígado com cerca de 1 cm de diâmetro. O fragmento foi imediatamente colocado no tampão de extração A, que já estava em banho-maria fervente, homogeneizado com o “polytron” e mantido no banho-maria por mais 10 minutos. Noventa segundos após a injeção, retirou-se um fragmento de músculo gastrocnêmio com cerca de 0,5 cm de diâmetro, e trabalhado da mesma forma.

A seguir fez-se a toracotomia para coleta de sangue, por punção direta do coração, para dosagem de glicemia e insulinemia basais, nos animais que não receberam insulina.

O material extraído e homogeneizado, após fervura, foi mantido em gelo para o transporte, centrifugado a 12.000 rpm por 40 minutos, a 4°C, para a remoção do material insolúvel, e o sobrenadante foi estocado em tampão de Laemmli, contendo 200 mM de DTT em uma proporção de 5:1, até a fase seguinte. Outra pequena porção do sobrenadante foi utilizada para quantificação da concentração protéica de cada amostra, através do método de biureto.

3.2.2. “Immunoblotting” ou “Westernblotting”:

Duzentos microgramas de extrato tecidual, por amostra, foram aplicados no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 2 mm de espessura, balizado por marcador de alto peso molecular da *Bio Rad* que contém: miosina (205 kDa), β galactosidade (116 kD), BSA (85 kDa) e ovalbumina (47 kDa). Realizou-se a eletroforese em cuba de minigel da *Bio Rad*, com solução tampão previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 25 volts por 2 horas e depois a 120 volts por mais 2 horas. A seguir, as proteínas, separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento

de eletrotransferência do minigel da *Bio Rad*, que foi mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas, como o descrito por TOWBIN, STAEHLIN, GORDON, 1979.

Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução bloqueadora, por duas horas, à temperatura ambiente, lavadas com solução basal por três sessões, de dez minutos. Em seguida, incubadas com anticorpo específico por 4 horas à temperatura ambiente, e novamente lavadas com solução basal, e então incubadas com a proteína A, marcada com I^{125} por duas horas. O excesso de proteína A foi lavado com solução basal e então as membranas foram expostas ao filme de RX (Eastman Kodak, Rochester, NY) com intensificador (Cronex Lightning Plus intensifying screens - DuPont, Wilmington, DE). O cassete foi mantido à temperatura de -80°C e, em média, após 12 a 48 horas, o filme foi revelado de forma convencional.

Após a revelação das auto-radiografias e visualização das bandas, estas foram submetidas à densitometria óptica (densitômetro modelo GS 300, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA), e suas áreas foram quantificadas. Com estes dados, realizou-se a análise estatística dos diferentes grupos, através da comparação das bandas obtidas. Os resultados finais foram a variação percentual entre os ratos considerados controles e demais grupos de ratos.

3.2.3. Imunoprecipitação:

Em alguns experimentos, os tecidos estudados foram extraídos e homogeneizados no tampão de extração B, em banho de gelo, e mantido nesta temperatura durante todo o processo. Após centrifugação por 25 min, a 12.000 rpm a 4°C , foi usado o sobrenadante para imunoprecipitação com anticorpos anti-receptor de insulina ou anti-IR, anti-IRS-1 e anti-IRS-2. Os volumes das amostras foram normalizados por concentração protéica e os volumes de cada anticorpo aplicado foi fixo ($10\mu\text{l}$ /amostra). As amostras ficaram incubando por 12-14 horas, a 4°C , acrescentando-se, a seguir, $50\mu\text{l}$ de proteína A-Shepharose 6MB, e após mais duas horas, os precipitados foram coletados em

centrifugação de 12000 rpm, a 4°C, por 15 minutos. Os precipitados foram lavados por 3 vezes com tampão específico.

As proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) contendo 100 mM de DTT, aquecidas em água fervente por 4 minutos, e então submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 6%. O procedimento segue as etapas já descritas anteriormente. Nestes experimentos de imunoprecipitação, os anticorpos utilizados para incubar as membranas foram o antifosfotirosina e o anti-PI 3-quinase.

3.2.4. Tratamento dos animais com inibidores da enzima conversora da angiotensina, com o bloqueador do receptor de angiotensina II e com a bradicinina:

Ratos senis (20 meses) receberam 2 mg/kg de peso de captopril, ou 15 mg/kg de peso de losartan, ou 100 µg de bradicinina.

O Captopril e o losartan foram administrados aos ratos através de sonda orogástrica (gavagem), em duas vezes; a primeira, 6 horas pré-experimento e a segunda, 1 hora pré-experimento. A bradicinina foi injetada, intraperitonealmente, em tempos descritos a seguir.

3.2.5. Outros:

Avaliação da ação insulínica através do teste de tolerância à insulina (ITT) curto:

Animais com 2 e 20 meses de idade foram submetidos ao teste endovenoso de tolerância à insulina. Os testes foram realizados pela manhã, após jejum noturno de 12 a 14 horas. Os animais foram anestesiados, em seguida tiveram coletada pequena amostra de sangue por secção da cauda e receberam 60 µg de insulina regular na veia peniana. A partir de então houve coleta seriada de amostras de sangues, aos 4, 8, 12 e 16 minutos após a

infusão. Estas amostras foram desproteinizadas em ácido tricloro acético, e após centrifugação, foram determinadas as glicemias pelo método descrito abaixo.

A velocidade de desaparecimento da glicose (K_{it}) foi calculada pela fórmula $\ln 2/t_{1/2}$. 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).

Dosagem da glicemia:

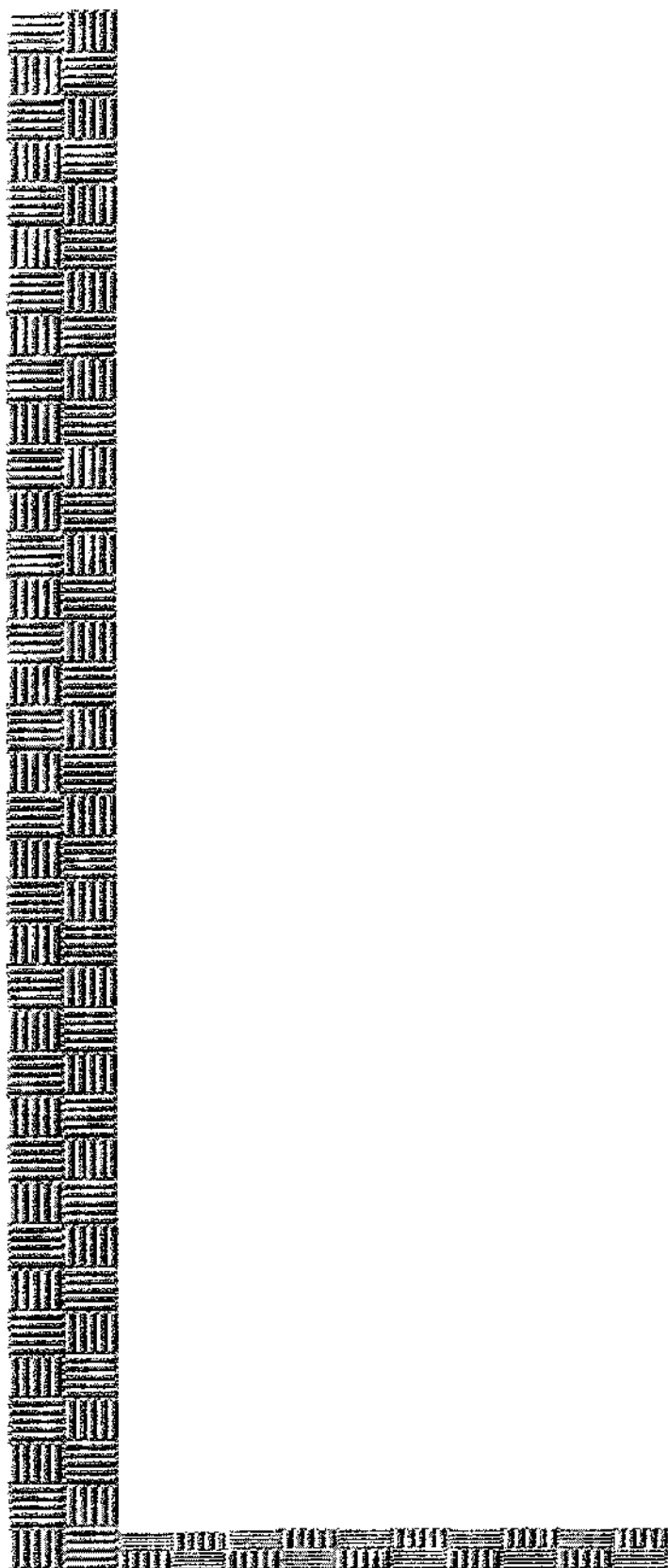
A determinação da glicose plasmática ou glicose sanguínea foi realizada através de método enzimático colorimétrico, segundo TRINDER, 1969 (Glicose E enzimática, Reactoclin) (HENRY, CANNON, WINKILMAN, 1974; LOTT & TURNER, 1975) e os resultados expressos em mg/dl.

Dosagem da insulina plasmática:

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

Análise estatística:

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



4. Resultados

4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS:

As características gerais dos animais utilizados nos diferentes experimentos são apresentadas na tabela 1. As determinações de glicose plasmática e insulina sérica descritas a seguir foram coletadas de animais em jejum de 12-14 horas.

Os animais dos grupos com 5, 12 e 20 meses de idade apresentaram pesos significativamente maiores que o grupo controle de 02 meses (TABELA 01). O nível de glicemia de jejum foi semelhante em todos os animais (TABELA 02), enquanto a insulina sérica foi discretamente maior com o envelhecimento dos animais, somente com diferença significativa entre os grupos com 2 e 20 meses de idade (2 m: $29 \pm 4 \mu\text{U/ml}$ x 20 m: $44 \pm 5 \mu\text{U/ml}$, $p < 0,01$) (FIGURA 2).

A discriminação dos valores relatados acima estão nos ANEXOS 1 e 2.

4.1.2. Caracterização da sensibilidade à insulina - velocidade de desaparecimento da glicose (K_{it}) nos animais com 2 e 20 meses:

A FIGURA 1 mostra, graficamente, a velocidade de desaparecimento da glicose (K_{it}), durante o teste de tolerância à insulina curto, realizado nos primeiros 16 minutos após a infusão do hormônio, nos animais com 2 e 20 meses de idade. O K_{it} mostrou-se significativamente menor nos animais com 20 meses, quando comparado aos controles jovens (2 meses) (velhos: $2,29 \pm 0,63$ vs jovens: $4,55 \pm 0,34\%/min$, $p < 0,001$).

A discriminação dos valores relatados acima está no ANEXO 3.

4.2. EFEITO DO ENVELHECIMENTO NAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA:

4.2.1. Efeito do envelhecimento na regulação do receptor de insulina, do IRS-1, do IRS-2 e na associação IRS-1/PI 3-quinase e IRS-2/PI 3-quinase em tecido hepático de ratos:

Não houve alteração no nível protéico do receptor de insulina, como determinado pelo “immunoblotting”, com anticorpo contra a porção terminal-carboxil do

receptor de insulina (FIGURA 3A). A análise, por densitometria ótica de oito experimentos, mostra que os níveis teciduais de receptor de insulina nos animais com 5, 12 e 20 meses foi de $90\pm 11\%$, $105\pm 10\%$ e $95\pm 19\%$, respectivamente, em relação aos animais controle com 2 meses de idade

Utilizando anticorpos anti-IRS-1 (FIGURA 3B), foi possível a visualização e posterior quantificação desta proteína nos fragmentos hepáticos dos animais com as diferentes idades. O nível tecidual do IRS-1 foi semelhante nos diferentes grupos etários ($100\pm 8\%$, $120\pm 14\%$ e $80\pm 12\%$, animais com 5, 12 e 20 meses respectivamente) (FIGURA 5A). De maneira semelhante, os níveis teciduais da proteína fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) determinado através de “immunoblotting” com o anticorpo específico (PI 3-quinase, fração regulatória p85), não apresentaram diferenças nos grupos estudados (FIGURA 3C).

A FIGURA 4 demonstra o efeito da insulina sobre a fosforilação em tirosinas de proteínas celulares do tecido hepático de ratos normais, jovens (2 meses) e velhos (20 meses). No estado basal, uma banda ampla, com peso molecular entre 110 e 130 kDa, foi observada. Esta banda foi inicialmente descrita como sendo a proteína quinase de adesão focal (FAK) e seu comportamento, após a estimulação insulínica, já foi descrito (YAMAUCHI *et al.*, 1995). Entretanto, como não é possível excluir a possibilidade de que outras proteínas fosforiladas em tirosina possam também migrar nesta ampla banda, ela será denominada, genericamente, de pp120. O grau de fosforilação basal da pp120 foi menor ($63\pm 7\%$, $p<0,05$) nos ratos de 20 meses quando comparado com ratos jovens. Após o estímulo insulínico as alterações foram inconsistentes em ambos os grupos. Uma banda de 95 kDa fica evidente no “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina, após infusão de insulina na veia porta. KASUGA *et al.*, 1982a, 1982b, 1982c, demonstraram que esta banda corresponde à subunidade β do receptor de insulina. Após o estímulo insulínico, há o aparecimento de outra banda, que migra entre 165 e 185 kDa, denominada de pp 185. Esta banda foi identificada como contendo o substrato I do receptor de insulina (IRS-1) (ROTHENBERG *et al.*, 1991). SUN *et al.*, 1995 descreveram outra proteína migrando

nesta ampla banda, que possui cerca de 70% de homologia com o IRS-1 e foi denominada IRS-2.

O grau de fosforilação do receptor de insulina mostrou uma diminuição discreta, mas progressiva para $94\pm7\%$, $89\pm11\%$ e $66\pm7\%$ ($p<0,05$) nos animais com 5, 12 e 20 meses, respectivamente, em relação aos controles de 2 meses (FIGURA 5).

A pp185 apresentou, após o estímulo insulínico, uma diminuição progressiva em seu grau de fosforilação para $70\pm9\%$ ($p<0,001$), $47\pm10\%$ ($p<0,001$) e $34\pm9\%$ ($p<0,001$) respectivamente nos animais com 5, 12 e 20 meses (FIGURA 5).

Para a confirmação de que a diminuição do grau de fosforilação da pp 185, após o estímulo insulínico, deu-se pela redução no grau de fosforilação do IRS-1 e (ou) do IRS-2, foram realizados experimentos de imunoprecipitação com anticorpos específicos contra estas proteínas. Assim amostras de fígado dos animais com 2 e 20 meses foram imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1 e anti-IRS-2, e os “immunoblottings” realizados com anticorpos antifosfotirosina (FIGURAS 6A e 7A). O grau de fosforilação do IRS-1 e do IRS-2 após estímulo insulínico diminuiu significativamente para $39\pm9\%$ ($p<0,001$) e $55\pm12\%$ ($p<0,001$) respectivamente (FIGURA 8).

Estudos anteriores (BACKER *et al.*, 1992; FOLLI *et al.*, 1993; ARAKI *et al.*, 1994; GIORGETTI *et al.*, 1993; HADARI *et al.*, 1992; LAVAN *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 destas proteínas. Desta forma, as membranas de nitrocelulose, que continham amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, foram incubadas com anticorpos contra a subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase (FIGURA 6B). Foi detectada uma discreta banda correspondente à PI 3-quinase, no estado basal, tanto dos animais controle quanto dos animais senis. Após a estimulação com insulina, a intensidade desta banda aumentou visivelmente nos animais controle jovens, de forma consistente, com a formação de uma associação estável entre IRS-1 e PI 3-quinase. Nos animais senis, esta banda não mostrou

variação em relação ao seu basal. A comparação das bandas estimuladas pela insulina, entre os animais com 2 (jovens) e 20 (senis) meses, revelou que a quantidade de PI 3-quinase associada ao IRS-1 estava significativamente reduzida para $27\pm14\%$ ($p<0,01$) nos animais senis (FIGURAS 6B e 8). Enquanto que a associação IRS-2/PI 3-quinase não se alterou ($100\pm21\%$) (FIGURAS 7B e 8).

A discriminação dos valores acima relatados encontra-se nos ANEXOS 4-9 A.

4.2.2. Efeito do envelhecimento na regulação do receptor de insulina, do IRS-1, do IRS-2 e na associação IRS-1/PI 3quinase e IRS-2/PI 3quinase em músculo de ratos:

Como em tecido hepático, o envelhecimento não produziu mudanças no nível protéico do receptor de insulina, no tecido muscular (FIGURA 9A). Os dados de oito experimentos podem ser observados na FIGURA 11A e demonstram variações de $104\pm14\%$, $96\pm13\%$, $98\pm21\%$, para os animais com 5, 12 e 20 meses, respectivamente, em comparação com os animais controle (2 m).

De maneira contrastante ao que foi observado no tecido hepático quanto ao nível tecidual de IRS-1, houve uma drástica e precoce diminuição desta proteína em tecido muscular de animais adultos jovens (FIGURA 9B). Em uma média de oito experimentos, a quantidade de IRS-1 nos grupos de 5, 12 e 20 meses foi de $51\pm9\%$ ($p<0,001$), $60\pm11\%$ ($p<0,001$) e $45\pm5\%$ ($p<0,001$), respectivamente (FIGURA 11), em comparação aos controles.

Os níveis teciduais da proteína PI 3-quinase, determinados através de “immunoblotting” com o anticorpo específico (PI 3-quinase, fração regulatória p85), não apresentaram diferenças nos grupos estudados (FIGURA 9C), de maneira similar ao tecido hepático.

A FIGURA 10 demonstra o efeito da insulina sobre a fosforilação em tirosinas de proteínas celulares do tecido muscular de ratos jovens (2 meses) e velhos (20 meses). No

estado basal, a banda com peso molecular entre 110 e 130 kDa (pp120) foi observada e apresentou mudanças inconsistentes quando analisada entre os grupos. Após infusão de insulina na veia porta, a banda de 95 kDa (subunidade β do receptor de insulina) foi evidenciada no “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina, bem como a banda denominada pp185, que contém os substratos 1 e 2 do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2).

O grau de fosforilação do receptor de insulina apresentou variações não significativas para $89\pm13\%$, $72\pm7\%$ e $92\pm19\%$ nos animais com 5, 12 e 20 meses, respectivamente, em relação aos controles de 2 meses (FIGURAS 10B e 11).

A pp 185 apresentou, após o estímulo insulínico, uma diminuição significativa no seu grau de fosforilação nos animais, ($53\pm5\%$, $p<0,001$ e $28\pm7\%$, $p<0,001$, respectivamente nos animais com 12 e 20 meses) (FIGURA 11).

De maneira semelhante ao realizado com o tecido hepático, foram feitos experimentos de imunoprecipitação com anticorpos específicos, anti-IRS-1 e anti-IRS-2. Assim amostras de músculo dos animais com 2 e 20 meses foram imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1 (FIGURA 12) e anti-IRS-2 (FIGURA 13) e os “immunoblottings” realizados com anticorpo antifosfotirosina (A). O grau de fosforilação do IRS-1 e do IRS-2, após estímulo insulínico, diminuiu significativamente em animais com 20 meses para $13\pm2\%$ ($p<0,01$) e $10\pm3\%$ ($p<0,05$) respectivamente (FIGURA 14).

Para avaliar a associação da subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase com o IRS-1, as membranas, cujas amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 ou anti-IRS-2, foram incubadas com anticorpo anti-PI 3-quinase (FIGURA 12B). De forma semelhante ao ocorrido com o tecido hepático, houve o aparecimento de uma banda após o estímulo insulínico, nos animais com 2 e 20 meses, sendo evidente a banda nos animais jovens e praticamente inexpressiva nos animais senis. Em um total de quatro experimentos, a quantidade de PI 3-quinase associada ao IRS-1, após estímulo insulínico, encontrou-se reduzida para $20\pm10\%$ ($p<0,005$), sugerindo, desta forma, uma associação muito menor entre IRS-1/PI 3-quinase nos ratos senis (FIGURA 14). E a associação

IRS-2/PI 3-quinase, de maneira diferente do tecido hepático, foi reduzida para $50\pm 21\%$ ($p<0,05$), nos animais senis (FIGURAS 13B e 14).

A discriminação dos valores acima relatados encontra-se nos ANEXOS 4-9 B.

4.3. EFEITO AGUDO DO CAPTOPRIL NAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA EM RATOS SENESCENTES:

4.3.1. Caracterização da sensibilidade à insulina - velocidade de desaparecimento da glicose (K_{it}) nos animais com 20 meses, que receberam captopril:

Não houve diferenças entre os níveis plasmáticos de glicose de jejum entre os ratos jovens e velhos. A administração aguda de captopril aos animais idosos não mudou os níveis de glicose plasmática. A FIGURA 15 mostra a velocidade de desaparecimento da glicose (K_{it}) durante o teste de tolerância à insulina (ITT) curto, que foi menor nos ratos idosos, quando comparados aos jovens (velhos: $2,29\pm 0,63$ vs jovens: $4,55\pm 0,34$ %/min, $p<0,01$). Após a administração de captopril aos ratos idosos, houve um aumento significativo da sensibilidade à insulina, com o K_{it} quase atingindo valores de ratos jovens (velhos: $2,29\pm 0,63$ vs velhos + inibidor da ECA: $4,65\pm 0,69$ %/min $p<0,05$). (FIGURA 15).

A discriminação dos valores acima relatados encontra-se nos ANEXOS 1-3.

4.3.2. Efeito agudo do captopril na fosforilação do receptor de insulina, do IRS-1 e na associação IRS-1/PI 3quinase em fígado e músculo de ratos senis (20 meses).

Ratos idosos que receberam ou não captopril foram injetados com insulina ou solução salina e após 30 e 90 segundos tiveram fragmentos do fígado (FIGURAS 16-19) e do músculo gastrocnêmio (FIGURAS 20-23), respectivamente, retirados, homogeneizados e imunoprecipitados conforme descrição anterior. Os extratos foram imunoprecipitados com anticorpos anti-receptor de insulina (FIGURAS 16 e 20) ou anti-IRS-1 (FIGURAS 18 e 22)

e, subseqüentemente, submetidos à eletroforese em gel, sob condições redutoras, e transferidos para membranas de nitrocelulose. Estas membranas foram então incubadas com anticorpos anti-receptor de insulina, anti-IRS-1, antifosfotirosina e anti-PI 3-quinase.

Houve um aumento no grau de fosforilação induzido pela insulina, na subunidade β do receptor de insulina, no fígado (FIGURA 16B) e músculo (FIGURA 20B) de ratos tratados com captopril. A análise por densitometria óptica quantificou um aumento de $462 \pm 253\%$ ($p < 0,05$) no fígado e de $697 \pm 78\%$ ($p < 0,001$) no músculo (FIGURAS 17 e 21). Não houve mudanças na quantidade tecidual do receptor e insulina.

Nas amostras que foram imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e incubadas com anticorpo antifosfotirosina, após o tratamento com captopril, houve mudanças no grau de fosforilação do IRS-1, observadas tanto no basal quanto após estímulo insulínico no fígado (FIGURA 18B). Antes do estímulo insulínico, ou seja em situação basal, o grau de fosforilação do IRS-1 foi aproximadamente 170% maior no grupo de ratos tratados com captopril do que nos ratos controles, e após o estímulo insulínico, o grau de fosforilação do IRS-1 aumentou para $250 \pm 17\%$ ($p < 0,001$) no fígado (FIGURAS 18B e 19) e $280 \pm 50\%$ ($p < 0,05$) no músculo (FIGURAS 22B e 23). Como há uma interação de alta afinidade entre o IRS-1 e a subunidade regulatória de 85 kDa da PI 3-quinase (BACKER *et al.*, 1992; FOLLI *et al.*, 1993; ARAKI *et al.*, 1994; GIORGETTI *et al.*, 1993; HADARI *et al.*, 1992; LAVAN *et al.*, 1992; KELLY & RUDERMAN, 1993) as membranas que continham as amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 foram incubadas com anticorpo anti-PI 3-quinase, para avaliação do grau de associação entre estas duas proteínas. Houve uma banda discreta na situação basal nos ratos controles, entretanto, nos ratos tratados, tal banda foi aproximadamente 200% maior, em concordância com o aumento no grau de fosforilação do IRS-1. Após o estímulo insulínico, a intensidade desta banda não mudou no grupo controle, enquanto que, no grupo tratado com captopril uma banda muito evidente foi observada. Comparações entre as bandas estimuladas pela insulina revelaram que a quantidade de PI 3-quinase associada ao IRS-1 aumentou para $305 \pm 20\%$ ($p < 0,001$) no fígado (FIGURAS 18C e 19) e $267 \pm 48\%$ ($p < 0,05$) no músculo (FIGURAS

22C e 23) de ratos tratados com captopril, como demonstrados pela análise por densitometria óptica.

4.5.1. Efeito do bloqueador do receptor 1 de angiotensina (AT1) - losartan:

Com o objetivo de investigar qual dos efeitos da inibição da enzima conversora da angiotensina, pelo captopril, estaria envolvido no aumento observado do grau de fosforilação do IRS-1, nestes animais, realizamos experimentos, tratando agudamente ratos com o losartan, um antagonista competitivo do receptor de angiotensina (AT1). Os ratos senis que receberam o losartan oralmente, foram submetidos ao mesmo protocolo já descrito. Os extratos de tecido hepático e tecido muscular foram imunoprecipitados com anticorpo anti-IRS-1 e, imediatamente, submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida, e as proteínas separadas, transferidas para em membranas de nitrocelulose. Estas membranas foram então incubadas com anticorpo antifosfotirosina (FIGURA 24). A análise de quatro experimentos mostrou que o grau de fosforilação do IRS-1, após o estímulo insulínico, foi de $110 \pm 30\%$ no tecido hepático e $110 \pm 21\%$ no tecido muscular dos ratos tratados agudamente com losartan, quando comparados com os controles (FIGURA 25).

4.5.2. Efeito da bradicinina sobre a fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1 no fígado e músculo de ratos senis.

Os inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) não somente bloqueiam a conversão da angiotensina I em II, mas também bloqueiam a degradação da bradicinina. Para melhor investigar se os efeitos potencializadores do captopril sobre o grau de fosforilação do IRS-1 podem ser mediados pela bradicinina, alguns experimentos foram realizados, injetando-se bradicinina e a seguir estudando-se o grau de fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1 em fígado e músculo de ratos senis.

Cinco minutos após a administração de bradicinina, o nível de fosforilação induzida pela insulina do receptor de insulina e do IRS-1 em músculo, aumentou aproximadamente para 11 e 7 vezes, respectivamente, em relação ao basal. O grau de fosforilação destas proteínas aumentou progressivamente a um máximo de 30 vezes, para ambas as proteínas, após exposição à bradicinina por 30 minutos (FIGURAS 26 e 27). No fígado, os resultados foram semelhantes, embora menos evidentes, com um aumento do grau de fosforilação do IRS-1 de 3 vezes, após 30 minutos da infusão de bradicinina (FIGURA 28).

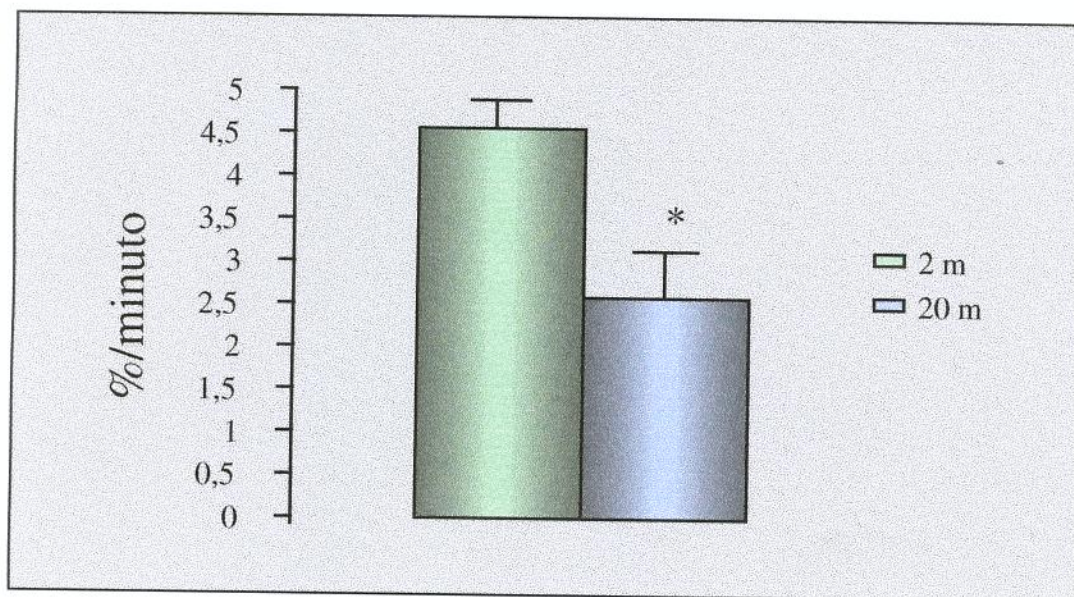


Figura 1: Velocidade de desaparecimento da glicose (Kitt) em ratos com 2 e 20 meses. Os animais foram submetidos ao teste de tolerância endovenosa à insulina (6 μ g de insulina) e as amostras foram coletadas nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção de insulina. O itt foi calculado como descrito em Métodos e os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

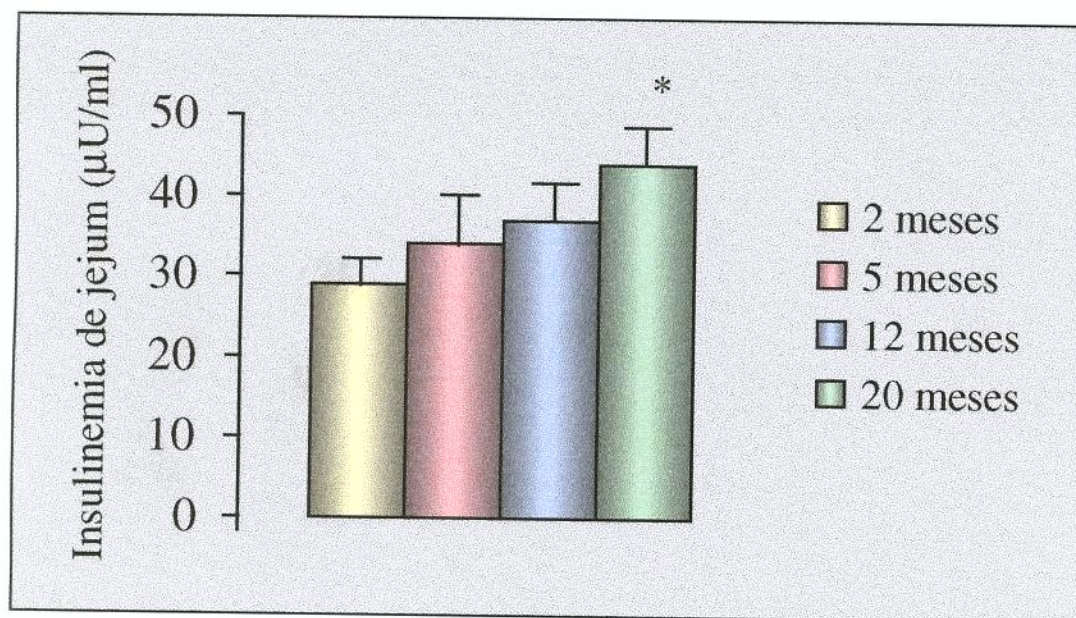
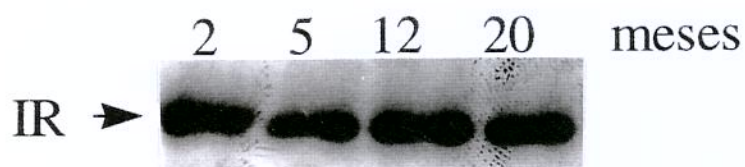
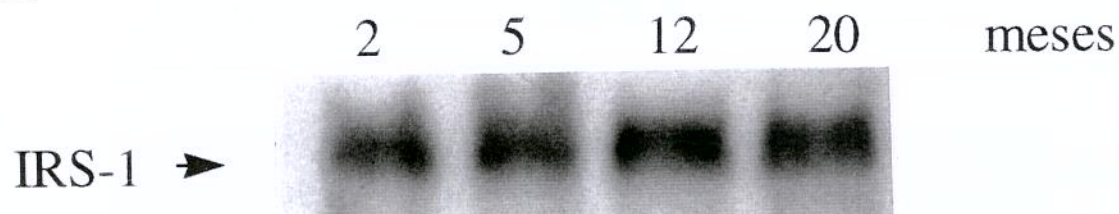


Figura 2: Médias das insulinas séricas de jejum de animais com 2, 5, 12 e 20 meses de idade. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

A.



B.



C.

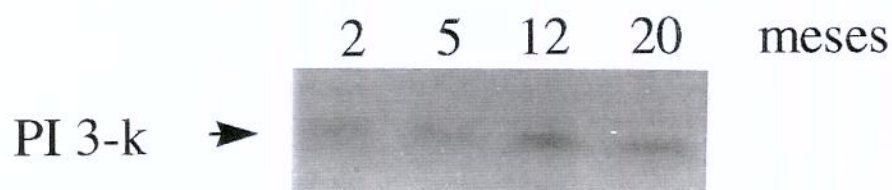


Figura 3: Avaliação do nível proteico do receptor (IR), do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e da PI 3-quinase (PI 3-k), em tecido hepático de ratos com 2, 5, 12 e 20 meses de idade. As proteínas foram extraídas em tampão, separadas em gel e, após transferência para membrana de nitrocelulose, foi realizado "immunoblotting" com anticorpos específicos e ¹²⁵I-proteína A. O "immunoblotting" foi realizado com anticorpos (A) anti-receptor de insulina (IR), (B) anti-IRS-1 e (C) anti-PI 3-k.

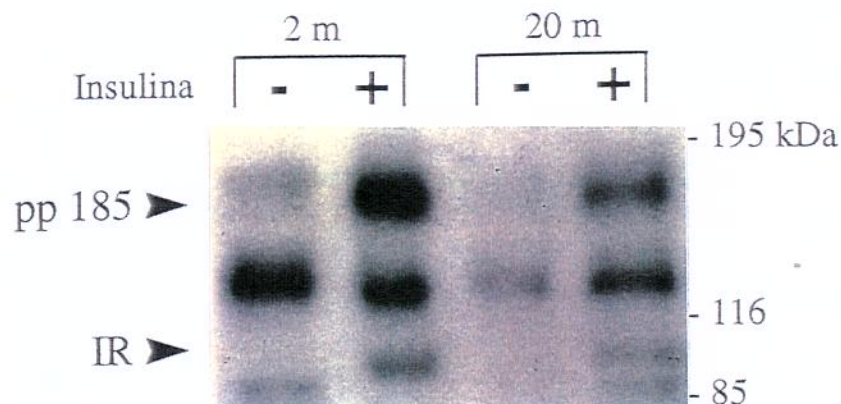


Figura 4: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina antes (-) e após (+) o estímulo com insulina, do receptor (IR) e da pp 185, em tecido hepático de ratos com 2 e 20 meses de idade. As proteínas foram extraídas como descrito na figura 3, porém o “immunoblotting” foi realizado com anticorpo antifosfotirosina.

