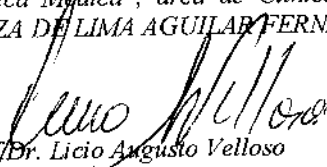


Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de Clínica Médica, da médica MARIA LUIZA DE LIMA AGUILAR FERNANDES.


Prof. Dr. Lício Augusto Velloso
Orientador

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Errata:

Resumo página ii linha 5 onde está escrito *da vias* SHC/GRB2 leia-se *da via*.

Introdução página 11 penúltima linha, onde está escrito *se deve*, leia-se *se devem*.

Introdução página 12 linha 11, onde está ponto e vírgula (;) deveria estar vírgula (,).

Conclusões página 63, no item 5 leia-se - Houve uma redução progressiva no grau de fosforilação do IR e de SHC e no grau de associação IR/SYC e de SHC/GRB2 tanto após estímulo com insulina quanto sem estímulo com insulina, entre as idades de 1 dia e 60 semanas.

Maria Luiza de L. A. Fernandes

***SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM SISTEMA
NERVOSO CENTRAL DE RATOS***

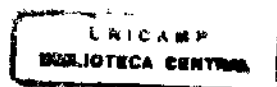
*Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de doutora em Medicina, na
área de Clínica Médica*

Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Co-orientador: Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad

*Campinas
2000*

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



UNIDADE 30
 N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
F391 p
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 43250
 PROC. 16-278100
 C ☐ D ☒
 PREC. RS 1100
 DATA 19/12/00
 N.º CPD

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

CM-00153247-0

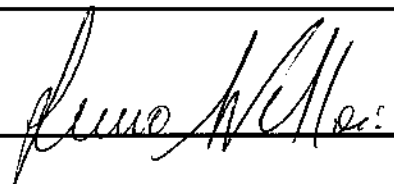
F391s Fernandes, Maria Luiza de Lima Aguilar
 Sinalização da insulina em Sistema Nervoso Central de ratos /
 Maria Luiza de Lima Aguilar Fernandes. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientadores : Lício Augusto Velloso, Mário José Abdalla Saad
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Ciências Médicas.

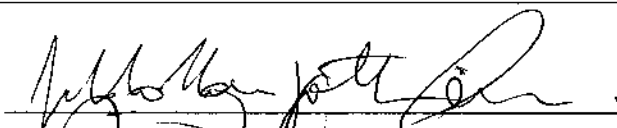
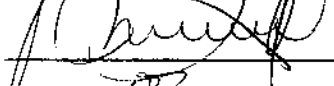
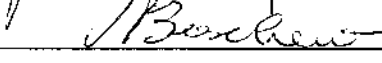
1. Cérebro. 2. Cerebelo. 3. Insulina - ^{receptores}. I. Lício
 Augusto Velloso. II. Mário José Abdalla Saad. III. Universidade
 Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

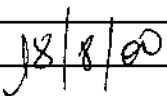
Orientador: Prof.Dr. Lício Augusto Velloso



Membros:

1. 
 2. 
 3. 
 4. 
 5. _____
-

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

Data: 

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

*Dedico este trabalho aos
meus filhos Maurício,
Vicente e Maria Rita,
e ao Sérgio.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível graças ao auxílio de pessoas muito queridas. A elas quero deixar meu muito obrigada.

Ao meu orientador, Professor Lício Augusto Velloso, por sua orientação segura, competente e amigável. As palavras são poucas para agradecer.

Ao meu co-orientador, Professor Mário José Abdalla Saad, pelo entusiasmo com que ensina e pesquisa, sempre incentivando a todos. Um exemplo a ser seguido.

À Professora Nilcéia Freire, atual Reitora da UERJ, por ter acreditado no meu trabalho e permitido meu afastamento.

Aos amigos da Disciplina de Medicina Integral da UERJ, pelo incentivo, apesar da sobrecarga de trabalho causada pelo meu afastamento.

Ao Sr. Luiz Janerí, que, com dedicação e competência, foi meu braço direito nos experimentos do dia a dia e, a todos que trabalham no laboratório, alunos e técnicos, em especial a Renata Pinthon, Rosângela Bezerra, Ana Cláudia Thirone, Verônica Paez-Espínosa, Maria Helena Lima, Carla R. Carvalho e Conceição Aparecida da Silva.

Aos amigos da Disciplina de Semiologia e Medicina Interna da UNICAMP, pelas experiências compartilhadas.

Aos meus amigos, todos, em especial Gulnar, Luíza Maria e Thelma.

E, finalmente, aos meus irmãos e cunhados pelo amor e incentivo e, aos nossos pais, com saudades.

RESUMO.....	i
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4. RESULTADOS.....	31
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÕES.....	62
7. SUMMARY.....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
9. PUBLICAÇÕES.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

$^{\mu}\text{Ci}$	microCuri
AKT	proteína quinase B
ATP	adenosina trifosfato
BAEPs	potenciais de evocação auditivo
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro (brain-derived neurotrophic factor)
Crk	produto do oncogene v-Crk
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	sal dissódico do ácido etilenodinitrilotetracético
EGF	fator de crescimento epidermal (epidermal growth factor)
Fyn	tirosina quinase intracelular
Gab-1	proteína adaptadora contendo sítio PH
GDP	guanosina difosfato
GLUT	transportador de glicose
GRB2	proteína ligadora de receptores para fatores de crescimento
GTP	guanosina trifosfato
I^{125}	isótopo 125 de iodo
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina (insulin-like growth factor-1)
IGF-1R	receptor do IGF-1
IR	receptor de insulina

IRS-1	substrato 1 do receptor de insulina
IRS-2	substrato 2 do receptor de insulina
IRSs	substratos do receptor de insulina
kDa	quilodaltos
LCR	líquido cefalorraquidiano
MAPK	proteína quinase ativadora da mitogênese
Nck	proteína adaptadora contendo sítios SH2/SH3
NPXpY	sítio de reconhecimento na porção justamembrana do receptor da insulina onde N = aspargina; P = prolina; X = qualquer aminoácido; pY=fosfotirosina
p21	inibidor da quinase dependente da ciclina (CDK)
p62 ^{dok}	proteína associada à proteína ativadora da GTPase
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PTEN	homólogo da fosfatase e tensina (phosphatase and tensin homolog)
PH	sítio homólogo à plestrina
PI 3-K	fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoreto
PTB	sítio de ligação de fosfotirosinas (phosphotyrosine binding)
RAS	proteína originalmente identificada como um oncogene, tem participação na regulação do metabolismo e crescimento celular
RNA	ácido ribonucléico

RTK	receptores de fatores de crescimento com atividade tirosino quinase intrínseca
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida e sódio dodecil-sulfato para eletroforese
SH2	sítio com homologia à Src-2
SH3	sítio com homologia à Src-3
SHC	molécula adaptadora e substrato do receptor de insulina
SHP2	fosfotirosina fosfatase
SNC	sistema nervoso central
SOS	fator ativador do Ras, apresenta homologia à Drosophila (Son-of-sevenless)
Src	oncogene originalmente definido como produto do sarcoma vírus Rous
Tris	tri(hidroximetil)-aminometano
Tyr	tirosina
VEPs	potenciais de evocação visual



Resumo

A insulina, agindo através do seu receptor (IR) pertencente à família dos receptores com atividade tirosina quinase, desencadeia uma série de respostas tecido-específicas mediadas por diferentes vias intracelulares. Uma destas vias, com atividade predominantemente ligada a crescimento celular e mitogênese envolve as proteínas SHC e GRB2. No presente estudo avaliou-se a sinalização da insulina através da vias SHC/GRB2 em sistema nervoso central (SNC) de ratos.

Inicialmente determinou-se presença e quantidades de IR, SHC e GRB2 em córtex cerebral e cerebelar. As três proteínas foram encontradas em concentrações similares em ambos os tecidos. Entretanto, quando os animais experimentais foram submetidos a tratamento agudo com insulina detectou-se aumento significativo da fosforilação de IR e SHC e da associação SHC/GRB2 somente em cerebelo e não em córtex cerebral.

Em seguida avaliou-se a variação da concentração de IR, SHC, GRB2 e da tirosina-fosfatase SHP2, desde o primeiro dia até a sexagésima semana de vida. Com relação ao nível de expressão protéica somente SHP2 sofreu queda significativa no período avaliado, mantendo-se as demais proteínas em níveis estáveis. Sob tratamento agudo com insulina observou-se que no decorrer do período avaliado ocorreu uma queda progressiva da fosforilação basal ou insulino-dependente de IR e SHC e da associação entre SHC/GRB2 tanto em cérebro quanto em cerebelo.

Conclui-se que elementos participantes de uma das vias intra-celulares de sinalização da insulina estão presentes em SNC, que sua atividade sofre modulação de acordo com a idade e que existem diferenças funcionais entre córtex cerebral e cerebelar na resposta à insulina.



1. Introdução

A insulina é um hormônio/proteína de aproximadamente 7.000 daltons, produzida e secretada pelas células β da ilhota pancreática, e que tem como principal função o estímulo à captação de glicose por tecidos alvos. Além de seus efeitos primários no controle da homeostase de glicose, a insulina participa na modulação da expressão de diversos genes seja através da regulação da transcrição do DNA, seja através de efeitos estimulatórios ou inibitórios sobre o ritmo de tradução, ou pelo controle da síntese de DNA, ou ainda regulando o transporte de íons e aminoácidos, em praticamente todas as células (CHEATHAM & KAHN, 1995).

A insulina inicia seus efeitos metabólicos e promotores de crescimento através da ligação a um receptor específico na membrana plasmática. O receptor de insulina (IR) é uma glicoproteína presente na membrana celular de praticamente todos os tecidos de mamíferos, que pertence à família dos receptores de fatores de crescimento com atividade tirosina quinase intrínseca (RTK) (FREYCHET, ROTH, NEVILLE, 1971; CUATRECASAS, 1972; KAHN, 1985; VIRKAMÄKI, UEKI, KAHN, 1999). O IR é uma proteína heterotetramétrica, composta de duas subunidades α e duas subunidades β . Regiões ricas em resíduos cisteína nas subunidades α e nas subunidades β , permitem uma ligação covalente inter- e intra-subunidades, através de pontes dissulfeto, formando assim uma estrutura funcional $\alpha_2 \beta_2$ (MASSAGUE et al., 1981; KASUGA et al., 1982a). Cada subunidade α com peso molecular de 135 kDa, é exclusivamente extracelular, e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade β é uma proteína transmembrana que apresenta peso molecular de 95 kDa, e que possui atividade tirosina quinase. O IR desta forma comporta-se, funcionalmente, como uma enzima alostérica com subunidades α

regulatórias e subunidades β catalíticas (KASUGA, KARLSSON, KAHN, 1982b; KASUGA et al., 1982c). Quando a insulina se liga à subunidade α , ocorre uma alteração na sua conformação fazendo com que a atividade quinase de uma das duas subunidades β seja estimulada (HERRERA & ROSEN 1986; PERLMAN et al., 1989; WHITE et al., 1988; VIRKAMÄKI et al., 1999), transferindo grupos fosfato do ATP para vários resíduos tirosina do receptor. O padrão de autofosforilação do receptor é rápido e em cascata, e envolve no mínimo 5 resíduos tirosina. A fosforilação de três resíduos tirosina (Tyr^{1158/1162/1163}) na alça regulatória da subunidade β , estabiliza a mudança conformacional que expõe a porção catalítica para ativação da porção quinase do receptor (HUBBARD et al., 1994), ampliando desta maneira, a atividade quinase em direção a outras proteínas citosólicas. Uma vez ativado, o receptor fosforila substratos intracelulares específicos, cumprindo assim o primeiro passo de uma longa cadeia de interações destinadas a produzir os efeitos biológicos finais da insulina (VAN OBBERGHEN et al., 1983).

Evidências têm sugerido que a atividade quinase do receptor tem papel essencial na mediação dos efeitos metabólicos agudos e prolongados sobre o crescimento celular estimulado pela insulina (EBINA et al., 1987; WILDEN et al., 1992ab). Estudos de mutagênese *in vitro* onde a lisina¹⁰³⁰ localizada no sítio de ligação do ATP do IR, foi substituída por outro aminoácido, demonstraram que tais mutantes expressos em linhagens celulares derivadas de tecidos classicamente responsivos à insulina, permitem a ligação da insulina ao seu receptor, porém não permitem a ativação da porção quinase do mesmo. Esses receptores mutantes foram totalmente ineficientes e incapazes de mediar os efeitos metabólicos e promotores do crescimento da insulina (EBINA et al., 1987; CHOU et al.,

1987; KROOK et al., 1996). Mutações outras geradas no sítio de fosforilação em tirosina (Tyr^{1158/1162/1163}) mostraram alterações similares, tendo o receptor mutante apresentado uma redução na capacidade de autofosforilação e na sua atividade tirosina quinase (ELLIS et al., 1986; WILDEN et al., 1990; WILDEN et al., 1992ab).

A tirosina⁹⁶⁰ da subunidade β , localizada na porção justamembrana do receptor cria o sítio de reconhecimento - NPXpY (onde N= aspargina, P = prolina, X = qualquer amino ácido e pY = fosfotirosina) do domínio PTB dos substratos do receptor de insulina que está presente em muitos receptores tirosina quinase, inclusive do IR. Mutação induzida nesta tirosina cria um receptor que se liga à insulina e é autofosforilado normalmente, apresentando também atividade quinase dirigida a substratos exógenos *in vitro*. Entretanto, tal mutante é incapaz de fosforilar o IRS-1 e outros substratos do receptor de insulina, o que provoca a perda da maioria das ações biológicas da insulina, sendo esta uma evidência da grande importância desempenhada por estes substratos na sinalização insulínica (WHITE et al., 1988; VIRKAMÄKI et al., 1999).

O receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R), como o IR também é uma tirosina quinase, e é também composto por 2 subunidades α extra-celulares, e 2 subunidades β transmembrana. Após a ligação do IGF, o IGF-1R sofre igualmente autofosforilação em vários resíduos tirosina situados na porção intracelular da subunidade β . Estes resíduos estão localizados em posições homólogas aos do IR (CHEATHAM & KAHN, 1995; VAN OBBERGHEN, 1994; ROCCHI et al., 1996).

Diferente da maior parte dos RTKs, que uma vez fosforilados ligam-se diretamente às proteínas com domínio SH2 para propagar o sinal, os receptores de insulina e do IGF-1,

uma vez fosforilados, catalizam a fosforilação de proteínas intermediárias, ou substratos do receptor, responsáveis pela transmissão do sinal entre o receptor e proteínas possuidoras do domínio SH2 (CHEATHAM & KAHN, 1995). Estes substratos são normalmente referidos como proteínas de acoplamento, pois diversas outras proteínas intracelulares se ligam a eles e deste modo transmitem o sinal em cascata para outras proteínas e substratos distais. Estas interações intracelulares proteína-proteína são essenciais para transmitir e compartimentalizar o sinal e desta forma permitir que o efeito final do hormônio ou fator de crescimento seja alcançado.

É importante ressaltar o fato que, em células intactas, tanto o IR como o IRS-1 são capazes de ser fosforilados em aminoácidos serina e treonina (KASUGA et al., 1982 ab; SMITH et al., 1993). Tais fosforilações podem ser estimuladas por tratamento prolongado com insulina, ésteres de forbol e análogos do AMP cíclico, e presumivelmente são resultantes da fosforilação do receptor pela proteína quinase C ou proteína quinase A (TAKAYAMA et al., 1984). Em contraste à fosforilação em tirosina, a qual ativa a quinase, a fosforilação em serina inativa a capacidade tirosina-quinase do receptor (TAKAYAMA, WHITE, KAHN, 1988; SMITH et al., 1993). Esta regulação da atividade quinase por fosforilações em aminoácidos distintos, apresenta-se como um importante mecanismo regulador do sinal insulínico em situações fisiológicas e patológicas (MYERS & WHITE, 1995).

Os substratos do receptor de insulina são uma família crescente de proteínas que são fosforiladas pelo receptor de insulina. Até o momento, nove membros desta família foram identificados, incluindo o IRS-1, o primeiro substrato a ser identificado e o mais

bem estudado (WHITE, TAKAYAMA, KAHN, 1985; SUN, ROTHENBERG, KAHN, 1991.), o IRS-2 (MIRALPEIX et al., 1992), o IRS-3 (LAVAN & LIENHARD, 1993) e o IRS-4 (PERROTI et al., 1987), que são geralmente vistos como os mais específicos para a sinalização insulínica; Gab-1 (VIRKAMÄKI et al., 1999); SHC, com suas três isoformas (PELICCI et al., 1992); e p62^{dok} (VIRKAMÄKI et al., 1999).

Os substratos do receptor de insulina (IRSs), são proteínas citoplasmáticas estruturalmente divididas em duas regiões, as quais determinam sua especificidade. Assim, a região amino-terminal (NH₂) do domínio PH (pleckstrin-homology) é altamente conservada e está envolvida na ligação das proteínas IRS à membrana e ao receptor de insulina; é encontrada em todas as proteínas desta família com exceção da SHC. Todos estes substratos, com exceção da Gab-1, têm um domínio PTB (phosphotyrosine-binding) localizado em direção à porção COOH-terminal com relação ao domínio PH. O domínio PTB é crítico para o reconhecimento da sequência NPXpY do receptor de insulina. Assim na maioria dos substratos, ambos os domínios PH e/ou PTB contribuem para a interação com o receptor, possivelmente cooperando com outros domínios dos substratos. Do ponto de vista funcional, todas as proteínas desta família se ligam ao receptor autofosforilado apenas transitoriamente e depois se desassociam, podendo então ser reconhecidas pelo domínio SH2 de diversas proteínas (SUN et al., 1995; VIRKAMÄKI et al., 1999).

Através de estudos realizados em cultura de células foi demonstrado que a insulina é capaz de induzir a fosforilação de uma proteína efetora denominada SHC (PRONK et al., 1993; OKADA, YAMAUCHI, PESSIN, 1995). Similar ao IRS-1, a SHC é uma proteína citoplasmática passível de ser tirosino-fosforilada por uma variedade de fatores de

crescimento e citocinas (OBERMEIER et al., 1993; SEGATTO et al., 1993; SASAOKA et al., 1994 ab). Descrita pela primeira vez por PELICCI e colaboradores (1992), a proteína SHC (src homology 2/ α collagen-related), cuja estrutura assemelha-se àquela do colágeno, é possuidora do domínio SH2, característica da qual deriva-se o seu nome (PELICCI et al., 1992). A família das proteínas SHC consiste de 3 proteínas relacionadas: as isoformas de 46 e 52 kDa resultam da utilização de diferentes pontos de iniciação no mesmo transcriptor; enquanto a isoforma de 66 kDa parece ser o resultado de “splicing” alternativo (PELICCI et al., 1992; PRONK et al., 1993).

Com o objetivo de determinar a importância da SHC na mediação das respostas intracelulares iniciadas pela insulina, diversos estudos *in vivo* em cultura de células e em sistemas reconstituídos *in vitro*, têm sido realizados. Embora alguns estudos coincidam em afirmar que as proteínas SHC não co-imunoprecipitam com IR ou IGF-1R ativados (PRONK et al., 1993), pesquisas realizadas utilizando receptores de insulina, IGF-1R e receptores de citocinas, apontam o IRS-1 e a SHC como substratos diretos destes receptores (MYERS & WHITE, 1993). Para evidenciar este fato, experimentos *in vitro* usando o sistema duplo-híbrido em leveduras (GUSTAFSON et al., 1995) foram realizados, demonstrando que a p52 SHC interage especificamente com o IR e o IGF-1R, através da ligação dos aminoácidos da porção amino-terminal 46 a 209, com os seus correspondentes localizados no domínio NPXpY da região juxtamembrana de ambos os receptores (ISAKOFF et al., 1996).

A proteína SHC contém um domínio especial PTB, que torna a fosforilação possível mesmo sem a presença do domínio PH (VIRKAMÄKI et al., 1999). Também diferente dos

outros membros da família dos substratos do receptor de insulina, a tirosil-fosforilação da SHC por insulina, liga esta proteína a uma única molécula efetora, chamada GRB2 (LOWESTEIN et al. 1993; McGLADE et al. 1992; ROZAKIS-ADOCK et al., 1992).

A porção SH2 (Src homology 2, “counterpart of viral src”), parte importante da estrutura de algumas proteínas citoplasmáticas, é um domínio altamente conservado, constituído por aproximadamente 100 aminoácidos, que se caracteriza por sua capacidade de interagir, através de ligações de alta afinidade, com as seqüências tirosina-fosforiladas de receptores e outras fosfoproteínas (ANDERSON et al., 1990; KOCH et al., 1991; MCGLADE et al., 1992). A associação de proteínas com domínio SH2 ao receptor ativado é estritamente dependente da autofosforilação do receptor (KOCH et al., 1991; MARGOLIS, 1992). Dentre as proteínas que possuem este domínio estão a subunidade p85 da fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-kinase) (MYERS et al., 1992; MYERS & WHITE, 1993), a GRB2 (SKOLNIK et al., 1993 ab), e a proteína SHP2 (SHPTP-2, ou PTP1-D ou Syp) (FREEMAN et al., 1992). Além destas proteínas adaptadoras, outras proteínas com porção SH2 ligam-se aos resíduos tirosina das proteínas IRS através deste domínio, como a Nck (CHEATHAM & KAHN, 1995), a Crk (VIRKAMÄKI et al., 1999), Fyn (VIRKAMÄKI et al., 1999) e Csk (VIRKAMÄKI et al., 1999).

A mais bem estudada molécula sinalizadora ativada através do IRS-1 e do IRS-2 é a PI 3-quinase, que possui um papel importante na modulação de diferentes funções celulares, incluindo captação de glicose através da sua participação na regulação da translocação das vesículas de GLUT4 para a membrana, antilipólise, ativação da síntese de ácidos graxos, síntese de glicogênio, fosforilação da AKT e estimulação da síntese protéica

e da síntese de DNA (LAVAN & LEINHARD, 1993; ALESSI & DOWNES, 1998; VIRKAMÄKI et al., 1999), além de participar das vias que levam à apoptose (MILLER et al., 1997; SHEPHERD, WITHERS, SIDDLE, 1998; ZHANG et al., 1998).

A GRB2 (growth factor receptor-bound protein-2), é uma pequena proteína citoplasmática de 25 kDa, constituída por dois domínios Src-homology 3 (SH3) e um SH2 (LOWENSTEIN et al., 1993; SKOLNIK et al., 1993a). A GRB2 está constitutivamente ligada a uma região rica em prolina da proteína “Son of Sevenless” (SOS), uma permutadora GDP/GTP para RAS. Uma vez ativada, GRB2 direciona a relocação de SOS à membrana, desta forma permitindo a ativação de RAS. A proteína RAS ligada ao GTP inicia eventos em cascata da via da MAPK (mitogen-activated protein kinases) (CATTANEO & PELICCI, 1998). Esta proteína portanto desempenha um papel fundamental direcionando a via de sinalização da insulina para funções controladoras do crescimento e diferenciação celular. Ela age como uma molécula adaptadora que, através do seu domínio SH2, liga receptores tirosino-fosforilados ou outras fosfoproteínas como a SHC e o IRS-1, ao fator intercambiador de nucleotídeos da guanina do RAS, SOS (SKOLNIK et al., 1993ab; PRUETT et al., 1995; CATTANEO & PELICCI, 1998). Esta capacidade da GRB2 de ligar-se ao SOS é resultado da presença dos domínios SH3 em sua molécula (LOWENSTEIN et al., 1993).

Estudos destinados a identificar a especificidade das proteínas efetoras ativadas pelas vias mitogênicas e/ou metabólicas, durante os processos de transmissão do sinal em células sensíveis à insulina (SASAKA et al., 1994b; LAZAR et al., 1995), sugerem que a interação SHC/GRB2/SOS desencadeia um estímulo mitogênico específico através da

ativação da via RAS/MAPK (ROZAKIS-ADCOCK et al., 1992; PAWSON, 1995; CATTANEO & PELICCI, 1998) e é fundamental no controle da proliferação e/ou transformação celular, assim como na ativação de certos mecanismos de crescimento celular (SASAKA et al., 1994ab; OWENS et al., 1994). Também foi proposto que a isoforma SHC p52 é capaz de se ligar ao PTEN (phosphatase and tensin homolog) assim inibindo o recrutamento da GRB2 e subsequente ativação via da MAP kinase, desta forma modulando vários aspectos da adesão e migração celular, apoptose e sobrevivência celular (DI CRISTOFANO & PANDOLFI, 2000).

Estudos prévios sugerem que o complexo SHC/GRB2/SOS ativa a p21ras diferentemente da associação IRS-1/GRB2/SOS, e que a homeostase no mecanismo de mitogênese produzido pela insulina depende de um balanço entre a associação IRS-1/GRB2/SOS e SHC/GRB2/SOS. Parece haver uma especificidade funcional da SHC em relação ao IRS-1, de tal modo que a função desta proteína na ativação das vias mitogênicas, quando associado ao complexo GRB2-SOS, parece ser importante, mas não fundamental, se comparada àquela da SHC (WATERS, YAMAGUCHI, PESSIN, 1993; ROSE et al., 1994).

A SHP2 é uma proteína com atividade fosfatase fosfotirosina-específica, (ECK et al., 1996; MATOSAKI & KASUGA, 1996; NEEL & TONKS, 1997) que é ativada por uma série de fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (brain-derived neurotrophic factor - BDNF), um membro da família das neurotrofinas (YAMADA et al., 1999), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o IGF-1R e a insulina (FENG et al., 1993; KAZLAUSKAS

et al., 1993; LECHLEIDER, FREEMAN, NELL, 1993; ROCCHI et al., 1996; ARAKI et al., 2000). Sua ativação ocorre em resposta ao estímulo de ligantes que induzem a fosforilação em tirosina nos receptores ou substratos destes. Esta ativação é dependente de mudanças conformacionais na estrutura da proteína (BARFORD & NEEL, 1998). Uma vez ativado, o SHP2 pode ligar-se através de seu domínio SH2 ao GRB2, levando a ativação de RAS (BENNETT et al., 1994; LI et al., 1994; NOGUCHI et al., 1994). Estudos usando SHP2 fosfatase-inativada e células expressando SHP2 mutante sem o domínio fosfatase sugerem que as funções da SHP2 como um possível regulador da ativação da MAPK e proliferação em vários tipos de células mitogênicas (MILARSKI & SALTIEL, 1994; YAMAUCHI et al., 1995; ZHAO et al., 1995; SHI et al., 1998).