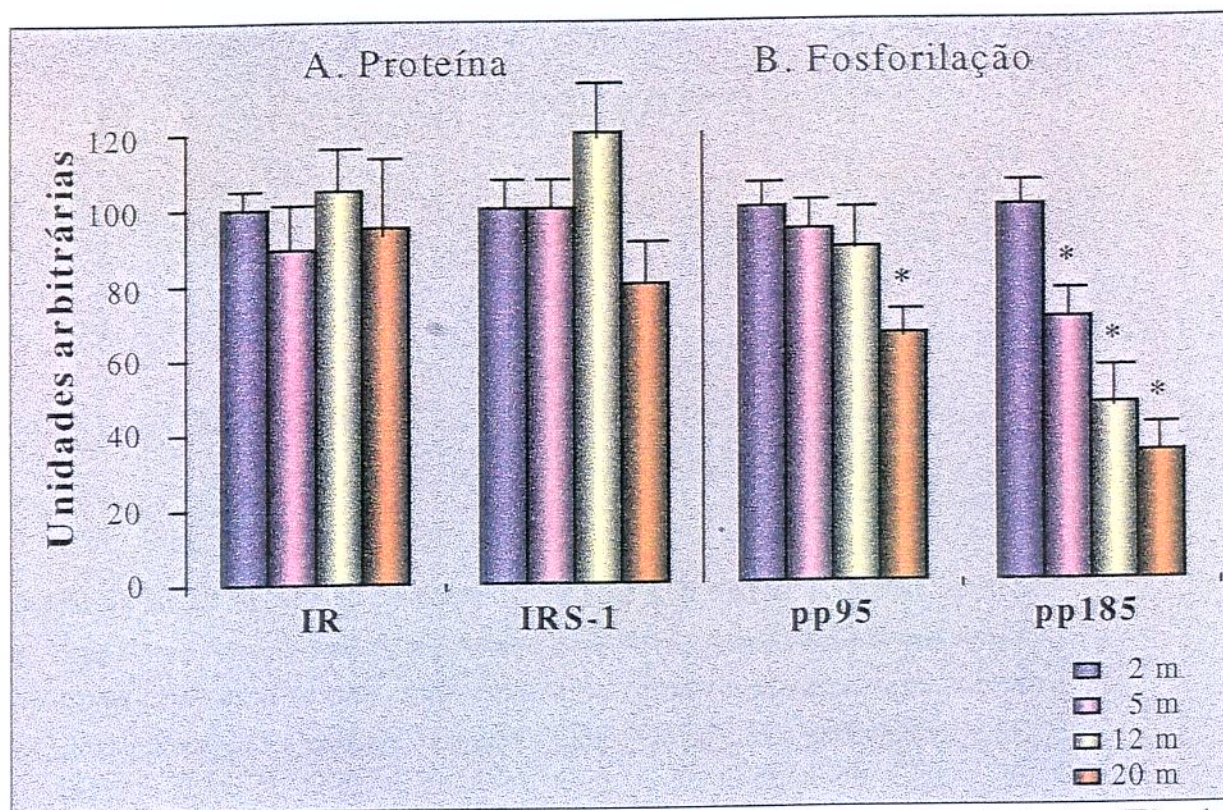
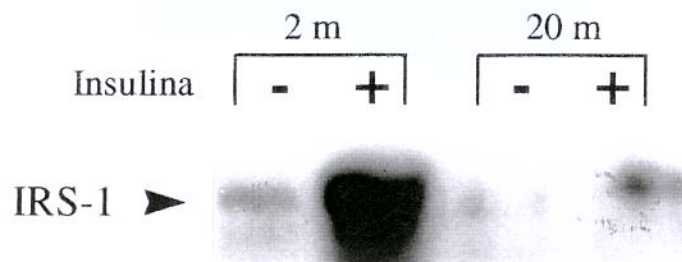


Figura 5: Efeito do envelhecimento sobre a concentração protéica (A) do receptor de insulina (IR) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), e do grau de fosforilação (B) do IR (pp95) e pp 185, em tecido hepático de ratos. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 8 experimentos como os das figuras 3 e 4. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

A. Fosforilação do IRS-1



B. Associação IRS-1/PI 3-k

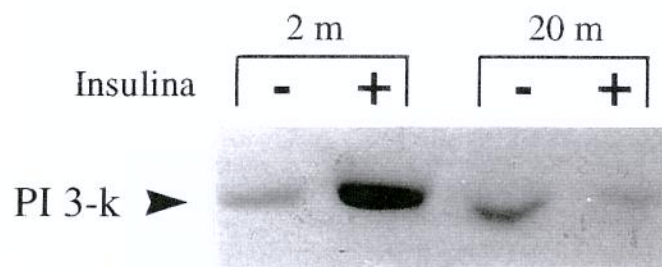
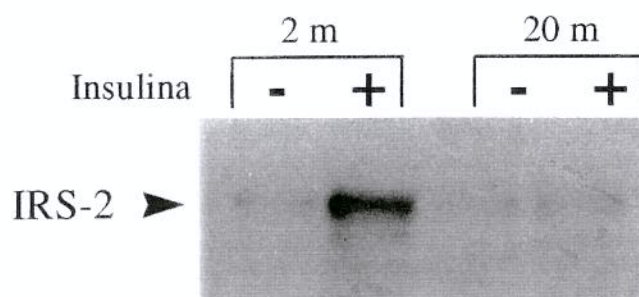


Figura 6: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato 1 do receptor de insulina, em tecido hepático, antes (-) e após (+) infusão de insulina, em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 de ratos com 2 e 20 meses de idade. As proteínas foram extraídas e separadas em gel, conforme descrição em Material e Métodos. Foi realizado "immunoblotting" com anticorpos antifosfotirosina (**A**) e anti-PI 3-quinase (**B**).

A. Fosforilação do IRS-2



B. Associação IRS-2/PI 3-k

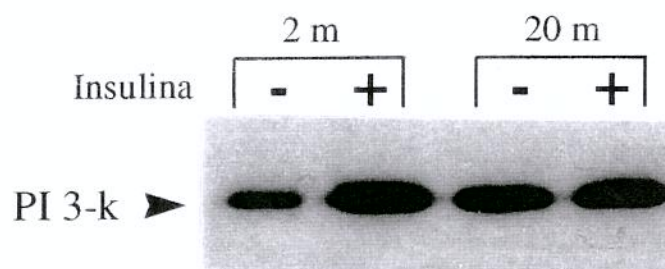


Figura 7: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato 2 do receptor de insulina, em tecido hepático, antes (-) e após (+) infusão de insulina, em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 de ratos com 2 e 20 meses de idade. As proteínas foram extraídas e separadas em gel, conforme descrição em Material e Métodos. Foi realizado "immunoblotting" com anticorpos antifosfotirosina (**A**) e anti-PI 3-quinase (**B**).

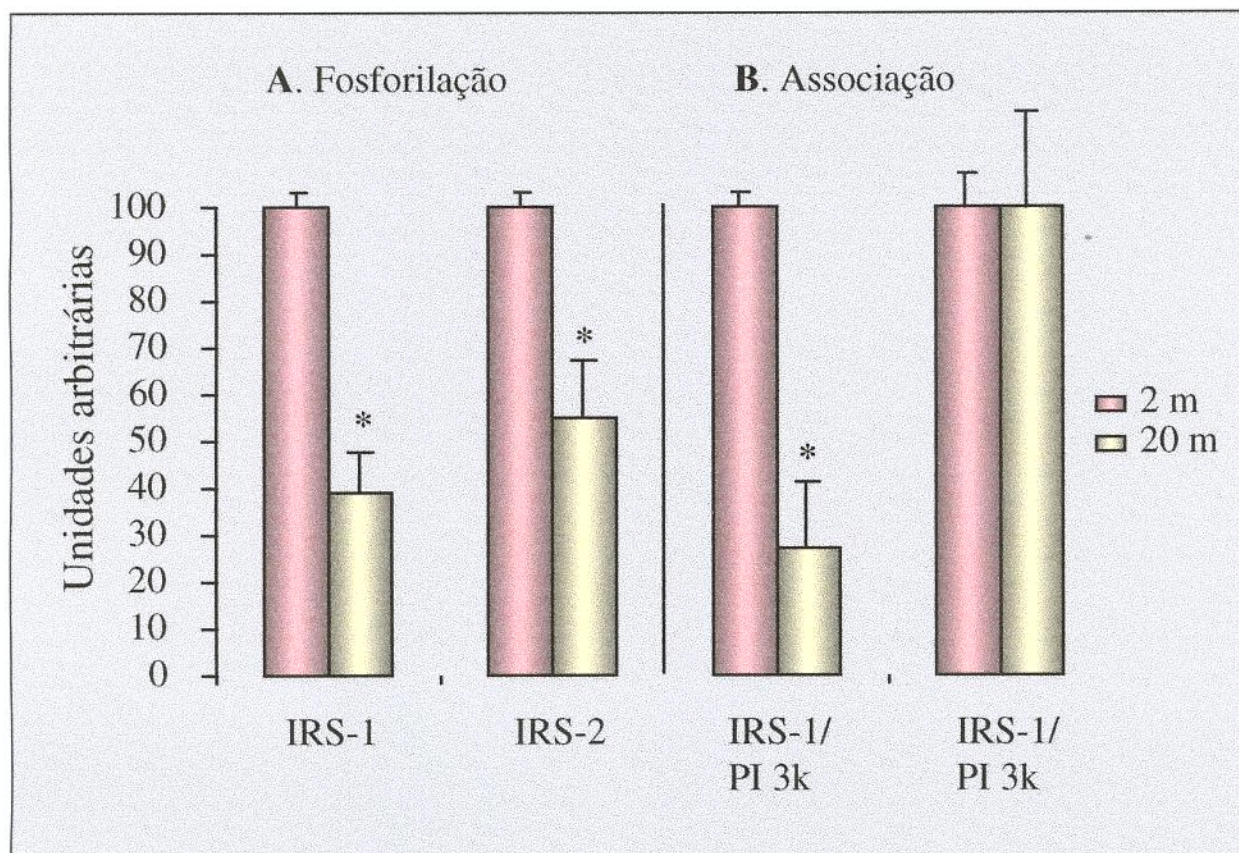


Figura 8: Efeito do envelhecimento sobre o grau de fosforilação do IRS-1 e IRS-2 e sobre a associação IRS-1/PI 3-quinase e IRS-2/PI 3-quinase, em amostras de tecido hepático de ratos com 2 e 20 meses de idade, previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e anti-IRS-2. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 4 experimentos como os das figuras 6 e 7. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM * $p < 0.05$

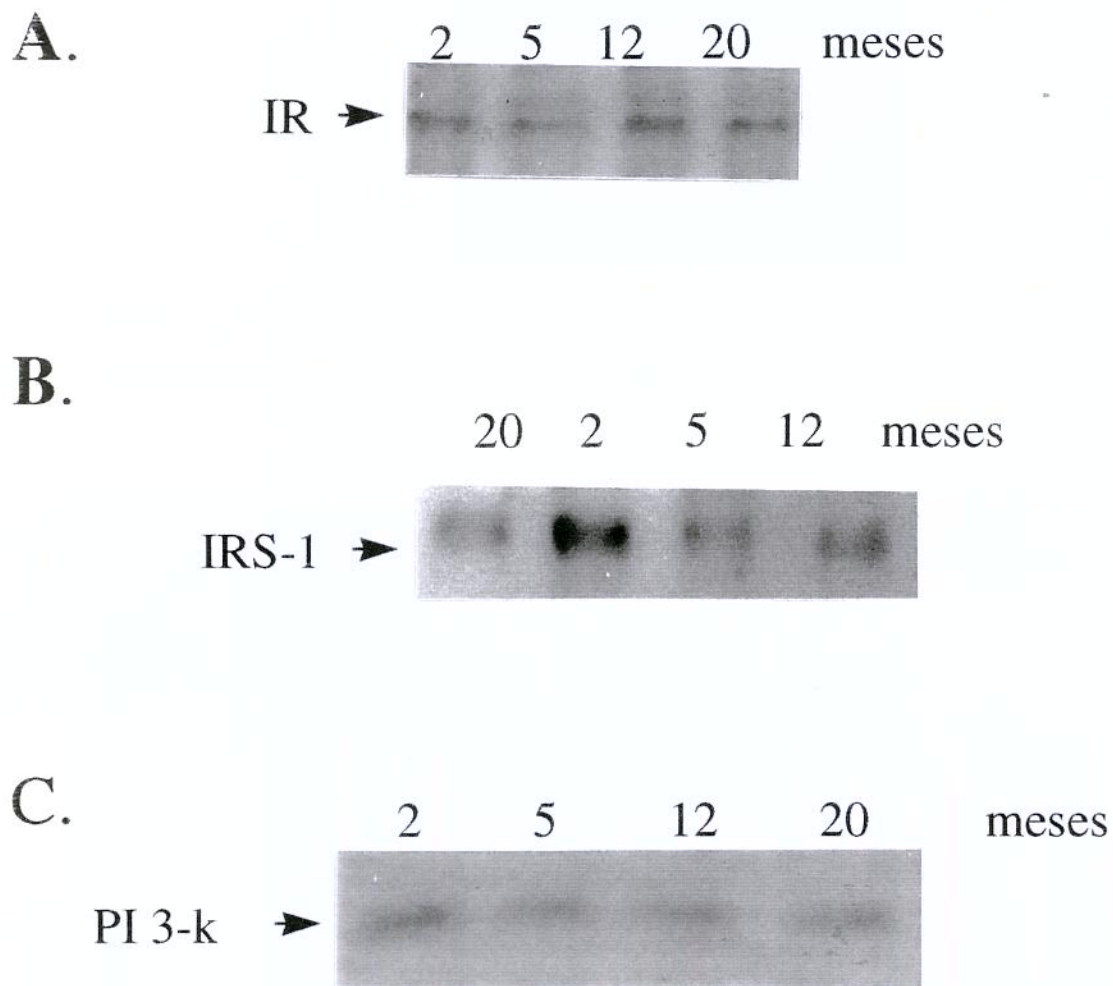


Figura 9: Avaliação do nível proteico do receptor (IR), do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e da PI 3-quinase (PI 3-k), em tecido muscular de ratos com 2, 5, 12 e 20 meses de idade. As proteínas foram extraídas como descrito na figura 2. O "immunoblotting" foi realizado com anticorpos (A) anti-receptor de insulina (IR), (B) anti-IRS-1 e (C) anti-PI 3-k.

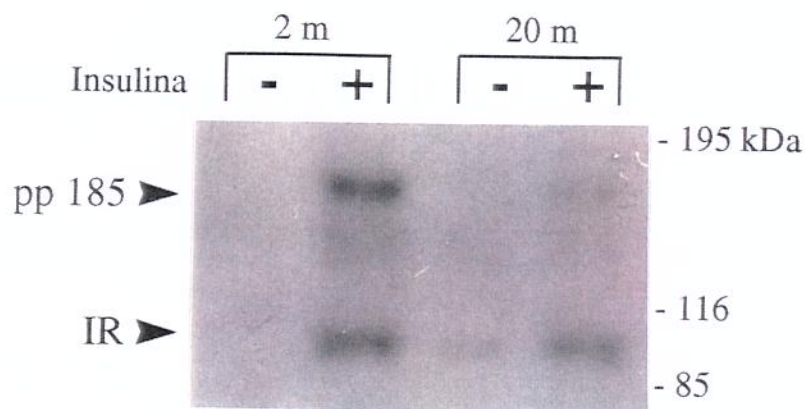


Figura 10: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina, antes (-) e após (+) o estímulo com insulina, do receptor (IR) e da pp 185, em tecido muscular de ratos com 2 e 20 meses de idade. As proteínas foram extraídas como descrito na figura 3, porém o “immunoblotting” foi realizado com anticorpo antifosfotirosina.

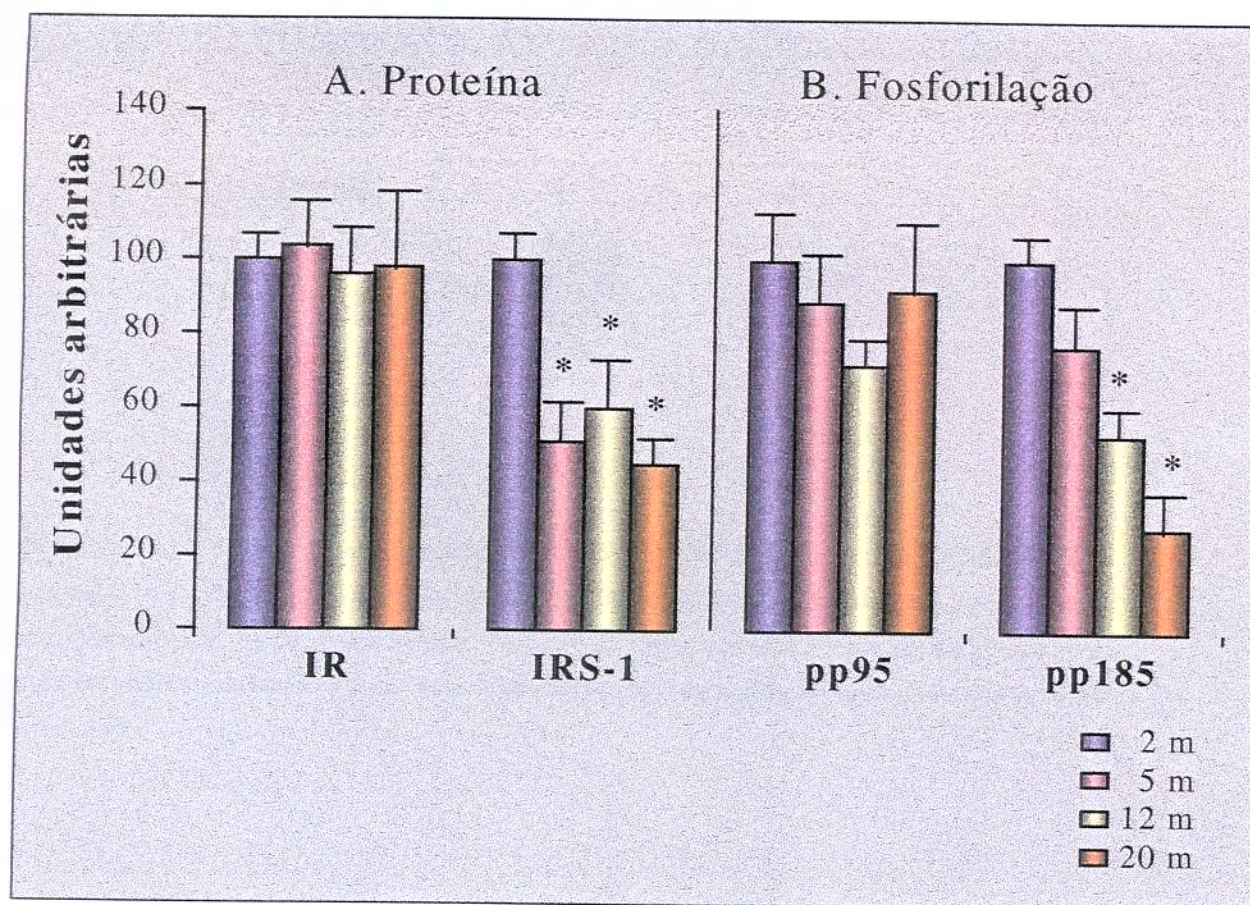
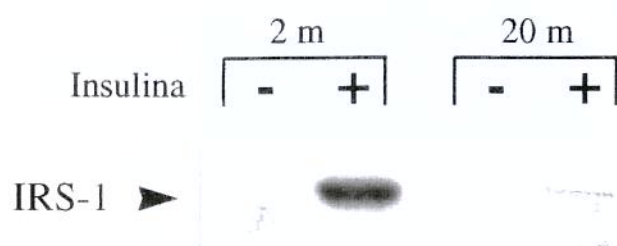


Figura 11: Efeito do envelhecimento sobre a concentração protéica (A) do receptor de insulina (IR) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e do grau de fosforilação (B) do IR (pp95) e pp185, em tecido muscular de ratos. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 8 experimentos como os das figuras 9 e 10. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM * $p < 0.05$

A. Fosforilação do IRS-1



B. Associação IRS-1/PI 3-k

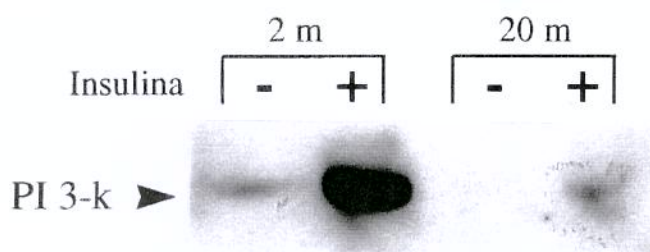
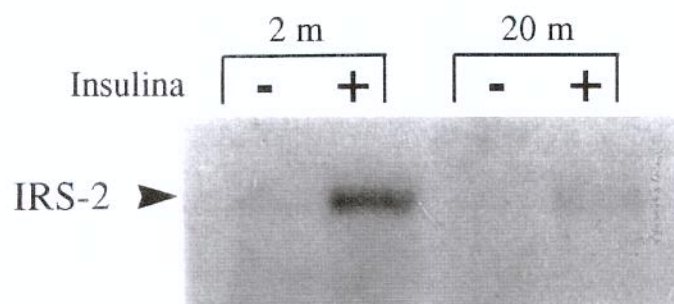


Figura 12: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato 1 do receptor de insulina, em tecido hepático, antes (-) e após (+) infusão de insulina, em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 de ratos com 2 e 20 meses de idade. As proteínas foram extraídas e separadas em gel, conforme descrição em Material e Métodos. Foi realizado "immunoblotting" com anticorpos antifosfotirosina (**A**) e anti-PI 3-quinase (**B**).

A. Fosforilação do IRS-2



B. Associação IRS-2/PI 3-k

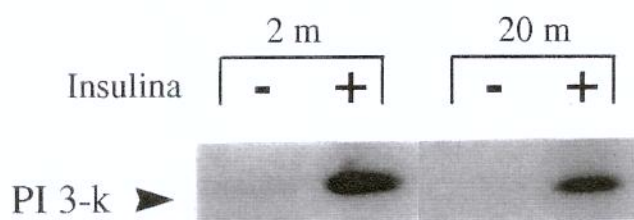


Figura 13: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato 2 do receptor de insulina, em tecido muscular, antes (-) e após (+) infusão de insulina, em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 de ratos com 2 e 20 meses de idade. As proteínas foram extraídas e separadas em gel, conforme descrição em Material e Métodos. Foi realizado "immunoblotting" com anticorpos antifosfotirosina (**A**) e anti-PI 3-quinase (**B**).

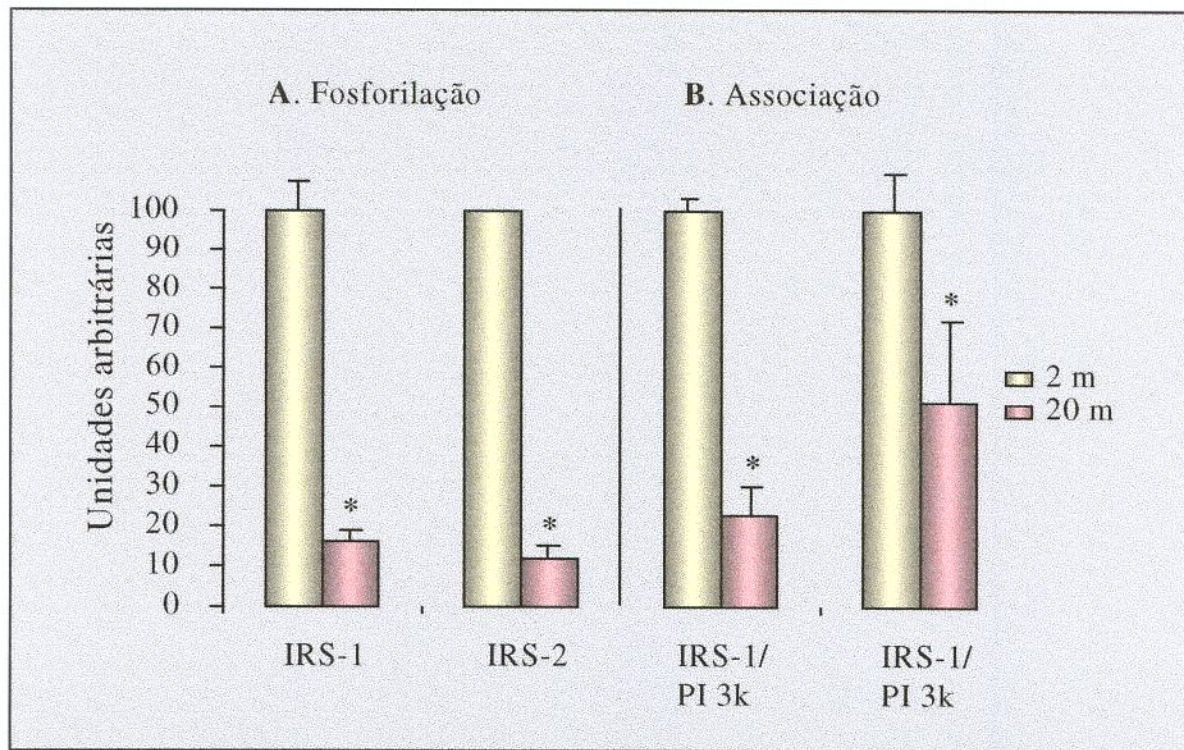


Figura 14: Efeito do envelhecimento sobre o grau de fosforilação do IRS-1 e IRS-2 e sobre a associação IRS-1/PI 3-quinase e IRS-2/PI 3-quinase, em amostras de tecido muscular de ratos com 2 e 20 meses de idade, previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e anti-IRS-2. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 4 experimentos como os das figuras 12 e 13. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM * $p < 0.05$

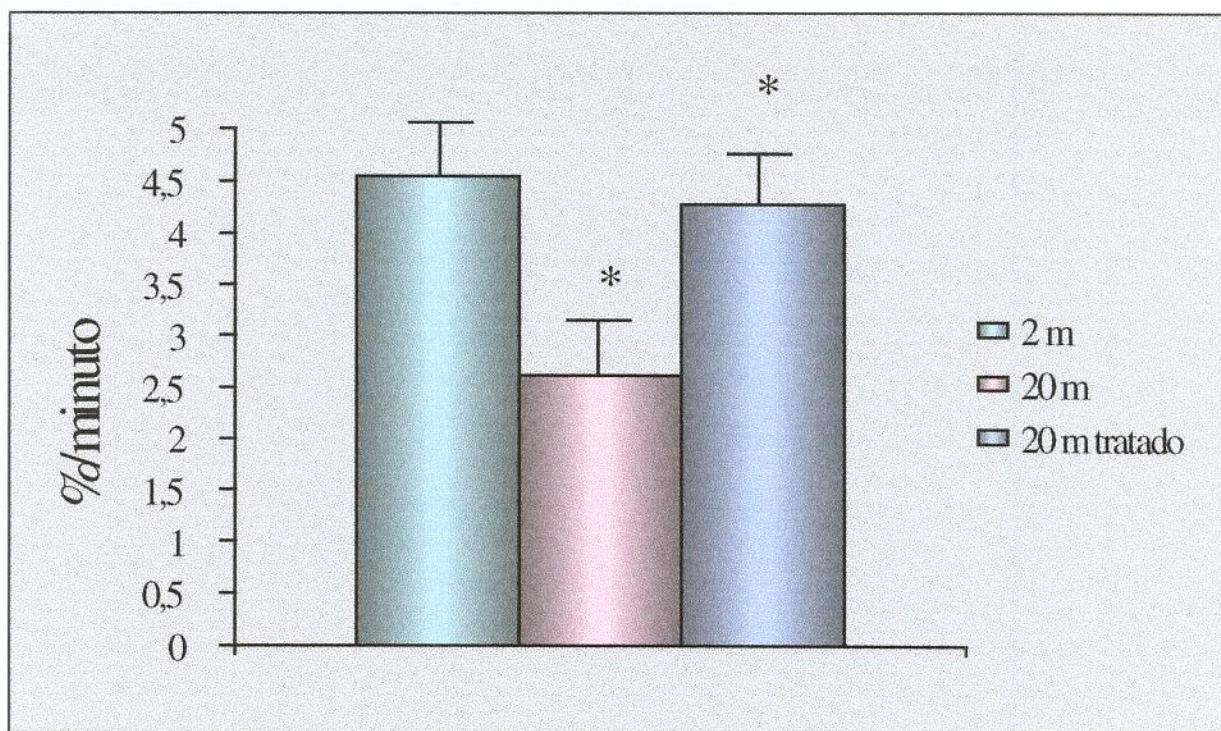


Figura 15: Velocidade de desaparecimento da glicose (Kitt) em ratos com 2 e 20 meses tratados ou não com captopril. Os animais foram submetidos ao teste de tolerância endovenosa à insulina (6 μ g de insulina) e as amostras foram coletadas nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção de insulina. O Kitt foi calculado como descrito em Métodos e os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

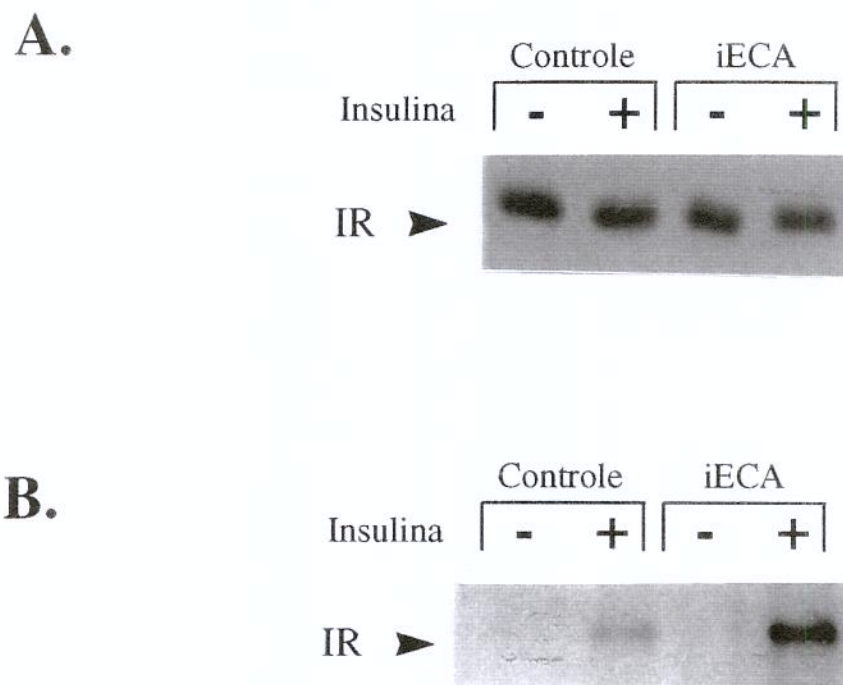


Figura 16: Avaliação do nível tecidual (A) e do grau de fosforilação (B) em tirosina do receptor de insulina em tecido hepático, antes (-) e após (+) infusão de insulina, em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-receptor de insulina de ratos com 20 meses de idade tratados ou não (controles) com inibidor da enzima conversora da angiotensina, captopril. As proteínas foram extraídas e separadas em gel, conforme descrição em Material e Métodos. Foi realizado "immunoblotting" com anticorpos antifosfotirosina.

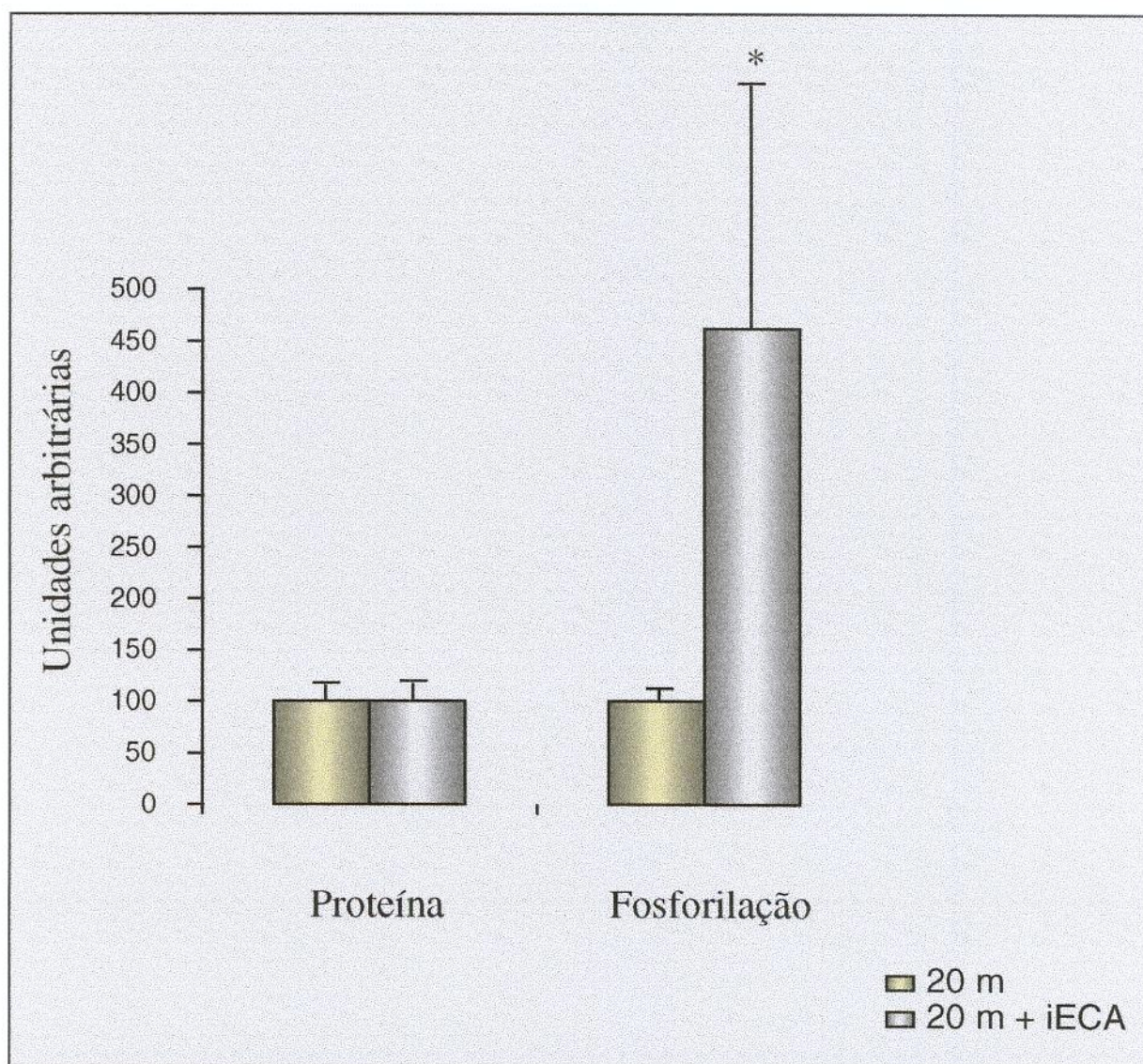


Figura 17: Efeito do captopril sobre o nível tecidual e o grau de fosforilação do receptor de insulina, em amostras de tecido hepático de ratos com 20 meses de idade. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-receptor de insulina (IR). A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 4 experimentos como os da figura 9 (A e B). Os valores são expressos como média $\pm$ EPM * $p < 0.05$

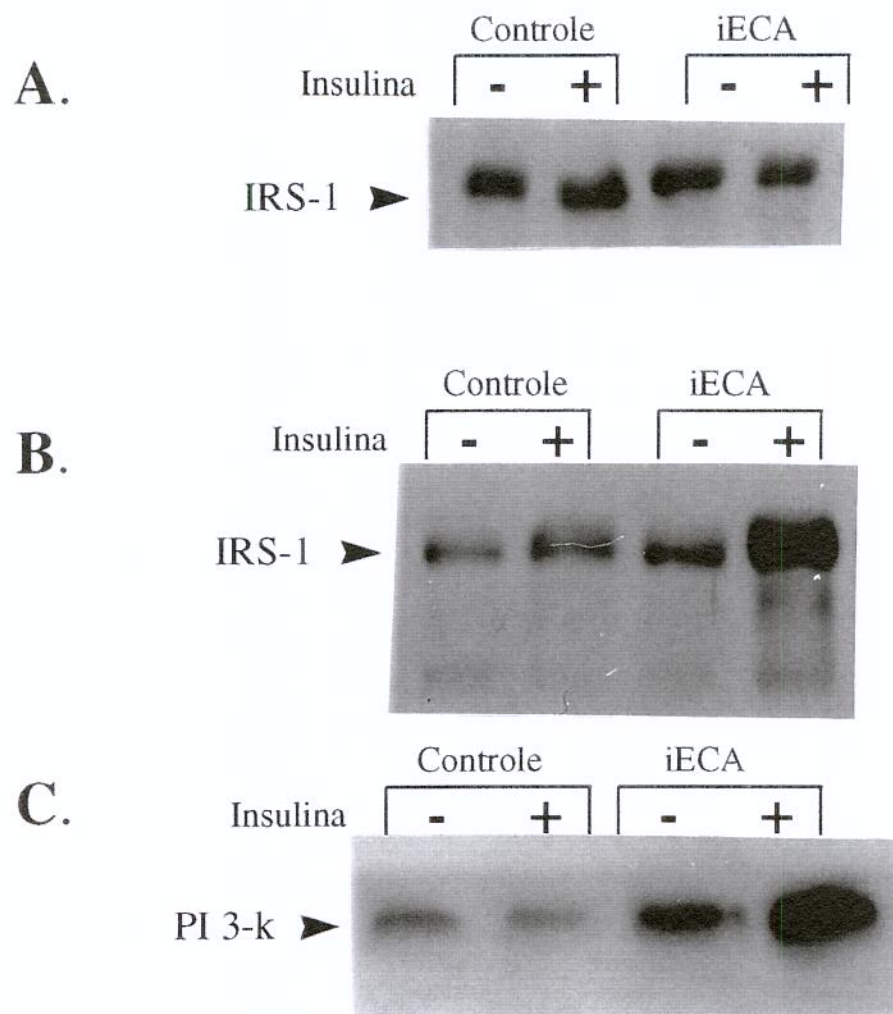


Figura 18: Avaliação do nível tecidual (A) e do grau de fosforilação (B) em tirosina do IRS-1 em tecido hepático e da associação IRS-1/PI 3-quinase (C), antes (-) e após (+) infusão de insulina, em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo IRS-1 de ratos com 20 meses de idade tratados ou não (controles) captopril. As proteínas foram extraídas e separadas em gel, conforme descrição em Material e Métodos. Foi realizado "immunoblotting" com anticorpos anti-IRS-1 (A), antifosfotirosina (B) e anti-PI 3-quinase (C).