Assim sendo, a ação insulínica envolve uma cascata de interações covalentes e não covalentes centralizadas num primeiro nível, nos IRSs e na SHC. A ligação da insulina ao seu receptor na superfície celular, determina a fosforilação da SHC e dos IRSs. Estes então atuam como proteínas ancoradouros para várias enzimas intracelulares e adaptadores moleculares. Tais ligações determinam múltiplos sinais na cascata da ação insulínica. Como resultado, a SHC constitui-se em elemento importante das vias intracelulares de ação insulínica, cujas ligações determinam a multiplicidade dos efeitos biológicos finais deste hormônio.

Estudos recentes sugerem que a insulina pode agir como um sinalizador metabólico aferente para o Sistema Nervoso Central (SNC). Resistências iniciais em se aceitar tal conceito se deve ao fato das células neuronais não dependerem da insulina para a captação de glicose. Com a descrição da presença de insulina no cérebro (HAVRANKOVA et al.,

1978a) sugeriu-se que esta era produzida no próprio SNC (HAVRANKOVA et al., 1978a), entretanto, a presença do hormônio no líquido cefalo-raquidiano em concentrações proporcionais a dos níveis do plasma circulante (WOODS & PORTER Jr, 1978) e a inexistência de transcritos de insulina em qualquer região do cérebro provam que toda insulina detectada no SNC era produzida pelas células β -pancreáticas, e que esta atravessava a barreira hemato-encefálica (BHE) através de um sistema de transporte especializado (PARDRIGE, 1986; BAURA et al., 1993). A alta densidade de receptores da insulina no plexo coróide, sugere que o mesmo esteja envolvido no transporte da glicose através da BHE (ZHAO et al., 1999).

Várias funções para a insulina no SNC têm sido sugeridas, como efeito pleotrópico no fluxo de íons (PORTE JR et al., 1998); ações no crescimento, sobrevivência e regulação de genes envolvidos na diferenciação celular (BOTHWELL, 1982; NAKAMURA, SHITARA, TAKAKURA, 1988; COKER et al., 1990), captação e liberação de neurotransmissores (PEINADO & MEYERES, 1991), o metabolismo das células neuronais e da glia (NAKAMURA et al., 1988), nas sinapses do SNC, através do seu receptor (ABBOTT, WELLES, FALLON, 1999); e regulação central da função autonômica, da termogênese, do controle do apetite e consequentemente do peso corporal (SCHWARTZ et al., 1992; PORTE JR et al., 1998; SCHWARTZ et al., 2000).

O impacto do diabetes mellitus no SNC tem sido demonstrado baseado em alterações neuroquímicas, eletrofisiológicas, estruturais e comportamentais (MOORADIAN, 1988; POZZESSERE et al., 1991; MCCALL, 1992; BIESSELS et al., 1994; KERN et al., 1994; BUSIGUINA et al., 1996; OTT et al., 1996; USIGUINA et al.,

1996; LEIBSON et al., 1997; STRACHAN & DEARY, 1997; PORTE JR et al., 1998). Estudos de neuropsicologia têm evidenciado deficiências nas funções cognitivas, em particular no aprendizado e memória e em processos de informações complexas (TUN et al., 1990; BIESSELS et al., 1999). Estudos neuroradiológicos demonstram discreta atrofia cerebral e um aumento de ocorrência de lesões corticais e subcorticais (DEJGAARD et al., 1991; ARAKI et al., 1994; BIESSELS et al., 1999). Estudos neurofisiológicos no SNC de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina demonstram um comprometimento da neurotransmissão expresso pela lentificação e redução de potenciais de evocação visual (VEPs) e potenciais de evocação auditivo (BAEPs) além do potencial de evocação somatosensorial (Di MARIO et al., 1995). Alterações neurofisiológicas também foram descritas no SNC de ratos diabéticos (CARSTEN, WHALEN, ISHI, 1989; RUBINI et al., 1992). Em estudo recente BIESSELS e colaboradores (1999), observaram que após 2 a 3 meses de diabetes induzido por STZ observa-se uma redução das VEPs e BAEPs indicando comprometimento vias neurosensoriais centrais. Tal comprometimento é tardio se comparado à lesão desencadeada em Sistema Nervoso Periférico (BIESSELS et al., 1999).

Alguns estudos têm demonstrado uma associação entre resistência à insulina e diabetes com a doença de Alzheimer, e também com a perda da memória devido à senilidade (KILANDER et al., 1993; BRETELER et al., 1996; OTT et al., 1996; LEIBSON et al., 1997; KU et al., 1997; HOYER, 1998; WICKELGEN, 1998). Estudos recentes demonstraram que a interação insulina/IR tem sido reconhecida como importante e possivelmente desempenhe papel na patogênese de desordens neuro-degenerativas. Na

doença de Parkinson foi observada, através de técnicas de imunohistoquímica, perda neuronal seletiva na substância negra acompanhando a diminuição da imunoreatividade para o IR (MOROO et al., 1994; TAKAHASHI et al., 1996).

Zhao e colaboradores em estudo recente sugerem que o IR pode participar do processo da memorização através da ativação do seu receptor tirosina quinase, possivelmente via SHC/GRB2/RAS/MAPK (ZHAO et al., 1999).

Os receptores da insulina, do IGF-1 e de outros fatores de crescimento são expressos em alta concentração no SNC de mamíferos adultos e em desenvolvimento (POSNER et al., 1974; HAVRANKOVA et al., 1978b; VAN HOUTEN et al., 1980; HILL et al., 1986; BOHANNON et al., 1988; LESNIAK et al., 1988; OCRANT et al., 1988; UNGER et al., 1989; MOSS et al., 1990; UNGER et al., 1991 ab; FOLLI et al., 1994; SHERRARD et al., 1997). A ligação da insulina é relativamente alta em membranas cerebrais fetais (KAPPY & RAIZADA, 1982) e pode permanecer alta por 2 semanas após o nascimento na maioria das regiões cerebrais, incluindo córtex cerebral e áreas subcorticais. Igualmente, a concentração do mRNA do receptor de insulina, no SNC do rato, é máxima ao nascer e declina a níveis mínimos no cérebro adulto (BARON-VAN EVERCOOREN et al., 1991).

O substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), o principal substrato do receptor de insulina, é expresso em diversas áreas do SNC, embora se discuta se sua localização coincide (BASKIN et al., 1994) ou não com a distribuição dos receptores de insulina ou de IGF-1 (FOLLI et al., 1994). Também a enzima PI3-quinase, está presente em várias áreas do SNC (FOLLI et al., 1994). SHC, GRB2 (O'BRYAN et al., 1996 a b; PELICCI et al.,

1996; CONTI et al., 1997) e SHP2 (SUSUKI et al., 1995, ARAKI et al., 2000), moléculas sinalizadoras intracelulares envolvidas nos sinais mitogênicos iniciados pela insulina, juntamente com outros fatores de crescimento e várias citocinas, também estão presentes no SNC.

Desta forma, a completa caracterização das vias de sinalização da insulina no SNC, bem como dos efeitos tróficos e metabólicos deste hormônio no cérebro vêm contribuindo para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos das lesões do SNC observadas em pacientes ou modelos animais de diabetes mellitus e de outras patologias degenerativas que parecem ser, ao menos em parte, conseqüentes de desarranjos da sinalização da insulina.



2. Objetivos

1. Investigar a presença de IR, SHC e GRB2 em córtex cerebral e cerebelar de ratos.
2. Avaliar a modulação idade-dependente da expressão e funcionalidade de IR, SHC e GRB2 em córtex cerebral e cerebelar de ratos.
3. Avaliar a ação da insulina sobre a funcionalidade de IR, SHC e GRB2 em córtex cerebral e cerebelar de ratos.



3. Material e Métodos

3.1. ANIMAIS

Em todos os experimentos foram utilizados fragmentos de cérebro e cerebelo de ratos (*Rattus norvegicus*, variedade albina), da linhagem Wistar-Hannover, machos. Os animais foram estudados em 6 diferentes idades: 1 dia, 7 dias, 21 dias, 6 semanas, 16 semanas e 60 semanas, e foram fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, Campinas SP.

Ratos de 1 dia e 7 dias eram desmamados na véspera dos experimentos e deixados em jejum de 12 horas. Os demais, após o desmame aos 21 dias eram alimentados com ração padronizada para roedores Labina, marca Purina, que contém 0,3 a 0,5g de sódio/100g de ração (85% do sódio na forma de Cloreto) e 0,75g de potássio/100g de ração, quantidade superior ao nível mínimo de 0,05g recomendado para que ocorram o crescimento e reprodução dos animais, e água à vontade (REEVES et al., 1993).

Uma semana antes de qualquer experimento os animais de 6 semanas, 16 semanas e 60 semanas eram acomodados em gaiolas plásticas, contendo no máximo seis animais cada, e mantidos em condições de fotoperíodo (12hs x 12hs) com ração e água fornecidos *ad libitum*. A alimentação foi suspensa por 12 a 14 horas antes da coleta do material a ser analisado.

3.2. MATERIAIS

Os reagentes e aparelhos utilizados para a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e imunoblotting foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA). A hidroximetilamina metano (TRIS), o fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), a aprotinina e o ditioneitol (DTT) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). O agente anestésico Amobarbital sódico e a insulina humana (Humulin R) utilizados foram fornecidos pelo Laboratório Lilly. O 125 Iodo (proteína A) foi fornecido pela Amersham (Amersham, UK). A Proteína A sepharose 6MB foi da Pharmacia (Uppsala, Suécia). A membrana de nitrocelulose (BA85-0.2um) foi da Schleicher & Schuell (Keene, NH).

Os anticorpos monoclonais antifosfotirosina foram adquiridos da UBI (Lake Placid, NY) e os policlonais, anti-receptor de insulina (anti-IR), anti-SHC, anti IGF-R, anti-Grb-2 e anti-SHP2 utilizados foram adquiridos da Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA).

Soluções Utilizadas nos experimentos:

3.2.1. 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.

3.2.2. 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%.

3.2.3. 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%.

3.2.4. 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.

3.2.5. 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.

3.2.6. 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.

3.2.7. Solução Basal:

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

3.2.8. Solução bloqueadora:

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

3.2.9. 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 4^o C. O ortovanadato, PMSF e a aprotinina devem ser acrescentados no momento do uso.

3.2.10. Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado:

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

3.2.11. Solução para anticorpos:

Solução contendo os anticorpos específicos que marcam as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 0,3% de leite em pó desnatado ou BSA e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal. Os anticorpos utilizados foram os seguintes, nas diluições indicadas: anticorpo antifosfotirosina, diluído 1:200 (V/V); os demais anticorpos, diluídos cada um 1:100 (V/V).

3.2.12. 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 ou BSA, dissolvido em solução basal, com 2 μCi de proteína A I^{125} ($30\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), fornecida pela Amersham.

3.2.13. Solução de incubação para *strip* de anticorpos de membranas de nitrocelulose:

Contém 10mM de Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 M de β mercaptoetanol, 8M de uréia, 0,1mg/ml de soro albumina bovina.

3.2.14. Solução de neutralização para *strip* de anticorpos de membrana de nitrocelulose:

Contém 1 M de Tris-HCl (pH 7,5).

3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1. Extração das proteínas teciduais

Em todos os procedimentos os animais experimentais foram anestesiados com 15 mg/Kg de peso corpóreo de amobarbital sódico. Os experimentos eram iniciados após a perda dos reflexos corneano e pedioso. Os animais eram então submetidos a laparotomia mediana e NaCl (0,18 M) (controle) ou insulina eram injetados em bolo na veia cava inferior. A dose de insulina variou de 0,06 μ g a 60 μ g nos experimentos de dose resposta. Após estabelecimento da dose ideal passou-se a trabalhar somente com a dose de 60 μ g. A insulina era diluída em NaCl na concentração de 120 μ g/ml. Nos animais com diferentes idades utilizou-se sempre a dose de 500 μ g/Kg de peso, a qual se aproxima da dose ideal encontrada para adultos.

Fragmentos de aproximadamente 2 g de córtex cerebelar ou da região frontal do córtex cerebral eram retirados 3 minutos após o tratamento com NaCl ou insulina, ou no tempo determinado durante experimentos de tempo resposta.

O material extraído foi imediatamente submetido à homogeneização por 30 segundos com processador do tipo politron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments modelo PT 10/35), operado em velocidade máxima, em 4 ml da solução tampão A para extração, mantida em banho-maria a 100°C. Após a homogeneização o material permanecia

em banho-maria por mais 10 minutos com a finalidade de desnaturar completamente as fosfatases que poderiam desfosforilar o receptor de insulina e seus substratos.

O material era centrifugado a 15000 rpm a 4°C por 40 minutos em centrífuga refrigerada tipo Beckmanm 70 Ti para remoção do material insolúvel, e o sobrenadante era então utilizado como amostra.

3.3.2. Immunoblotting

Uma pequena parte do sobrenadante foi utilizada para determinação da quantidade de proteínas (BRADFORD, 1976) por método colorimétrico, e outra preparada para aplicação no gel, com a adição do tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) contendo 100 mM de DTT, e então fervidas a 100°C por 5 minutos em banho-maria. Alíquotas deste último contendo quantidades padronizadas de proteínas (200 μ g) foram aplicadas no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 8% Tris acrilamida), em um aparelho de minigel da Bio-Rad (Mini-Protean), banhados pelo tampão de corrida.

Em cada gel sempre se aplicou uma amostra de marcador padrão de proteínas com pesos moleculares conhecidos, assim estabelecidos: marcador de alto peso: miosina (205 kDa), beta galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (80 kDa) e ovalbumina (49kDa) ou marcador de baixo peso: fosfolipase B (101 kDa), soroalbumina bovina (83 kDa), ovalbumina (50,6 kDa), anidrase carbônica (35,5 kDa), inibidor da tripsina de soja (28,6 kDa) e lisosima (20,9 kDa). Os géis recebiam voltagem constante de 30 volts por 1

hora, e a seguir a 100 volts por aproximadamente 2 horas para que ocorresse a separação adequada das proteínas. Após o término da separação as proteínas eram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em voltagem constante de 120 volts por 2 horas no aparelho de transferência miniatura da Bio-Rad utilizando-se o tampão para transferência (TOWBIN, STAHLIN, GORDON, 1979), adicionando-se 0,02% de SDS para facilitar a eluição das proteínas de alto peso molecular.

A ligação inespecífica de anticorpos à membrana de nitrocelulose foi reduzida pela pré-incubação do filtro com a solução bloqueadora, por um período de 2 horas em temperatura ambiente ou 12 horas a 4°C. Em seguida as membranas eram incubadas com anticorpos antifosfotirosina, anti-receptor de insulina, anti-SHC anti-GRB2 ou anti SHP2 diluídos em solução para anticorpos por 4 horas à temperatura ambiente ou por 14 horas a 4°C, e então lavados 3 vezes com solução basal.

Após a lavagem a membrana de nitrocelulose era incubada com proteína A marcada com ¹²⁵Iodo por 2 horas à temperatura ambiente ou 12 horas a 4°C, e em seguida lavada novamente por 3 vezes com solução basal. A ligação do material radioativo à membrana foi detectada por auto-radiografia, utilizando-se exposição com filme tipo Kodak XAR e intensificador do tipo Cronex Lightning Plus, a - 80°C por períodos variáveis, de acordo com a necessidade.

A intensidade das bandas foi determinada através da densitometria das mesmas no filme revelado, realizada no programa Eagle Eye *scanner* para computador (Stratagene). Os resultados foram expressos como variação percentual em relação ao grupo controle (100%),

e nos permitiram avaliar os níveis protéicos e grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina, da proteína SHC, e a associação do SHC/IR e SHC/GRB2 e a quantidade de proteína do SHP2.

3.3.3. Imunoprecipitação

Fragments do córtex cerebral e cerebelar foram homogeneizados a 4°C, em solução tampão para extração B. Após a centrifugação por 45 minutos a 12000 rpm a 4°C, o volume das amostras foi normalizado por concentração protéica, tal como os extratos totais, e as mesmas foram incubados com anticorpos anti-IR, anti-SHC ou anti-GRB2 e permaneceram sob agitação contínua, a 4°C por 12 horas. Em seguida foram acrescentados 50 μ l de proteína A-Sepharose 6MB a cada amostra para precipitação dos complexos proteína/anticorpo específico, os quais foram mantidos em agitação contínua por mais duas horas. Após nova centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado por três vezes com a solução específica para lavagem, e a seguir foi acrescentado o Tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) contendo 100 mM de DDT, e fervidas a 100°C por 5 minutos em banho-maria. Após estas etapas o material foi submetido aos procedimentos habituais da eletroforese em SDS-PAGE 8% para os imunoprecipitados com anti-IR, aos quais foram aplicados marcadores de alto peso molecular, e em SDS-PAGE 10% para os imunoprecipitados com anti-SHC e anti-GRB2, aos quais foram aplicados marcadores de baixo peso molecular. Seguiu-se a transferência para membrana de nitrocelulose como

descrito anteriormente. As membranas foram submetidas ao blotting com anticorpos anti-fosfotirosina, para avaliar o nível de fosforilação do IR e da proteína SHC.

Para estudar associação de SHC com GRB2 foi realizado *strip* das membranas de nitrocelulose imunoprecipitadas com SHC, incubando-se as membranas com 15 ml de tampão para incubação para *strip* por 60 minutos a 60°C em banho-maria, a solução desprezada e a seguir estas membranas foram neutralizadas com o tampão de neutralização para *strip* por 30 minutos, à temperatura ambiente, em agitação contínua. A seguir esta solução foi também desprezada, e as membranas reequilibradas com solução basal, e então estas membranas foram submetidas a imunoblotting com anti-GRB2 para quantificar o grau de associação SHC/GRB2.

Para avaliar as quantidades de proteínas IR e SHC, foi realizado *strip* nas membranas em que haviam sido imunoprecipitados os anticorpos acima, e após o término do processo as membranas foram submetidas a imunoblotting com anticorpo anti-IR, e anti-SHC.

Para quantificação protéica do SHP2, foi realizado *strip* nas membranas de extrato total, e a seguir realizado *imunoblotting* com anticorpo anti-SHP2.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados possibilitando a análise dos grupos de forma concomitante. Para a análise dos efeitos da insulina em animais adultos utilizou-se teste t de *Student* para dados não pareados com significância de 5% ($p < 0,05$) e resultados expressos com a média +/- erro padrão de uma variação percentual com relação ao tratado com NaCl (0,18 M). Para a análise dos efeitos da idade utilizou-se ANOVA para dados multivariáveis com significância de 5% ($p < 0,05$) e resultados expressos como variação percentual do valor obtido para animais de 1 dia.



4. Resultados

4.1. Caracterização das proteínas envolvidas nas etapas iniciais da ação da insulina em sistema nervoso central de ratos.

4.1.1. Presença do receptor de insulina, SHC e GRB2 em tecidos cerebral e cerebelar de ratos. Inicialmente investigou-se a presença do receptor de insulina, de SHC e de GRB2 em córtex cerebral e em cerebelo de ratos. Tal investigação foi realizada através das técnicas de imunoprecipitação e imunoblotting com anticorpos específicos. Os três elementos investigados foram detectados em ambos os tecidos em níveis protéicos similares (Fig.1). O anticorpo anti-SHC utilizado apresentava reatividade cruzada contra as três isoformas conhecidas até então, p46^{SHCA}, p52^{SHCA} e p66^{SHCA}. Em experimentos iniciais, as medidas comparativas a marcadores moleculares padrão sugeriram que a forma predominante em sistema nervoso central fosse a p46^{SHCA}, entretanto, recentemente CATANEO & PELICCI (1998), utilizando anticorpos específicos para cada isoforma determinaram que durante a vida embrionária tanto p46^{SHCA} quanto p52^{SHCA} são expressas, e que após o nascimento a forma p52^{SHCA} é a predominante. Em análises realizadas com separação mais extensa por eletroforese em gel de poliacrilamida, e utilizando-se marcadores de massa molecular de baixo e alto peso em paralelo, observou-se definitivamente que a forma predominante observada tanto em córtex cerebral quanto em cerebelo era a p52^{SHCA}.

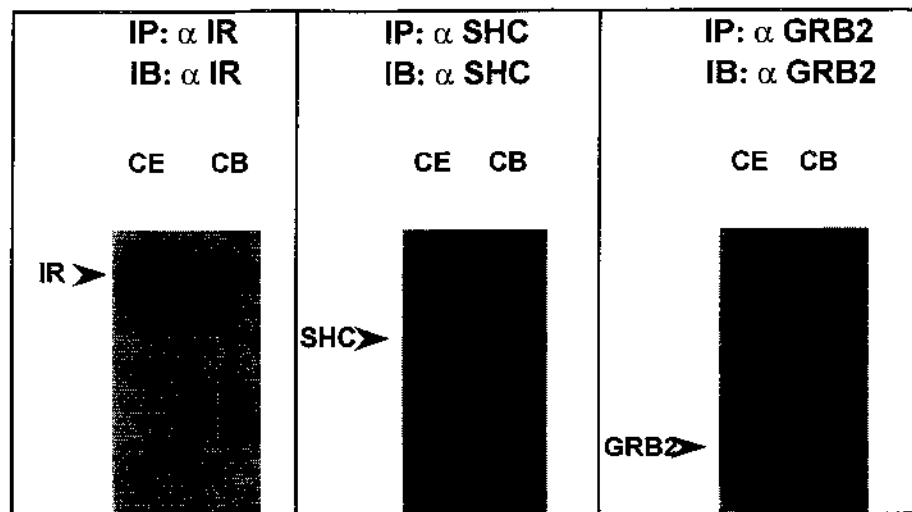


Figura 1. Presença de IR, SHC e GRB2 em córtex cerebelar e cerebral de ratos. Fragmentos de córtex cerebral (CE) e cerebelar (CB) foram retirados e homogeneizados em tampão B. Após centrifugação, alíquotas contendo 3,0 mg de proteína-total foram submetidas a imunoprecipitação (IP) com anticorpos anti-IR, anti-SHC ou anti-GRB2. Os imunoprecipitados foram então separados por SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e analisados por imunoblot com anti-IR, anti-SHC e anti-GRB2 respectivamente.

4.1.2. Efeito da insulina sobre a expressão do receptor de insulina em tecidos cerebral e cerebelar de ratos. Não foi detectada alteração induzida por insulina, no nível de expressão protéica do receptor de insulina, como determinado através do imunoblotting de membranas de nitrocelulose onde transferiram-se imunoprecipitados anti-receptor de insulina separados por eletroforese em gel de poliacrilamida. A ausência de modulação por insulina dos níveis de expressão do seu receptor foi determinada tanto em córtex cerebral (salina 100% +/- 4% vs insulina 82% +/- 14%) (Fig. 2 A) quanto em cerebelo (salina 100% +/- 4% vs insulina 102% +/- 10%) (Fig.2 B).

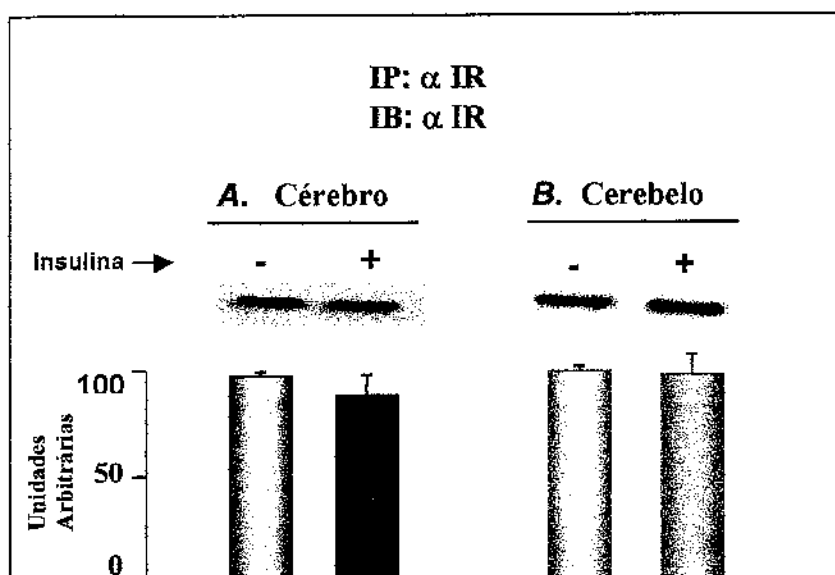


Figura 2. Efeito da insulina sobre a expressão de IR em córtex cerebral e cerebelar de ratos Fragmentos de córtex cerebral (CE) e cerebelar (CB) foram retirados e homogeneizados em tampão B. Após centrifugação, alíquotas contendo 3,0 mg de proteína-total foram submetidas à imunoprecipitação (IP) com anticorpos anti-IR ou anti-SHC. Os imunoprecipitados foram então separados por SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e analisados por imunoblot com anti-IR ou anti-SHC respectivamente.

4.1.3. Avaliação da fosforilação em tirosina do receptor de insulina e da proteína SHC em resposta a diferentes doses de insulina em tecidos cerebral e cerebelar de ratos. Com o objetivo de investigar o efeito de diferentes concentrações de insulina sobre os níveis de fosforilação do receptor de insulina e da proteína SHC, realizaram-se experimentos de dose resposta onde foram injetadas, na veia cava inferior, doses crescentes de insulina regular (0,06 a 60 μ g) diluídas em solução de NaCl (0,18 M). Amostras de tecido foram retiradas três minutos após o tratamento. Serviram como controle animais onde similar volume de NaCl (0,18 M) foi injetado e fragmentos de tecidos retirados após três minutos. Os resultados obtidos revelaram que as doses de insulina utilizadas não promovem incremento significativo no grau de fosforilação do receptor de insulina ou da proteína SHC em córtex cerebral. Por outro lado, significativa resposta traduzida por fosforilação em

tirosina tanto do receptor de insulina quanto da proteína SHC foi detectada em cerebello de ratos, sendo que a fosforilação máxima ocorreu entre as doses de 6 μg e 60 μg (Fig. 3). Tal resultado em cerebello apresenta similaridades com os efeitos observados após o tratamento com insulina, quando se analisam tecidos que tradicionalmente são estudados como alvo da ação insulínica, quais sejam, fígado, músculo e rim.