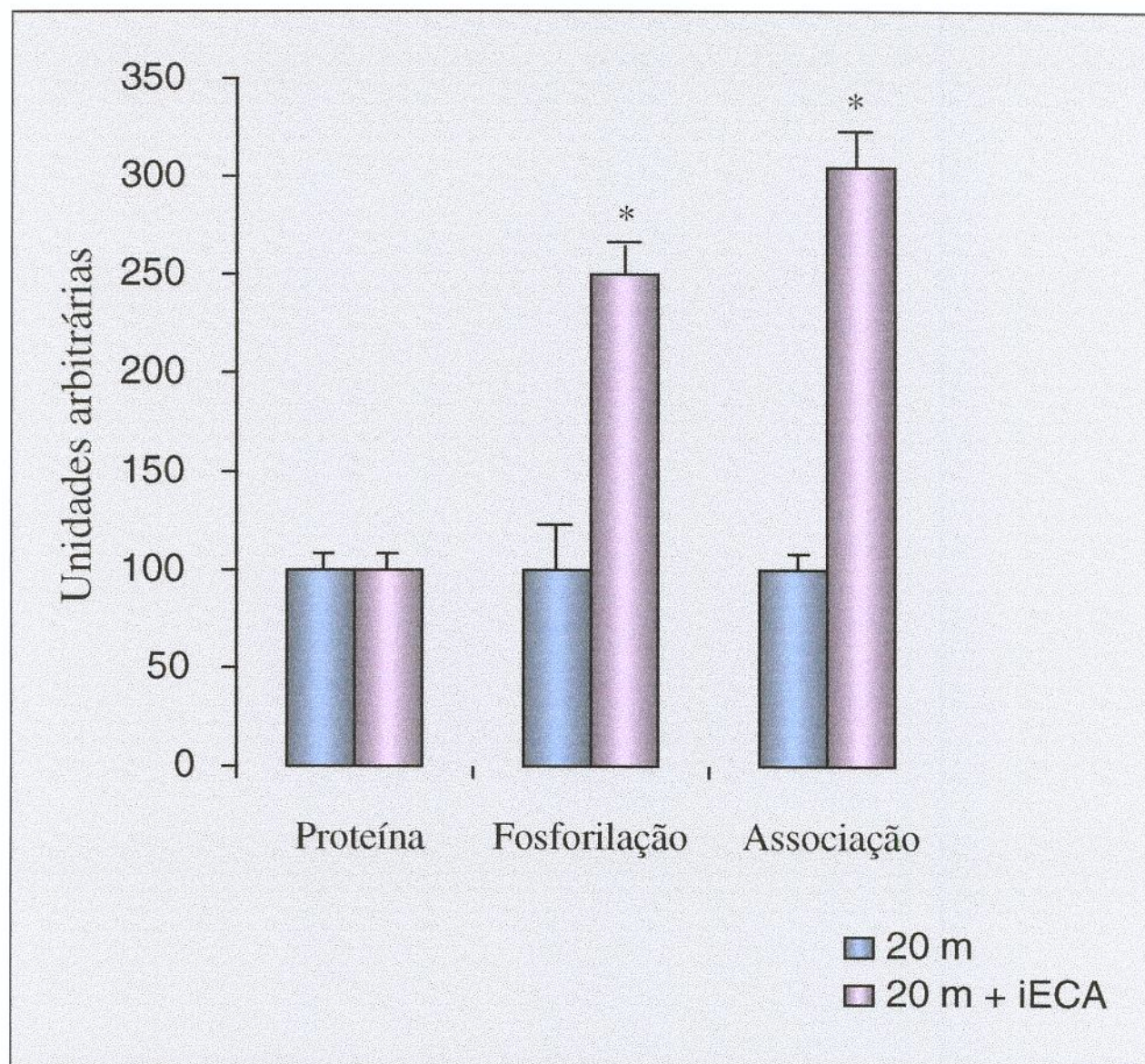


Figura 19: Efeito do captopril sobre o nível tecidual e o grau de fosforilação do IRS-1, em amostras de tecido hepático de ratos com 20 meses de idade. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 4 experimentos como os da figura 18. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM * $p < 0,05$

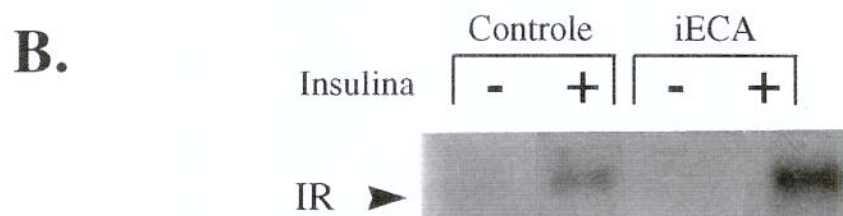
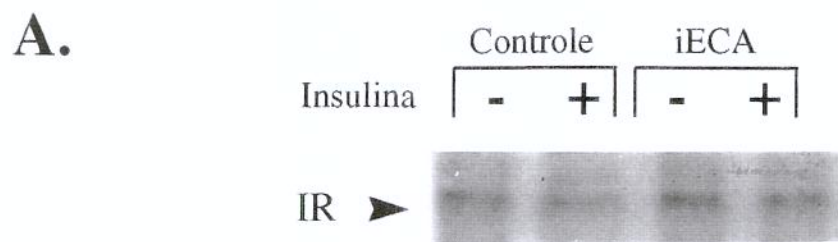


Figura 20: Avaliação do nível tecidual (A) e do grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina em tecido muscular, antes (-) e após (+) infusão de insulina, em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo IRS-1 de ratos com 20 meses de idade tratados ou não (controles) com captopril. As proteínas foram extraídas e separadas em gel, conforme descrição em Material e Métodos. Foi realizado "immunoblotting" com anticorpos anti-receptor de insulina (A) e antifosfotirosina (B).

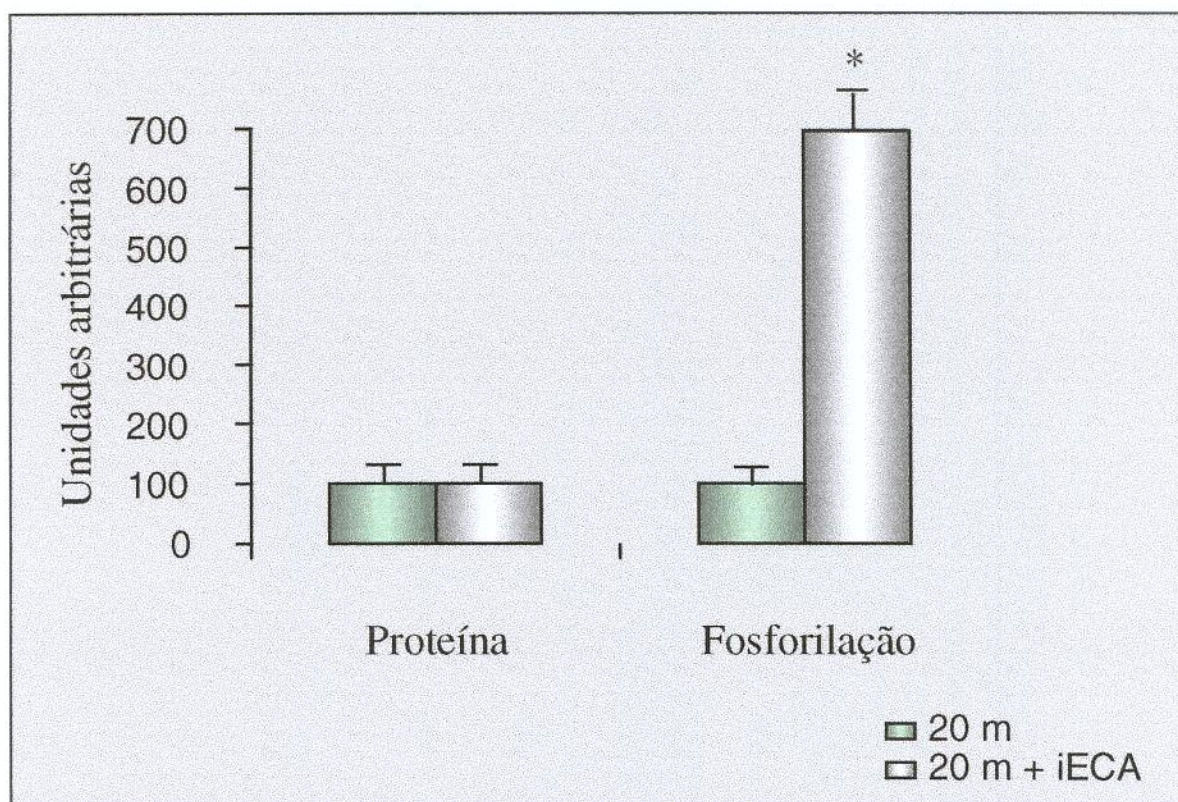


Figura 21: Efeito do captopril sobre o nível tecidual e o grau de fosforilação do receptor de insulina, em amostras de tecido muscular de ratos com 20 meses de idade. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-receptor de insulina (IR). A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 4 experimentos como os da figura 20 (A e B). Os valores são expressos como média $\pm$ EPM * $p < 0.05$

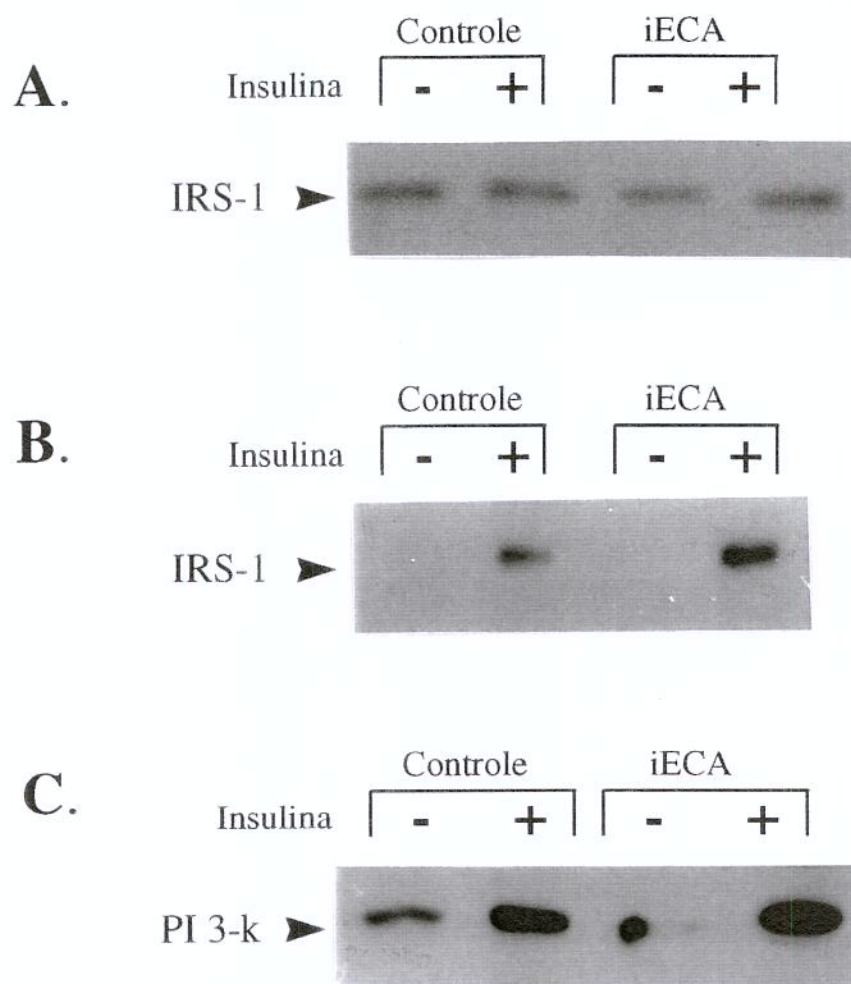


Figura 22: Avaliação do nível tecidual (A) e do grau de fosforilação (B) em tirosina do IRS-1 em tecido muscular e da associação IRS-1/PI 3-quinase (C), antes (-) e após (+) infusão de insulina, em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo IRS-1 de ratos com 20 meses de idade tratados ou não (controles) com captopril. As proteínas foram extraídas e separadas em gel, conforme descrição em Material e Métodos. Foi realizado "immunoblotting" com anticorpos anti-IRS-1 (A), antifosfotirosina (B) e anti-PI 3-quinase (C).

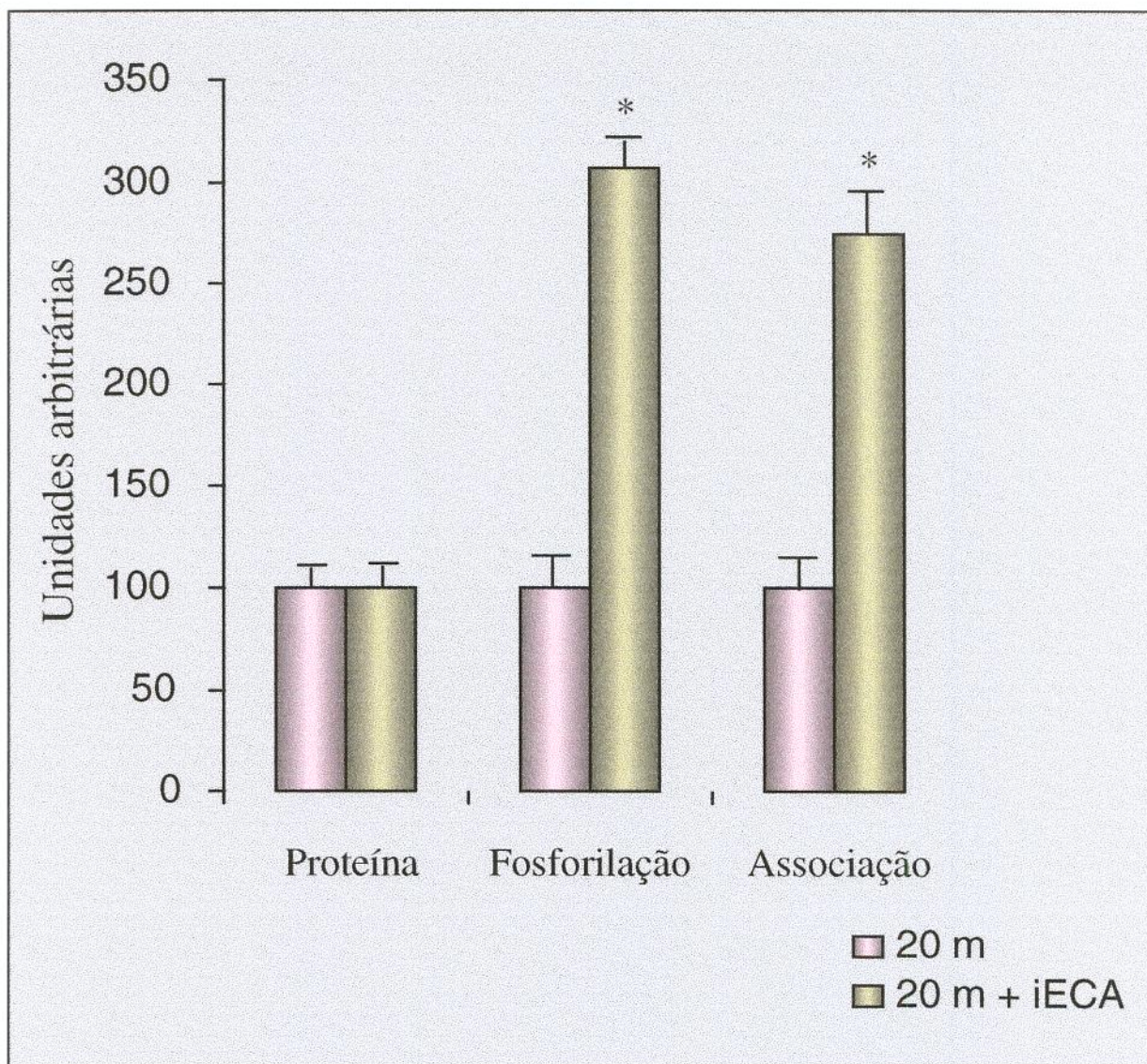


Figura 23: Efeito do captopril sobre o nível tecidual e o grau de fosforilação do IRS-1, em amostras de tecido muscular de ratos com 20 meses de idade. As amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 4 experimentos como os da figura 22. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM * $p < 0.05$

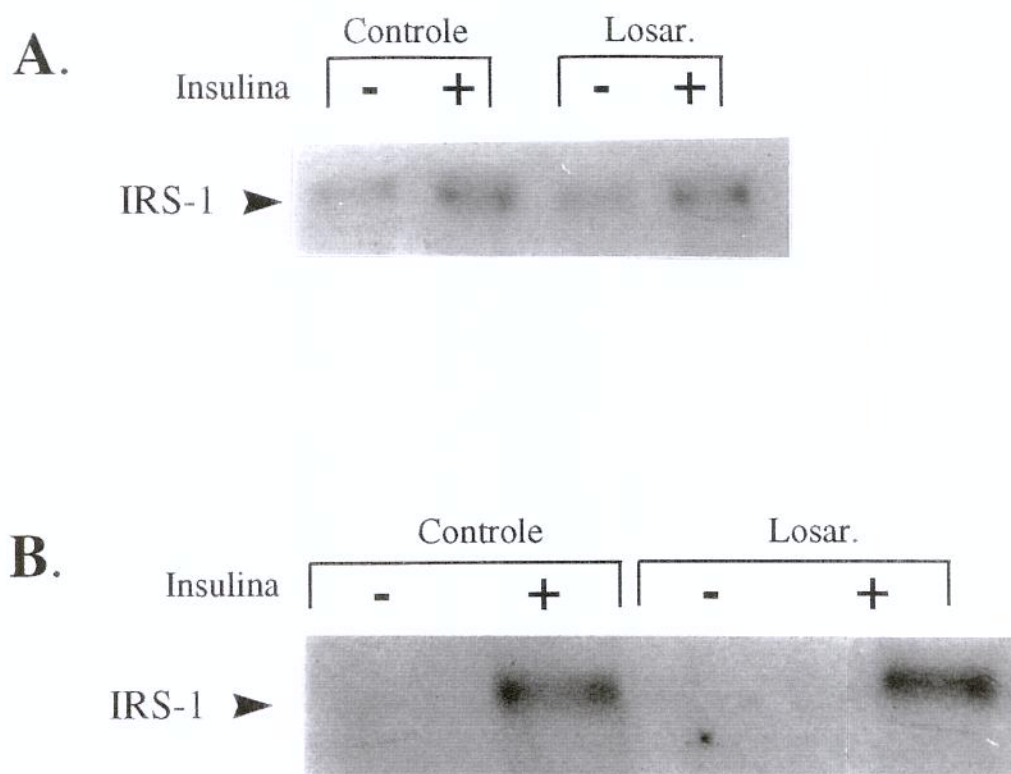


Figura 24: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido hepático (A) e tecido muscular (B), antes (-) e após (+) infusão de insulina, em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo IRS-1 de ratos com 20 meses de idade tratados com o bloqueador do receptor de angiotensina, losartan. As proteínas foram extraídas e separadas em gel, conforme descrição em Material e Métodos. Foi realizado "immunoblotting" com anticorpos antifosfotirosina.

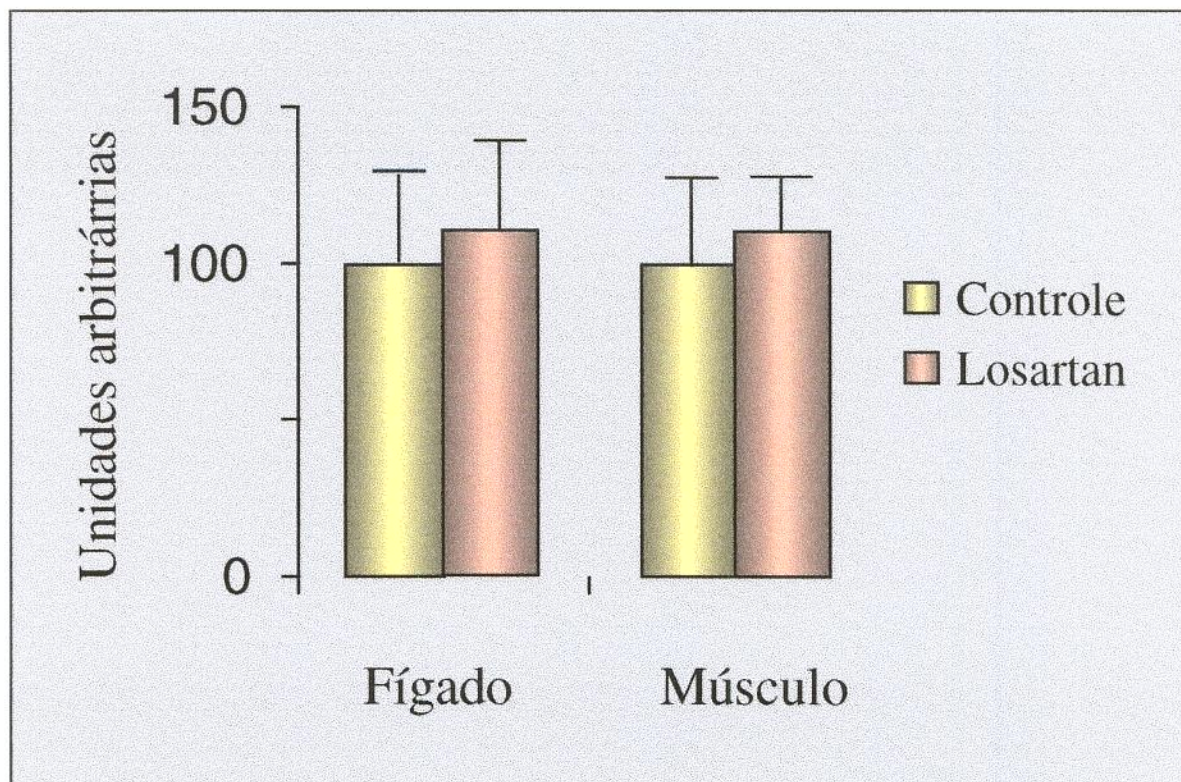


Figura 25: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 induzido pela insulina, em tecido hepático (A) e tecido muscular (B) de ratos com 20 meses de idade tratados com o bloqueador do receptor de angiotensina, losartan. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 4 experimentos iguais aos da figura 24. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM * $p < 0.05$

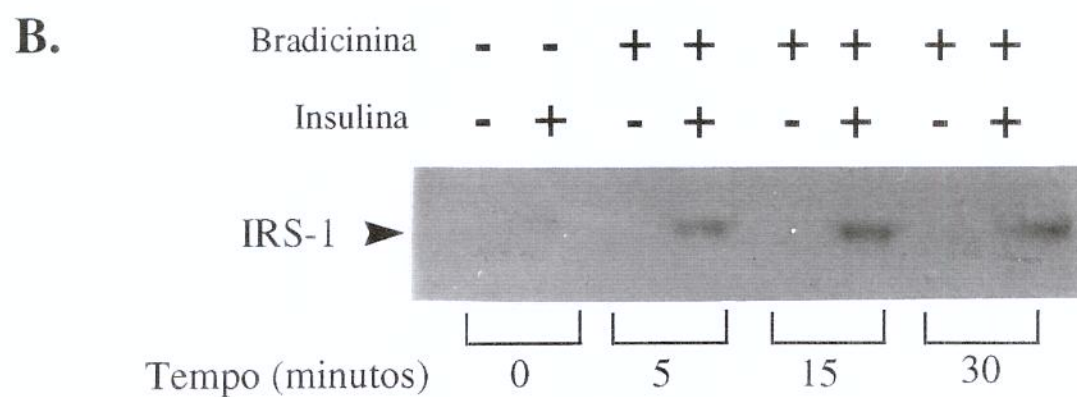
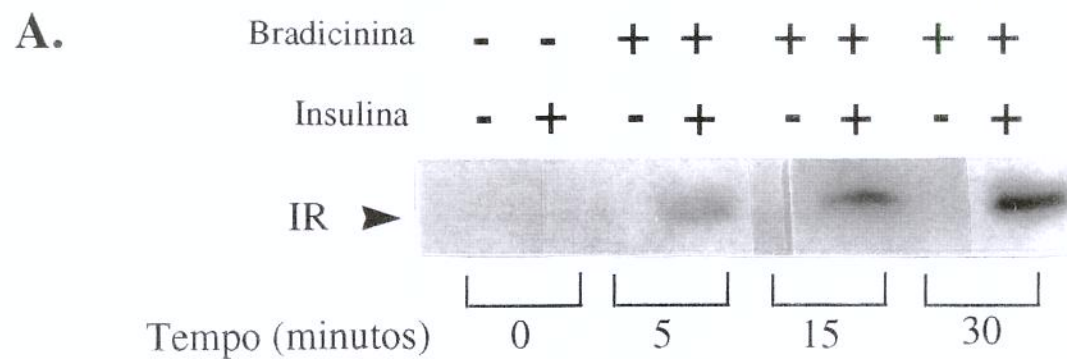


Figura 26: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina (A) e do IRS-1 (B) induzidos pela insulina, em tecido muscular extraídos em diferentes tempos (5, 15 e 30 minutos), após infusão de bradicinina intraperitoneal em ratos com 20 meses de idade. As proteínas foram extraídas e separadas em gel, conforme descrição em Material e Métodos. Foi realizado "immunoblotting" com antifosfotirosina.

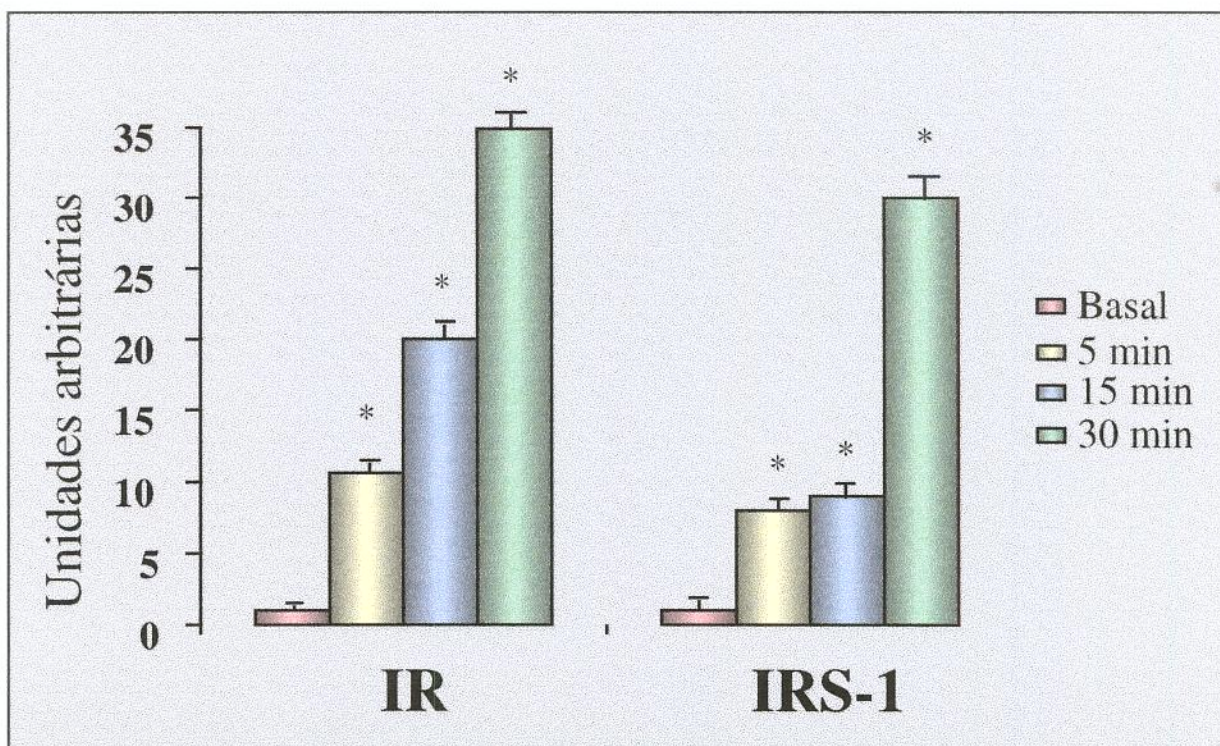


Figura 27: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina (A) e do IRS-1 (B) induzidos pela insulina, em tecido muscular extraído em diferentes tempos (5, 15 e 30 minutos), após infusão de bradicinina intraperitoneal em ratos com 20 meses de idade. A densitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 3 experimentos iguais aos da figura 26. Os valores são expressos como média.

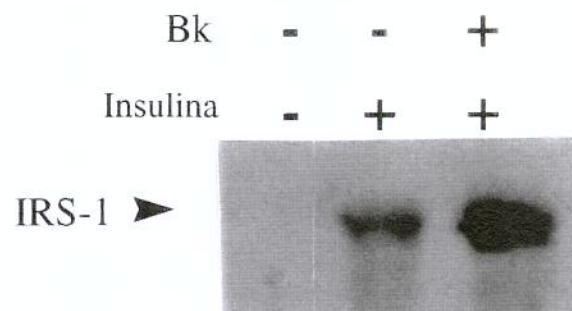
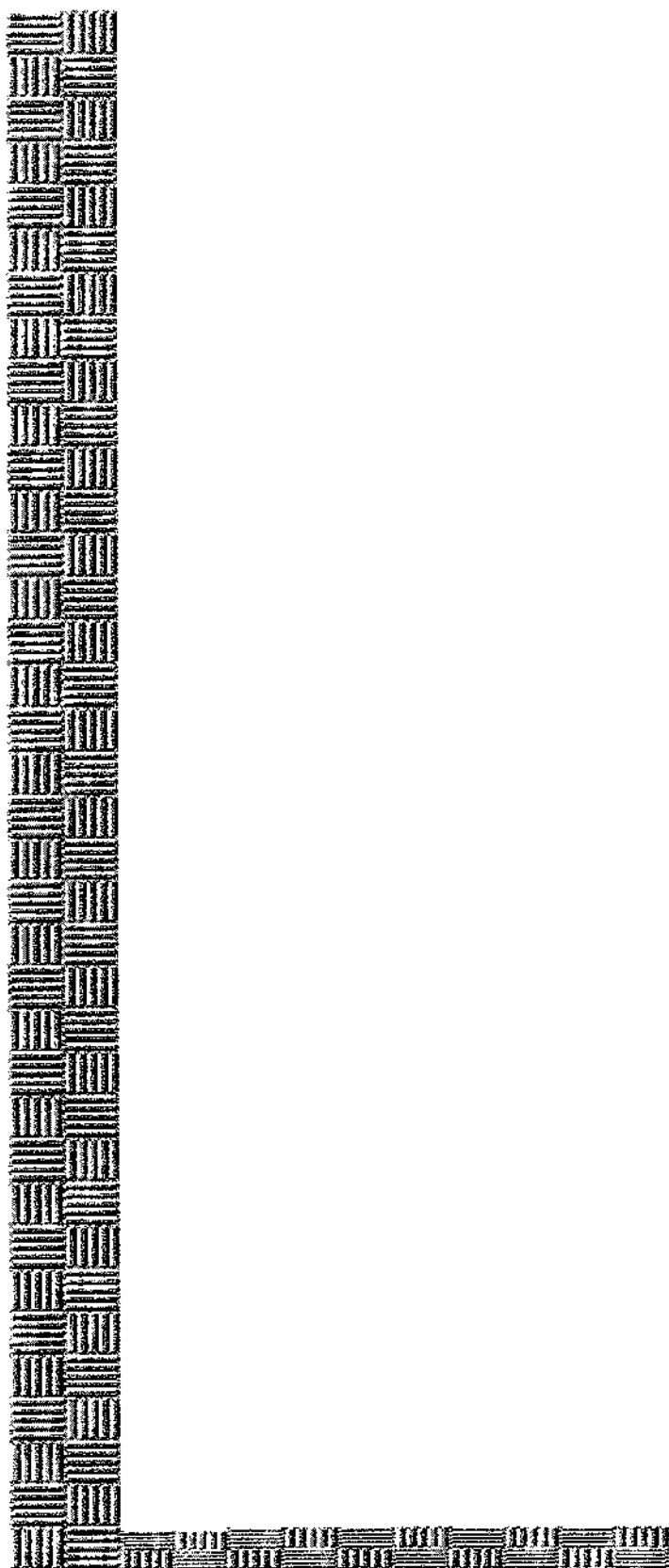


Figura 28: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 induzido pela insulina, em tecido hepático, após infusão de bradicinina intraperitoneal em ratos com 20 meses de idade. As proteínas foram extraídas e separadas em gel, conforme descrição em Material e Métodos. Foi realizado "immunoblotting" com anticorpo antifosfotirosina.



5. Discussão

A insulina tem como mediador inicial, para suas ações celulares em processos metabólicos e de crescimento celular, o seu receptor transmembrana. A ligação da insulina na subunidade α do seu receptor, ativa a capacidade tirosina quinase da subunidade β em direção a ela mesma, autofosforilando-se, e em direção a substratos endógenos como o IRS-1 (SUN *et al.*, 1992) e o IRS-2 (SUN *et al.*, 1995), que são constituintes da pp185. Estes substratos possuem vários sítios de fosforilação em serina, treonina e tirosina. No IRS-1, nove destes sítios de fosforilação em tirosina tem uma sequência repetitiva de aminoácidos, YMXM ou YXXM, onde o Y é o aminoácido tirosina, o X corresponde a qualquer aminoácido e M é o aminoácido metionina. Quando estes sítios estão fosforilados, são envolvidos em interações não covalentes entre IRS-1 ou IRS-2 com outras moléculas sinalizadoras, particularmente proteínas que contém o domínio chamado SH2 (BACKER *et al.*, 1992; FOLLI *et al.*, 1993; KUHNE *et al.*, 1993; PAWSON T, 1995). Assim a fosforilação em tirosinas do IRS-1 e IRS-2 é um segundo passo intracelular que leva a associação IRS-1/PI 3-quinase e IRS-2/PI 3-quinase. Outras proteínas descritas como sendo fosforiladas após o estímulo insulínico são a ecto-ATPase (LIN & GUIDOTTI, 1989), a pp60 (LAVAN & LIENHARD, 1993), o Shc (KOVACINA & ROTH, 1993) e o JAK2 (SAAD *et al.*, 1996).

O estudo da regulação das etapas iniciais da ação insulínica em modelos animais, pode ser realizada *in vitro*, através de receptores de insulina parcialmente purificados e substratos exógenos, ou *in vivo* após a infusão de insulina.

O protocolo experimental utilizado neste trabalho, estimulação *in vivo* com insulina, extração e homogeneização dos tecidos hepático e muscular em condições desnaturantes ou em condições apropriadas para imunoprecipitação e posterior “immunoblotting” com anticorpos específicos, permitiu uma avaliação das etapas iniciais da ação insulínica nestes dois tecidos importantes para a homeostase da glicose (SAAD *et al.*, 1989).

Nos estudos iniciais sobre a fisiologia molecular do receptor de insulina foram utilizados receptores parcialmente purificados e a atividade quinase foi determinada *in vitro*, em direção a substratos exógenos como histonas (ROTHENBERG, WHITE, KAHN,

1990). Embora sejam ensaios informativos, estes procedimentos são susceptíveis a artefatos bioquímicos resultantes da homogeneização do tecido e purificação do receptor, como proteólise e desfosforilação do receptor por fosfatases contaminantes (KATHURIA *et al.*, 1986). Também a remoção do receptor da membrana plasmática interfere em interações com outros componentes celulares e pode influenciar a atividade quinase do receptor (FEHLMAN *et al.*, 1985). Finalmente, há diferenças importantes na atividade quinase do receptor manifestas *in vitro*, dependendo do substrato exógeno utilizado (ROTHENBERG *et al.*, 1990). O método utilizado aqui não está sujeito a estas implicações, permitindo uma determinação direta do grau de fosforilação do receptor de insulina, do IRS-1 e do IRS-2, o que é também uma avaliação da atividade quinase *in vivo* do receptor, dirigida a estes substratos endógenos.

Com esta metodologia, foi realizado o estudo das etapas iniciais de ação insulínica em tecidos hepático e muscular de ratos com 2, 5, 12 e 20 meses de idade. Os ratos, com 20 meses apresentaram hiperinsulinemia basal, sem alteração dos níveis de glicose plasmática de jejum, sugerindo uma menor sensibilidade à insulina, que foi documentada pela redução na velocidade de decaimento da glicose, durante o teste de tolerância à insulina. A resistência insulínica que se desenvolve com o envelhecimento dos ratos está associada a uma progressiva diminuição da utilização periférica, e aumento da produção hepática de glicose durante teste de “clamp” euglicêmico hiperinsulinêmico (NISHIMURA *et al.*, 1988), acompanhada de diminuição da síntese de glicogênio muscular, em ratos com 20 meses (GOODMAN *et al.*, 1983).

Procurando investigar mecanismos moleculares que pudessem contribuir para explicar tais alterações alguns estudos demonstraram uma depleção do “pool” intracelular de GLUT4 em adipócitos de ratos velhos (MATHEI *et al.*, 1990) e de alguns músculos como epitroclear, plantar e quadríceps de ratos com 10 meses (GULVE *et al.*, 1993). E em ensaios com receptores de insulina isolados de músculo esquelético de ratos com 2 e 20 meses de idade, o “binding” de insulina permaneceu semelhante, sugerindo que o defeito nesta situação de resistência à insulina, seja pós-receptor (NISHIMURA *et al.*, 1988; KONO *et al.*, 1990).

Apesar da quantidade semelhante de receptores de insulina, nos tecidos hepático e muscular de ratos com diferentes idades (2, 5, 12 e 20 meses), foi observada uma diminuição de 34% no grau de autofosforilação do receptor em tecido hepático de ratos velhos (20 m) após estímulo insulínico, *in vivo*. Isto pode ter significado biológico, uma vez que a diminuição na fosforilação do receptor tem sido bem correlacionada com situações de resistência à insulina (KASUGA *et al.*, 1982a; EBINA *et al.*, 1987; CHOU *et al.*, 1987; GIORGINO *et al.*, 1993; WHITE & KAHN, 1994). Estes achados são discordantes de estudos prévios em animais idosos, nos quais os receptores foram parcialmente purificados e ensaios de atividade quinase foram realizados *in vitro* (KONO *et al.*, 1990; BARNARD *et al.*, 1992). Nestes estudos, em receptores isolados de tecido hepático, não foram detectadas alterações de autofosforilação induzida pela insulina ou fosforilação dos substratos usados. Isto pode ser explicado, pelo menos em parte, pela diferença de metodologia utilizada entre estes estudos e o nosso, como previamente discutido. Nossos resultados também demonstraram que em tecido muscular não houve alterações na autofosforilação do receptor, após estímulo insulínico.

A presença de redução da autofosforilação do receptor em fígado, mas não em músculo dos ratos com 20 meses é uma característica também presente em outros modelos animais de resistência à insulina, como os ratos tratados com dexametasona (KARASIK & KAHN, 1988; SAAD *et al.*, 1993) e o camundongo ob/ob (SAAD *et al.*, 1992). Nestes dois modelos animais, é possível que a exposição crônica destes tecidos a diferentes níveis de insulina contribua para estes resultados, uma vez que o fígado está exposto a uma concentração maior de insulina do que o músculo, justificando a regulação tecido-específica do grau de fosforilação do receptor de insulina. SAAD *et al.*, 1995, demonstraram que a hiperinsulinemia crônica induziu a redução nos níveis e grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina, em cultura de células de hepatoma de ratos (células Fao). Diante deste contexto, a redução, na autofosforilação do receptor de insulina em tecido hepático de ratos com 20 meses, pode ser consequência da hiperinsulinemia presente.

As mudanças nos níveis teciduais de IRS-1, com o envelhecimento, mostraram também uma regulação tecido-específica, com diminuição para ~ 50% no músculo, mas não

em fígado. Esta diminuição do nível protéico de IRS-1, em músculo, ocorre precocemente nos animais, entre 2 e 5 meses de idade. Esta alteração não parece ter como causa a hiperinsulinemia descrita anteriormente, pois a redução da quantidade de IRS-1 ocorre antes do aparecimento da hiperinsulinemia, nos animais entre 2-5 meses e se dá no tecido muscular. Esta pode ser uma característica específica deste modelo animal de resistência à insulina. Apesar de serem animais obesos em relação aos controles, no modelo animal de obesidade e hiperinsulinemia, camundongos ob/ob, foi detectada uma diminuição nos níveis teciduais de IRS-1 em fígado e não em músculo (SAAD *et al.*, 1992). Uma vez que o tecido muscular é quantitativamente o mais importante na homeostase da glicose, este defeito pode ter um significado essencial como causa da resistência à insulina observada em ratos velhos. RICE & GARNER, 1994, demonstraram que a diminuição na quantidade de IRS-1 em adipócitos isolados de ratos era acompanhado de diminuição da captação de glicose, estabelecendo uma importante correlação entre níveis teciduais de IRS-1 e captação desse monossacáride. Ainda neste contexto, é importante a descrição de GOODMAN *et al.*, 1983, e NISHIMURA *et al.*, 1988, de que há uma redução na captação de glicose durante o envelhecimento, mas esta diminuição é muito marcante entre 2-4 meses de idade, período em que nosso estudo demonstrou a redução muscular de IRS-1.

Nossa observação de que há uma significativa redução nos graus de fosforilação do IRS-1 e do IRS-2 em tecidos hepático e muscular, bem como da associação destes substratos com a PI 3-quinase, após estímulo insulínico nos ratos senis, sugere que estes eventos também tenham papel na resistência insulínica, associada ao envelhecimento. Um mecanismo regulatório importante das etapas iniciais da ação insulínica é através da fosforilação do IRS-1 em aminoácidos serina e treonina (MYERS & WHITE, 1996). Esta regulação do IRS-1, que foi recentemente descrita, pode ser evidenciada em cultura de células, utilizando-se metodologia variada (TANTI *et al.*, 1994). Demonstrou-se que a fosforilação do IRS-1 em serina e (ou) treonina reduz, de maneira importante, a capacidade do receptor de insulina fosforilar este substrato em tirosina, dificultando a transmissão do sinal insulínico. Diversas enzimas com atividade quinase como a 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 tais alterações (WHITE & KAHN, 1984). ISHIZUKA *et al.*, 1993,

demonstraram um aumento na quantidade de proteína quinase-C em tecido adiposo de ratos idosos. Neste mesmo estudo também foi demonstrado um aumento na atividade desta proteína quinase associada à membrana, em tecido muscular destes animais senescentes. Assim é possível que, o aumento da proteína quinase-C descrito, possa induzir fosforilação em serina do IRS-1 e (ou) IRS-2, dificultando a interação destes com o receptor de insulina.

Outro fator que pode contribuir para explicar as alterações no grau de fosforilação do IRS-1 e IRS-2 é a constituição da membrana celular, que altera sua composição lipídica com o envelhecimento, aumentando a relação colesterol/fosfolípide. ZOPPINI & KAHN, 1992, descreveram, em cultura de células, variações importantes no grau de fosforilação do receptor de insulina e (ou) de seus substratos, em função de variações do constituinte lipídico da membrana.

Ainda deve ser considerado como possibilidade para se explicar a redução da fosforilação dos substratos do receptor de insulina em ratos idosos, a atividade de enzimas que desfosforilam estes substratos, que são as fosfotirosinas fosfatases (PTPases). NADIV *et al.*, 1994, demonstraram um aumento da atividade de PTPases em tecido hepático de ratos idosos, sugerindo ser este um provável mecanismo na redução do grau de fosforilação do IRS-1 e IRS-2 em tecido hepático dos ratos velhos. Pelo acima exposto pode-se concluir que diversos fatores podem alterar o grau de fosforilação do IRS-1 e IRS-2 em animais idosos. O papel real de cada um destes fatores, induzindo as reduções de fosforilação dos substratos do receptor nos animais com 20 meses, ainda necessita ser investigado.

Outro dado interessante foi em relação ao IRS-2, que apresentou redução no seu grau de fosforilação induzido pela insulina em ambos os tecidos dos ratos senis, porém a associação com a PI 3-quinase demonstrou uma regulação tecido-específica, não se alterando no fígado e reduzindo para ~50% no tecido muscular. Esta alteração tecido-específica, na associação IRS-2/PI 3-quinase nos ratos idosos é difícil de ser explicada, mas pode também ser uma outra característica específica do envelhecimento, pois não foi observada em outro modelo animal de resistência à insulina, como os ratos tratados cronicamente com GH (THIRONE *et al.*, 1997), que apresentaram diminuição da fosforilação dos substratos 1 e 2 e da associação destes substratos com a PI 3-quinase.

A insulina estimula a captação de glicose em tecidos muscular e adiposo, em parte pelo estímulo à translocação do GLUT4 (transportador de glicose) de um compartimento intracelular para a membrana plasmática (STEPHENS & PILCH, 1995; RICE & GARNER, 1994; QUON *et al.*, 1995). A conclusão de que a PI 3-quinase é necessária para a translocação do GLUT4, estimulada pela insulina, tem sido sustentada por diferentes métodos experimentais (HARA *et al.*, 1994; OKADA *et al.*, 1994; HARUTA *et al.*, 1995; CHEATAM *et al.*, 1994). A captação de glicose, estimulada pela insulina em células adiposas, é inibida pelo “wortmannin” e LY90024, dois inibidores da PI 3-quinase (CLARKE *et al.*, 1994; YEH *et al.*, 1995; SANCHES-MARGALET *et al.*, 1994). Mais ainda, uma mutação, na PI 3-quinase com deleção no sítio de ligação da subunidade p110, inibe a captação de glicose estimulada pela insulina (HARA *et al.*, 1994). Somados, estes resultados sugerem que a ativação da PI 3-quinase é necessária para a captação de glicose, estimulada pela insulina. Portanto, a redução da associação IRS-1/PI 3-quinase em ambos os tecidos pode estar associada à diminuição da tolerância à glicose, observada neste modelo animal.

A obesidade e a hiperinsulinemia, pelo menos em parte, podem contribuir para a resistência à insulina, associada ao envelhecimento destes ratos. OLEFSKY & REAVEN, 1975 e DAVIDSON & KARJALA, 1978, demonstraram que a resistência à insulina não ocorria em ratos velhos, quando havia restrição calórica. Entretanto, há diferenças entre os modelos animais de resistência à insulina e obesidade, e o aqui utilizado que é o envelhecimento. SAAD *et al.*, 1992, demonstraram uma diminuição no nível protéico do IRS-1 em fígado, mas não em músculo de camundongos ob/ob, modelo animal de obesidade e hiperinsulinemia. Esta resposta, provavelmente, refletiu a exposição crônica destes tecidos a diferentes níveis de insulina, como previamente discutido. Neste contexto, a diminuição dos níveis protéicos de IRS-1 no músculo poderia ser um dado próprio do envelhecimento, e não um reflexo da obesidade ou hiperinsulinemia e poderia ser responsável pela diminuição da captação periférica de glicose observada em ratos entre 2-5 meses de idade (NISHIMURA *et al.*, 1988; KONO *et al.*, 1990).

Em resumo, esta parte inicial do trabalho demonstrou uma redução na fosforilação do receptor, do IRS-1 e IRS-2 e da interação IRS-1/PI 3-quinase em tecido hepático. É possível que a menor autofosforilação do receptor tenha contribuído para os eventos subsequentes neste tecido. Em tecido muscular, observou-se uma redução na fosforilação do IRS-1 e IRS-2 acompanhado de redução na interação destes com a PI 3-quinase. É possível que a redução da quantidade de IRS-1 contribua para a menor fosforilação em tirosina deste substrato. Estes dados sugerem que alterações, nas etapas iniciais da ação insulínica, possam ter significado importante no mecanismo de resistência a esse hormônio, associada ao envelhecimento.

Efeito do captopril nas etapas iniciais da ação insulínica

O uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) é acompanhado de um aumento da sensibilidade à insulina (JAUCH *et al.*, 1987; HENRIKSEN & JACOB, 1995; DONNELLY, 1992; BERNE, 1991; PACHECO *et al.*, 1990; FERRANNINI *et al.*, 1987; NATALI *et al.*, 1991; PAOLISSO *et al.*, 1991; HERIKSEN *et al.*, 1996; HERINGS *et al.*, 1995), em pacientes com hipertensão arterial e (ou) *diabetes mellitus* não-insulino dependente ou tipo II (DMNID), que são situações de resistência à insulina.

Em modelos animais de resistência à insulina como o rato Zucker, o captopril também aumenta a sensibilidade à insulina. Entretanto, o efeito desta droga na resistência à insulina em outros modelos animais como o envelhecimento, não tinha sido ainda investigado.

Nossos resultados demonstraram que, após a administração oral aguda de captopril, houve uma melhora na sensibilidade à insulina, nos ratos senescentes, demonstrada pelo aumento da velocidade de decaimento da glicose, durante o teste venoso de tolerância à insulina (ITT). O mecanismo pelo qual o captopril induz a um aumento da sensibilidade à

insulina ainda não está completamente compreendido. Nosso estudo investigou o efeito do captopril nas etapas iniciais da ação insulínica, em ratos senescentes.

Como já descrito, a resistência à insulina que ocorre nestes ratos velhos está associada a uma redução no grau de fosforilação do IRS-1 e na associação deste substrato com PI 3-quinase, após o estímulo insulínico. O tratamento agudo com captopril aumentou significativamente o grau de fosforilação induzido pela insulina tanto do receptor de insulina, quanto do IRS-1, em ambos os tecidos. O aumento do grau de fosforilação do IRS-1 foi acompanhado de um aumento da associação IRS-1/PI 3-quinase em ambos os tecidos. Como descrito anteriormente, a associação IRS-1/PI 3-quinase está ligada ao transporte de glicose em tecido muscular e à síntese de glicogênio em fígado e músculo e, um aumento nesta interação, pode contribuir para a melhora na sensibilidade à insulina dos animais senis, tratados agudamente com captopril.

Para avaliarmos qual efeito do captopril induziria este aumento no grau de fosforilação do IRS-1, após estímulo insulínico, estudamos separadamente suas ações. O primeiro e mais bem descrito efeito do captopril envolve a inibição da conversão da angiotensina I a angiotensina II, tanto sistêmica quanto localmente (SOUBRIER *et al.*, 1988). Isto leva a um nível reduzido de angiotensina II, cujos efeitos podem ser simulados pelo uso do bloqueador competitivo do receptor AT1, losartan. A investigação do efeito do bloqueador do receptor de angiotensina sobre as etapas iniciais da ação insulínica em tecidos muscular e hepático também adquire importância, pelas descrições recentes de um “cross-talk” entre as vias de sinalização da insulina e da angiotensina, bem como pela ação hiperglicemiante deste hormônio, descrita nos últimos anos (MACHADO *et al.*, 1995). Nosso laboratório descreveu que a angiotensina (AII) é capaz de estimular a fosforilação em tirosina do IRS-1 e a seguir a associação deste com a PI 3-quinase (SAAD *et al.*, 1995) em coração de ratos. Hormônios como a insulina ou IGF-1, quando induzem a associação IRS-1/PI 3-quinase, paralelamente aumentam a atividade desta última enzima. Após infusão de AII, demonstrou-se que a associação IRS-1/PI 3-quinase foi acompanhada de uma marcante redução na atividade da enzima (VELLOSO *et al.*, 1996; SAAD *et al.*, 1995).

Entretanto, os efeitos do losartan, nas etapas iniciais da ação insulínica em fígado e músculo não haviam sido ainda investigados.

Nossos resultados demonstram que, embora o captopril aumente o grau de fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1, induzidos pela insulina em tecido muscular e hepático, nos ratos tratados com losartan não houve diferença no grau de fosforilação do IRS-1 ou associação com a PI 3-quinase, após o estímulo insulínico em ambos os tecidos. Neste contexto, o estudo de TOMIYAMA *et al.*, 1994, descrevendo que o tratamento por três semanas com o losartan diminuiu a pressão arterial média de ratos SHR (espontaneamente hipertensos e com resistência à insulina) sem afetar a sensibilidade à insulina, estão em concordância com nossos dados, sobre o efeito desta droga nas vias de transmissão do sinal insulínico. Estes dados sugerem que o efeito do captopril nas etapas iniciais da ação insulínica, não é dependente do antagonismo da angiotensina II

A segunda ação dos inibidores da ECA envolve a inibição da cininase II, uma enzima semelhante à ECA, que é responsável pela degradação da bradicinina (YANG, ERDÖS, LEVIN, 1970), aumentando conseqüentemente os níveis circulantes desta cinina. Recentemente, HENRIKSEN *et al.*, 1996, demonstraram que a administração de bradicinina sensibiliza a ação insulínica sobre o transporte de glicose, reduzindo a glicemia nos ratos Zucker (modelo animal de obesidade, hiperinsulinemia e hiperglicemia). Nossos resultados indicam que o pré-tratamento com bradicinina induz um aumento progressivo e, dose-dependente, no grau de fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1, após estímulo insulínico, em fígado e músculo de ratos velhos. Recentemente, RETT *et al.*, 1996, demonstraram, em corações isolados de ratos, que a bradicinina mimetizou a translocação induzida pela insulina tanto de GLUT1 quanto GLUT4, utilizando-se doses que não afetaram o fluxo sanguíneo coronariano. Nesta mesma linha, ISAMI *et al.*, 1996 demonstraram que a bradicinina potencializou a ação da insulina na translocação do GLUT4 do "pool" intracelular para a membrana plasmática em adipócitos isolados. Como a associação IRS-1/PI 3-quinase tem um importante papel na translocação dos transportadores de glicose, nossos resultados sugerem que a bradicinina aumentando a fosforilação do IRS-1 induzida pela insulina e sua associação com a PI 3-quinase, levaria ao

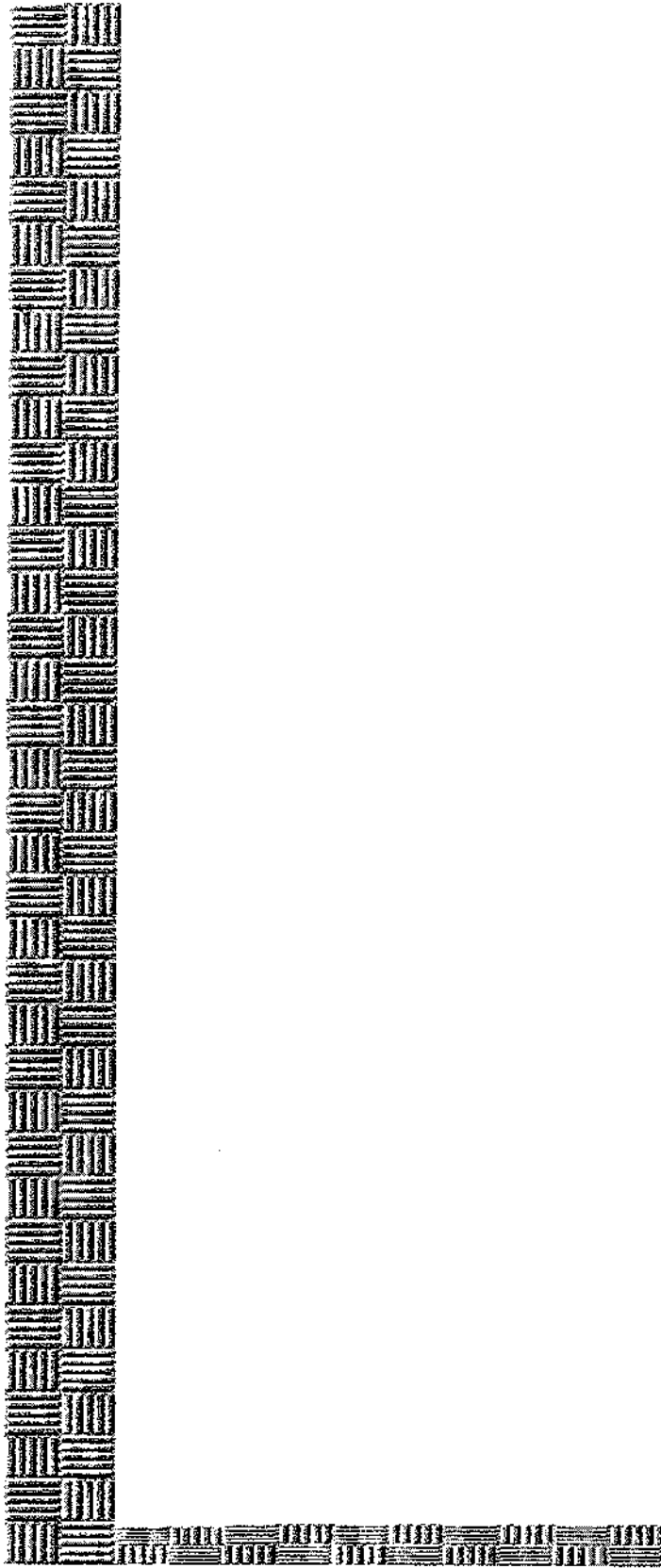
aumento da translocação dos GLUT1 e 4 aumentando assim o transporte de glicose e a sensibilidade à insulina.

ISAMI *et al.*, 1995, demonstraram, em adipócitos isolados de cães, que a administração de bradicinina aumentou o grau de fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1, induzido por insulina. Interessante que a evolução temporal também foi diferente, permanecendo o receptor com níveis mais elevados de fosforilação por tempo mais prolongado que os receptores de adipócitos controles. Este resultado sugere que a bradicinina pode reduzir o efeito de fosfatases (PTPases), que são importantes reguladores da desfosforilação do receptor de insulina.

HÄRING *et al.*, 1996, utilizando cultura de fibroblastos (rat-1), que hiperexpressam o receptor de insulina humano, demonstraram que há, possivelmente, um “cross-talk” entre vias de transmissão do sinal de insulina e de bradicinina. Nossos resultados demonstraram que, em fígado e músculo, os dois tecidos de maior importância para a homeostase da glicose, há também um “cross-talk” entre os sistemas intracelulares da insulina e da bradicinina. Este fenômeno pode ter implicações clínicas, uma vez que a resistência à insulina ocorre em vários estados patológicos, incluindo a hipertensão arterial, a aterosclerose e é um componente central do DMNID.

Há ainda outros mecanismos propostos para a influência positiva dos inibidores da ECA sobre a utilização de glicose, como a melhora do fluxo sanguíneo capilar, acompanhado de um melhor aporte de insulina e glicose ao tecido muscular (JAUCH *et al.*, 1987; TOMIYAMA *et al.*, 1994). HIROOKA *et al.*, 1992, descreveram a maior vasodilatação dependente de um fator endotelial após o uso do captopril, assim como a melhora do controle glicêmico em pacientes com DMNID, o que foi acompanhada de um aumento no fluxo sanguíneo do antebraço (KODOMA *et al.*, 1990). Embora as contribuições potenciais das influências hemodinâmicas dos inibidores da ECA sobre a utilização da glicose não possam ser descartadas, nossos resultados sobre as etapas iniciais da ação insulínica *in vivo* nos tecidos hepático e muscular dos ratos velhos, indicam, pelo menos, ações adicionais dos inibidores da ECA e da bradicinina sobre a sensibilidade à insulina.

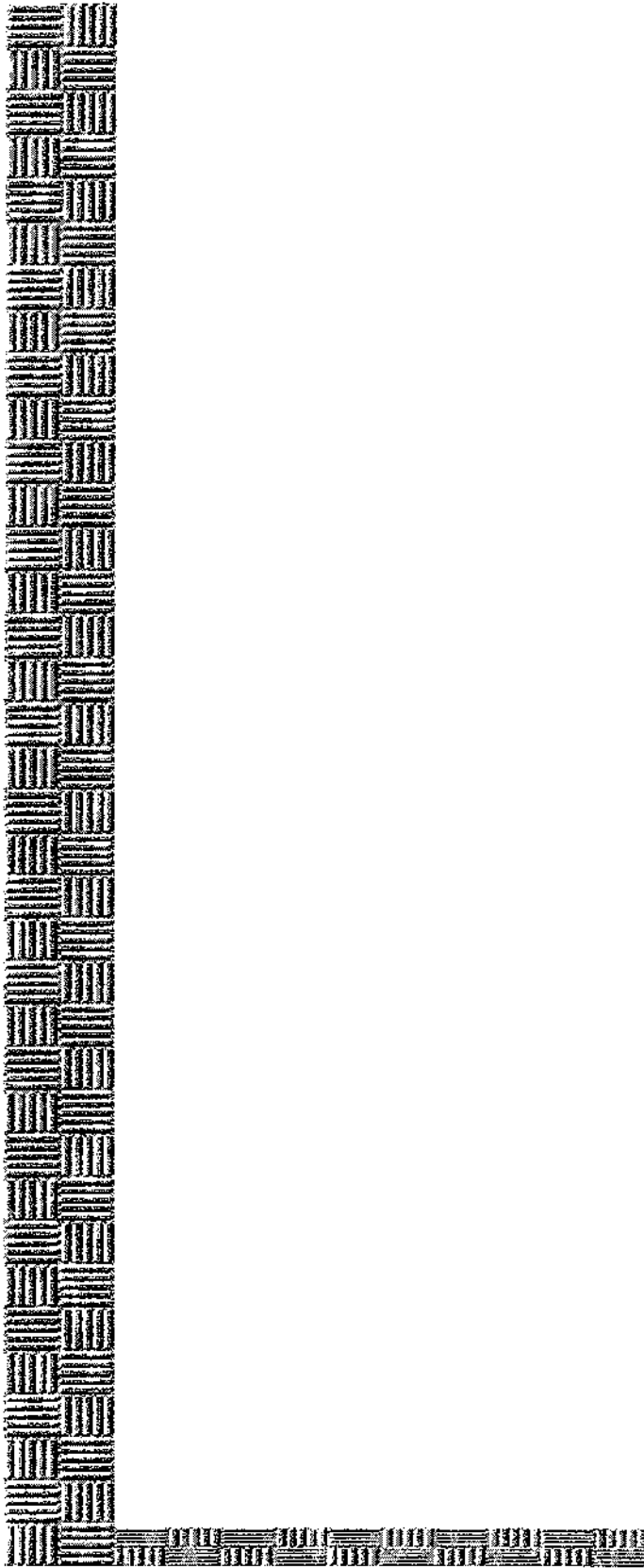
Em resumo, esta parte final do trabalho demonstrou uma melhora na sensibilidade à insulina, acompanhada de um aumento no grau de fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1 e na associação IRS-1/PI 3-quinase em fígado e músculo de ratos senis, tratados com captopril. Tais resultados foram simulados pela administração de bradicinina e não pelo uso do inibidor do receptor de angiotensina II. Estes resultados sugerem um possível mecanismo molecular para o efeito benéfico do captopril sobre a sensibilidade à insulina.



6. Conclusão

As conclusões do presente trabalho demonstram:

- Uma redução no grau de fosforilação do receptor, do IRS-1 e do IRS-2 e da interação IRS-1/PI 3-quinase em tecido hepático.
- Em tecido muscular observou-se uma redução precoce nos níveis protéicos de IRS-1 acompanhada de diminuição no grau de fosforilação do IRS-1 e do IRS-2 e da interação destes com a PI 3-quinase.
- Nestes animais senis, que foram tratados com inibidor da enzima conversora da angiotensina, o captopril, houve melhora da sensibilidade à insulina, acompanhada de um aumento do grau de fosforilação do receptor de insulina, do IRS-1 e da associação IRS-1/PI 3-quinase, em ambos os tecidos.
- Este aumento do grau de fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1, nos animais que receberam captopril, foram simulados através do tratamento com bradicinina.



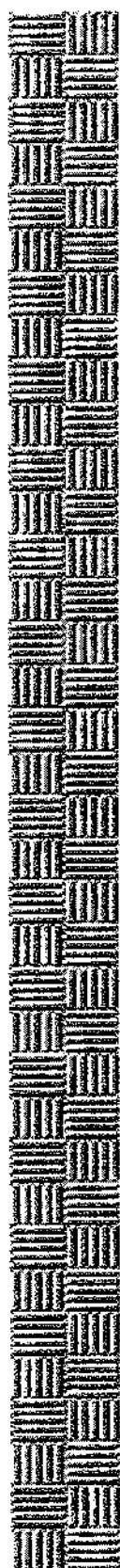
7. Summary

Insulin stimulates the tyrosine kinase activity of its receptor resulting in the phosphorylation of its cytosolic substrate, insulin receptor substrate-1 (IRS-1), which in turn associates with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), thereby activating the latter. Aging is associated with insulin resistance. However, the exact molecular mechanism is unknown. In the present study, we have examined the phosphorylation status of the insulin receptor, IRS-1 and IRS-2, as well as the association between IRS-1/PI 3-kinase and IRS-2/PI 3-kinase, in the liver and muscle of 2, 5, 12, and 20 months-old rats by immunoblotting with specific antibodies.

There were no changes in the insulin receptor concentration in the liver and muscle of rats 2 to 20 months-old as determined by immunoblotting using antibody to the carboxyl-terminal of the receptor. However, insulin stimulation of receptor autophosphorylation as determined by immunoblotting with antiphosphotyrosine antibody was reduced by 34% ($p<0.05$) in the liver of rats at 20 months. Interestingly, IRS-1 protein levels decrease at an early stage (5 months) by $49\pm9\%$ ($p<0.001$) and remained at low levels thereafter in muscle but not in liver. In samples previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and blotted with antiphosphotyrosine antibody, there was a $61\pm9\%$ ($p<0.001$) and $87\pm2\%$ ($p<0.002$) decrease in insulin stimulated IRS-1 phosphorylation level in liver and muscle respectively, of 20 months-old rats. The insulin-stimulated IRS-1 association with PI 3-kinase was decreased in the liver by $73\pm14\%$ ($p<0.01$) and by $80\pm10\%$ ($p<0.01$) in the muscle of 20 months-old rats with no change in the PI 3-kinase protein levels. Finally, by immunoprecipitation, the detection of insulin-stimulated IRS-2 phosphorylation followed the same pattern as that for IRS-1, in both liver of 2 and 20 months-old rats. These data suggest that changes in the early steps of insulin signal transduction may have an important role in the insulin resistance observed in old animals.

Another aim of this study was to investigate the effect of captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, that enhances insulin sensitivity, on the early steps of insulin action in aging rats. The 20 months-old rats that received captopril showed an increase in insulin sensitivity by intravenous insulin tolerance test, and this effect was accompanied by an increased insulin-induced receptor autophosphorylation by $462\pm253\%$

($p < 0.05$) in the liver and $697 \pm 78\%$ ($p < 0.001$) in the muscle of treated rats. There were also increases of $250 \pm 17\%$ ($p < 0.001$) and $280 \pm 50\%$ ($p < 0.05$) in insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation levels of the liver and muscle, respectively, of animals treated with captopril. The insulin-stimulated IRS-1 association with PI 3-kinase in the liver increased by $305 \pm 20\%$ ($p < 0.001$) and by $267 \pm 48\%$ ($p < 0.05$) in the muscle. The acute administration of bradykinin ($100 \mu\text{g/kg}$, i.p.) increased insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and of IRS-1 in the liver and muscle in a similar fashion. These data demonstrate that ACE inhibitors modulate the early steps of insulin signalling, and that this effect may be simulated by the administration of bradykinin.



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 signaling in mice with target disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, 372: 186-190, 1994.
- 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.
- BARNARD, R. J.; LAWANI, L. O.; MARTIN, D. A.; YOUNGREN, J. F.; SING, R.; SCHECK, S. - Effects of maturation and aging on the skeletal muscle glucose transport system. **Am. Physiol. Soc.**, 25: E619-E626, 1992.
- BERNE, C. - Metabolic effects of ACE inhibitors. **J. Int. Med.** 229: 119-125, 1991.
- 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.**, 72:248-154, 1976.
- BRENELLI, S.L.; MAEDA, L.; CARVALHO, C.R.O.; SAAD, M.J.A.; VELLOSO, L.A. - Effect of uremia in the early steps in insulin signal transduction in liver and muscle of rats. In: **79th Annual Meeting of the Endocrine Society**, 1997.
- CARPENTER, C. L.; CANTLEY, I. 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.
- CARRASCOSA, J. M.; RUIZ, P.; MARTINEZ, C.; PULIDO, J. A.; SATRUSTEGUI, J.; ANDRES, A. - Insulin receptor kinase activity in rat adipocytes is decreased during aging. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 160: 303-309, 1989.
- 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. Cel. Biol.**, 14: 4902-4911, 1994.
- CHOU, C.K.; DULL, T.J.; RUSSEL, D.S.; GHERZI, R.; LEWOHL, D.; ULLRICH, A.; ROSEN, O.M. - Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack proein tyrosine kinse activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. **J. Biol. Chem.**, 262: 1842-1847, 1987.