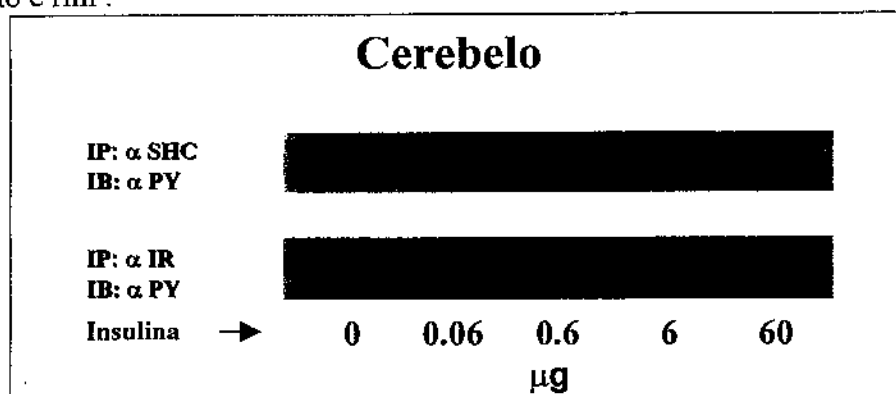


Figura 3. Dose-resposta da insulina sobre a fosforilação em tirosina de SHC e IR. Animais experimentais foram tratados com doses crescentes (0,06 a 60 μg) de insulina. Fragmentos de córtex cerebelar e cerebral foram homogeneizados e submetidos à imunoprecipitação com anticorpos anti-SHC ou anti-IR. Imunoprecipitados foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e avaliados por imunoblot utilizando-se anticorpos anti-SHC ou anti-IR. Nesta figura são apresentados somente os resultados obtidos em cerebello.

4.1.4. Determinação do tempo de fosforilação do receptor de insulina e SHC em resposta à insulina em tecidos cerebral e cerebelar de ratos. Com o objetivo de determinar o tempo no qual se detecta maior grau de fosforilação do receptor de insulina e da proteína SHC em resposta a uma dose ótima de insulina, realizaram-se experimentos, nos quais fragmentos de cérebro e cerebello foram retirados nos tempos 0, 30 segundos, 1, 2, 3, 5 e 10 minutos após o tratamento com insulina (60

μg) ou NaCl (0,18 M) (Fig. 4). Tais experimentos demonstraram inicialmente que em córtex cerebral, mesmo utilizando-se a dose ideal determinada para cerebelo, não se detectou elevação significativa do grau de fosforilação tanto do receptor de insulina quanto do substrato SHC em quaisquer dos tempos avaliados. Em cerebelo entretanto, detectou-se um aumento progressivo do grau de fosforilação tanto do receptor de insulina quanto de SHC, sendo que a resposta máxima para ambas as proteínas ocorreu entre 2 e 3 minutos, e que a fosforilação retornou a níveis basais após 10 minutos.

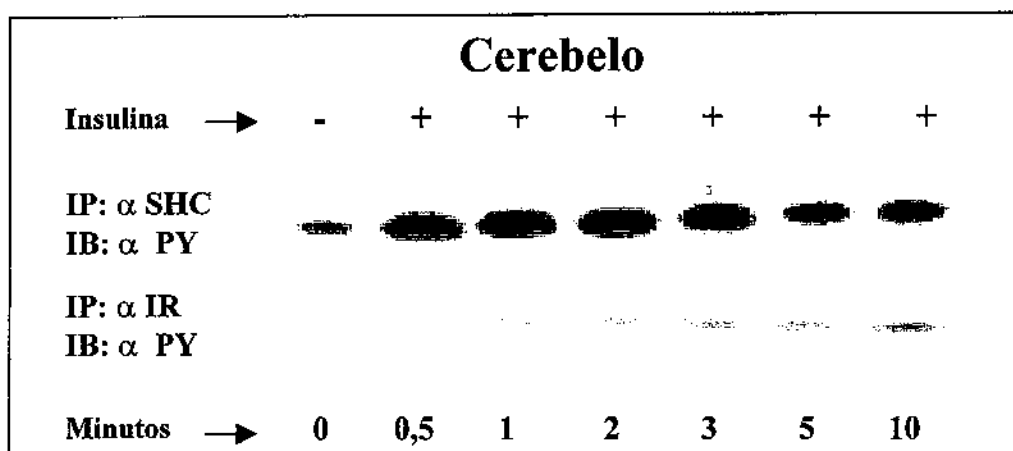


Figura 4. Tempo-resposta da insulina sobre a fosforilação em tirosina de SHC e IR. Animais experimentais foram tratados com dose de 60 μg de insulina. Fragmentos de córtex cerebelar e cerebral foram retirados nos tempos descritos e a seguir homogeneizados e submetidos à imunoprecipitação com anticorpos anti-SHC ou anti-IR. Os imunoprecipitados foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e avaliados com imunoblot utilizando-se anticorpos anti-PY. Nesta figura são apresentados somente os resultados obtidos em cerebelo.

4.1.5. Determinação do tempo de associação entre o receptor de insulina e SHC, e entre SHC e GRB2, em resposta à insulina, em tecidos cerebral e cerebelar de ratos. Estudos recentes demonstraram (PRONK et al., 1993; OKADA, YAMAUCHI, PESSIN, 1995) que o receptor de insulina, uma vez fosforilado em resposta ao ligante é capaz de se associar transitoriamente e fosforilar o substrato SHC. Homogeneizados de córtex cerebral ou cerebelo de ratos tratados por 3 minutos com 60 μ g de insulina ou de controles tratados com similar volume de NaCl (0,18 M) foram utilizados em experimentos de imunoprecipitação com anticorpos anti-receptor de insulina. Após resolução dos imunoprecipitados em gel de poliacrilamida e transferência para membrana de nitrocelulose, realizaram-se imunoblots com anticorpo anti-SHC e observou-se que em dose e tempo ideais a insulina é capaz de induzir um aumento na associação entre o seu receptor e o substrato SHC somente em cerebelo e não em cérebro de ratos. Quando se realizaram imunoprecipitações com anticorpo anti-SHC, de homogeneizados obtidos de ratos tratados com insulina ou NaCl (0,18 M) por diferentes tempos, e a seguir blotaram-se as membranas com anticorpo anti-receptor de insulina, determinou-se que entre 30 segundos e 5 minutos após a exposição à insulina, ocorria associação entre as proteínas avaliadas. Mais uma vez, somente em cerebelo tal associação era induzida por insulina (Fig. 5).

A proteína SHC, uma vez fosforilada pelo receptor de insulina é capaz de se associar à GRB2 (CATTANEO & PELICCI, 1998). Para determinar se tal associação ocorria nos tecidos estudados, membranas que continham proteínas

precipitadas com anticorpo anti-SHC foram submetidas a imunoblot com anticorpo anti-GRB2. Os resultados demonstraram que a associação entre SHC e GRB2 em cerebello ocorreu a partir de 30 segundos e foi máxima aos 2 minutos (Fig. 5). Avaliação similar realizada com imunoprecipitados anti-SHC obtidos a partir de homogeneizados de córtex cerebral demonstraram que a insulina é incapaz de induzir a associação entre SHC e GRB2 neste tecido nos tempos e doses avaliados.

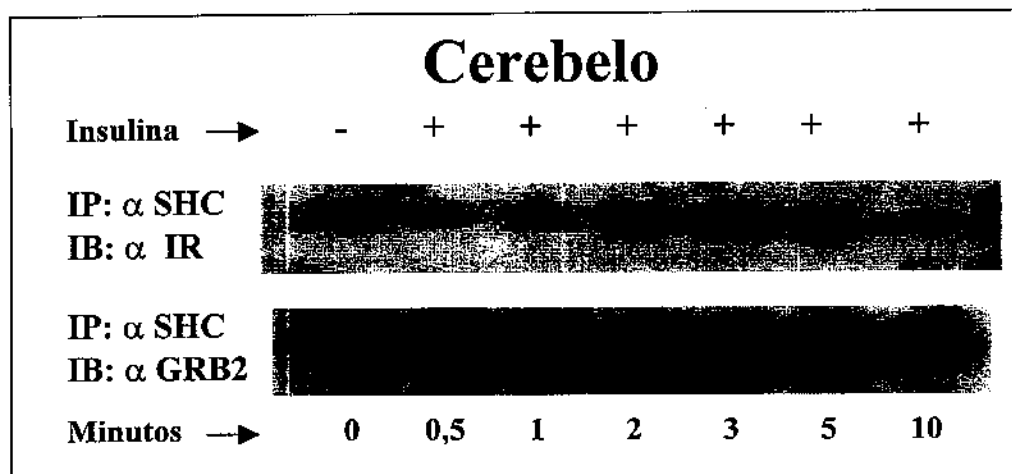


Figura 5. Tempo-resposta da insulina sobre a associação SHC/IR e SHC/GRB2. Animais experimentais foram tratados com dose de 60 µg de insulina. Fragmentos de córtex cerebelar e cerebral foram retirados nos tempos descritos e a seguir homogeneizados e submetidos à imunoprecipitação com anticorpos anti-SHC. Os imunoprecipitados foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e avaliados com imunoblot utilizando-se anticorpos anti-IR ou anti-GRB2. Nesta figura são apresentados somente os resultados obtidos em cerebello.

4.1.6. Efeitos de doses e tempos ideais de tratamento com insulina sobre a fosforilação em tirosina de IR. Quando animais experimentais foram tratados com 60 μ g de insulina por 3 minutos detectou-se aumento de 71% $\pm$ 13% ($p < 0,005$) na fosforilação do IR em cerebello, entretanto, similar tratamento foi ineficaz em produzir aumento na fosforilação de IR em córtex cerebral (Fig. 6).

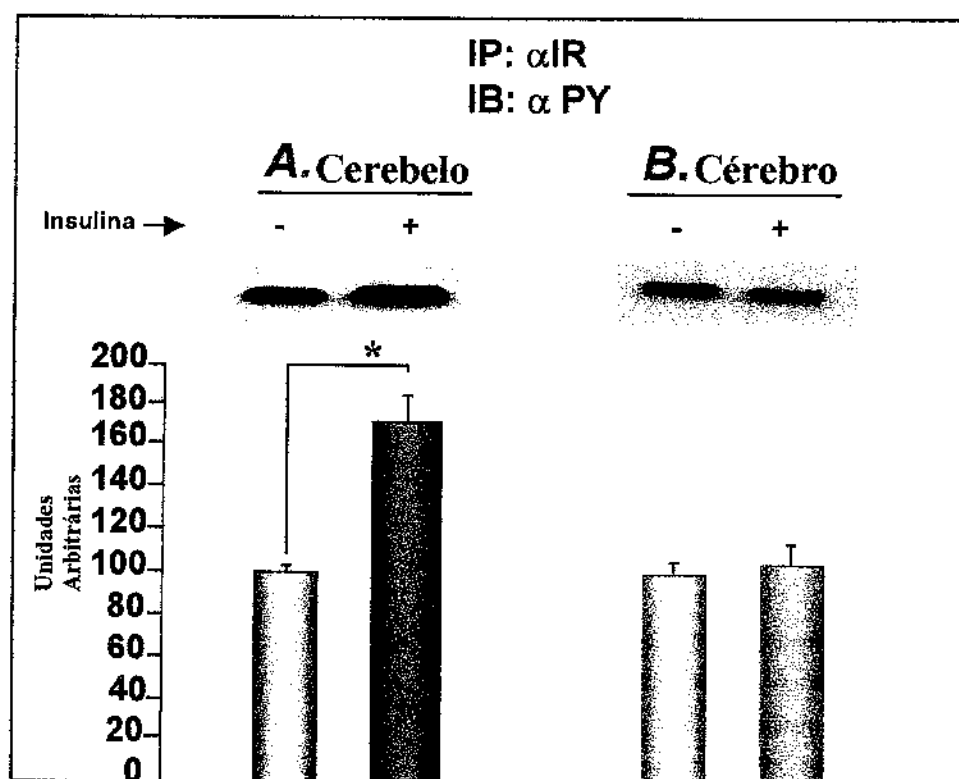


Figura 6. Efeito do tratamento agudo da insulina sobre a fosforilação do IR em cerebello (A) e cérebro (B). Animais experimentais foram tratados com dose de 60 μ g de insulina. Fragmentos de córtex cerebelar e cerebral foram retirados após 3 minutos e a seguir homogeneizados e submetidos à imunoprecipitação com anticorpos anti-IR. Os imunoprecipitados foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e avaliados com blot utilizando-se anticorpos anti-PY ($n=17$, $*p<0,005$).

4.1.7. Efeitos de doses e tempos ideais de tratamento com insulina sobre a fosforilação em tirosina de SHC. Quando animais experimentais foram tratados com 60 μ g de insulina por 3 minutos detectou-se aumento de 53% $\pm$ 6,5% ($p < 0,001$) sobre o basal, na fosforilação de SHC em cerebello, e mais uma vez, similar tratamento foi ineficaz em produzir aumento na fosforilação de IR em córtex cerebral (Fig. 7).