- 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.
- DAVIDSON, M.B.; KARJALA, R.G. - Primary insulin antagonism of glucose transport in muscle from the older-obese rat. **Metabolism**, 27: 1994-2005, 1978.
- 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. **Molecular Endocrinology**, 4: 409-416, 1990.
- DONNELLY, R. - Angiotensin-converting enzyme enhibitors and insulin sensitivity: metabolic effects in hypertension, diabetes, and heart failure. **J. Ardiov. Pharm.**, 20(suppl. 11): S38-S44, 1992.
- EBINA, Y.; ARAKI, E.; TAIRA, M.; SHIMADA, F.; MORI, M.; CRAIK, C.S.; SIDDLE, K.; PIERCE, S.B.; ROTH, R.A.; RUTTER, W.J. - 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: 704-708, 1987.
- FEHLMAN, M.; PERYRON J.; SAMSON, M.; VAN OBERGHEN, 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.
- FERRANNINI, E.; BUZZIGOLI, G.; BONADONNA, R.; GIORICO, M.A.; OLEGGINI, M.; GRAZIADEI, L.; PEDRINELLI, R.; BRANDI, L.; BEVILACQUA, S. - Insulin resistance in essential hypertension. **N. Engl. J. Med.**, 317: 350-357, 1987.
- FOLLI, F.; SAAD, M. J. A.; BACKER, J. M.; KAHN, C. R. - Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with IRS-1 in liver and muscle of the intact rat. **J. Biol Chem.**, 267:22171-22177, 1992.
- FOLLI, F.; SAAD, M. J. A.; BACKER, J. M.; KAHN, C. R. - Regulation of phosphatidylinositol 3-Kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, 92:1787-1794, 1993.
- FREYCHET, P.; ROTH, J.; NEVILLE JR, D. M. - Insulin receptor in the liver: Specific binding of [¹²⁵ I] insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 68:1833-1837, 1971.
- GANS, R.O.B.; BILO, H.J.G.; NAUTA, J.J.P.; POPP-SNIJDERS, C.; HEINE, R.J.; DONKER, A.J.M. - The effect of angiotensin-I converting enzyme inhibition on insulin action in healthy volunteers. **Eur. J. Clin. Invest.**, 21: 527-533, 1991.
- 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.

- GIORGINO, F.; ALMAHFOUZ, A.; GOODYEAR, L. J.; SMITH, R. J. - Glucocorticoid regulation of insulin receptor and substrate IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle *in vivo*. **J. Clin. Invest.**, 91:2020-2030, 1993.
- GOODMAN, N. M.; DLUZ, S. M.; McELANEY, M. A.; BELUR, E.; RUDERMAN, N. B. - Glucose uptake and insulin sensitivity in rat muscle: Change during 3-96 weeks of age. **Am. J. Physiol.**, 244:E93-E100, 1983.
- HADARI, Y.R.; TZAHAR, E.; NADIV, O.; ROTHENBERG, P.; ROBERTS, C.T.J.; LEROITH, 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.
- 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.
- HÄRING, H.U.; TIPPMER, S.; KELLERER, M.; MOSTHAF, L.; KRODER, G.; BOSSENMAIER, B.; BERTI, L. - Potential mechanisms of a cross talk between bradykinin and insulin receptor. **Diabetes**, 45: S115-S119, 1996.
- HARUTA, M.T.; MORRIS, A.J.; ROSE, D.W.; NELSON, J.G.; MUECKLER, 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.; JACOB, S. - Effects of captopril on glucose transport activity in skeletal muscle of obese Zucker rats. **Metabolism**, 44: 267-272, 1995.

- HENRIKSEN, E. J.; JACOB, S.; AUGUSTIN, H. J.; DIETZE, G. J. - Glucose transport activity in insulin-resistant rat muscle. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and bradykinin antagonism. **Diabetes**, 45: S125-S128, 1996.
- HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WINKILMAN, I. - Clinical chemistry, Principles and Tecniques, 2nd ed., Herper and Row Publisher, Ino N.Y., 1288, 1974.
- HERINGS, R.M.C.; BOER, A.; STRICKER, B.H.C.H.; LEUFKENS, H.G.M.; PORSIUS, A. - Hypoglycaemia associated with use of inhibitors of angiotnsin-converting enzyme. **Lancet**, 345: 1195-1198, 1995.
- 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.
- HIROOKA, Y.; IAMIZUMA, T.; MASAKI, H.; ANDO, S.; HARADA, S.; MOMOHARA, M.; TAKESHITA, A. - Captopril improved impaired endothelium-dependent vaodilation in hypertensive patients. **Hypertension**, 20: 175-180, 1992.
- ISAMI, S.; KISHIKAWA, E.; ARAKI, E.; UEHARA, M.; KANEKO, K.; SHIROTANI, T.; URA, S.; MOTOYOSHI, S.; MATSUMOTO, K.; MIYAMURA, N.; SHICHIRI, M. - Bradykinin enhances GLUT4 translocation through the increase of insulin receptor tyrosine kinase in primary adipocytes: evidence that bradykinin stimulates the insulin signaling pathway. **Diabetologia**, 39: 412-420, 1996.
- ISHIZUKA, T.; YAMAMOTO, M.; KAJITA, K.; MIURA, K.; YASUDA, K.; HERNANDEZ, H.; FARESE, R. V. - Differential effect of aging on protein kinase c activity in rat adipocytes and soleus muscle. **Metabolism**, 42: 420-425, 1993.

- JAUCH, K. W.; HARTL, W.; GÜNTHER, B.; WICKLMAYR, M.; RETT, K.; DIETZE, G.
- Captopril enhances insulin responsiveness of forearm muscle tissue in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Eur. J. Clin. Invest.**, 17: 448-454, 1987.
- KAHN, C. R. - Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. **Annu. Rev. Med.**, 36:429-451, 1985.
- KARASAKI, 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.
- KARASIK, A.; KAHN, C.R. - Dexamethasone-induced changes in phosphorylation of the insulin and epidermal growth factor receptors and their substrates in intact rat hepatocytes. **Endocrinology**, 123: 2214-2222, 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.
- KODOMA, J.; KATAYAMA, S.; TANAKA, K.; KAWAZU, S.; ISHII, J. - Effect of captopril on glucose concentration: possible role of augmented postprandial forearm blood flow. **Diabetes Care**, 13: 1109-1111, 1990.
- KONO, S.; KUZUZYA, H.; OKAMOTO, M.; NISHIMURA, H.; KOSAKI, A.; KAKEHI, T.; INOVE, G.; MAEDA, I.; IMURA, H. - Changes in receptor kinase with aging in rat skeletal muscle and liver. **Am. J. Physiol.**, 259: E27-E35, 1990.
- 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.
- 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.
- LAEMMLI, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.
- LAVAN, B.E.; KUHNÉ, M.R.; GARNER, C.W.; ANDERSON, D.; REEDIJK, M.; PAWSON, T.; LIENHARD, G.E. - The association of insulin-elicited phosphotyrosine proteins with src homology 2 domains. **J. Biol. Chem.**, 267: 11631-11636, 1992.
- 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.
- LOTT, J.A.; TURNER, K - Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. **Clin. Chem.**, 21: 1754-1770, 1975.
- MACHADO, L.J.C.; MIHESSEN-NETO, I.; MARUBAYASHI, U.; REIS, A.M.; COIMBRA, C.C. - Hyperglycemic action of angiotensin II in freely moving rats. **Peptides**, 16: 479-483, 1995.
- MASSAGUE, J. P.; PILCH, P. F.; CZECH, M. P. - Electrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unit stoichiometries. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, 77: 7137-7141, 1981.
- MATHEI, S.; BENECKE, H.; KLEIN, H.H.; HAMANN, A.; KERYMANN, G.; GRETEN, G. - Potential mechanism of insulin resistance in aging: impaired insulin-stimulated glucose transport due to a depletion of intracellular pool of glucose transporters in Fischer rat adipocytes. **J. Endocrinol.**, 126: 99-107, 1990.
- MYERS, M.G.; WHITE, M.F. - Insulin signal transduction and the IRS proteins. **Annu. Rev. Pharmacol. Metab.**, 6: 209-215, 1995.
- NADIV, O.; SHINITZKY, M.; MANU, H.; HECHT, D.; ROBERTS JR, C. T.; LE ROITH, D.; ZICK, Y. - Elevated protein tyrosine phosphatase activity and increased membrane viscosity are associated with impaired activation of the insulin receptor kinase in old rats. **Biochem. J.**, 298:443-450, 1994.
- NATALI, A.; SANTORO, D.; PALOMBO, C.; CERRI, M.; GHIONE, S.; FERRANNINI, E. - Impaired insulin action on skeletal muscle metabolism in essential hypertension. **Hypertension**, 17: 170-178, 1991.

- NEVES, F.A.; MEZZOMO, N.F.; KOHLMANN, N.E.; KOHLMANN, Jr.O.; ZANELLA, M.T.; RIBEIRO, A.B. - [Glucose tolerance test and insulin secretion in patients with essential hypertension. Effect of enalapril] Tolerância a glicose e secreção de insulina em pacientes com hipertensão arterial essencial. Efeito do enalapril. **Arq. Bras. Cardiol.**, 62: 1-5, 1994.
- NISHIMURA, H.; KUZUYA, H.; OKAMOTO, M.; YOSHIMASA, Y.; YAMADA, K.; IDA, T; KAKEHI, T; IMURA, H. - Change of insulin action with aging in conscious rats determined by euglycemic clamp. **Am. J. Physiol.**, 254: E92-E98, 1988.
- NUNES, A.L.B.; BRENELLI, S.L.; CARVALHO, C.R.O.; SAAD, M.J.A. - Redução da fosforilação do IRS-1 no fígado de ratos sépticos. In: **IX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (resumos)**, 178, 1994.
- OKADA, T.; KAWANO, Y.; SAHIHARA, T.; HAZEKI, O.; UI, M. - Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin induced glucose transport
- OLEFSKY, J.M.; REAVEN, G.M. - Effects of age and obesity on insulin binding to isolates adipocytes. **Endocrinology**, 96: 1486-1498, 1975.
- PACHECO, C. A.; RAMIREZ, L. C.; RIOS, J. M.; RASKIN, P. - Hypoglycemia induced by angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with non-insulin-dependent diabetes receiving sulfonylurea therapy. **Am. J. Med.**, 89: 811-713, 1990.
- PAOLISSO, G.; RIU, S.; MARRAZZO, G.; VERZA, M.; VARRICHIO, M.; D'ONOFRIO, F. - Insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with chronic congestive heart failure. **Metabolism**, 40: 972-977, 1991.
- PAWSON, T. - Protein modulates and signaling networks. **Nature**, 373: 573-580, 1995.

- 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.
- 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.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; HAHEY, G.C. - AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet., **J. Nutr.**, 123:1939-1951, 1993.
- RETT, K.; WICKLMAYR, M.; DIETZE, G.J.; HÄRING, H.U. - Insulin-induced glucose transporter (GLUT1 and GLUT4) translocation in cardiac muscle tissue is mimicked by bradykinin. **Diabetes**, 45: S66-S69, 1996.
- RICE, K.M.; GARNER, G.R. - Correlation of the insulin receptor substrate-1 with insulin-responsive deoxyglucose transport in 3T3-l1 adipocytes. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 198: 523-530, 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.

- 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.; ARAKI, E.; MIRALPEIX, M.; ROTHENBERG, P. L.; WHITE, M. F.; KAHN, C. R. - Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, 90:1839-1849, 1992.
- SAAD, M. J. A.; FOLLI, F.; KAHN, 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.; VELLOSO, L. A.; CARVALHO, C. R. O. - Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation in insulin receptor substrate 1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. **Biochem. J.**, 310 : 741-744, 1995 (c).

- SAAD, M.J.A. - Molecular mechanisms of insulin resistance. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, 27: 941-957, 1994.
- SAAD, M.J.A.; CARVALHO, C.R.O.; THIRONE, A.C.P.; VELLOSO, L. A. - Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **J. Biol. Chem.**, 271: 22100-22104, 1996.
- SAAD, M.J.A.; KAHN, C.R. - Alterations in insulin receptor and substrate phosphorylation in hypertensive rats. **J. Am. Soc. Nephrol.**, 3: S69-S77, 1992.
- SAAD, M.J.A.; MAEDA, L.; BRENELLI, C.R.O.; PAIVA, L.A.; VELLOSO, L.A. - Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. **Diabetologia**, 40: 179-186, 1997.
- SANCHES-MARGALET, V.; GOLDFINE, I.D.; VLAHOS, C.J.; SUNG, C.K. - Role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor LY294002. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 157: 140-145, 1994.
- 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.
- SOUBRIER, F.; ALHENC-GELAS, F.; HUBEERT, C.; ALLEGRI, J.; JOHN, M.; TREGGAR, G.; CORVOL, P. - Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 85: 9386-9390, 1988.
- 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.

SUN, X. J.; WANG, L. M.; PATTI, M. A.; BRUNING, J. C.; HAAG, B.; JOHSON, R. S.; KAHN, C. R. - Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. **Nature**, 337:173-177, 1995.

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.

TAKATA, Y.; WEBSTER, N. J. G.; OLEFSKY, J. M. - Mutation of the two carboxyl terminal tyrosines results in an insulin receptor with normal metabolic signaling properties. **J. Biol. Chem.**, 263:8912-8917, 1988.

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.

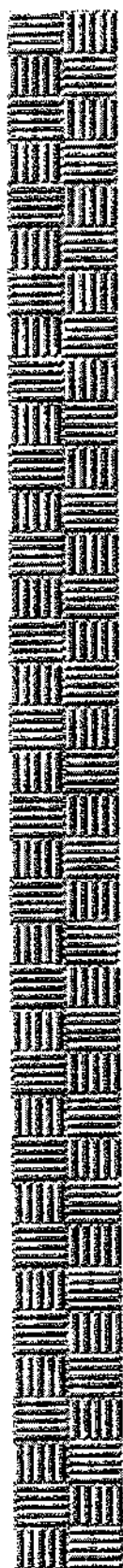
TAKAYAMA, S.; WHITE, M. F.; LAURIS, V.; KAHN, C. R. - Phorbol esters modulate insulin receptor phosphorylation and insulin action in hepatoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, 81: 7797-7801, 1984.

- 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 OBERGHEEN, 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 GH treatment on insulin signal transduction in rat tissues. **Mol. Cel. Endocr.**, in press, 1997.
- TOMIYAMA, H.; KUSHIRO, T.; ABETA, H.; ISHII, T.; TAKAHASHI, A.; FURUKAWA, L.; ASAGAMI, T.; HINO, T.; SAITO, F.; OTSUKA, Y.; KURUMATANI, H.; KOBAYASHI, F.; KANMATSUSE, K.; KALIWARA, N. - Kinins contribute to the improvement of insulin sensitivity during treatment with angiotensin converting enzyme inhibitor. **Hypertension**, 23: 450-455, 1994.
- TOWBIN, H.; STAEBLIN, J.; GORDON, J. - Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 76:4350-4354, 1979.
- TRINDER, P. - Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **J. Clin. Path.** 22: 158-161, 1969.
- 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.

- UEHARA, M.; KISHIKAWA, H.; ISAMI, S.; KISANUKI, K.; MITAMURA, N.; MIYATA, T.; YANO, T.; SHICHIRI, M. - Effect on insulin sensitivity of angiotnsin converting enzyme inhibitors with or without a sulphydryl group: bradykinin may improve insulin resistance in dog and humans. **Diabetologia**, 40: 300-307, 1994.
- VELLOSO, L.A.; FOLLI, F.; SUN, X.J.; WHITE, M.F.; SAAD, M.J.A.; KAHN, C.R. - Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 12490-12495.
- 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.
- WHITE, M.F.; KAHN, C.R. - The insulin signaling system. **J. Biol. Chem.**, 269: 1-4, 1994.
- WILDEN, P. A.; KAHN, C. R.; SIDDLE, K.; WHITE, M. F. - Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic funcions. **J. Biol. Chem.**, 267: 16660-16668, 1992.
- YAMAUCHI, K.; MILARSKI, K.L.; SALTIEL, A.R.; PESSIN, J.E. - Protein tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a require positive effector for insulin downstream signaling. **Biochemistry**, 92: 664-668, 1995.
- YANG, H.Y.T.; ERDÖS, E.G.; LEVIN, Y. - A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotnsin I and inactivates bradykinin. **Biochem. Biophys. Acta.**, 214: 374-376, 1970.

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.

ZANELLA, M.T.; BAPTISTA, M.; COSTA, C.H.; KOHLMANN, N.E.; KOHLMANN, Jr.O.; RIBEIRO, A.B. - [Comparative effects of captopril and chlorthalidone on glucose tolerance and insulin levels essential hypertensives] Comparação entre os efeitos de captopril e da clortalidona sobre a tolerância a glicose e os níveis séricos de insulina em hipertensos essenciais. **Arq. Bras. Cardiol.**, 67: 47-52, 1996.



9. Anexos

ANEXO 01

TABELA 01: Características gerais dos animais quanto à idade, peso (g), glicemia expressa em mg/dl, insulina sérica expressa em $\mu\text{U/ml}$, e velocidade de decaimento da glicose, medida pelo ITT curto, expressa por $\%/min$ dos diferentes grupos estudados (2, 5, 12 e 20 meses de idade). Os resultados são expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média e a significância expressa em *p, entre o grupo controle (2 meses) e os demais grupos de idades distintas, e entre o grupo de 20 meses sem (controle) e com tratamento agudo com captopril.

Grupos	Peso (g)	Glicemia (mg/dl)	Insulina ($\mu\text{U/ml}$)	k_{it} (%/min)
2 meses	136 $\pm$ 6	123 $\pm$ 5	29 $\pm$ 4	4,55 $\pm$ 0,34
5 meses	337 $\pm$ 10 *p<0,01	124 $\pm$ 8	34 $\pm$ 8	
12 meses	392 $\pm$ 10 *p<0,01	118 $\pm$ 9	37 $\pm$ 6	
20 meses	444 $\pm$ 12 *p<0,01	124 $\pm$ 11	44 $\pm$ 5 *p<0,01	2,29 $\pm$ 0,63 *p<0,01
20 meses com captopril	440 $\pm$ 10	109 $\pm$ 7		4,65 $\pm$ 0,69 *p <0,05

ANEXO 02

TABELA 02: Níveis de glicose e de insulina séricas, expressas em mg/dl e μ U/ml, respectivamente, dos animais com 2, 5, 12 e 20 meses de idade. São expressas as Médias $\pm$ Erros Padrão da Média (M), Desvios Padrão da Média (DPM) e a significância expressa em *p-

2 meses		5 meses		12 meses		20 meses		20 meses + iECA	
Glicemia	Insulina	Glicemia	Insulina	Glicemia	Insulina	Glicemia	Insulina	Glicemia	
mg/dl	μ U/ml	mg/dl	μ U/ml	mg/dl	μ U/ml	mg/dl	μ U/ml	mg/dl	
154	25	139	64	150	20	154	64	122	
113	24	132	27	145	46	140	45	98	
105	25	130	50	124	18	131	37	97	
116	29	122	17	120	42	116	42	135	
127	40	139	35	90	50	121	42	144	
104	52	86	10	86	38	128	54	110	
137	33			112		73	23	115	
104	35							97	
157	15							97	
115	13							87	
127									
118									
114									
13	10	6	6	7	6	7	7	10	n
123 $\pm$ 5	29 $\pm$ 4	124 $\pm$ 8	34 $\pm$ 8	118 $\pm$ 9	36 $\pm$ 6	124 $\pm$ 11	44 $\pm$ 5	109 $\pm$ 7	M
17,57	11,6	19,98	20,3	24,6	13,53	27,8	12,9	19,7	DPM
		=0,8	=0,56	=0,66	=0,32	=0,98	*<0,05	=0,24	p

ANEXOS 03

TABELA 03: Tabela contendo os resultados dos decaimentos de glicose pelo teste de tolerância à insulina curto (ITT) nos animais com 2 (controles) e 20 meses, sendo este último grupo dividido entre os sem (controles) e com tratamento agudo pelo inibidore da enzima conversora de angiotensina, captopril. Os resultados são expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média (M), Desvio Padrão da Média (DPM) e a significância expressa em *p.

	2 meses	20 meses	20 meses + iECA
	3,74	2,15	3,56
	3,70	2,12	4,07
	4,01	2,10	3,66
	5,75	5,05	4,35
	4,10	2,12	4,20
	5,72	0,25	8,06
	4,85		
M	4,55 $\pm$ 0,34	2,29 $\pm$ 0,63	4,65 $\pm$ 0,69
DPM	0,89	1,54	1,7
P		*p<0,01	*p<0,05

ANEXO 04

TABELA 04: Medida da densitometria óptica, das bandas correspondentes à subunidade β do receptor de insulina detectadas através do “immunoblotting” com anticorpo anti-receptor de insulina. A tabela A corresponde aos resultados obtidos no tecido hepático e a tabela B em tecido muscular de ratos com 2, 5, 12 e 20 meses de idade. Os resultados são expressos com média $\pm$ erro padrão da média (M) e desvio padrão da média (DPM). A análise estatística utilizada foi o teste t não pareado e a significância é expressa em p , comparando-se cada grupo com o grupo controle de 2 meses. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

TABELA A

	2 meses	5 meses	12 meses	20 meses
	7718	6439	8721	4789
	6427	5156	9688	8702
	7592	4751	8478	9434
	7110	3163	7648	9750
	7185	9110	9161	8519
	7939	9503	7258	1006
	7914	6327	3932	
		8788		
n	7	8	7	6
média	7412	6654	7841	7033
desvio	543	2296	1915	3450
erro	206	811	725	1408
t		0,849	0,57	0,289
p		0,41	0,57	0,778
unidades arbitrárias	100$\pm$3	90$\pm$11	105$\pm$10	95$\pm$19

TABELA B

	2 meses	5 meses	12 meses	20 meses
	3706	6940	2463	2052
	5146	5301	3843	4343
	2061	5660	1555	4195
	5271	2278	5889	1587
	4558	5598	6856	1807
	4677	5523	3764	1602
	3946	1519	3470	8646
	4868	3732	2219	5484
	3874	3682	3484	8145
	3531		7806	
	5086		2595	
	4698		5728	
n	12	9	12	9
média	4285	4470	4139	4206
desvio	916	1777	1979	2759
erro	265	592	572	919
t		0,31	0,23	0,09
p		0,76	0,81	0,92
unidades arbitrárias	100±6	104±14	96±13	98±21

ANEXO 05

TABELA 05: 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. A tabela **A** corresponde aos resultados obtidos no tecido hepático e a tabela **B** em tecido muscular de ratos com 2, 5, 12 e 20 meses de idade. Os resultados são expressos com média $\pm$ erro padrão da média (M) e desvio padrão da média (DPM). A análise estatística utilizada foi o teste *t* não pareado e a significância é expressa em *p*, comparando-se cada grupo com o grupo controle de 2 meses. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

TABELA A

	2 meses	5 meses	12 meses	20 meses
	13841	11606	15351	10004
	11440	11697	5445	5876
	13625	13240	16587	8428
	12864	9801	11305	12609
	13455	15414	11624	8612
	12012		24520	6054
	3764		15400	17548
	12690		17132	
	10159		16168	
	10940			
	10940			
	6931			
	16984			
	22688			
	8452			
	12928			
	15630			
n	16	5	9	7
média	12400	12351	14837	9876
desvio	4249	2105	5189	4095
erro	1062	942	1729	1544
t		0,025	1,27	1,32
p		0,98	0,21	0,2
unidades arbitrárias	100$\pm$8	100$\pm$8	120$\pm$14	80$\pm$12

TABELA B

	2 meses	5 meses	12 meses	20 meses
	4720	2958	1850	2670
	5939	2667	3566	3482
	5871	3780	6647	2161
	6622	1081	5261	2485
	5260	2003	2985	
	4968	1853	2917	
	6465	4371	2288	
	5044	6006		
	7291			
	6719			
	6044			
	8328			
	6815			
	4494			
n	14	8	7	4
média	6041	3090	3645	2699
desvio	1045	1584	1715	563
erro	279	560	649	281
t		5,28	3,998	6,05
p		0,000	0,000	0,000
unidades	100±5	51±9	60±11	45±5
arbitrárias				

ANEXO 06

TABELA 06: Medida da densitometria óptica, em unidades arbitrárias, das bandas correspondentes à fosforilação da pp120 quando submetidos ao “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY). A tabela A corresponde aos resultados obtidos no tecido hepático e a tabela B em tecido muscular de ratos com 2, e 20 meses de idade. Os resultados são expressos com média $\pm$ erro padrão da média (M) e desvio padrão da média (DPM). A análise estatística utilizada foi o teste *t* não pareado e a significância é expressa em *p*, comparando-se cada grupo com o grupo controle de 2 meses. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

TABELA A

	2 meses		20 meses	
	basal	pós-estímulo	basal	pós-estímulo
	3641	3356	2785	3287
	3520	3690	4160	4407
	3102	3102	3000	4200
	6541	5207	2500	3800
	6090	6257		
	6022	6716		
n	6	6	4	4
média	4935	4721	3111	3923
desvio	1419	1557	728	493
erro	579	635	364	246
p		=0,8		=0,11
unidades	100$\pm$12 %	96$\pm$13 %		
arbitrárias			100$\pm$12	126$\pm$8 %
p			<0,05	=0,3
unidades	100$\pm$12 %		63$\pm$7 %	
arbitrárias		100$\pm$13 %		83$\pm$5 %

TABELA B

	2 meses		20 meses	
	basal	pós-estímulo	basal	pós-estímulo
	9993	11390	19252	10471
	10676	14047	11003	18893
	11759	10757	10002	17000
	11001	11847	15063	13421
	11141	10680		
	11984	11864		
n	6	6	4	4
média	15074	15776	13830	14946
desvio	4740	4276	4225	3748
erro	1935	1745	2113	1874
p		=0,79		0,7
unidades	100±13 %	104±11 %		
arbitrárias			100±15 %	108±13 %
p			=0,68	=0,76
unidades	100±13 %		100±15 %	
arbitrárias		100±11 %		95±12 %

ANEXO 07

TABELA 07: Medida da densitometria óptica, em unidades arbitrárias, das bandas correspondentes à fosforilação da subunidade β do receptor de insulina (pp 95) quando submetidos ao “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY). A tabela **A** corresponde aos resultados obtidos no tecido hepático e a tabela **B** em tecido muscular de ratos com 2, 5, 12 e 20 meses de idade. Os resultados são expressos com média $\pm$ erro padrão da média (M) e desvio padrão da média (DPM). A análise estatística utilizada foi o teste *t* não pareado e a significância é expressa em *p*, comparando-se cada grupo com o grupo controle de 2 meses. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

TABELA A

	2 meses	5 meses	12 meses	20 meses
	3372	3222	3475	3081
	4299	3773	3075	3009
	3827	4531	4567	1802
	3094	4147	3444	3045
	2992	5148	3030	
	4026	3215	2110	
	5992	4546	3358	
	4598	2606	6424	
	4606			
	4239			
	5073			
	4613			
	3424			
	3587			
n	14	8	8	4
média	4124	3898	3685	2734
desvio	828	849	1296	622
erro	221	300	458	311
t		0,7	0,97	3,09
p		0,49	0,34	0,007
unidades arbitrárias	100 $\pm$ 5	94 $\pm$ 7	89 $\pm$ 11	66 $\pm$ 7

TABELA B

	2 meses	5 meses	12 meses	20 meses
	8886	3986	5461	6276
	4617	4429	2984	5592
	4290	7287	3935	8760
	13573	9693	3148	2800
	3222	5156	5325	
	5500	5631	4060	
	5242	6839	3765	
	6588	2127	6984	
	10337		5368	
	6632			
	5728			
	4116			
	3870			
n	13	8	9	4
média	6354	5643	4559	5857
desvio	2960	2310	1307	2451
erro	822	816	436	1225
t		0,578	1,698	0,303
p		0,57	0,105	0,76
unidades	100±13	89±13	72±7	92±19
arbitrárias				

ANEXO 08

TABELA 08: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à fosforilação da pp185 quando submetidos ao “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY). A tabela **A** corresponde aos resultados obtidos no tecido hepático e a tabela **B** em tecido muscular de ratos com 2, 5, 12 e 20 meses de idade. Os resultados são expressos com média $\pm$ erro padrão da média (M) e desvio padrão da média (DPM). A análise estatística utilizada foi o teste *t* não pareado e a significância é expressa em *p*, comparando-se cada grupo com o grupo controle de 2 meses. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

TABELA A

	2 meses	5 meses	12 meses	20 meses
	6156	4970	1571	4209
	7961	4967	2946	1802
	7345	4122	1818	5218
	6290	3633	1086	2391
	11906	1418	8305	1690
	9698	2359	6105	6868
	6030	3070	3572	3220
	7048	3270	4912	
	7805	6645	2311	
	5994	8042		
	6643	7375		
	8816	4488		
	8374	11449		
	7152	6328		
	7560	9488		
	6329			
	5511			
	8824			
	7342			
	11572			
n	20	15	9	7
média	7722	5441	3625	2628
desvio	1755	2772	2393	1921
erro	393	716	798	728
t		2,977	6,902	6,458
p		0,005	0,000	0,000
unidades arbitrárias	100 $\pm$ 5	70 $\pm$ 9	47 $\pm$ 10	34 $\pm$ 9

TABELA B

	2 meses	5 meses	12 meses	20 meses
	14854	7290	6034	1600
	8361	9717	5799	4580
	16858	12376	3547	1258
	12609	12802	8270	6020
	11114	3614	7710	4311
	18044	8228	8840	
	13632	6835	6340	
	8879	8529	6369	
	13290	10654		
	10760	16730		
	11340			
	10890			
	11631			
n	13	10	7	5
média	12481	9677	6652	3554
desvio	2844	3677	1796	2049
erro	790	1163	680	915
t		2,066	4,889	6,359
p		0,51	0,000	0,000
unidades arbitrárias	100±6	77±9	53±5	28±7

ANEXO 09

TABELA 09: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à fosforilação do IRS-1 em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY) e anti-PI 3-quinase, para avaliar a associação IRS-1/PI 3-quinase. A tabela A corresponde aos resultados obtidos no tecido hepático e a tabela B em tecido muscular de ratos com 2 e 20 meses de idade. Os resultados são expressos com média (M) $\pm$ erro padrão da média (EPM) e desvio padrão da média (DPM). A análise estatística utilizada foi o teste *t* não pareado e a significância é expressa em *p*, comparando-se cada grupo com o grupo controle de 2 meses. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

TABELA A

	Fosforilação		Associação	
	2 meses	20 meses	2 meses	20 meses
	7170	2001	6681	3846
	7405	4767	7550	303
	7564	1927	7135	1594
	6933	2600		
n	4	4	3	3
média	7268	2824	7122	1914
desvio	276	1330	435	1793
erro	138	665	251	1036
t		6,54		4,889
p		0,000		0,008
unidades	100$\pm$2	39$\pm$9	100$\pm$3	27$\pm$14
arbitrárias				

TABELA B

	Fosforilação		Associação	
	2 meses	20 meses	2 meses	20 meses
	1123	224	11209	23
	1634	140	11234	3766
	1379	185	11700	3227
n	3	3	3	3
média	1378	183	11848	2338
desvio	255	42	699	2023
erro	147	24	404	1169
t		8,009		7,696
p		0,001		0,002
unidades arbitrárias	100±11	13±2	100±3	20±10

ANEXO 10

TABELA 10: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à fosforilação do IRS-2 em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 e “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY) e anti-PI 3-quinase, para avaliar a associação IRS-2/PI 3-quinase. A tabela **A** corresponde aos resultados obtidos no tecido hepático e a tabela **B** em tecido muscular de ratos com 2 e 20 meses de idade. Os resultados são expressos com média (M) $\pm$ erro padrão da média (EPM) e desvio padrão da média (DPM). A análise estatística utilizada foi o teste *t* não pareado e a significância é expressa em *p*, comparando-se cada grupo com o grupo controle de 2 meses. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

TABELA A

	Fosforilação		Associação	
	2 meses	20 meses	2 meses	20 meses
	9869	6231	19610	20450
	8633	2179	18958	13461
	8816	6868	13362	16410
	8374	4209	15100	
	4			
n	8923	4	4	3
média	656	4872	16757	16773
desvio	326	2123	3014	3508
erro		1061	1507	2025
t		6,495		0,007
p		0,000		0,9
unidades	100$\pm$4	55$\pm$12	100$\pm$9	100$\pm$21
arbitrárias				

TABELA B

	Fosforilação		Associação	
	2 meses	20 meses	2 meses	20 meses
	925	242	13019	8043
	2447	23	6664	4943
	1076	160	12609	3496
	1089	126	11467	
n	4	4	4	3
média	1384	138	10939	5494
desvio	712	91	2925	2323
erro	356	45	1462	1343
t		3,47		2,64
p		0,013		0,046
unidades arbitrárias	100±26	10±3	100±13	50±21

ANEXO 11

TABELA 11: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à fosforilação da subunidade β do receptor de insulina e do IRS-1 de amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpos anti-IR e anti-IRS-1 e submetidos a “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY) e da banda correspondente à PI 3-quinase (PI 3-k) associada ao IRS-1 em tecidos (A) hepático e (B) muscular de ratos com 20 meses de idade tratados ou não agudamente com o inibidor da enzima conversora da angiotensina, captopril. Os resultados são expressos com média (M) $\pm$ erro padrão da média (EPM) e desvio padrão da média (DPM). A análise estatística utilizada foi o teste *t* não pareado e a significância é expressa em *p*, comparando-se o grupo controle (20 m) e o tratado (20 m). O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

TABELA A

	Fosforilação		Associação		
	Controle IR-PY	Tratado IR-PY	Controle IRS-1-PY	Tratado IRS-1-PY	
	1843	13708	9444	17951	9221
	1521	1760	5232	17742	8395
	1802		6749	19319	5200
	1522		6120	13736	9534
				17395	
n	4	2	4	4	4
média	1672	7734	6886	17187	8087
desvio	174	8448	1815	2402	1984
erro	87	4224	907	1202	992
t		3,3		6,8	
p		0,03		0,000	
unidades arbitrárias	100 $\pm$ 15	462 $\pm$ 253	100 $\pm$ 26	250 $\pm$ 17	100 $\pm$ 12
					26615
					25970
					21366
					24650
					2862
					1654
					9,1
					0,000
					305 $\pm$ 20

TABELA B

	Fosforilação			Associação		
	Controle IR-PY	Tratado IR-PY	Controle IRS-1-PY	Tratado IRS-1-PY	Controle PI 3-K	Tratado PI 3-k
	210	2281	690	1433	1637	6924
	229	3020	646	2682	1558	4798
	497	2128	762	1293	1497	3110
	280		710	2452	233	3928
	559					
n	5	3	4	4	4	4
média	355	2476	702	1965	1756	4690
desvio	161	477	48	703	389	1641
erro	72	576	24	351	190	845
t		9,5		3,58		3,47
p		0,000		0,012		0,013
unidades arbitrárias	100±20	697±78	100±3	280±50	100±11	267±48

ANEXO 12

TABELA 12: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à fosforilação do IRS-1 de amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1 e submetidos a “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY) em tecidos (A) hepático e (B) muscular de ratos com 20 meses de idade tratados ou não agudamente com o bloqueador do receptor de angiotensina AT1, losartan. Os resultados são expressos com média (M) $\pm$ erro padrão da média (EPM) e desvio padrão da média (DPM). A análise estatística utilizada foi o teste *t* não pareado e a significância é expressa em *p*, comparando-se o grupo controle (20 m) e o tratado (20 m). O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

	A (FÍGADO)		B (MÚSCULO)	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
	31147	37347	2780	2524
	21621	11688	1182	5745
	17177	12146	2952	5761
	5472	12205	7139	2843
	6200	16419	3696	2716
n	5	5	5	5
média	16323	17961	3550	3918
desvio	10825	11005	2206	1679
erro	4854	4935	989	753
t		0,23		0,297
p		0,81		0,774
unidades arbitrárias	100$\pm$30	110$\pm$30	100$\pm$28	110$\pm$21

ANEXO 13

TABELA 13: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à fosforilação do IR (A) e do IRS-1 (B) de amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpos anti-IR e anti-IRS-1 e submetidos a “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY) em tecido muscular de ratos com 20 meses de idade tratados ou não bradicinina, intraperitonealmente. Os resultados são expressos com média (M) $\pm$ erro padrão da média (EPM) e desvio padrão da média (DPM). A análise estatística utilizada foi o teste *t* não pareado e a significância é expressa em *p*, comparando-se o grupo controle (20 m) e o tratado (20 m), nos diferentes tempos após a administração da droga. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

TABELA (A)

	Controle	5 minutos	15 minutos	30 minutos
	300	2150	5700	10200
	310	2500	5797	11160
	290	2957	5191	9570
n	3	3	3	3
média	300	405	5563	10310
desvio	10	234	325	800
erro	6		188	462
t				
p				
unidades	1 $\pm$ 0,02	8,5 $\pm$ 0,8	18 $\pm$ 0,6	34 $\pm$ 1,5
arbitrárias				

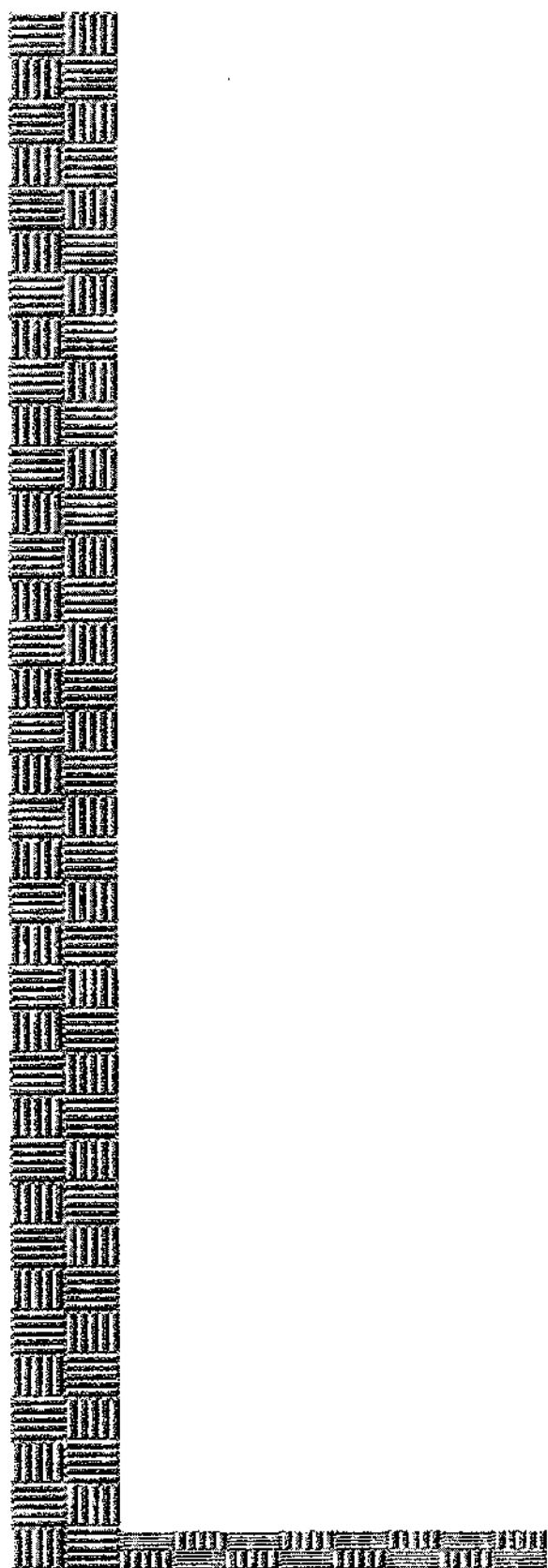
TABELA (B)

	Controle	5 minutos	15 minutos	30 minutos
	725	4350	5800	21750
	834	4587	5004	22518
	649	3764	4543	18172
n	3	3	3	3
média	736	4234	5116	20813
desvio	93	424	636	2319
erro	54	245	368	1364
t				
p				
unidades arbitrárias	1±0,07	6±0,3	7±0,5	28±2

ANEXO 14

TABELA 14: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à fosforilação do IRS-1 de amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpos anti-IRS-1 e submetidos a “immunoblotting” com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY) em tecido hepático de ratos com 20 meses de idade tratados ou não bradicinina, intraperitonealmente. Os resultados são expressos com média (M) $\pm$ erro padrão da média (EPM) e desvio padrão da média (DPM). A análise estatística utilizada foi o teste *t* não pareado e a significância é expressa em *p*, comparando-se o grupo controle (20 m) e o tratado (20 m). O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

	Controle	30 minutos
	6241	19971
	5310	15399
	6394	17903
n	3	3
média	5982	17757
desvio	587	2289
erro	339	1323
t		
p		
unidades arbitrárias	1 $\pm$ 0,06	3 $\pm$ 0,22



10. Publicações

Effect of Aging on Insulin Receptor, Insulin Receptor Substrate-1, and Phosphatidylinositol 3-Kinase in Liver and Muscle of Rats*

CARLA R. O. CARVALHO, SIGISFREDO L. BRENELLI, ANA C. SILVA,
ANDRE L. B. NUNES, LICIO A. VELLOSO, AND MARIO J. A. SAAD

Department of Internal Medicine, FCM-UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brazil

ABSTRACT

Insulin stimulates the tyrosine kinase activity of its receptor, resulting in the phosphorylation of its cytosolic substrate, insulin receptor substrate-1 (IRS-1), which, in turn, associates with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), thereby activating the latter. Aging is associated with insulin resistance, but the exact molecular mechanism is unknown. In the present study, we examined the levels and phosphorylation status of the insulin receptor and IRS-1 as well as the association between IRS-1 and PI 3-kinase in the liver and muscle of 2-, 5-, 12-, and 20-month-old rats.