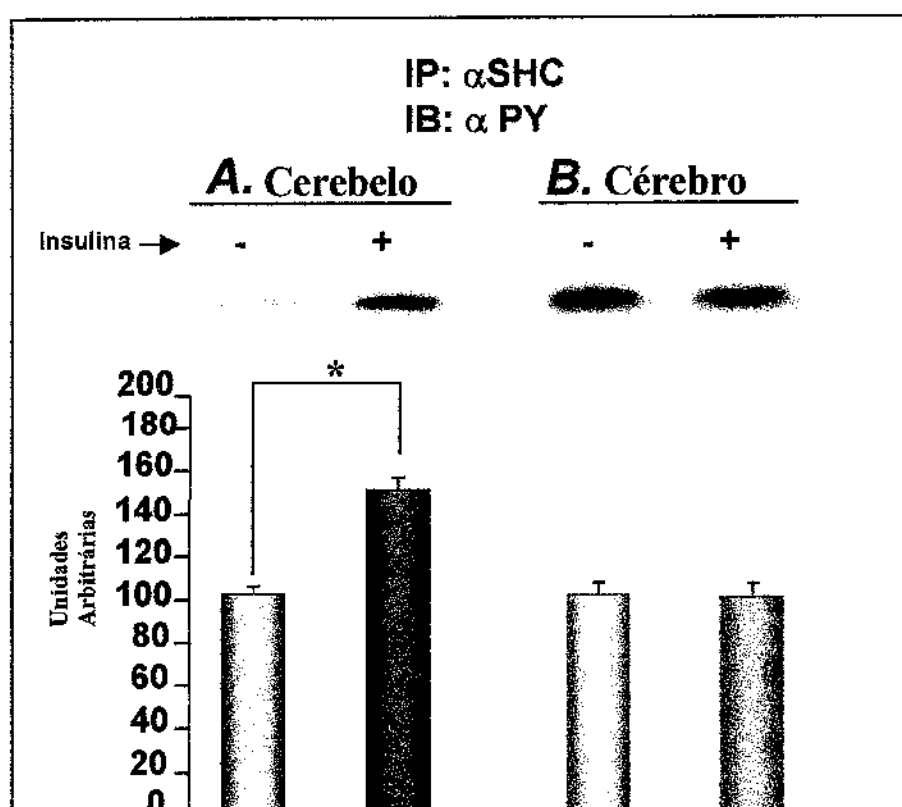


Figura 7. Efeito do tratamento agudo com insulina sobre a fosforilação de SHC em cerebello (A) e cérebro (B). Animais experimentais foram tratados com dose de 60 μ g de insulina. Fragmentos de córtex cerebelar e cerebral foram retirados após 3 minutos e a seguir homogeneizados e submetidos à imunoprecipitação com anticorpos anti-SHC. Os imunoprecipitados foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e avaliados por imunoblot utilizando-se anticorpos anti-PY ($n=13$, $*p < 0,001$).

4.1.8. Efeitos de doses e tempos ideais de tratamento com insulina sobre a associação SHC/IR em cérebro e cerebelo. Quando animais experimentais foram submetidos a tratamento com 60 μg de insulina por 3 minutos ocorreu um aumento de 157% $\pm$ 26% ($p < 0,05$) na associação do SHC/IR em cerebelo, entretanto, tal tratamento foi ineficaz na indução da mesma associação em cérebro (Fig. 8).

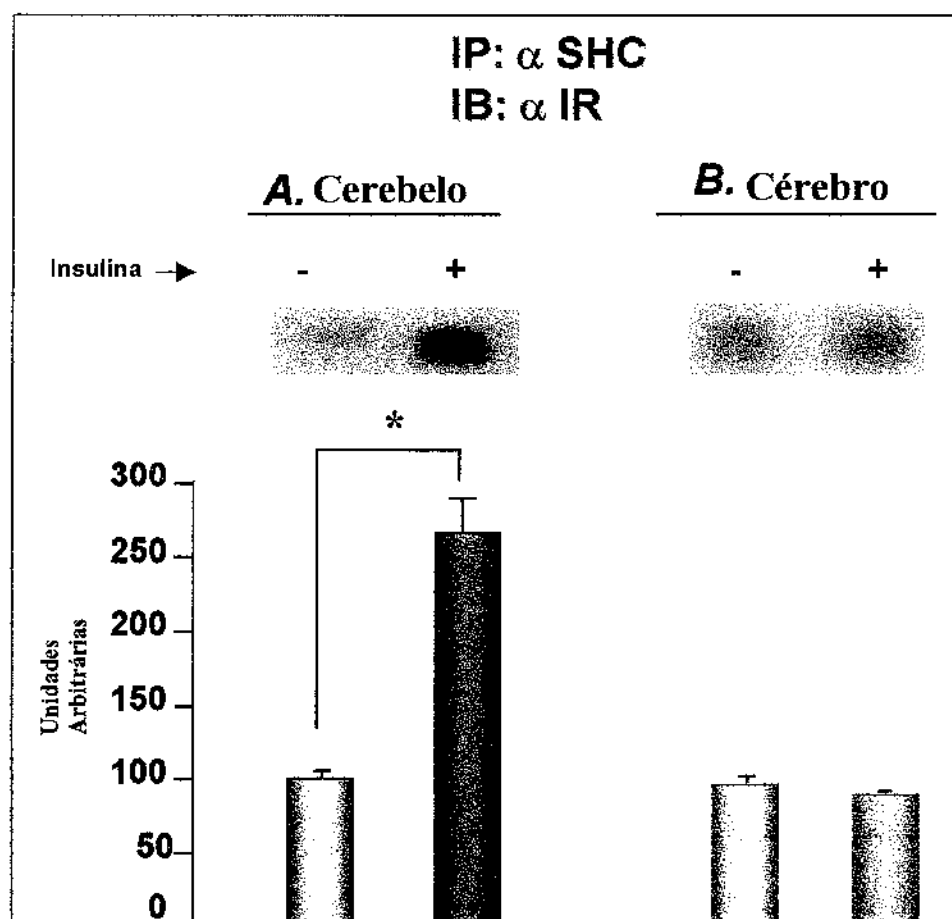


Figura 8. Efeito do tratamento agudo com insulina sobre a associação entre SHC e IR em cerebelo (A) e cérebro (B). Animais experimentais foram tratados com dose de 60 μg de insulina. Fragmentos de córtex cerebelar e cerebral foram retirados após 3 minutos e a seguir homogeneizados e submetidos à imunoprecipitação com anticorpos anti-SHC. Os imunoprecipitados foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e avaliados por imunoblot utilizando-se anticorpos anti-IR ($n=5$, $*p < 0,05$).

4.1.9. Efeitos de doses e tempos ideais de tratamento com insulina sobre a associação SHC/GRB em cérebro e cerebelo. Quando animais experimentais foram submetidos a tratamento com 60 µg de insulina por 3 minutos ocorreu um aumento de 52% +/- 1% (*p<0,005) na associação SHC/GRB2 em cerebelo; em cérebro não houve variação significativa (Fig. 9).

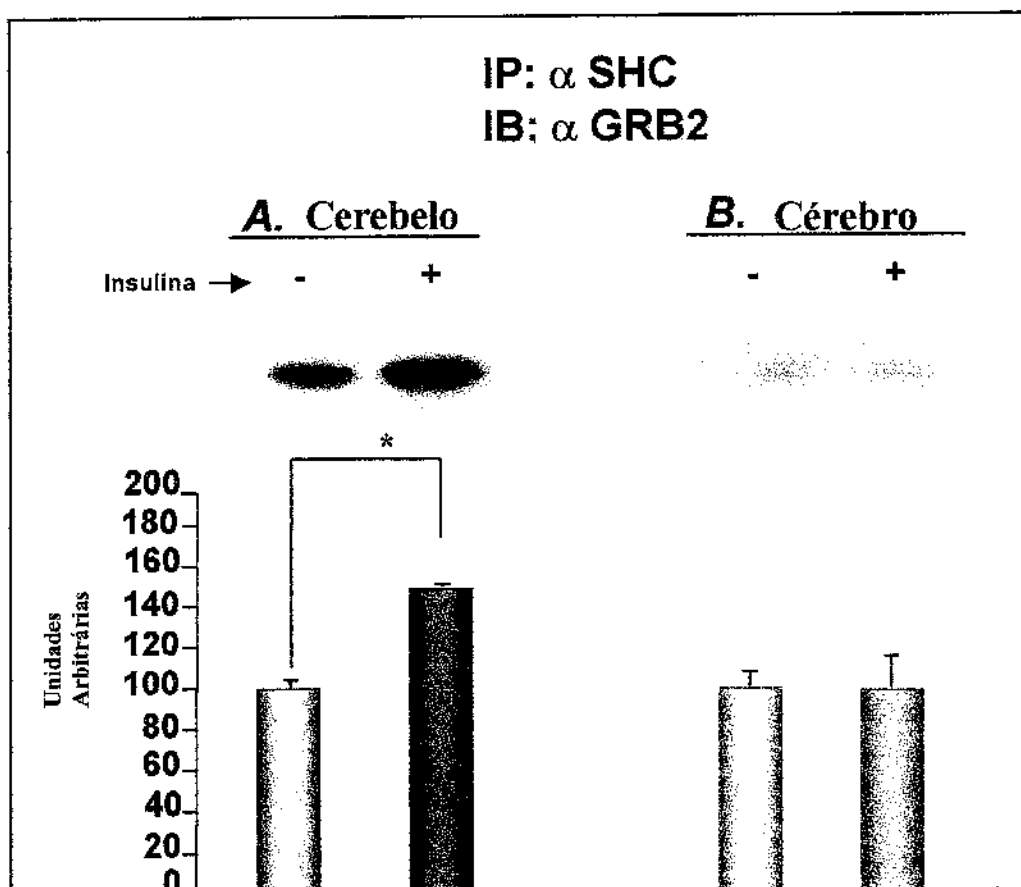


Figura 9. Efeito do tratamento agudo com insulina sobre a associação entre SHC e GRB2 em cerebelo (A) e cérebro (B). Animais experimentais foram tratados com dose de 60 µg de insulina. Fragmentos de córtex cerebelar e cerebral foram retirados após 3 minutos e a seguir homogeneizados e submetidos à imunoprecipitação com anticorpos anti-SHC. Os imunoprecipitados foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e avaliados por imunoblot utilizando-se anticorpos anti-GRB2 (n=12, *p<0,005).

4.2. Efeito da idade sobre a expressão e funcionalidade de elementos participantes da via de sinalização da insulina em córtex cerebral e cerebelo de ratos.

4.2.1. Efeito da idade na expressão do receptor de insulina e de SHC em córtex cerebral e cerebelo de ratos. Ao avaliar-se o nível de expressão protéica do receptor de insulina e de SHC em córtex cerebral e em cerebelo de ratos, desde o primeiro dia após o nascimento à pré-senilidade, observou-se que o receptor de insulina manteve níveis protéicos constantes durante todo o período em córtex cerebral (Fig. 10 A/C), enquanto que em cerebelo detectou-se tendência de aumento entre o primeiro e o sétimo dia após o nascimento (Fig. 10 B), com posterior estabilização até a sexagésima semana (Fig. 10 B/D). A variação observada em cerebelo entretanto, não apresentou diferença estatística. Similarmente, as concentrações protéicas de SHC não foram afetadas pela idade em ambos os tecidos estudados (Fig. 10).

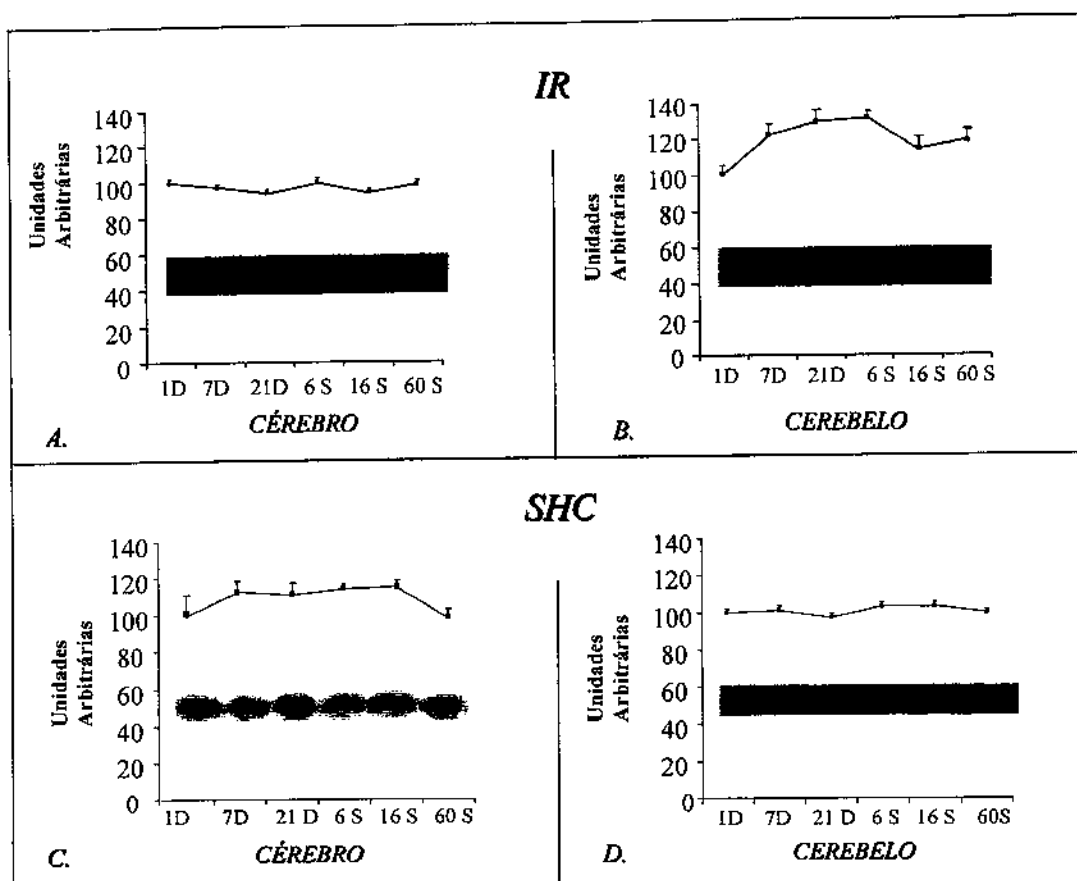


Figura 10. Expressão de IR e SHC mantêm-se constantes durante a vida. Fragmentos de córtex cerebral e cerebelar foram retirados e homogeneizados em tampão B. Após centrifugação, alíquotas contendo igual quantidade protéica foram submetidas a imunoprecipitação com anticorpos anti-IR e anti-SHC. Os imunoprecipitados foram então separados por SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e analisados por imunoblot com anti-IR e anti SHC respectivamente.