There were no changes in the insulin receptor concentration in the liver and muscle of rats 2–20 months old, as determined by immunoblotting using antibody to the COOH-terminus of the receptor. However, insulin stimulation of receptor autophosphorylation, as determined by immunoblotting with antiphosphotyrosine antibody was reduced by 25% ($P < 0.05$) in the liver and muscle of rats at 20 months. Interestingly, IRS-1 protein levels decrease at an early stage (5 months) by 58 ± 9% ($P < 0.01$) and remained at low levels thereafter

in muscle, but not in liver. In samples previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and blotted with antiphosphotyrosine antibody, there were 60 ± 9% ($P < 0.001$) and 92 ± 4% ($P < 0.001$) decreases in the insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation levels in liver and muscle, respectively, of 20-month-old rats. The insulin-stimulated IRS-1 association with PI 3-kinase was decreased by 70 ± 2% in the liver ($P < 0.001$) and by 98 ± 3% ($P < 0.001$) in the muscle of 20-month-old rats, with no change in the PI 3-kinase protein levels. The phosphotyrosine-associated PI 3-kinase activity after insulin stimulation was dramatically reduced in liver and muscle of 20-month-old rats compared to that in 2-month-old rats. Finally, by immunoprecipitation, the detection of insulin-stimulated IRS-2 phosphorylation followed the same pattern as that for IRS-1 in both liver of 2- and 20-month-old rats. These data suggest that changes in the early steps of insulin signal transduction may have an important role in the insulin resistance observed in old animals. (*Endocrinology* 137: 151–159, 1996)

IT HAS BEEN established that insulin resistance occurs with aging (1–7). It was previously demonstrated by the clamp technique that insulin actions were impaired with aging in 2- to 20-month-old rats (6). Although various defects in insulin action have been reported in animals during aging (4, 7–10), the exact mechanisms involved in the insulin resistance have not been adequately defined.

Insulin initiates its metabolic and growth-promoting effects by binding to the β -subunit of its tetrameric receptor (11), which leads to the autophosphorylation of specific tyrosine residues of the β -subunit. This process enhances the tyrosine kinase activity of the receptor toward other protein substrates (11). Considerable evidence demonstrates that insulin receptor tyrosine kinase activity is essential for many, if not all, of the biological effects of insulin (11–13). In most cells, this primary event leads to the subsequent tyrosyl phosphorylation of a broad band of 165–185 kDa cytoplasmic protein, called pp185 (11, 14–16). One component of this band has been well characterized as insulin receptor substrate-1 (IRS-1) (17). IRS-1 has been implicated as the first postreceptor step in insulin signal transmission based on studies with insulin receptor mutants (11). In cultured cells

(18, 19) and in animal tissues (20), phosphorylated IRS-1 associates with the lipid-metabolizing enzyme phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), thus activating this enzyme. Although decreased insulin receptor kinase activity has been reported in various insulin-resistant states, including aging (7), in most studies the receptors were partially purified, and the kinase assays were performed *in vitro* using exogenous phosphoacceptor substrates such as histones (7, 8). Thus, the role of IRS-1 has not been examined in insulin-sensitive tissues during aging.

Using antipeptide antibodies to the insulin receptor and IRS-1 along with antiphosphotyrosine antibodies, it is possible to directly assess insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of both the insulin receptor and its substrate, IRS-1. In the present study we examined the phosphorylation status of these two proteins and the association between IRS-1/PI 3-kinase after insulin stimulation *in vivo*. Furthermore, the levels of these proteins in the liver and muscle of rats 2, 5, 12, and 20 months of age were determined to evaluate the initial steps of insulin action during aging in rats.

Materials and Methods

Materials

The reagents and apparatus for SDS-PAGE and immunoblotting were obtained from Bio-Rad (Richmond, CA). Tris, phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), aprotinin, silicone, and dithiothreitol were obtained

Received May 2, 1995.

Address all correspondence and requests for reprints to: Mario J. A. Saad, M.D., Department of Internal Medicine, FCM-UNICAMP, Cidade Universitaria, Campinas, Sao Paulo 13081-970, Brazil.

* This work was supported by FAPESP and CNPq grants.

from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Sodium amobarbital and human recombinant insulin (Humulin R) were purchased from Eli Lilly Co. (Indianapolis, IN). [32 P]ATP and [125 I]protein A were obtained from Amersham (Aylesbury, UK), and protein A-Sepharose 6 MB was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Nitrocellulose (BA85; 0.2 μ m) was obtained from Schleicher and Schuell (Keene, NH). Male Wistar rats were purchased from the UNICAMP Central Breeding Center. Monoclonal antiphosphotyrosine antibodies and anti-PI 3-kinase (p85) antibody were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Anti-IRS-1 antibody and antiinsulin receptor antibody were raised in rabbits as previously described (21). Anti-IRS-1 antibody was kindly provided by Dr. Morris F. White and X. J. Sun (Joslin Diabetes Center, Boston, MA).

Animals

Male Wistar rats were divided into four groups by age (2, 5, 12, and 20 months old) with body weights of 131 ± 6 , 272 ± 10 , 392 ± 8 , and 444 ± 9 g, respectively. All groups were fed standard rodent chow and water *ad libitum*. Food was withdrawn 12–14 h before the experiments.

Methods

Rats were anesthetized with sodium amobarbital (15 mg/kg BW, ip) and used in experiments 10–15 min later, i.e. as soon as anesthesia was assured by loss of pedal and corneal reflexes. The abdominal cavity was opened, the portal vein was exposed, and 0.5 ml normal saline (0.9% NaCl) with or without 10^{-5} M insulin was injected. After 30 sec, the liver was removed, minced coarsely, and homogenized immediately in approximately 10 vol solubilization buffer A in a water bath maintained at 100°C with a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operated at maximum speed for 30 sec. The solubilization buffer A was composed of 1% SDS, 100 mM Tris (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, and 10 mM sodium vanadate. The homogenate was boiled for 10 min and then cooled in an ice bath for 40 min.

Approximately 90 sec after injection, hindlimb muscle was quickly excised and homogenized as described for liver. Both extracts were centrifuged at 15,000 rpm at 4°C in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA) for 45 min to remove insoluble material, and the supernatant was used for the assay.

In preliminary experiments we showed that the maximal phosphorylation for IRS-1 occurs between 30–60 sec in liver and between 1–4 min in muscle after insulin infusion into portal vein. The doses that produced these maximal stimulations were 10^{-6} and 10^{-5} M insulin for liver and muscle, respectively. As we infused into the portal vein 10^{-5} M insulin and extracted liver at 30 sec and muscle at 90 sec, the tissue sampling was performed at the peak of phosphorylation events.

In some experiments, the liver and muscle of animals 2 and 20 months old were extracted and homogenized in extraction buffer B [1% Triton X-100, 100 mM Tris (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF, and 0.1 mg/ml aprotinin] at 4°C. After centrifugation, the supernatant solutions of these tissues were used for immunoprecipitation with anti-IRS-1 antibody and protein A-Sepharose 6 MB.

When used for PI 3-kinase activity determination, the liver and muscle of animals 2 and 20 months old were extracted and homogenized in buffer C at 4°C. After centrifugation for 35 min at $30,000 \times g$ at 4°C, equal protein amounts of the supernatants were used in immunoprecipitations with antiphosphotyrosine antibody, and immunocomplexes collected with protein A-Sepharose 6 MB or protein A/G plus (Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA) were used for PI 3-kinase activity determination. Buffer C was composed of 50 mM HEPES (pH 7.4), 137 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 2 mM Na_3VO_4 , 10 mM Na pyrophosphate, 100 mM Na fluoride, 2 mM EDTA, 2 mM PMSF, 2 mM aprotinin, 2 mM leupeptin, 10% (vol/vol) glycerol, and 1% (vol/vol) Triton X-100.

Protein analysis by immunoblotting

The samples were treated with Laemmli sample buffer (22) containing 100 mM dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 4 min. For total extracts, similar sized aliquots (200 μ g protein) were subjected

to SDS-PAGE (6% bis-acrylamide) in a Bio-Rad miniature lab gel apparatus (Mini-Protein, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). M_r standards were myosin (194 kDa), β -galactosidase (116 kDa), BSA (85 kDa), and ovalbumin (49.5 kDa).

Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 2 h at 120 V (constant) in the Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protein) as described by Towbin *et al.* (23), except for the addition of 0.02% SDS to the transfer buffer to enhance the elution of high M_r proteins. Nonspecific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter overnight at 4°C in blocking buffer (5% nonfat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blot was incubated with antiphosphotyrosine antibodies (1 μ g/ml), antiinsulin receptor antibody (1:100), or anti-PI 3-kinase (1:500) or anti-IRS-1 (1:100) antibodies; diluted in blocking buffer (0.3% BSA instead of nonfat dry milk) overnight at 4°C; and washed for 60 min with the blocking buffer without milk. The blots were then incubated with 2 μ Ci [125 I]protein A (30 μ Ci/ μ g) in 10 ml blocking buffer for 4 h at room temperature and then washed again for 2 h as described above. [125 I]Protein A bound to the antiphosphotyrosine and antipeptide antibodies was detected by autoradiography using pre-flashed Kodak XAR film (Eastman Kodak, Rochester, NY) with Cronex Lightning Plus intensifying screens (DuPont, Wilmington, DE) at -80°C for 12–48 h. Band intensities were quantitated by optical densitometry (model GS 300, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA) of the developed autoradiographs.

Determination of PI 3-kinase activity in samples from liver and muscle immunoprecipitated with antiphosphotyrosine antibodies

Immunoprecipitates collected with protein A-Sepharose 6 MB were washed three times in ice-cold PBS, pH 7.4, containing 1% Triton X-100 and 100 μ M Na_3VO_4 , three times in ice-cold 100 mM Tris (pH 7.5) containing 100 mM $LiCl_2$ and 100 μ M Na_3VO_4 , and finally, twice in ice-cold 10 mM Tris (pH 7.5) containing 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 100 μ M Na_3VO_4 . The pellets were resuspended in 50 μ l ice-cold 10 mM Tris, pH 7.5, containing 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 μ l 100 mM $MgCl_2$, and 10 μ l phosphatidylinositol (2 μ g/ μ l) sonicated in 10 mM Tris (pH 7.5)-EDTA 1 mM. The reaction was started by the addition of 10 μ l 440 μ M ATP containing [32 P]ATP and lasted 10 min at 22°C under continuous vortex. To stop the reaction, 20 μ l 8 N HCl and 160 μ l methanol-chloroform (1:1) were added, and after short centrifugation, the lower phase was applied to silica TLC plates coated with 1% (wt/vol) potassium oxalate. TLC was run in $CHCl_3$ - CH_3OH - H_2O - NH_4OH (60:47:11:3:2), and spots were visualized by autoradiography. Quantitation was performed by optical densitometry (Hoefer Scientific Instruments, model GS 300).

Statistical analysis

Experiments were always performed by studying all groups of animals in parallel. For comparisons, paired and unpaired Student's *t* test were used as appropriate. The level of significance used was $P < 0.05$.

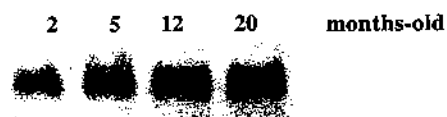
Results

Figures 1 and 2 illustrate the protocol for the assessment of insulin receptor signaling in the intact rat. Rats of different ages were injected with saline or insulin, and after 30 and 90 sec, the liver (Fig. 1) and hindlimb skeletal muscle (Fig. 2) were removed and homogenized as described in *Materials and Methods*. The extracts were subsequently subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and blotted onto nitrocellulose membranes. These blots could then be analyzed using antiinsulin receptor (Figs. 1A and 2A), anti-IRS-1 (Figs. 1B and 2B), antiphosphotyrosine (Figs. 1C and 2C), and anti-PI 3-kinase antibodies (Figs. 1D and 2D).

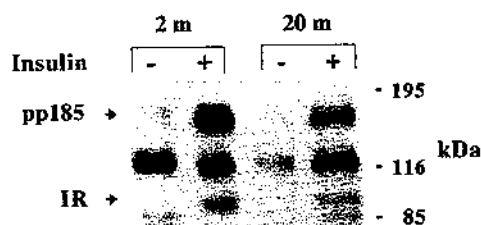
A. Anti-insulin receptor antibody



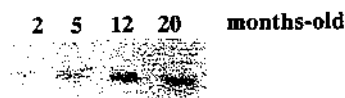
B. Anti-IRS-1 antibody



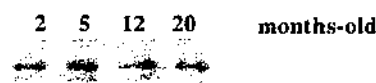
C. Antiphosphotyrosine antibody



D. Anti-PI 3-kinase antibody



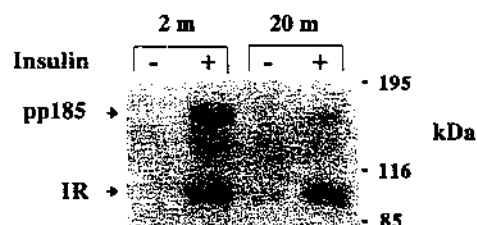
A. Anti-insulin receptor antibody



B. Anti-IRS-1 antibody



C. Antiphosphotyrosine antibody



D. Anti-PI 3-kinase antibody

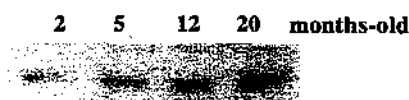


FIG. 1. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation in intact liver from normal rats of different ages. The proteins from the liver were isolated as described in *Materials and Methods*. Briefly, rats were anesthetized, and the abdominal wall was incised to expose the viscera. Normal saline (lanes 1 and 3, left to right) or 10^{-5} M insulin (lanes 2 and 4) was infused into a portal vein as a bolus injection, and 30 sec later, liver was excised and homogenized in extraction buffer A at 100°C for 5 min. After centrifugation, aliquots with the same amount of protein were resolved on 6% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and detected with antiinsulin receptor antibodies (A), anti-IRS-1 antibodies (B), antiphosphotyrosine antibodies (C), anti-PI 3-kinase antibodies (D), and [125 I]protein A and subjected to autoradiography.

Effect of aging on insulin receptors and IRS-1 phosphorylation in liver

There was no change in insulin receptor levels (Fig. 1A) in the liver of rats 2–20 months old, as determined by immunoblotting with an antibody to the COOH-terminus of the insulin receptor. Using the specific antipeptide antibody against IRS-1 (Fig. 1B), there was a slight, but not statistically significant, decrease in the level of IRS-1 in liver during aging. Acute insulin stimulation had no effect on IRS-1 protein levels. This was confirmed by scanning densitometry (Fig. 3A).

Figure 1C shows that before insulin stimulation, a broad band migrating between 115–130 kDa was observed in phosphotyrosine blots of liver extracts. This protein was previously identified as focal adhesion kinase (FAK), and its behavior after insulin stimulation has been described (24).

FIG. 2. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation in intact muscle from rats of different ages. The proteins from the muscle were isolated as described in *Materials and Methods* and processed as described in Fig. 1. The muscle fragment was excised after 90 sec of insulin injection in the portal vein and homogenized in buffer A at 100°C for 5 min. After centrifugation, aliquots with the same amount of proteins were resolved on 6% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and detected with antiinsulin receptor antibodies (A), anti-IRS-1 antibodies (B), antiphosphotyrosine antibodies (C), anti PI 3-kinase antibodies (D), and [125 I]protein A and subjected to autoradiography.

However, as we have not excluded the possibility that other phosphotyrosine proteins may also migrate in this broad band, we refer to this band as pp120. After stimulation with insulin, the phosphotyrosine content of pp120 decreased to $51 \pm 13\%$ ($P < 0.01$) in the 2-month-old animals, whereas the changes in the 20-month-old rats were inconsistent. Both before and after insulin treatment, pp120 was consistently less phosphorylated (by $49 \pm 12\%$) in the latter age group compared to the former.

There was a decrease in the insulin-stimulated phosphorylation of the 95-kDa β -subunit of the insulin receptor during aging (Fig. 1C). Scanning densitometry revealed slight decreases of $12 \pm 4\%$ ($P < 0.05$) and $25 \pm 4\%$ ($P < 0.05$) at 12 and 20 months, respectively (Fig. 3B). In the same antiphosphotyrosine blots of whole tissue extracts, a broad band migrating between 165–185 kDa was detectable in addition to the 95-kDa band seen after insulin injection. This band is known as pp185 and contains IRS-1

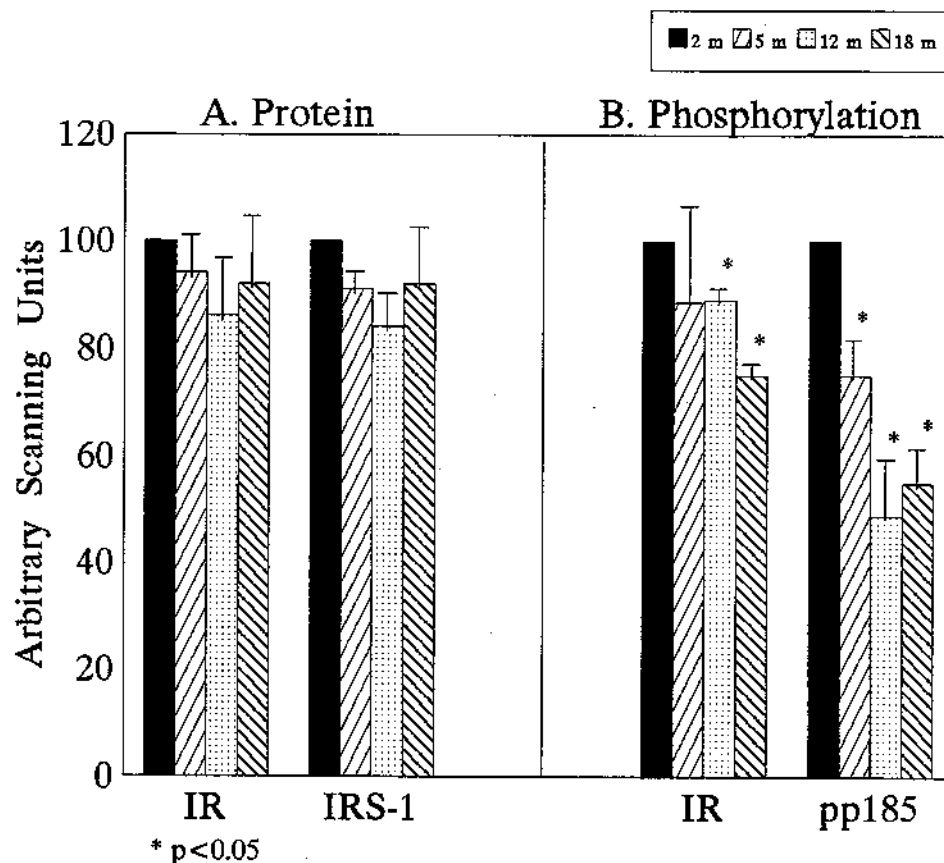


FIG. 3. Effect of aging on insulin receptor (IR) and IRS-1 protein (A) and IR and pp185 phosphorylation (B) levels in liver of rats. Scanning densitometry was performed on autoradiograms from 10 experiments to determine insulin receptor and IRS-1 concentrations and for tyrosine phosphorylation of proteins. The values are expressed as the mean $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$.

as one of its component (25, 26). The phosphorylation of pp185 was reduced by $25 \pm 9\%$ ($P < 0.05$), $50 \pm 14\%$ ($P < 0.001$), and $45 \pm 8\%$ ($P < 0.01$) 5, 12, and 20 months after birth, respectively (Fig. 3B).

Previous studies (19, 20, 26–30) suggested that there is a relatively stable high affinity interaction between IRS-1 and the 85-kDa subunit of the PI 3-kinase, such that both proteins are coprecipitated by antibodies to either protein. In samples from liver previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody (Fig. 4A), there was a $60 \pm 9\%$ ($P < 0.001$) decrease in the insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation at 20 months (Fig. 4C). When the same blots were subsequently incubated with antibodies directed against the 85-kDa subunit of PI 3-kinase (Fig. 4B), there was a faint band in the basal state of animals 2 and 20 months old. After insulin stimulation, the intensity of this band increased in both groups of animals, consistent with a stable association of IRS-1 and PI 3-kinase. However, comparison of the bands stimulated by insulin revealed that the amount of PI 3-kinase associated with IRS-1 was reduced by $70 \pm 2\%$ ($P < 0.001$) in liver of 20-month-old rats (Fig. 4D).

To determine whether the reduction in the association between IRS-1/PI 3-kinase was caused by differences in the total amount of PI 3-kinase in the tissues of old animals, we investigated the level of total enzyme protein by immunoblotting the tissue extracts with the same antibody to the 85-kDa subunit of PI 3-kinase. Based on immunoreactivity,

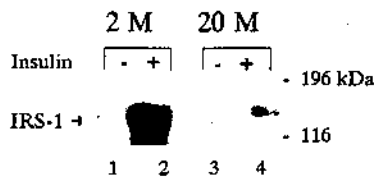
the hepatic level of this enzyme did not change significantly during aging (Fig. 1D).

Effect of aging on IRS-2 phosphorylation and insulin-stimulated PI 3-kinase activity in rat liver

In mice homozygous for target disruption of the IRS-1 gene, the downstream effects are partially compensated by another insulin receptor substrate, called IRS-2 (25, 26). To investigate the phosphorylation level of IRS-2 in aging, we immunoprecipitated liver samples from young and 20-month-old rats with anti-IRS-2 antibody and blotted with antiphosphotyrosine antibody (Fig. 5). After *in vivo* insulin stimulation, the extent of IRS-2 phosphorylation was decreased by 75% in the liver of old rats.

To determine the effect of aging on PI 3-kinase activity, young and old rats were injected with saline or insulin as described above, and extracts of liver were prepared and immunoprecipitated with antiphosphotyrosine antibodies. A low basal PI 3-kinase activity was present in antiphosphotyrosine immunoprecipitates from liver of 2- and 20-month-old rats. After insulin stimulation, there was a dramatic increase in PI 3-kinase activity in young rats, but in old rats, this stimulation was minor. Thus, compared with young rats, the level of insulin-stimulated PI 3-kinase activity in antiphosphotyrosine immunoprecipitates was reduced by $79 \pm 10\%$ in old rats (Fig. 4E).

A. Antiphosphotyrosine antibody



B. Anti-PI 3-kinase antibody

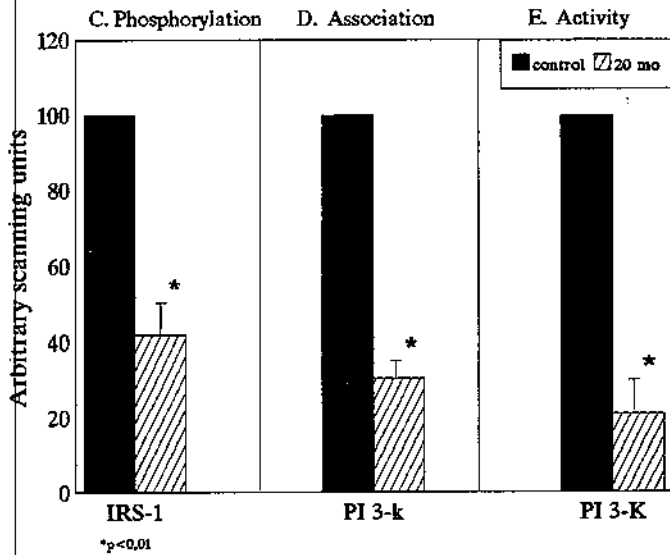
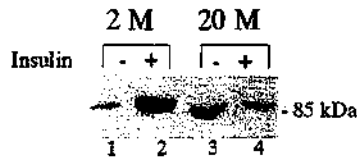


FIG. 4. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 and its association with PI 3-kinase in liver of 2- and 20-month-old rats. The proteins were isolated, as described in *Materials and Methods*, with extraction buffer B and kept on ice; after centrifugation, aliquots from the supernatant were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibodies and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody (A) and with anti-PI 3-kinase antibody (B). Scanning densitometry was performed on autoradiograms from four experiments for IRS-1 phosphorylation (C), four experiments for the association of PI 3-kinase with IRS-1 (D), and three experiments for antiphosphotyrosine immunoprecipitated for PI 3-kinase activity (E). The values are expressed as the mean $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$.

Effect of aging on the insulin receptor and IRS-1 phosphorylation in rat skeletal muscle

The effect of aging on the insulin receptor levels (Fig. 2A) in rat skeletal muscle were similar to that in liver, i.e. there was no significant change as determined by immunoblotting. In contrast, there was a significant decrease in the muscle levels of IRS-1 protein that was clearly evident at an early stage (5 months), as analyzed by immunoblotting with anti-IRS-1 antibody (Fig. 2B). The decreases were $58 \pm 9\%$ ($P < 0.01$), $46 \pm 3\%$ ($P < 0.001$), and $56 \pm 6\%$ ($P < 0.001$) after 5, 12, and 20 months, respectively (Fig. 6A).

The effect of aging on muscle phosphotyrosyl proteins was

**Anti-IRS-2 immunoprecipitation
Antiphosphotyrosine immunoblotting**

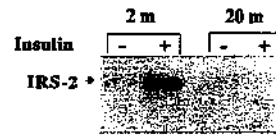


FIG. 5. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-2 in liver of 2- and 20-month-old rats. The proteins were isolated as described, in *Materials and Methods*, with extraction buffer B and kept on ice; after centrifugation, aliquots from the supernatant were immunoprecipitated with anti-IRS-2 antibodies and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody.

similar to that in the liver (Fig. 2C). The constitutively phosphorylated protein (pp120) in muscle migrates a little higher than liver. Comparison of the lanes observed after insulin stimulation showed that there was a $25 \pm 11\%$ decrease in the insulin receptor β -subunit phosphorylation in 20-month-old rats (Fig. 6B). Figure 2B also shows a decrease in insulin-stimulated pp185 phosphorylation in skeletal muscle during aging. The decrease was almost maximal at $36 \pm 5\%$ ($P < 0.001$) after 12 months and reached $38 \pm 8\%$ ($P < 0.001$) at 20 months (Fig. 6B).

There was a marked decrease in the phosphorylation of IRS-1 in 20-month-old rats by $92 \pm 4\%$ ($P < 0.001$), as demonstrated in experiments in which muscle samples were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and analyzed by immunoblotting with antiphosphotyrosine antibody (Fig. 7A). When the membranes from these experiments were immunoblotted with antibody to PI 3-kinase (Fig. 7B), there was little detectable immunoreactivity in the basal state in both 2- and 20-month-old animals. After exposure to insulin, a band with the expected M_r of the regulatory subunit of PI 3-kinase (85 kDa) was present in the muscle anti-IRS-1 immunoprecipitates of both groups, a finding consistent with the stable association of IRS-1 with PI 3-kinase. However, the amount of PI 3-kinase associated with IRS-1 was reduced by $98 \pm 3\%$ ($P < 0.001$) in 20-month-old rats, suggesting much less association between these two proteins in old rats (Fig. 7D). These data are not related to PI 3-kinase protein levels, as the muscle extracts immunoblotted with p85 antibody showed no changes in the levels of this protein during aging (Fig. 2D).

Effect of aging on IRS-2 phosphorylation and insulin-stimulated PI 3-kinase activity in rat skeletal muscle

Muscle samples were also immunoprecipitated with anti-IRS-2 antibody and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody. The level of insulin-stimulated IRS-2 phosphorylation was reduced by 90% in muscle of 20-month-old rats (data not shown). The effect of aging on PI 3-kinase activity in muscle was similar to that in liver. A low level of basal PI 3-kinase activity was present in antiphosphotyrosine immunoprecipitates from muscle of 2- and 20-month-old rats. After insulin stimulation, there was an important increase in PI 3-kinase activity in muscle of young rats, but only a modest increase in old rats. Thus, compared with that in 2-month-old rats, the level of insulin stimulated PI 3-kinase

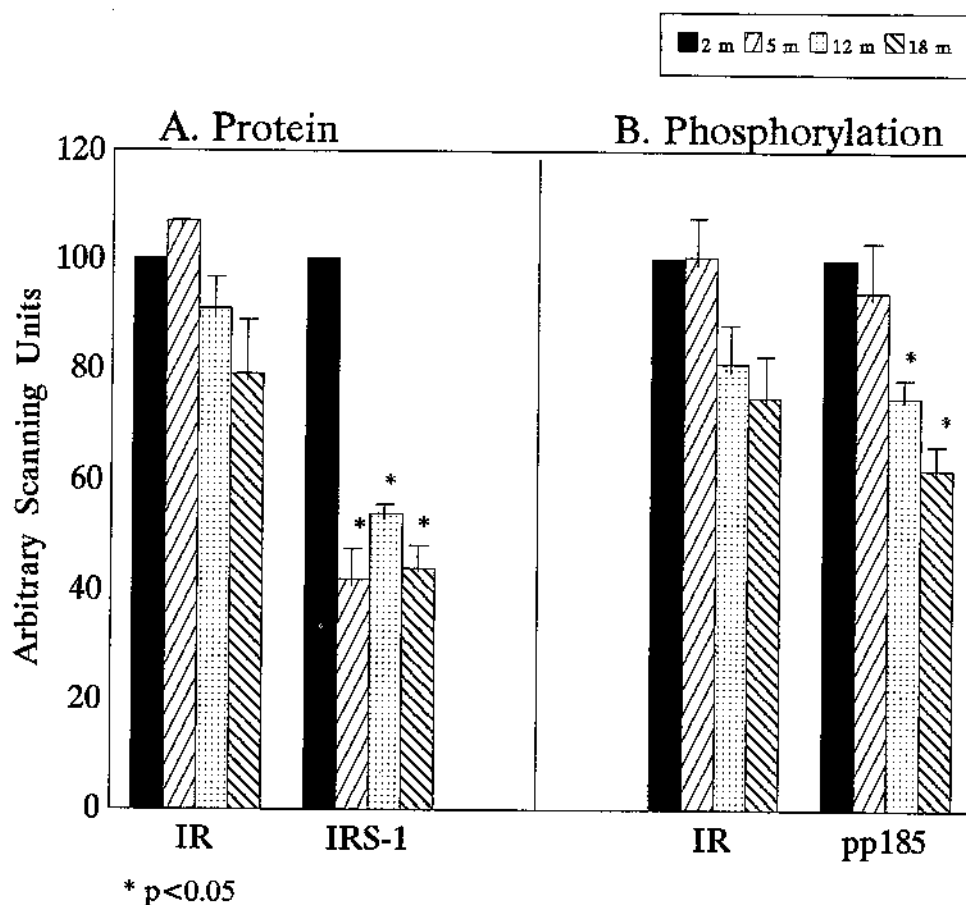


FIG. 6. Effect of aging on insulin receptor (IR) and IRS-1 protein (A) and IR and pp185 phosphorylation (B) levels in muscle of rats. Scanning densitometry was performed on autoradiograms from 10 experiments for insulin receptor and IRS-1 concentration determinations and for tyrosine phosphorylation of proteins. The values are expressed as the mean $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$.

activity in antiphosphotyrosine immunoprecipitates was reduced by $90 \pm 10\%$ in 20-month-old rats (Fig. 7E).

Discussion

Although the sequence of events that couples the insulin receptor to its final cellular actions is not fully understood, several of the early steps in the cascade of insulin action have been characterized at a molecular level. After insulin binding, the activated insulin receptor kinase catalyzes the tyrosine phosphorylation of a protein termed IRS-1 (31). IRS-1 has been shown to be a direct substrate of the insulin receptor both *in vivo* and *in vitro* (17, 31) and has several potential serine, threonine, and tyrosine phosphorylation sites. Nine of these tyrosine phosphorylation sites have the repetitive sequence motif Tyr-Met-xxx-Met (YMXM) or Tyr-xxx-xxx-Met (YXXM). When phosphorylated, these sites as well as others appear to be involved in noncovalent interactions of IRS-1 with other signaling molecules, particularly proteins containing SH2 domains (19, 20, 32, 33). Thus, tyrosine phosphorylation of IRS-1 leads to a second early intracellular step involving an association of IRS-1 with the enzyme PI 3-kinase. The association probably occurs through phosphorylated YMXM motifs on IRS-1 and the SH2 domain of the 85-kDa subunit of PI 3-kinase (20, 33). Insulin also increases the cellular concentration of phosphatidylinositol 3-phosphate, phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate, and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, indicating that PI 3-kinase

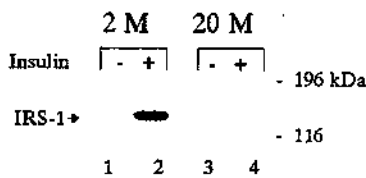
is activated after insulin stimulation (33, 34). The influence of aging on this early stage of insulin action, particularly with regard to insulin resistance, has not yet been examined.

The insulin resistance that develops during aging is associated with an increased glucose intolerance (6). The rate of glycogen synthesis in response to stimulation by insulin is markedly decreased in the soleus muscle of 85-week-old Wistar rats (3), and impaired insulin-stimulated glucose uptake due to a depletion of the pool of glucose transporters has been observed (35). A decrease in the inhibition of hepatic glucose production by physiological concentrations of insulin has also been implicated as one of the contributing elements (6). The primary defects underlying these phenomena are largely unknown, although most studies agree that age-dependent resistance is associated with a postbinding defect, as the number of insulin receptor remains unaltered with advancing age (7).

Despite the normal number of insulin receptors in the liver and muscle of different aged rats, we observed a 25% reduction in the level of insulin receptor autophosphorylation in both tissues of old rats after stimulation with insulin *in vivo*. This may be of biological significance, because a decrease in receptor phosphorylation has been well correlated with insulin resistance (11–13, 36). These findings are consistent with previous studies in old animals, in which the receptors were partially purified and the kinase assays performed *in vitro* (7, 8).

The changes in IRS-1 levels during aging show a tissue-

A. Antiphosphotyrosine antibody



B. Anti-PI 3-kinase antibody

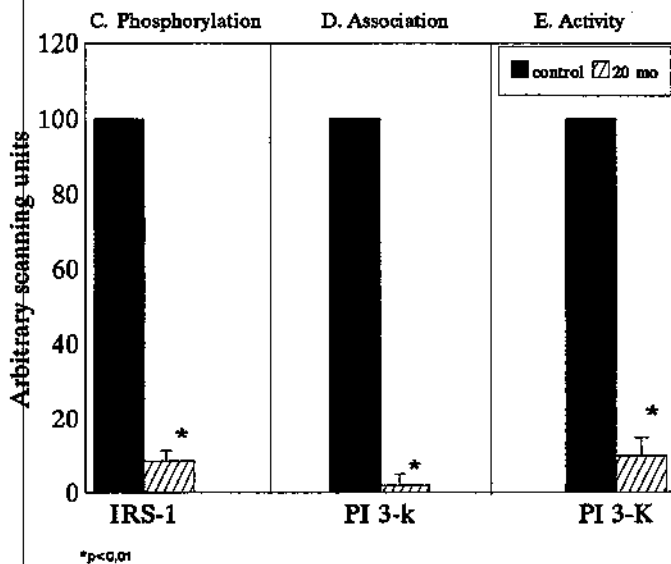
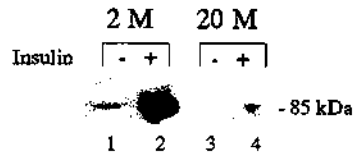


FIG. 7. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 and its association with PI 3-kinase in muscle of 2- and 20-month-old rats. The proteins were isolated, as described in *Materials and Methods*, with extraction buffer B and kept on ice; after centrifugation, aliquots from the supernatant were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibodies and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody (A) and with anti-PI 3-kinase antibody (B). Scanning densitometry was performed on autoradiograms from four experiments for IRS-1 phosphorylation (C), four experiments for the association of PI 3-kinase with IRS-1 (D), and three experiments for antiphosphotyrosine immunoprecipitated for PI 3-kinase activity (E). The values are expressed as the mean $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$.

specific regulation, with a decrease in muscle but not in liver. This decrease in muscle IRS-1 protein levels occurs early in life (between 2–5 months). It is interesting that previous studies demonstrated that the maximal rate of insulin-induced glucose disappearance was significantly reduced between 2–5 months of age, but that the dose-response curves shifted progressively to the right up to 20 months (6). Rice and Garner (37) recently demonstrated a close correlation between IRS-1 protein levels and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Our results suggest that the marked decrease in IRS-1 protein levels in the muscle of 5-month-old animals may have an important role in the reduced glucose uptake in this tissue, as previously demonstrated (3).

Our observation that there was a significant decrease in the level of hepatic and muscle IRS-1 tyrosine phosphorylation and also in the association between IRS-1 and PI 3-kinase upon insulin stimulation in 20-month-old rats suggests that these events may have a role in age-dependent insulin resistance. Recently, it was demonstrated that mice homozygous for target disruption of the IRS-1 gene had resistance to the glucose-lowering effects of insulin (25, 26). This correlated with a marked reduction in insulin-stimulated glucose transport in isolated adipocytes (25). Evidence from other sources and using different approaches also demonstrated a correlation between PI 3-kinase activity and glucose transport (38–40). Thus, it is reasonable to speculate that the IRS-1/PI 3-kinase pathway may be linked to the activation of glucose transport and that a reduction in this association in old rats may have a role in the insulin resistance observed in aging.

It is interesting that in IRS-1-deficient mice, despite the absence of IRS-1-associated PI 3-kinase activity, there is significant insulin stimulation of PI 3-kinase in antiphosphotyrosine immunoprecipitates. This stimulation of PI 3-kinase activity is accompanied by the appearance of the new insulin-stimulated phosphoprotein, IRS-2, which can be detected in antiphosphotyrosine immunoblots of anti-p85 precipitates. Thus, IRS-1-deficient mice use an alternative high mol wt substrate of insulin receptor that binds to PI 3-kinase and was named IRS-2.

In 20-month-old rats there was not a compensation for reduced IRS-1 phosphorylation levels, because the insulin stimulation of PI 3-kinase activity in antiphosphotyrosine immunoprecipitates was reduced by $79 \pm 10\%$ in liver and by $90 \pm 10\%$ in muscle. In accordance, insulin stimulation of IRS-2 phosphorylation was markedly decreased in liver and muscle of 20-month-old rats.

An interesting observation in these experiments was that in liver of young rats there was a decrease in pp120 phosphorylation after insulin stimulation. Recent evidence demonstrates that phosphorylated IRS-1 binds and activates a phosphatase, SHPTP₂, which, in turn, dephosphorylates FAK (24). As FAK is one component of the pp120, this sequence of events may explain the reduction in pp120 phosphorylation after insulin infusion in 2-month-old rats. It is important to note that in 20-month-old rats that phosphorylate IRS-1 only weakly after stimulation with insulin, the changes in pp120 phosphorylation were inconsistent.

The reduction in insulin receptor, IRS-1, and IRS-2 phosphorylation seen in 20-month-old rats may be related to changes in the plasma membrane, in the activity of protein tyrosine phosphatases (PTPases), or to other factors. Recently, Nadiv *et al.* (41) demonstrated that old rats have a plasma membrane lipid content different from that of young rats. In addition, Zoppini and Kahn (42) demonstrated that the phospholipid environment in the plasma membrane is an important modulator of transmembrane signaling within the insulin receptor heterotetramer and of substrate phosphorylation. Changes in the activity of the enzymes responsible for phosphotyrosine dephosphorylation (PTPases) may also be important. Indeed, an increase in the PTPase activity directed against the β -subunit of the insulin receptor in muscle from old rats has been recently reported (41). A further

finding suggesting that the PTPases may have increased activity in 20-month-old rats is the reduced level of tyrosine phosphorylation of pp120 before and after insulin stimulation compared to that in 2-month-old animals.

Insulin resistance associated with aging may be caused at least in part by the obesity commonly found in older rats. Previous studies reported that when caloric intake was restricted in old rats, insulin resistance did not occur (43, 44). However, there are important differences between the obesity model of insulin resistance and the age-dependent model of insulin resistance. We demonstrated a reduction in IRS-1 protein levels in the liver, but not in the muscle, of an animal model of obesity and hyperinsulinemia (ob/ob mouse) (45). This response may reflect chronic exposure of these tissues to different levels of insulin, as liver is exposed to higher insulin levels than muscle. In this setting, a reduction in IRS-1 protein levels in muscle may be a unique feature of aging, not a reflection of obesity or hyperinsulinemia, and may have a role in the decreased glucose uptake observed between 2–5 months of age.

In summary, this study shows that reduced expression and/or phosphorylation of IRS-1 may lead to reduced association between IRS-1/PI 3-kinase in the liver and muscle of old rats. In parallel, there was a decrease in IRS-2 phosphorylation and in PI 3-kinase activity in antiphosphotyrosine immunoprecipitates in both tissue. These data suggest that changes in the early steps of insulin signal transduction may have an important role in the insulin resistance observed in old animals.

Acknowledgments

The authors wish to thank Drs. C. R. Kahn, Morris F. White, X. J. Sun, and Martin G. Myers (Joslin Diabetes Center, Boston, MA) for kindly providing the antibodies anti-IRS-1, anti-IRS-2, and antiinsulin receptor.

References

- Barnard RJ, Lawani LO, Martin DA, Youngren JF, Singh R, Scheck SH 1992 Effects of maturation and aging on the skeletal glucose transport system. *Am J Physiol* 262:E619–E626
- Fink RI, Kolterman OG, Griffin J, Backer JM, Olefsky JM 1983 Mechanisms of insulin resistance in aging. *J Clin Invest* 71:1523–1535
- Goodman NM, Diuz SM, McElaney MA, Belur E, Ruderman NB 1983 Glucose uptake and insulin sensitivity in rat muscle: change during 3–96 weeks of age. *Am J Physiol* 244:E93–E100
- Gulve EA, Henriksen EJ, Rodnick KJ, Youn JH, Holloszy JO 1993 Glucose transporters and glucose transport in skeletal muscle of 1- to 25 mo-old rats. *Am J Physiol* 264:E319–E327
- Reed MJ, Reaven GM, Mondon CE, Azhar S 1993 Why does insulin resistance develop during maturation? *J Gerontol* 48:B139–B144
- Yoshimasa Y, Yamada K, Ida T, Kakehi T, Imura H 1988 Change of insulin action with aging in conscious rats determined by euglycemic clamp. *Am J Physiol* 254:E92–E98
- Kono S, Kuzuya H, Okamoto M, Nishimura H, Kosaki A, Kakehi T, Inoue G, Maeda I, Imura H 1990 Changes in receptor kinase with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol* 259:E27–E35
- Carrascosa JM, Ruiz P, Martinez C, Pulido JA, Satrustegui J, Andres A 1989 Insulin receptor kinase activity in rat adipocytes is decreased during aging. *Biochem Biophys Res Commun* 160:303–309
- Nadiv O, Cohen O, Zick Y 1992 Defects of insulin's signal transduction in old rat livers. *Endocrinology* 130:1515–1524
- Kern M, Dolan PL, Mazzeo RS, Wells JA, Dohn GL 1992 Effects of aging and exercise on GLUT-4 glucose transporters in muscle. *Am J Physiol* 263:E362–E367
- White MF, Kahn CR 1994 The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269:1–5
- Ebina Y, Araki E, Taira M, Shimada F, Mori M, Craik CS, Siddle K, Pierce SB, Roth RA, Rutter WJ 1987 Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:704–708
- Chou CK, Dull TJ, Russel DS, Gherzi R, Lewohl D, Ullrich A, Rosen OM 1987 Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. *J Biol Chem* 262:1842–1847
- White MF, Maron R, Kahn CR 1985 Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr 185,000 protein in intact cells. *Nature* 318:183–186
- Maegawa H, Olefsky JM, Thies S, Boyd D, Ullrich A, McClain MA 1988 Insulin receptor with defective tyrosine kinase inhibit normal receptor function at the level of substrate phosphorylation. *J Biol Chem* 261:16597–16603
- Momomura K, Tobe K, Seyama Y, Takaku F, Akanuma Y, Kasuga M 1987 Insulin-induced tyrosine phosphorylation in intact rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 155:1181–1186
- Sun XJ, Rothenberg PL, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden P, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF 1991 Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature (Lond)* 352:73–77
- Lamphere L, Carpenter CL, Sheng ZF, Kallen RG, Lienhard GE 1994 Activation of PI 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes by association with insulin receptor substrate-1. *Am J Physiol* 266:E486–E494
- Backer JM, Myers Jr MG, Schoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Schlessinger J, White MF 1992 The phosphatidylinositol 3-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J* 11:3469–3479
- Folli F, Saad MJA, Backer JM, Kahn CR 1993 Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin resistance and insulin-deficient diabetes mellitus. *J Clin Invest* 92:1787–1794
- Saad MJA, Folli F, Kahn JA, Kahn CR 1993 Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Invest* 92:2065–2072
- Laemmli UK 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)* 227:680–685
- Towbin H, Staehlin J, Gordon J 1979 Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350–4354
- Yamauchi K, Milarski KL, Saltiel AR, Pessin JE 1995 Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:664–668
- Tamamoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S, Sekchara H, Yoshioka S, Horikoshi H, Furuta Y, Ikawa Y, Kasuga M, Yazaki Y, Aizawa S 1994 Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372:182–186
- Araki E, Lipes MA, Patti MA, Bruning JC, Haag B, Johnson RS, Kahn CR 1994 Alternative pathway of insulin signaling in mice with target disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372:186–190
- Giorgetti S, Ballotti R, Kowalski-Chawel A, Tartare S, VanObberghen E 1993 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
- Hadari YR, Tzahar E, Nadiv O, Rothenberg P, Roberts CT, LeRoith D, Yarden Y, Zick Y 1992 Insulin and insulinomimetic agents induce activation of phosphatidylinositol 3-kinase upon its association with pp185 (IRS-1) in intact rat livers. *J Biol Chem* 267:17483–17486
- Lavan BE, Kuhne MR, Garner CW, Anderson D, Rudijk M, Pawson T, Lienhard GE 1992 The association of insulin-elicited phosphotyrosine proteins with src homology domains. *J Biol Chem* 267:11631–11636
- Kelly KL, Ruderman NB 1993 Insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase. Association with a 185-kDa tyrosine-phosphorylated

- protein (IRS-1) and localization in a low density membrane vesicle. *J Biol Chem* 268:4391-4398
31. Sun XJ, Miralpeix M, Myers Jr MG, Glasheen EM, Backer JM, Kahn CR, White M F 1992 Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. *J Biol Chem* 267:22662-22672
32. Kuhne MR, Pawson T, Lienhard GE, Feng GH 1993 The insulin receptor substrate 1 associate with the SH₂-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *J Biol Chem* 268:11479-11481
33. Pawson T 1995 Protein modules and signaling networks. *Nature* 373:573-580
34. Ruderman NB, Kapeller R, White MF, Cantley LC 1990 Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1411-1415
35. Mathaei S, Benecke H, Klein HH, Hamann A, Kreymann G, Greten G 1990 Potential mechanism of insulin resistance in aging: impaired insulin-stimulated glucose transport due to a depletion of intracellular pool of glucose transporters in Fischer rat adipocytes. *J Endocrinol* 126:99-107
36. Giorgino F, Almahfouz A, Goodyear LJ, Smith RJ 1993 Glucocorticoid regulation of insulin receptor and substrate IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle *in vivo*. *J Clin Invest* 91:2020-2030
37. Rice KM, Garner GR 1994 Correlation of the insulin receptor substrate-1 with insulin-responsive deoxyglucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 198:523-530
38. Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR 1994 Phosphatidylinositol 3/kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 14:4902-4911
39. Quon MJ, Butte AJ, Zarnowski MJ, Sesti G, Cushman SW, Taylor SI 1995 Insulin receptor substrate 1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4 translocation in transfected rat adipose cells. *J Biol Chem* 269: 27920-27924
40. Kanai F, Ito K, Todaka M, Hayashi H, Kamohara S, Ishii K, Okada T, Hazeki O, Ebina Y 1993 Insulin-stimulated GLUT4 translocation is relevant to the phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 195:762-768
41. Nadiv O, Shinitzky M, Manu H, Hecht D, Roberts Jr CT, LeRoith D, Zick Y 1994 Elevated protein tyrosine phosphatase activity and increased membrane viscosity are associated with impaired activation of the insulin receptor kinase in old rats. *Biochem J* 298:443-450
42. Zoppini G, Kahn CR 1992 Effect of phospholipase treatment on insulin receptor signal transduction. *Diabetologia* 35:109-115
43. Olefsky JM, Reaven GM 1975 Effects of age and obesity on insulin binding to isolates adipocytes. *Endocrinology* 96:1486-1498
44. Davidson MB, Karjala R G 1978 Primary insulin antagonism of glucose transport in muscle from the older-obese rat. *Metabolism* 27:1994-2005
45. Saad MJA, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR 1992 Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest* 90:1839-1849

EFFECT OF CAPTOPRIL, LOSARTAN, AND BRADYKININ ON EARLY STEPS OF INSULIN ACTION.

Carla RO Carvalho, Ana Claudia P Thirone, Licio A Velloso, Mario JA Saad

Departamento de Clinica Medica, FCM, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

Key words: ACE inhibitors, bradykinin, IRS-1, insulin resistance, tyrosine phosphorylation

Please address correspondence to:

Mario J.A. Saad, M.D.

Departamento de Clinica Medica

FCM-UNICAMP

Campinas, SP, Brasil

13081-970

Fax: + 55 192 393114

ABSTRACT

Insulin initiates its metabolic and growth-promoting effects by binding to the α subunit of its receptor, thereby activating the kinase in the β subunit. This event leads to tyrosyl phosphorylation of its cytosolic substrate, insulin receptor substrate-1 (IRS-1), which in turn associates with and activates phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase). The clinical use of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) has been associated with increased insulin sensitivity. However, the exact molecular mechanism is unknown. In the present study, we have examined the phosphorylation status of the insulin receptor and IRS-1, as well as the association between IRS-1 and PI 3-kinase in the liver and muscle of rats treated acutely with captopril, using immunoprecipitation with anti-peptide antibodies to the insulin receptor, IRS-1, and immunoblotting with antiphosphotyrosine and anti-PI 3-kinase antibodies.

Insulin stimulation increased receptor autophosphorylation to $462 \pm 253\%$ ($p < 0.05$) in the liver and $697 \pm 78\%$ ($p < 0.001$) in the muscle of ACEi treated rats. There were also increases to $250 \pm 17\%$ ($p < 0.001$) and $280 \pm 50\%$ ($p < 0.05$) in the insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation levels in the liver and muscle, respectively, of animals treated with captopril. The insulin-stimulated IRS-1 association with PI 3-kinase in the liver rose to $305 \pm 20\%$ ($p < 0.001$) and in the muscle to $267 \pm 48\%$ ($p < 0.05$). The losartan, an angiotensin receptor (AT1) blocker, had no significant effect on insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation in both tissues. The acute administration of bradykinin increased insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and of IRS-1 in the liver and muscle. These data demonstrate that ACE inhibitors modulate the early steps of insulin signalling, and that this effect may be simulated by the administration of bradykinin.

INTRODUCTION

Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors have well-documented effects in reducing blood pressure and improving other cardiovascular parameters in hypertensive individuals. The influence of ACE inhibitors such as captopril on glucose metabolism has also been studied. Several clinical studies have shown that the short- and long-term administration of captopril results in an increased insulin-stimulated glucose disposal in diabetic or hypertensive persons (1-9). The short-term oral administration of captopril at doses which have no effect on blood pressure has been reported to improve peripheral glucose disappearance (10). However, it is currently unclear whether this captopril-induced improvement in whole-body disposal results from an alteration in skeletal muscle insulin signalling pathways, or from an improved muscle blood flow, or even from the combination of both of these.

Many of the proteins involved in insulin action have been defined at a molecular level over the past decade (11). The insulin receptor is a protein tyrosine kinase which, when activated by insulin binding, undergoes rapid autophosphorylation and phosphorylates intracellular protein substrates including insulin receptor substrate 1 (IRS-1) (11-17). Following tyrosine phosphorylation IRS-1 acts as docking protein for several Src homology 2 domain-containing molecules, including phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), and SHPTP2 (18-34). The interaction between the IRS-1 and PI 3-kinase occurs through the p85 regulatory subunit of the enzyme and results in an increase in catalytic activity of the p110 subunit. PI 3-kinase is essential for many insulin-sensitive metabolic processes including stimulation of glucose transport and stimulation of glycogen and protein synthesis (28-33). In aging rats (20 month-old), there is insulin resistance accompanied by a decrease in IRS-1 tyrosine phosphorylation and association with PI 3-kinase in liver and muscle (23).

In order to determine whether the improvement in insulin sensitivity induced by captopril is related to modulation of the early steps of insulin action, we have studied the phosphorylation status of the insulin receptor and of IRS-1 as well as the association of the latter with PI 3-kinase in the liver and muscle of aging rats treated with this ACE inhibitor.

METHODS

Materials

The reagents for SDS-PAGE and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA). Tris, phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, and bradykinin were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Protein A Sepharose 6 MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden), [¹²⁵I]protein A was from Amersham (Aylesbury, UK) and nitrocellulose paper (BA85, 0.2 μ m) was from Schleicher & Schuell (Keene, NH). Sodium thiopental and human recombinant insulin (Humulin R) were from Eli Lilly Co. (Indianapolis, IN). Male Wistar rats were from the UNICAMP Central Breeding Center. Captopril (Capoten ®) was from Bristol-Myers Squibb, Munich, Germany and losartan Monoclonal antiphosphotyrosine antibodies and anti-PI 3-kinase (p85) antibody were from Upstate Biotechnology Incorporated (Lake Placid, NY). Anti-IRS-1 antibody and anti-insulin receptor antibody were from Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA).

Animals

Male Wistar rats 20 months old were provided with standard rodent chow and water *ad libitum*. Food was withdrawn 12-14 h before the experiments. In some experiments we also used 2 months old rats.

Methods

Rats received captopril (2 mg/kg BW), or losartan (15 mg/kg BW) orally 6 and 1 hour before the experiment, or bradykinin (100 μ g, ip), as described in figure legends, before the experiment. The animals were subsequently anesthetized with sodium thiopental (25mg/kg BW, ip) and used 10-15 min later, *i.e.* as soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes. The abdominal cavity was opened, the portal vein exposed, and 0.5 ml of normal saline (0.9% NaCl) with or without 6 μ g insulin was injected. After 30 sec, the liver was removed, minced coarsely and homogenized immediately in approximately ten volumes of solubilization buffer (1% Triton-X 100,

100 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF and 0.1 mg of aprotinin/ml) at 4 °C using a polytron PTA 20S generator (model PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operated at maximum speed for 30 sec.

Approximately 90 sec after the injections described above, hindlimb muscle was quickly excised and homogenized as described for liver. Both extracts were centrifuged at 15,000 rpm at 4°C in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA) for 45 min to remove insoluble material, and the supernatant was used for the assay. Protein determination was performed by the Bradford dye binding method using the Bio-Rad reagent and BSA as the standard. The supernatants of these tissues were used for immunoprecipitation with anti-insulin receptor and anti-IRS-1 antibody and Protein A Sepharose 6 MB or protein A/G plus (Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA).

Protein analysis by immunoblotting

The precipitated proteins were treated with Laemmli sample buffer (35) containing 100 mM dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 4 minutes after which they were subjected to SDS-PAGE (6% bis-acrylamide) in a Bio-Rad miniature lab gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).

Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean) as described by Towbin *et al.* (36) except for the addition of 0.02% SDS to the transfer buffer to enhance the elution of high M_r proteins. Non-specific protein binding to the nitrocellulose was reduced by pre-incubating the filter overnight at 4° C in blocking buffer (5% nonfat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blot was incubated with antiphosphotyrosine antibodies (1µg/ml), or with anti PI 3-kinase (1:500) diluted in blocking buffer (0.3% BSA instead of nonfat dry milk) overnight at 4° C and then washed for 60 min with the blocking buffer without milk. The blots were subsequently incubated with 2 µCi of [¹²⁵I]protein A (30 µCi/µg) in 10 ml of blocking buffer for 2 h at room temperature and then washed again for 30 minutes as described above. [¹²⁵I]Protein A bound to the antiphosphotyrosine and antipeptide antibodies was detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film (Eastman Kodak, Rochester, NY) with Cronex Lightning Plus

intensifying screens (DuPont, Wilmington, DE) at -80°C for 12-48 h. Band intensities were quantitated by optical densitometry (model GS 300, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA) of the developed autoradiographs.

Estimation of in vivo insulin action using the 15 minute insulin tolerance test (ITT)

Some animals from both groups underwent an intravenous insulin tolerance test (0.5 ml of 6 μg of insulin, i.v.) and samples for blood glucose determination were collected at 0 (basal), 4, 8, 12 and 16 minutes after i.v. insulin injection. Thereafter, the rate constant for plasma glucose disappearance (Kitt) was calculated from the formula $0.693/t_{1/2}$. The plasma glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least square analysis of the plasma glucose concentration during the linear phase of decline (37). We also performed ITT in young (2 months-old) rats as a control.

Statistical analysis

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

RESULTS

Effect of acute captopril treatment on the 15 min insulin tolerance test (ITT) in aging rats

There was no significant difference between the fasting plasma glucose levels of young and aging rats. The acute administration of captopril to aging rats did not change the fasting plasma glucose level. As shown in Figure 1, the glucose disappearance rate (Kitt) during the 15-min ITT was significantly lower in aging rats when compared with young rats (2 months-old) (aging: 2.7 ± 0.7 vs young: 4.5 ± 0.6 %/min, $p < 0.001$). After administration of captopril to aging animals, there was a marked increase in insulin sensitivity with the Kitt almost reaching the values for young rats (aging: 2.7 ± 0.7 vs aging + ACE inhibitor: 4.2 ± 0.7 %/min, $p < 0.01$).

Effect of captopril on IR and IRS-1 phosphorylation in the liver and muscle of aging rats

Aging rats which did or did not receive captopril were injected with saline or insulin, and after 30 and 90 sec, the liver (Fig. 2, 3) and hindlimb skeletal muscle (Fig. 4, 5), respectively, were removed and homogenized as described in the Methods. The extracts were immunoprecipitated with anti-insulin receptor (Fig. 2, 4) or anti-IRS-1 (Fig. 3, 5) antibodies and subsequently subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and blotted on to nitrocellulose membranes. These blots were then analysed using anti-insulin receptor, anti-IRS-1, antiphosphotyrosine, and anti-PI 3-kinase antibodies.

There was an increase in the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of the 95 kDa β subunit of the insulin receptor in the liver (Fig. 2B) of the captopril treated animals. Scanning densitometry revealed an increase to $462 \pm 253\%$ ($p < 0.05$) in the liver (Fig. 2B) and $697 \pm 78\%$ ($p < 0.001$) in muscle (Fig. 4B). There was no change in insulin receptor protein levels.

In tissue samples previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody, after captopril treatment, changes were observed in both basal and stimulated phosphorylation of IRS-1 in liver. Before insulin stimulation, basal IRS-1 phosphorylation was $\sim 170\%$ higher in captopril-treated rats than in control and the insulin-

stimulated IRS-1 phosphorylation in captopril-treated rats increased to $250 \pm 17\%$ ($p < 0.001$) in the liver (Fig. 3B) and $280 \pm 50\%$ ($p < 0.05$) in muscle (Fig. 5B). Previous studies (18-22) suggested that there is a relatively stable high affinity interaction between IRS-1 and the 85-kDa subunit of the PI 3-kinase, such that both proteins can be co-precipitated by antibodies to either protein. When blots that had been previously immunoprecipitated with antibody against IRS-1 were subsequently incubated with antibodies against the 85 kDa subunit of PI 3-kinase, there was a faint band in the basal state in control rats but in captopril-treated rats this band was $\sim 200\%$ higher, in accordance with an increase in basal IRS-1 phosphorylation. After insulin stimulation, the intensity of this band did not change in the control group while in the ACEi-treated group a broad band was evident. Comparison of the bands stimulated by insulin revealed that the amount of PI 3-kinase associated with IRS-1 accompanied the increase of its phosphorylation in both of the tissues from the treated rats, and corresponded to $305 \pm 20\%$ ($p < 0.001$) in the liver (Fig. 3C) and $267 \pm 48\%$ ($p < 0.05$) in muscle (Fig. 5C) as revealed by scanning densitometry.

Effect of losartan on IR and IRS-1 phosphorylation in the liver and muscle of aging rats

In order to investigate whether the increase in the phosphorylation of IRS-1 seen in aging rats that received captopril resulted from the inhibition of AII formation we treated these animals with losartan, a competitive angiotensin receptor (AT1) antagonist. Aging rats that did or did not receive losartan orally (Los.), were submitted to the same protocol as described in the Methods. The extracts were immunoprecipitated with anti-insulin receptor and anti-IRS-1 antibodies and subsequently subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and blotted on to nitrocellulose membranes. These blots were then analysed using antiphosphotyrosine antibodies. Fig. 6 shows that there was no change in IRS-1 tyrosine phosphorylation in the animals treated with losartan. The densitometric analyses of four experiments showed that after insulin injection the level of IRS-1 phosphorylation in the liver and muscle of rats treated with losartan was $110 \pm 30\%$ (ns) and $110 \pm 21\%$ (ns), respectively, of that seen in control animals (Fig. 6).

Effect of bradykinin on IR and IRS-1 phosphorylation in liver and muscle of aging rats

Captopril not only blocks the conversion of angiotensin I to angiotensin II but also prevents the degradation of bradykinin. To assess whether the bradykinin potentiating effects of captopril

were involved in the increased IRS-1 phosphorylation after insulin infusion, we injected rats with bradykinin (100 μ g, ip) and examined the changes in insulin receptor and IRS-1 phosphorylation in the liver and muscle.

Five minutes after the administration of bradykinin, the level of insulin-induced receptor and IRS-1 phosphorylation in muscle increased by ~ 11 and ~ 7 -fold, respectively. The phosphorylation of these proteins increased progressively to a maximum of ~ 30 -fold for both receptor and IRS-1 phosphorylation 30 minutes after the injection of bradykinin (Fig. 7A, B). In liver, the results were similar although much less dramatic, with an increase in insulin-induced IRS-1 phosphorylation of ~ 3 -fold 30 minutes after bradykinin administration (Fig. 7C). There was also a parallel increase in insulin-induced association between IRS-1 and PI 3-kinase in liver and muscle after bradykinin infusion (data not shown).

DISCUSSION

In humans and animal models of insulin resistance, ACE inhibitors increase the sensitivity to insulin (1-10). Our results demonstrate that after acute oral administration of captopril there was an improvement in insulin sensitivity in aging rats as shown by an increase in glucose disappearance rate during the 15-min ITT. The mechanism underlying the improvement in insulin sensitivity induced by ACE inhibitor is not fully understood. In the present study, we evaluated the *in vivo* insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor and IRS-1, and also the association of IRS-1 with PI 3-kinase (25-27) in the liver and muscle of aging rats treated with captopril.

The insulin resistance that occurs in aging rats is associated with a reduction in both IRS-1 phosphorylation and its association with PI 3-kinase after insulin stimulation (23). Treating aging rats with captopril significantly increased the insulin-induced insulin receptor and IRS-1 phosphorylation both in the liver and muscle. The increased phosphorylation of IRS-1 was accompanied by an increase in IRS-1/PI 3-kinase association in both tissues. These findings may be of biological significance since the decrease in insulin receptor and IRS-1 phosphorylation observed in aging animals when compared with young ones is known to correlate with insulin resistance (12, 13, 23). Insulin increases glucose uptake into cells, partly through the translocation of GLUT4 from intracellular compartments to the plasma membrane in muscle and adipose tissues (31, 32). Distinct experimental approaches have lead to the conclusion that PI 3-kinase is necessary for insulin-stimulated GLUT4 and GLUT1 translocation (28-32, 40, 41). Evidence from other sources has also demonstrated a correlation between PI 3-kinase activity and glycogen metabolism (18, 28, 33). Thus, it is reasonable to speculate that the IRS-1/PI 3-kinase pathway may be linked to the activation of glucose transport in muscle and glycogen synthesis in the liver and muscle, and that an increase in this association in aging animals treated acutely with captopril may have a role in the enhanced insulin sensitivity in these animals. An increase in basal IRS-1 tyrosine phosphorylation in aging rats treated with ACE inhibitor was observed in liver but not in muscle, and may be a direct tissue-specific effect of captopril. Alternatively, this may reflect systemic improvement in insulin action, reflected in liver IRS-1 tyrosine phosphorylation because this tissue is exposed to higher insulin levels than muscle.

In order to investigate the mechanism behind the phosphorylation-enhancing effect of captopril, we studied the two effects of ACE inhibitors. The first and best described mode of action for ACE inhibitors involves the inhibition of the conversion of angiotensin I to angiotensin II, both sistemically and locally (43). This leads to a reduced level of AII, the effects of which can be simulated by blocking the AT1 receptor. In a recent series of experiments, we demonstrated that there is cross-talk between the AII and insulin signaling systems (44, 45). We also showed ACE inhibition to be involved in the ability of captopril to enhance the insulin-induced insulin receptor and IRS-1 tyrosine phosphorylation. In this regard, we investigated the effects of losartan, an AT1 receptor blocker, on the early steps of insulin signal transduction. Our results showed that there was no difference in the IRS-1 phosphorylation status in the liver and muscle of control and losartan-treated rats after insulin injection. Losartan also did not significantly affect the insulin-stimulated IRS-1 association with PI 3-kinase. Interestingly, Tomiyama et al. (46) reported that a 3 week treatment with the losartan decreased the mean blood pressure of spontaneously hypertensive rats without affecting the sensitivity to insulin. In contrast, we observed that ACE inhibitor administration improved insulin sensitivity, suggesting that there is no dependence on AII antagonism.