4.2.2. Efeito da idade no grau de fosforilação do receptor de insulina em córtex cerebral e cerebelo de ratos. Ao analisarem-se os imunoprecipitados de receptor de insulina obtidos a partir de fragmentos de córtex cerebral ou de cerebelo de ratos tratados com insulina (60µg) ou NaCl (0,18 M), por 3 minutos, observou-se que quando submetidos a imunoblot com anticorpo anti-fosfotirosina, o grau de

fosforilação em tirosina do receptor apresentou queda progressiva em ambos os tecidos estudados tanto quando os animais experimentais foram tratados com insulina como quando tratados com NaCl (Fig. 11 A/B). A variação maior ocorreu entre os dias 1 e 21 após o nascimento. A partir de então, a queda foi mais lenta e, apenas em cerebelo de animais tratados com NaCl, houve nova intensificação do ritmo de queda entre 16 e 60 semanas de vida.

Como não se detectou variação na quantidade protéica do receptor de insulina em ambos os tecidos durante o período analisado, a redução observada na fosforilação do receptor ocorreu devido à redução da incorporação de fósforo em tirosina por molécula, numa base estequiométrica.

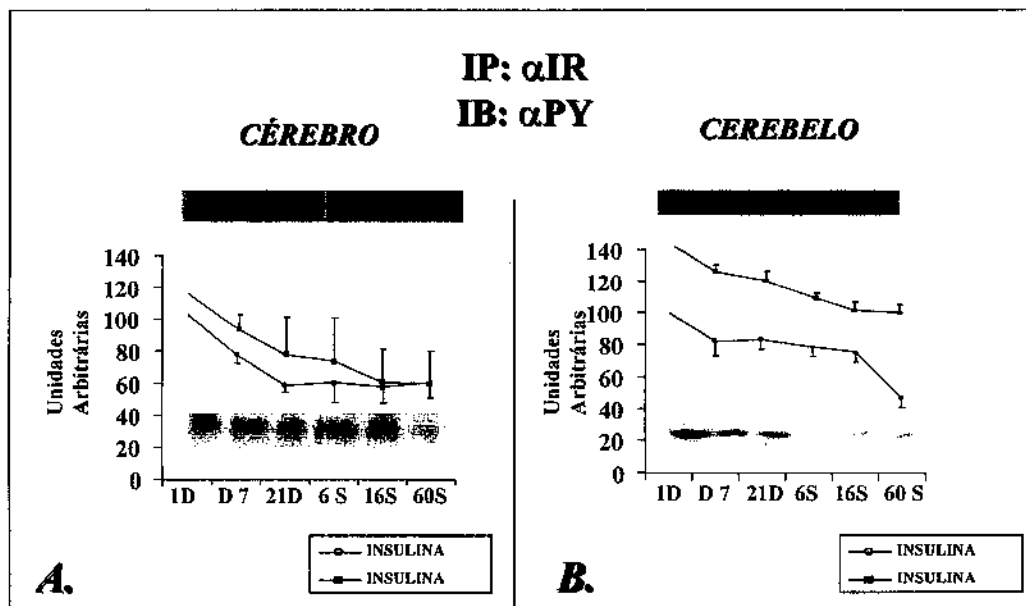


Figura 11. A fosforilação do IR decresce progressivamente durante a vida. Fragmentos de córtex cerebral e cerebelar foram retirados e homogeneizados. Após 3 minutos da injeção de insulina ou salina, alíquotas do sobrenadante com igual quantidade protéica foram submetidos à imunoprecipitação (IP) com anticorpos anti-IR. Os imunocomplexos foram coletados com proteína A-sefarose 6MB e separados por SDS-PAGE. As proteínas foram então transferidas para membrana de nitrocelulose e detectadas com anticorpo antifosfotirosina (PY), marcadas com proteína A- 125 I e então submetidos a autoradiografia (n=10, p<0,05).

4.2.3. Efeito da idade no grau de fosforilação de SHC e no grau de associação entre SHC e GRB2 em córtex cerebral e cerebelo de ratos. Imunoprecipitados de SHC obtidos a partir de fragmentos de córtex cerebral ou de cerebelo de ratos tratados por 3 minutos com 60 μ g de insulina ou com NaCl (0,18 M), e que subsequentemente foram submetidos a imunoblotting com anticorpo anti-fosfotirosina revelaram uma progressiva queda no grau de fosforilação em ambos os tecidos avaliados e em ambas as situações experimentais. Como pode ser observado nas figuras (Fig. 12 A/B) ocorreu um decréscimo significativo, progressivo e constante, que se detecta desde o primeiro dia de nascimento até a sexagésima semana de vida, sem que tivessem sido observadas maiores oscilações nas várias situações analisadas.

Similarmente ao que foi observado para o receptor de insulina, o decréscimo no grau de fosforilação de SHC ocorreu em razão de uma variação na incorporação de fósforo por molécula de SHC, e não em virtude de uma redução na concentração da proteína.

O grau de associação entre SHC e GRB2 induzida pela insulina, sofreu redução progressiva e significativa durante o período de vida analisado e em ambos os tecidos estudados (Fig. 12 C/D). A variação desde o nascimento até a sexagésima semana de vida seguiu o mesmo padrão observado para a fosforilação de SHC.

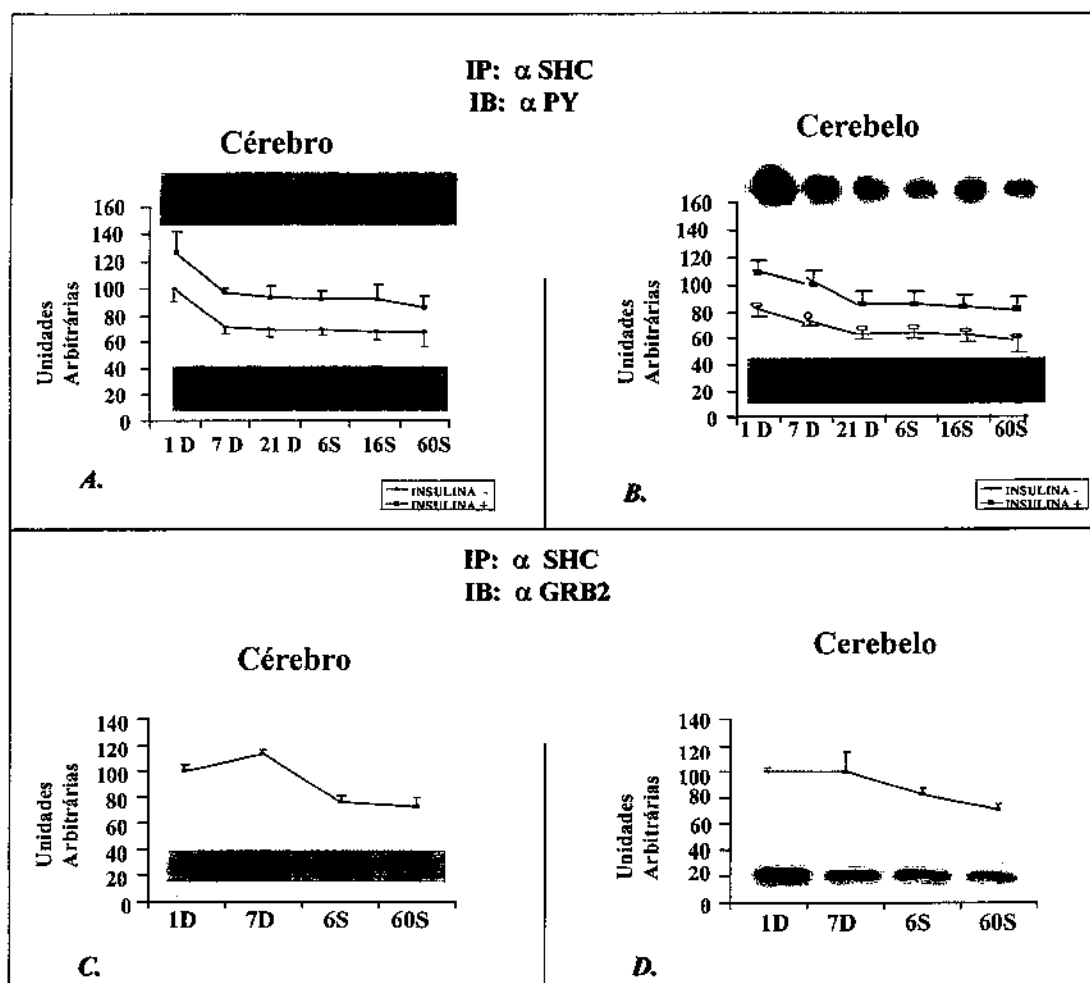


Figura 12. A fosforilação de SHC e a associação SHC/GRB2 decrescem progressivamente durante a vida. Fragmentos de córtex cerebral e cerebelar foram retirados e homogeneizados. Após 3 minutos da injeção de insulina ou salina, alíquotas do sobrenadante com igual quantidade protéica foram submetidos à imunoprecipitação (IP) com anticorpos anti-SHC. Os imunocomplexos foram coletados com proteína A-sefarose 6MB e separados por SDS-PAGE. As proteínas foram então transferidas para membrana de nitrocelulose e detectadas com anticorpo antifosfotirosina (PY) (A/B) ou anticorpo anti-GRB2 (C/D), marcadas com proteína A- 125 I e então submetidas a autoradiografia ($n=10$, $p<0,05$).

4.2.4. Efeito da idade sobre a expressão da proteína SHP2 em córtex cerebral e cerebelo de ratos. A enzima tirosina-fosfatase SHP2, além de exercer um papel adjuvante na transmissão intracelular do sinal da insulina e de outros mensageiros que utilizam receptores da família dos receptores-tirosina-quinase, desempenha um papel na modulação do sinal dos mesmos mensageiros. Como os níveis de fosforilação do receptor de insulina e de SHC diminuem progressivamente durante a vida tanto em córtex cerebral quanto em cerebelo de ratos, decidiu-se estudar o nível protéico de SHP2 em ambos os tecidos em questão, durante o mesmo período em que se realizou a avaliação dos demais elementos da via de sinalização da insulina.

Em ambos os tecidos avaliados os níveis de SHP2 caíram progressivamente, e de modo significativo desde o sétimo dia após o nascimento até 60 semanas de vida (Fig. 13). O aumento observado do primeiro ao sétimo dia não foi significativo.

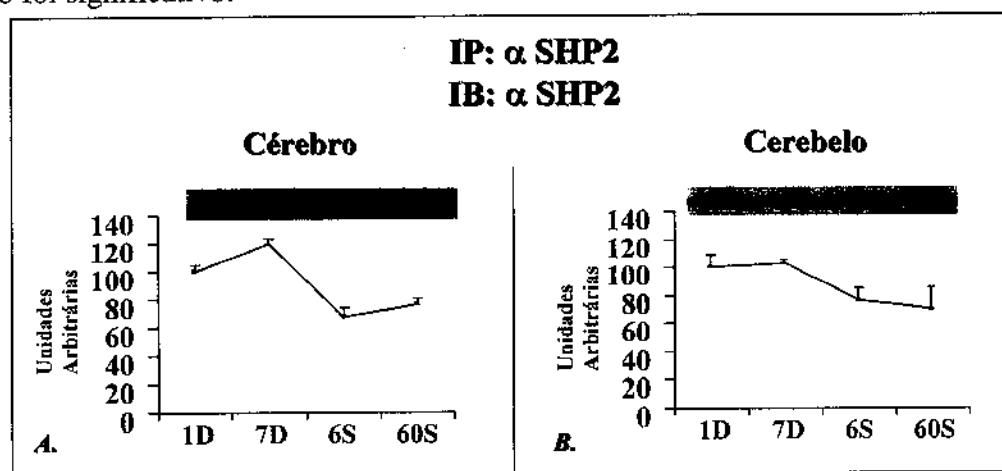


Figura 13. O nível protéico de SHP2 decresce durante a vida. Fragmentos de córtex cerebral e cerebelar foram retirados e homogeneizados. Aliquotas do sobrenadante com igual quantidade protéica foram submetidos à imunoprecipitação (IP) com anticorpos anti-SHP2 e então separados por SDS-PAGE. As proteínas foram então transferidas para membrana de nitrocelulose e detectadas com anticorpo-SHP2, marcadas com proteína A- 125 e então submetidos a autoradiografia (n=7, p<0,005).



5. Discussão

As ações da insulina em tecidos alvos são mediadas pelo receptor de insulina, uma molécula hetero-tetramérica, transmembrana, pertencente à família dos receptores de fatores de crescimento com atividade tirosina quinase intrínseca (FREYCHET et al, 1971; CUATRECASAS, 1972; KAHN, 1985; VIRKAMÄKI, UEKI, KAHN, 1999). Após a ligação da insulina à subunidade α do seu receptor, a atividade tirosina quinase da subunidade β é ativada. O substrato inicial do receptor de insulina é a própria subunidade β , que uma vez fosforilada passa a recrutar e fosforilar em tirosina, diversas proteínas citoplasmáticas denominadas substratos do receptor da insulina. Estes substratos são chamados de moléculas de acoplamento, por serem capazes de, uma vez fosforilados, ligarem-se a outras proteínas e assim deflagrar uma série de eventos intracelulares que culminarão com os efeitos finais da insulina em um determinado tecido (WHITE et al, 1985; PERROTI et al., 1987; MIRALPEIX et al., 1992; PELICCI et al., 1992; LAVAN & LIENHARD, 1993; OBERMEIER et al., 1993; PRONK et al., 1993; SEGATTO et al., 1993; SASAOKA et al., 1994a; GUSTAFSON et al., 1995; OKADA et al., 1995; SUN et al., 1995; ISAKOFF et al., 1996; SASAOKA et al., 1996; VIRKAMÄKI et al., 1999).