A second, less emphasized mode of action of ACE inhibitors involves the inhibition of kininase II, an enzyme identical do ACE, which results in a decreased degradation of bradykinin (47). Recent studies have shown that the administration of bradykinin improves insulin action on glucose transport and reduces plasma glucose levels in Zucker rats (9, 48-50). Uehara et al. (50) demonstrated that bradykinin antagonism prevents significant increases in whole-body insulin-mediated glucose disposal resulting from acute captopril treatment in insulin-resistant dogs and in human patients with NIDDM. Our results indicate that pre-treatment with bradykinin induces a progressive and dose-dependent (not shown) increase in insulin-induced insulin receptor and IRS-1 phosphorylation in the liver and muscle of aging rats after insulin stimulation. Following bradykinin treatment there was also an increase in insulin-stimulated IRS-1 association with PI 3-kinase in the liver and muscle (data not shown). This result is interesting because bradykinin has been shown to improve insulin sensitivity (9). Recently, Rett et al. (48) demonstrated in the isolated rat heart that bradykinin, at a concentration that does not affect coronary flow, mimics the insulin-induced translocation of both GLUT4 and GLUT1. Recently Isami et al. (49) demonstrated in dog

adipocytes that bradykinin enhances GLUT4 translocation through the increase in insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and IRS-1. Our study is the first to demonstrate that bradykinin increases insulin-induced receptor and IRS-1 tyrosine phosphorylation and association with PI 3-kinase in the liver and muscle of an animal model of insulin resistance. It is interesting that we did not observe any effect of ACE inhibitor and/or bradykinin on the early steps in insulin action in young rats. In this regard, the descriptions of improvement in glucose disposal by ACE inhibitors in animal models and humans, is related to situations of insulin resistance. It is possible that ACE inhibitors and/or bradykinin may be effective in some but not all situations of insulin resistance, and this deserves further exploration. It will be also of interest to investigate the effects of ACE inhibitors and/or bradykinin on molecular mechanisms that control early steps in insulin signalling, and upon the activity of enzymes responsible for phosphotyrosine dephosphorylation (phosphotyrosine phosphatases), considering a previous demonstration that bradykinin delayed the dephosphorylation of the insulin receptor in adipocytes (49).

Most previous investigations have attributed the influence of ACE inhibitors on glucose disposal to improved capillary blood flow and an accompanying increased delivery of insulin and glucose to muscle (1, 51). Additionally, Hirooka et al. (52) reported an improvement in endothelium-dependent vasodilation after the administration of captopril, and Kodama et al. (53) reported an improvement in glycemic control among NIDDM subjects which was accompanied by an increase in forearm blood flow. Although the potential contribution of the hemodynamic influences of ACE inhibitors on glucose disposal cannot be ruled out, our results on the early steps of insulin action *in vivo* in the liver and muscle of aging rats, indicate that these are additional effect of ACE inhibitors and bradykinin and/or its metabolites on insulin sensitivity.

Häring et al. (54) have demonstrated that in rat-1 fibroblasts overexpressing the human insulin receptor, there is cross-talk between the insulin receptor and the bradykinin signaling system. Our results show that in liver and muscle, the two main tissues involved in glucose homeostasis, there is also cross-talk between insulin and bradykinin signalling pathways. This phenomenon may have important clinical implications, since insulin resistance occurs in a variety of pathological states including essential hypertension and atherosclerosis and is a central component of NIDDM. The potential for this interaction as a site for new therapeutic approaches to treat insulin resistance, as

well as for increased understanding of the insulin signalling and G-protein-coupled pathways deserves further exploration.

In summary, this study has shown an improvement in insulin sensitivity accompanied by an increase in insulin-induced IR and IRS-1 phosphorylation as well as IRS-1/PI 3-kinase association in the liver and muscle of aging rats following treatment with an ACE inhibitor. These increases are simulated by the administration of bradykinin, an observation that may help to explain the mechanism by which ACE inhibitors improve insulin sensitivity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr E. Antunes (Department of Pharmacology, UNICAMP) for kindly providing the bradykinin. The technical assistance of Mr. L. Janeri and Mrs. C. M Silva is also gratefully acknowledged. This work was supported by grants from FAPESP and CNPq.

REFERENCES

1. Jauch KW, Hartl W, Guenther B, Wicklmayr M, Rett K, Dietze G. Captopril enhances insulin responsiveness of forearm muscle tissue in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.* 17: 448-454, 1987.
2. Henriksen EJ, Jacob S. Effects of captopril transport activity in skeletal muscle of obese Zucker rats. *Metabolism* 44: 267-272, 1995.
3. Donnelly R. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and insulin sensitivity: metabolic effects in hypertension, diabetes, and heart failure. *J. Ardiiov. Pharm.* 20 (suppl. 11): S38-S44, 1992.
4. Berne C. Metabolic effects of ACE inhibitors. *J. Int. Med.* 229 (suppl. 2): 119-125, 1991.
5. Pacheco CA, Ramirez LC, Rios JM, Raskin P. Hypoglycemia induced by angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with non-insulin-dependent diabetes receiving sulfonylurea therapy. *Am. J. Med.* 89: 811-812, 1990.
6. Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Brandi L, Bevilacqua S. Insulin resistance in essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* 317: 350-357, 1987.
7. Natali A, Santoro D, Palombo C, Cerri M, Ghione S, Ferrannini E. Impaired insulin action on skeletal muscle metabolism in essential hypertension. *Hypertension.* 17: 170-178, 1991.
8. Paolisso G, Riu S, Marrazzo G, Verza M, Varricchio M, D'Onofrio F. Insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with chronic congestive heart failure. *Metabolism.* 40: 972-977, 1991.
9. Henriksen EJ, Jacob S, Augustin HJ, Dietze GJ. Glucose transport activity in insulin-resistant rat muscle. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and bradykinin antagonism. *Diabetes* 45 (suppl 1): S125-S128, 1996.
10. Herings RMC, Boer A, Stricker BHCh, Leufkens HGM, Porsius A. Hypoglycaemia associated with use of inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Lancet.* 345: 1195-1198, 1995.

11. White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* 269: 1-5, 1994.
12. Ebina Y, Araki E, Taira M, Shimada F, Mori M, Craik CS, Siddle K, Pierce SB, Roth RA, Rutter WJ. 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.
13. Chou CK, Dull TJ, Russel DS, Gherzi R, Lewohl D, Ullrich A, Rosen OM. Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. *J. Biol. Chem.* 262:1842-1847, 1987.
14. White MF, Maron R, Kahn CR. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr 185,000 protein in intact cells. *Nature* 318:183-186, 1985.
15. Maegawa H, Olefsky JM, Thies S, Boyd D, Ullrich A, McClain MA. Insulin receptor with defective tyrosine kinase inhibits normal receptor function at the level of substrate phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 261:16597-16603, 1988.
16. Momomura K, Tobe K, Seyama Y, Takaku F, Akanuma Y, Kasuga M. Insulin-induced tyrosine phosphorylation in intact rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155:1181-1186, 1987.
17. Sun XJ, Rothenberg PL, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden P, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-77, 1991.
18. Lamphere L, Carpenter CL, Sheng ZF, Kallen RG, Lienhard GE. Activation of PI 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes by association with insulin receptor substrate-1. *Am. J. Physiol.* 266: E486-E494, 1994.
19. Backer JM, Myers MG, Jr, Schoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Schlessinger J, White MF. The phosphatidylinositol 3-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J.* 11: 3469-3479, 1992.

20. Folli F, Saad MJA, Backer JM, Kahn CR. Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin resistance and insulin-deficient diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 92: 1787-1794, 1993.
21. Saad MJA, Hartmann LGC, Carvalho DS, Galoro CAO, Brenelli SL, Carvalho CRO. 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.
22. Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J. Clin. Invest.* 95: 2195-2204, 1995.
23. Carvalho CRO, Brenelli SL, Silva AC, Nunes ALB, Velloso, Saad MJA. 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.
24. Saad MJA, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 90: 1839-1849, 1992.
25. Lavan BE, Kuhne MR, Garner CW, Anderson D, Rudijk M, Pawson T, Lienhard GE. The association of insulin-elicited phosphotyrosine proteins with src homology domains. *J. Biol. Chem.* 267: 11631-11636, 1992.
26. Kelly KL, Ruderman NB. Insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase. Association with a 185-kDa tyrosine-phosphorylated protein (IRS-1) and localization in a low density membrane vesicle. *J. Biol. Chem.* 268: 4391-4398, 1993.
27. Giorgetti S, Balloti R, Kowalski-Chawel A, Tartare S, VanObberghen 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.

28. Hara K, Yonezawa K, Sakaue H, Ando A, Koton K, Kitamura T, Kitamura Y, Ueda H, Stephens L, Jackson TR, Hawkins PT, Dhand R, Clark AE, Holman GD, Waterfield MD, 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.
29. Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. 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.
30. Clarke JF, Young PW, Yonezawa K, Kasuga M, Holman GD. Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Biochem. J.* 300: 631-635, 1994.
31. Yeh JL, Gulve EA, Rameh L, Birbaum MJ. 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.
32. Sanches-Margalet V, Golfine ID, Vlahos CJ, Sung CK. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor LY 294002. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204: 446-452, 1994.
33. Welsh GI, Foustone EJ, Young SW, Tavaré JM, Proud CG. Wortmannin inhibits the effects of insulin and serum on the activities of glycogen synthase kinase-3 and mitogen-activated protein kinase. *Biochem. J.* 303: 15-21, 1994.
34. Yamauchi K, Milarski KL, Saltiel AR, Pessin JE. Protein tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a require positive effector for insulin downstream signaling. *Biochemistry*. 92: 664-668, 1995.
35. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
36. Towbin H, Staehlin J, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354, 1979.

37. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Gigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corgnati A, Muggeo M. Estimation of *in vivo* insulin action in man: comparison of insulin tolerance test with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68: 374-378, 1989.
38. Stephens JM, Pilch PF. The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT4, the major insulin-responsive glucose transporter. *Endocrine Rev.* 16: 529-546, 1995.
39. Quon MJ, Butte AJ, Zarnowski MJ, Sesti G, Cushman SW, Taylor SI. Insulin receptor substrate-1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4 translocation in transfected rat adipose cells. *J. Biol. Chem.* 270: 27920-27924, 1995.
40. Haruta T, Morris AJ, Rose DW, Nelson JG, Mueckler M, Olefsky JM. Insulin stimulated GLUT4 translocation is mediated by a divergent intracellular signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 270: 27991-27994, 1995.
41. Lam K, Carpenter CL, Ruderman NB, Friel JC, Kelly KL. The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1. Stimulation by insulin and inhibition by wortmannin. *J. Biol. Chem.* 269: 20648-20652, 1994.
43. Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubeert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 9386-9390, 1988.
44. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJA, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 12490-12495, 1996.
45. Saad MJA, Velloso LA, Carvalho CRO. Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. *Biochem. J.* 310: 741-744, 1995.
46. Tomiyama H, Kushihiro T, Abeta H, Ishii T, Takahashi A, Furukawa L, Asagami T, Hino T, Saito F, Otsuka Y, Kurumatani H, Kobayashi F, Kanmatsuse K, Kajiwara N. Kinins contribute to

the improvement of insulin sensitivity during treatment with angiotensin converting enzyme inhibitor. *Hypertension*. 23: 450-455, 1994.

47. Yang HYT, Erdös EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochem Biophys Acta*. 214: 374-376, 1970.

48. Rett K, Wicklmayr M, Dietze GJ, Häring HU. Insulin-induced glucose transporter (GLUT1 and GLUT4) translocation in cardiac muscle tissue is mimicked by bradykinin. *Diabetes* 45 (suppl 1): S66-S69, 1996.

49. Isami S, Kishikawa E, Araki E, Uehara M, Kaneko K, Shirohani T, Todaka M, Ura S, Motoyoshi S, Matsumoto K, Miyamura N, Shichiri. Bradykinin enhances GLUT4 translocation through the increase of insulin receptor tyrosine kinase in primary adipocytes: evidence that bradykinin stimulates the insulin signalling pathway. *Diabetologia*. 39: 412-420, 1996.

50. Uehara M, Kishikawa H, Isami S, Kisanuki K, Ohkubo Y, Mitamura N, Miyata T, Yano T, Shichiri M. Effect on insulin sensitivity of angiotensin converting enzyme inhibitors with or without a sulphhydryl group: bradykinin may improve insulin resistance in dogs and humans. *Diabetologia* 37: 300-307, 1994.

51. Torlone E, Rambotti AM, Periello G, Botta G, Santeusano F, Brunetti P, Bolli GB. ACE-inhibition increases hepatic and extrahepatic sensitivity to insulin in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and arterial hypertension. *Diabetologia* 34: 119-125, 1991.

52. Hirooka Y, Imaizuma T, Masaki H, Ando S, Harada S, Momohara M, Takeshita A. Captopril improved impaired endothelium-dependent vasodilation in hypertensive patients. *Hypertension*. 20: 175-180, 1992.

53. Kodoma J, Katayama S, Tanaka K, Kawazu S, Ishii J. Effect of captopril on glucose concentration: possible role of augmented postprandial forearm blood flow. *Diabetes Care* 13: 1109-1111, 1990.

54. Häring HU, Tippmer S, Kellerer M, Mosthaf L, Kroder G, Bossenmaier B, Berti L. Potential mechanisms of a cross talk between bradykinin and insulin receptor. *Diabetes* 45 (suppl. 1): S115-S119, 1996.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Glucose disappearance rate in young, aging and aging captopril treated rats. Animals in both groups were submitted to an intravenous insulin tolerance test (6 μ g of insulin, i.v.) and samples for blood glucose determination were collected at 0 (basal), 4, 8, 12 and 16 minutes after i.v. insulin injection. The rate constant for plasma glucose disappearance (Kitt) was calculated as described in methods.

Figure 2: Insulin receptor phosphorylation in liver of captopril treated rats. Normal saline (lanes 1 and 3) or 6 μ g of insulin (lanes 2 and 4) was administered into the portal vein as a bolus injection and 30 s later the liver was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-insulin receptor antibody and immunoblotted with anti-insulin receptor (A) and antiphosphotyrosine antibody (B). The insulin receptor protein levels and phosphorylation are shown as the mean $\pm$ SEM of the scanning densitometry of 6 experiments. * Significant differences at least at $p < 0.05$.

Figure 3: IRS-1 phosphorylation in liver of captopril treated rats. Normal saline (lanes 1 and 3) or 6 μ g of insulin (lanes 2 and 4) was administered into the portal vein as a bolus injection and 30 s later the liver was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with anti-IRS-1 (A), antiphosphotyrosine (B) and anti-PI 3-kinase antibodies (C). The IRS-1 protein level, the insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation and PI 3-kinase association are shown as the mean $\pm$ SEM of the scanning densitometry of 6 experiments. * Significant differences at least at $p < 0.05$.

Figure 4: Insulin receptor phosphorylation in muscle of captopril treated rats. Normal saline (lanes 1 and 3) or 6 μ g of insulin (lanes 2 and 4) was administered into the portal vein as a bolus injection and 90 s later hindlimb muscle was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-insulin receptor antibody and immunoblotted with anti-insulin receptor (A) and antiphosphotyrosine antibody (B). The insulin receptor protein levels and phosphorylation are shown as the mean $\pm$ SEM of the scanning densitometry of 6 experiments. * Significant differences at least at $p < 0.05$.

Figure 5 IRS-1 phosphorylation in muscle of captopril treated rats. Normal saline (lanes 1 and 3) or 6 μ g of insulin (lanes 2 and 4) was administered into the portal vein as a bolus injection and 90 s later hindlimb muscle was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with anti-IRS-1 (A), antiphosphotyrosine (B) and anti-PI 3-kinase antibodies (C). The IRS-1 protein level, the insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation and PI 3-kinase association are shown as the mean $\pm$ SEM of the scanning densitometry of 6 experiments. * Significant differences at least at $p < 0.05$.

Figure 6: Effect of losartan on insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in liver (A) and muscle (B) of aging rats. The tissue samples were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibodies and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody. Scanning densitometry was performed on autoradiograms from 4 experiments. The values are expressed as the mean $\pm$ SEM.

Figure 7: Effect of bradykinin on insulin-stimulated insulin receptor and IRS-1 tyrosine phosphorylation in muscle of aging rats. Rats were treated with 100 μ g Bradykinin, i.p., for the indicated time and then acutely stimulated with insulin (+) or normal saline (-); skeletal muscle was extracted as described in methods. Aliquots with same amount of protein were immunoprecipitated with anti-insulin receptor (A) or anti-IRS-1 (B) antibodies and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody. (C) Effect of Bradykinin on insulin induced IRS-1 tyrosine phosphorylation in liver. Bradykinin was injected i.p. 30 minutes before insulin and liver was extracted 30 seconds after insulin infusion, and submitted to the same protocol as (B). The insulin receptor and IRS-1 phosphorylation are shown as the mean of the scanning densitometry of two experiments.

Figure 1

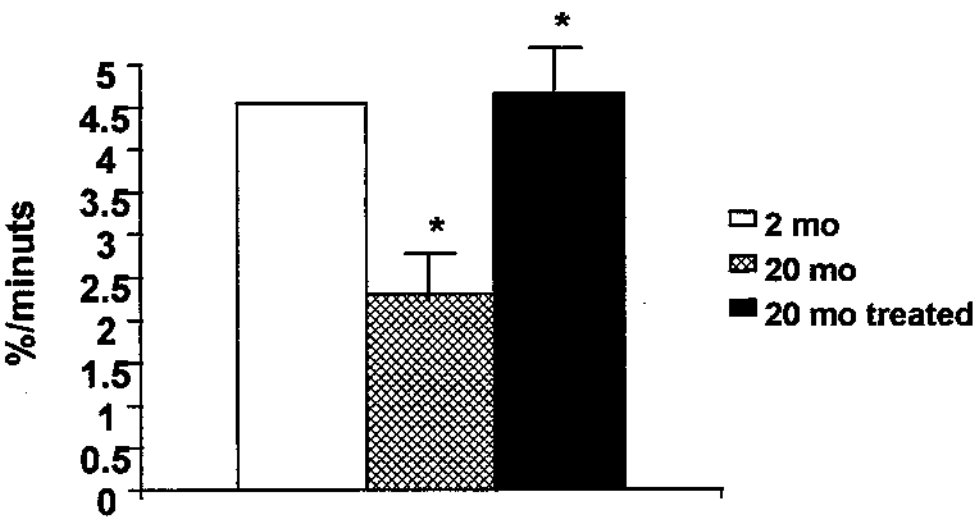


Figure 2

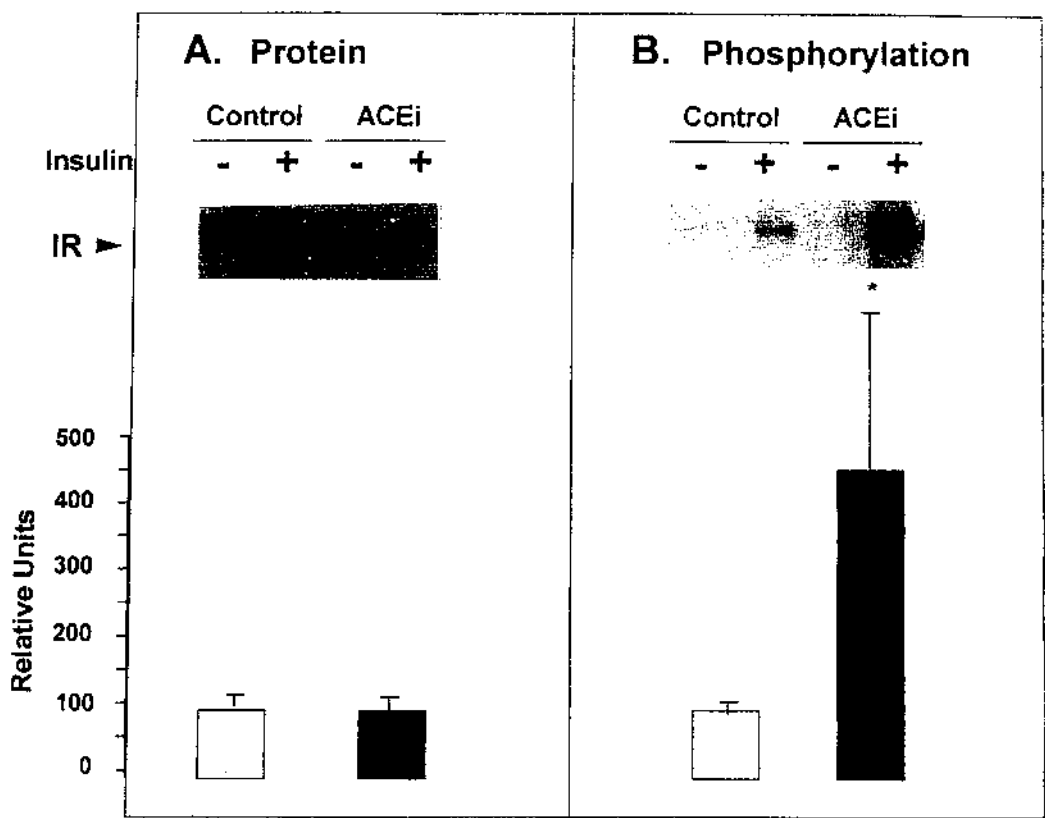


Figure 3

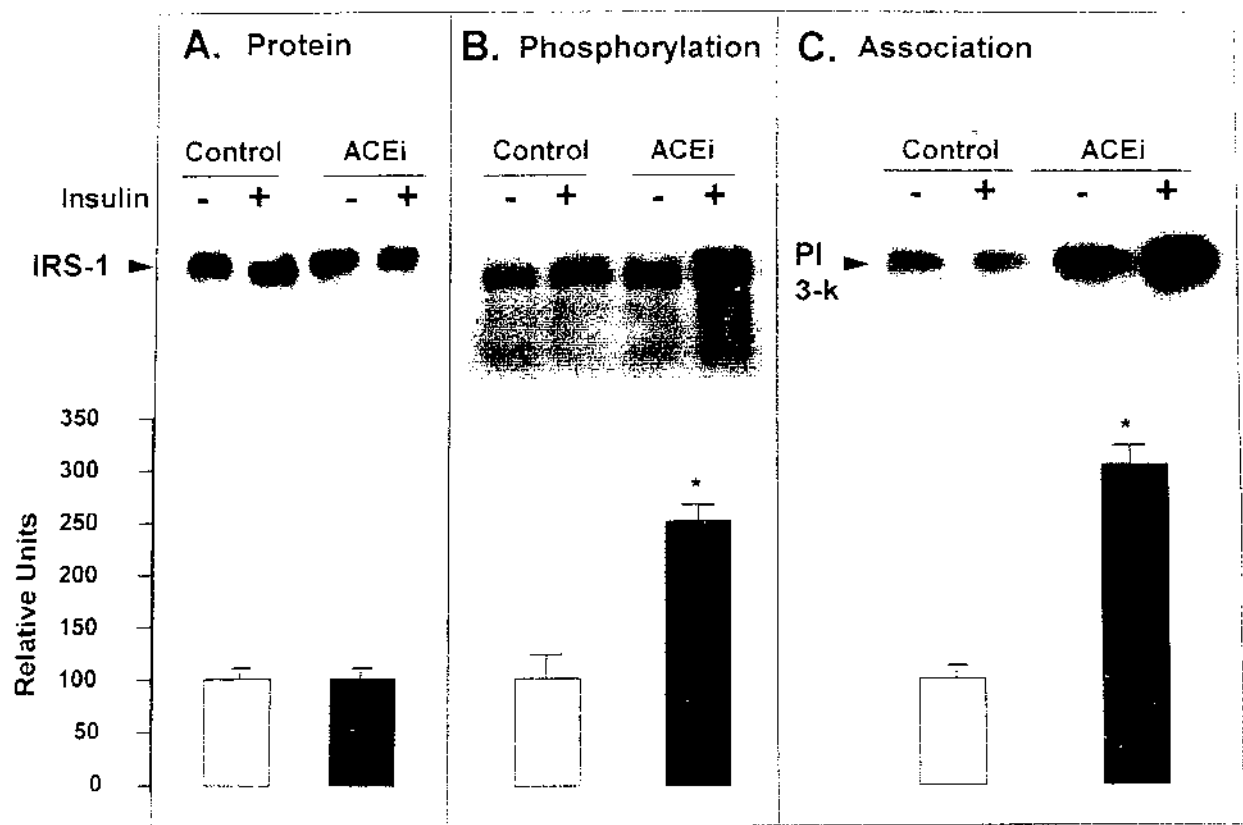


Figure 4

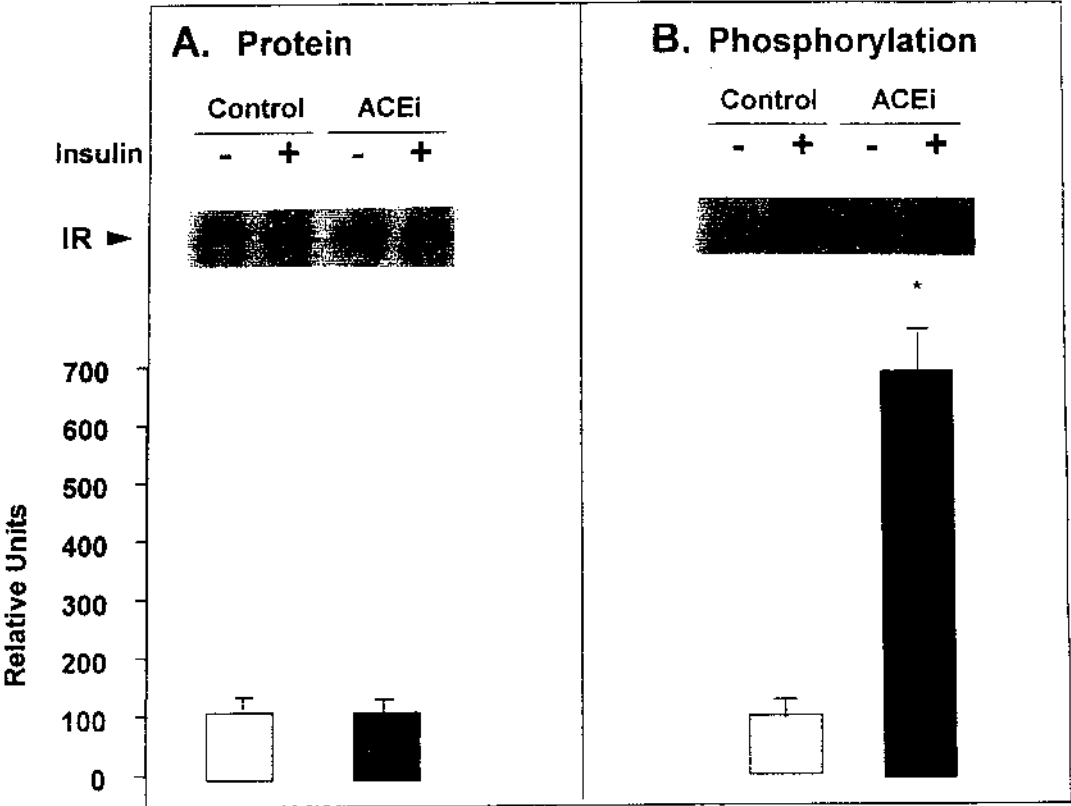


Figure 5

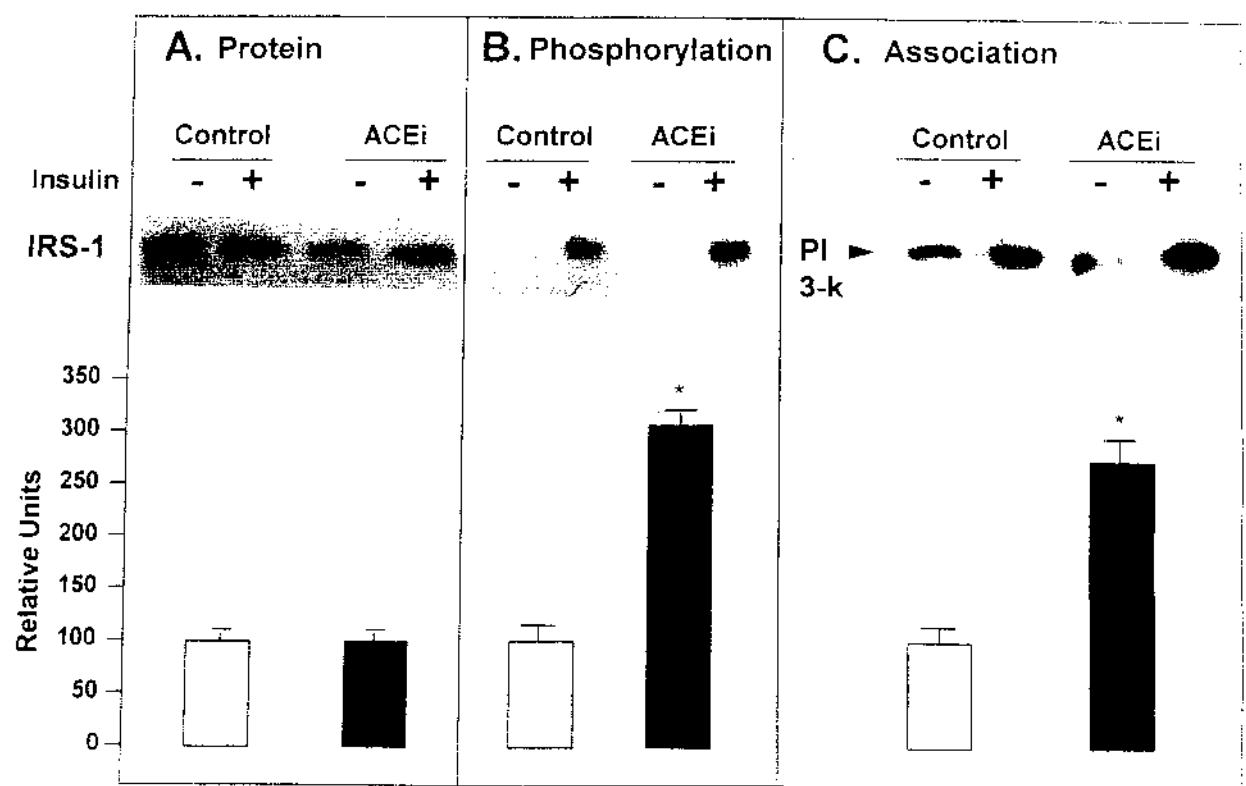


Figure 6

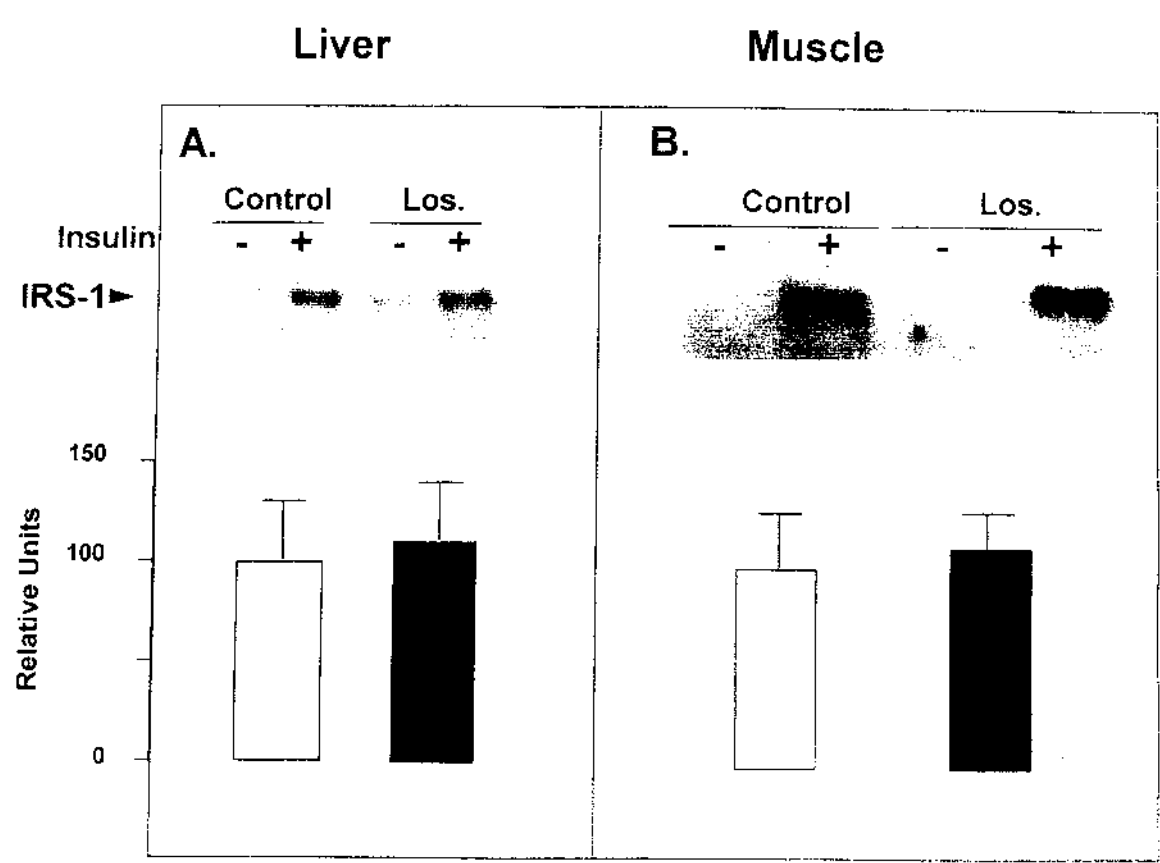
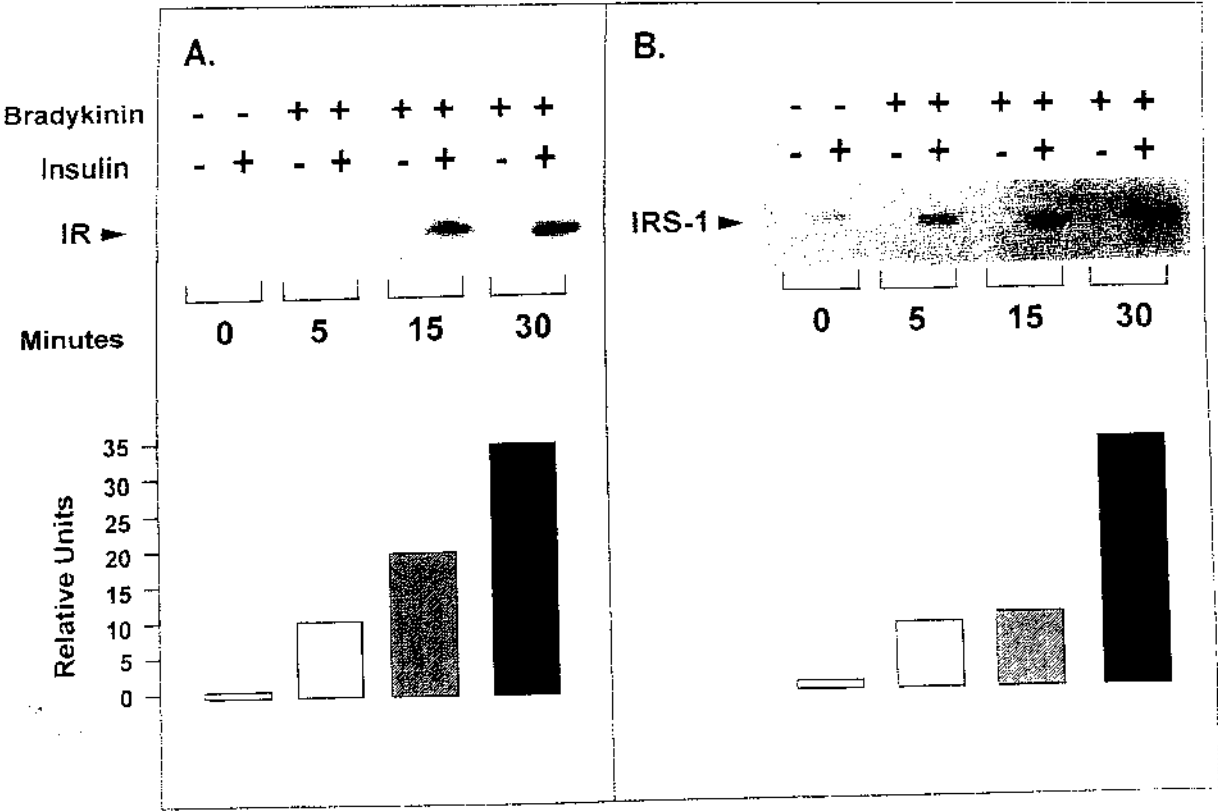


Figure 7

Muscle



Liver