As principais moléculas de acoplamento da via de sinalização da insulina são o IRS-1, o IRS-2 e SHC (VIRKAMÄKI et al., 1999). Os IRSs são aparentemente especializados na transmissão do sinal da insulina, do IGF-1, e de alguns outros poucos hormônios que se mostraram capazes de ativar esta via (SAAD et al, 1995d; VELLOSO et al., 1996; THIRONE et al, 1997). A SHC, de maneira diferente, é capaz de ser fosforilada através de diversas vias de sinalização (OBERMEIER et al., 1993; SEGATTO et al., 1993; SASAOKA et al., 1994a). Também de modo diferente dos IRSs, que são capazes de se

ligar a diversas proteínas citoplasmáticas, a SHC, uma vez fosforilada é capaz de se ligar apenas ao complexo GRB2-SOS (CATTANEO & PELICCI, 1998). Ao ocorrer tal ligação, SOS é ativado e se liga à RAS, desta forma levando à ativação da via RAS/MAPK, que estimula o crescimento celular e a mitogênese (CATTANEO & PELICCI, 1998).

Sinalização e ação insulínicas têm sido amplamente estudadas em fígado, músculo e tecido adiposo, sítios de maior importância metabólica para o organismo, e onde se detectam alterações funcionais mais evidentes induzidas pelo hormônio pancreático (SAAD et al., 1992 ab, 1993, 1994ab, 1995abcd, 1996, 1997; VELLOSO et al., 1996). Como as células neuronais não dependem da insulina para a captação de glicose, investigadores sempre direcionaram seus estudos para os sítios tradicionais da ação da insulina. Durante muito tempo se supôs que a insulina não exercesse papel importante no metabolismo, crescimento ou desenvolvimento cerebral (CRONE, 1965). Entretanto, HAVRANKOVA e colaboradores (1978 ab) descreveram a presença da insulina e de receptores de insulina no cérebro e, desde então, um número crescente de estudos vêm sendo realizados com o objetivo de se avançar no conhecimento e caracterização das ações da insulina no SNC.

Atualmente sabe-se que o receptor de insulina está amplamente distribuído no cérebro, sendo as mais altas concentrações detectadas no hipotálamo (SCHWARTZ et al., 2000). Sabe-se ainda que o IRS-1 está presente no SNC, existindo entretanto controvérsias a respeito de sua co-localização (BASKIN et al., 1994) ou não com os receptores de insulina e de IGF-1 (FOLLI et al., 1994). Finalmente, sabe-se que SHC, GRB2, SHP2 e elementos da via de sinalização da MAP quinase também são expressos em várias regiões

cerebrais (POSNER et al., 1974; HAVRANKOVA et al., 1978 ab; FOLLI et al., 1994; SUSUKI et al., 1995; PELICCI et al., 1996; ARAKI et al., 2000).

No presente reconhece-se que toda insulina detectada no SNC atravessa a barreira hemato-encefálica através de um sistema de transporte especializado que inclui receptores de insulina presentes em capilares cerebrais (PARDRIGE, 1986; BAURA et al., 1993). Por outro lado, a insulina também pode atingir o SNC por difusão (ERMISCH et al., 1993; BEGLEY et al., 1994). As regiões circunventriculares do cérebro, por exemplo, são conhecidas por possuírem uma vascularização pouco restritiva e que, portanto permite a passagem de moléculas maiores, sem que estas sofram a característica seletividade encontrada em regiões onde a barreira hemato-encefálica está presente (VAN HOUTEN, 1980; BEGLEY et al., 1994).

Poucos estudos investigaram o tempo necessário para insulina plasmática chegar ao cérebro. Em experimentos com insulina marcada o nível do hormônio aumenta lenta e progressivamente no líquido céfalo-raquidiano (LCR), levando de 30 a 180 minutos para que se atinja o pico. Porém, a presença de insulina marcada já é detectada após 1 minuto em certas regiões do cérebro (ERMISCH et al., 1993). Estes fatos sugerem que a insulina circulante se localiza inicialmente no parênquima de certas regiões, e somente depois no LCR (SCHWARTZ et al., 1992; BAURA et al., 1993; BAURA et al., 1996; BANKS et al., 1997).

O transporte de insulina plasmática para o SNC apresenta características de restrição por saturação, o que favorece a hipótese de ser mediado principalmente pelo receptor de insulina, restando para a difusão um papel secundário.

Uma vez estabelecido que receptores de insulina e elementos envolvidos na mediação intracelular do sinal insulínico estão presentes em diversas regiões do SNC; que a insulina, produzida pelas células β das ilhotas pancreáticas atravessa a barreira hematoencefálica, seja através de transporte por receptores, seja através de difusão, se fez necessário, estabelecer os efeitos da insulina nas várias regiões do cérebro e os mecanismos moleculares envolvidos nestas ações.

CRANSTON e colaboradores (1988) demonstraram, que em pacientes diabéticos, o metabolismo da glicose era mais baixo no cerebelo do que em córtex cerebral, e que as constantes de captação e fosforilação da glicose eram inversas.

Existem diferenças regionais, na capacidade metabólica cerebral, que poderiam explicar as razões pelas quais o córtex cerebral é mais sensível a hipoglicemia em relação ao cerebelo. O metabolismo da glicose cerebral não é sensível às concentrações de insulina dentro dos limites fisiológicos. Isto sugere que os receptores de insulina intracerebrais e os receptores periféricos têm papéis diferentes entre si.

A maior parte dos estudos da ação da insulina no SNC foi realizada em ratos e em cultura de células neuronais (BASKIN et al, 1994; ANTONETTI et al., 1996; O'BRYAN et al., 1996 ab). Em neurônios (SCHWARTZ et al., 1992) e em células da glia (NAKAMURA et al., 1988) a insulina exerce efeitos primários de promoção do crescimento e modulação sináptica, enquanto a regulação do metabolismo da glicose é independente do hormônio pancreático (SCHWARTZ et al., 1992). Da mesma maneira, o transporte e oxidação da glicose, e também a síntese de glicogênio, não são alterados em neurônios de embrião de aves cultivados na ausência de insulina (HEIDENREICH, DE

VILLIS, GILMORE, 1988). Entretanto, as células da glia podem ser sensíveis à insulina, já que esta estimula a captação de glicose por aquelas células (CLARKE et al., 1984), e por células de glioblastoma humano (GRUNBERGER et al., 1986), além de promover o acúmulo de glicogênio em cultura primária de astroglia de cérebro de ratos recém natos.

No presente trabalho, analisou-se a presença e a ativação de proteínas envolvidas nas etapas iniciais da ação da insulina, numa via envolvida em crescimento celular e mitogênese, em córtex cerebelar e córtex cerebral de ratos.

Numa primeira etapa, determinaram-se diferenças regionais entre as áreas analisadas com relação à expressão protéica e capacidade de responder ao tratamento agudo com insulina. Na etapa seguinte, avaliou-se o efeito do tempo e do envelhecimento sobre a expressão e função destes elementos.

Iniciou-se a investigação pela determinação da presença do receptor da insulina, de SHC e de GRB2 em ambos os tecidos estudados. Não se encontraram diferenças significativas entre as quantidades de cada um dos elementos, quando se compararam córtex cerebral ou cerebelar. Observou-se entretanto, que apesar de presente em ambos os tecidos, a regulação funcional do IR, de SHC e de GRB2 ocorria de forma diferente em cada tecido, quando os animais experimentais eram expostos a tratamento com insulina. Desta forma, em cerebelo a insulina induziu uma rápida fosforilação do seu receptor, que foi imediatamente seguida pela fosforilação de SHC e, subsequente pela ligação entre SHC e GRB2. Os experimentos de tempo-resposta mostraram que, a associação entre o receptor de insulina e SHC se iniciava 30 segundos após a infusão de insulina e permanecia detectável por pelo menos 5 minutos. Tal associação induzia a imediata

fosforilação de SHC, a qual era máxima após 3 minutos, enquanto a associação SHC/GRB2 era máxima entre 2 e 3 minutos. Os experimentos de dose-resposta mostraram que os eventos funcionais foram desencadeados por concentrações fisiológicas de insulina.

Em contraste com os achados em cerebelo, não houve resposta à infusão de insulina em córtex cerebral. Em experimentos de tempo-resposta prolongados (maior que 20 minutos) ou com doses maiores de insulina (acima de 60 μ g), não houve aumento na fosforilação do receptor, na associação entre o receptor de insulina e SHC ou na associação entre SHC e GRB2. A possibilidade de que a concentração de insulina na região anterior do córtex seja menor, ou que se eleve de forma mais lenta do que em cerebelo, não pode ser descartada. Entretanto, pode-se concluir que, caso a insulina estimule a fosforilação do seu receptor em tecido cerebral, tal estímulo deve ocorrer em tempos ou doses diferentes daqueles testados nos presentes experimentos.

Os métodos utilizados, estimulação *in vivo* com insulina, extração e homogeneização de tecidos cerebral e cerebelar em condições desnaturantes ou em condições apropriadas para imunoprecipitação, e posterior imunoblotting com anticorpos específicos anti-receptor de insulina, anti-SHC, anti-GRB2 e anti-fosfotirosina, permitiram uma avaliação das etapas iniciais da ação insulínica, após sua ligação ao receptor. Estes métodos raramente sofrem interferências, como aquelas decorrentes de artefatos bioquímicos resultantes da homogeneização do tecido e purificação do receptor, proteólise e desfosforilação do receptor por fosfatases contaminantes (KATHURIA et al., 1986), bem como da remoção do receptor da membrana plasmática, onde interações com outros componentes celulares podem influenciar sua atividade (FEHLMAN et al., 1985). O método utilizado permitiu

uma determinação direta do grau de fosforilação do receptor de insulina, da proteína SHC e da sua associação com GRB2, assim como da relação destes parâmetros com o grau de fosforilação do receptor de insulina, o que implicou em uma avaliação da atividade quinase *in vivo* do receptor de insulina, dirigida a um substrato endógeno, a proteína SHC.

Ocorreu falha metodológica na mensuração da massa molecular da isoforma detectada de SHC em cérebro e cerebelo. O método de eletroforese, em gel de poliacrilamida–SDS empregado não permitiu, a princípio, que se determinasse com exatidão a massa molecular de SHC, sendo inicialmente sugestivo de se tratar da isoforma de 46 kDa. Na época das análises iniciais não se dispunha de anticorpos específicos para as diferentes isoformas. Após as determinações de CATTANEO & PELICCI (1998), e então utilizando-se separações mais longas em eletroforese, pudemos confirmar que a forma predominante de SHC, durante a vida pós-natal, em cérebro e cerebelo de ratos é p52^{SHCA}.

A seguir estudou-se o efeito da idade na expressão e ativação do receptor de insulina, de SHC e de GRB2 em cérebro e cerebelo. Para tal utilizaram-se ratos com 1 dia, 7 dias, 21 dias, 6 semanas, 16 semanas e 60 semanas de vida.

Alguns poucos estudos haviam avaliado em cérebro, as variações dos níveis de receptor de insulina com a idade. A maior parte destes estudos utilizou metodologia que avaliava a ligação de insulina marcada aos tecidos (ZAIA & PIANTANELLI, 1997; POMERANGE et al., 1988; ZAIA & PIANTANELLI, 2000) e não a quantificação protéica do receptor de insulina (GARAFOLO & ROSEN, 1989).

Ao analisarem-se os sítios de ligação da insulina, a maior parte dos autores detectou uma diminuição progressiva desde o nascimento até a senilidade (SONNTAG et al., 1999).

Entretanto KAPPY & RAIZADA (1982), trabalhando com membranas purificadas de cérebro de ratos não encontraram diferenças nos sítios de ligação da insulina entre fetos a termo e adultos. A análise de sítios de ligação do IGF-1 no cérebro segue o mesmo padrão, onde, em geral, encontrou-se uma diminuição no decorrer da vida (SONNTAG et al., 1999).

Na presente investigação, utilizando-se métodos imunológicos que permitem a avaliação quantitativa do receptor de insulina e do receptor de IGF-1 em cérebro e cerebelo de ratos, demonstrou-se que, entre 1 dia e 60 semanas de vida não ocorrem variações significativas nos níveis destas proteínas em qualquer dos sítios avaliados. Após uma extensa revisão da literatura, encontrou-se apenas um trabalho onde a expressão do receptor de insulina e do receptor de IGF-1 foi avaliada usando métodos imunológicos. Neste trabalho, GARAFOLLO & ROSEN (1989), empregando diversos anticorpos que apresentavam reação cruzada com a subunidade β do receptor de insulina e do receptor de IGF-1, descreveram uma progressiva queda na forma imunoreativa de ambos os receptores, desde a vida embrionária até a vida adulta. De modo diferente da metodologia empregada em nosso estudo, estes autores usaram anticorpos inespecíficos, realizaram imunoblots de extratos totais de cérebro, e basearam suas conclusões nas quantificações densitométricas de apenas 2 experimentos.

Com respeito à queda no número de sítios de ligação da insulina e do IGF-1 descrita na maioria dos estudos, acredita-se que tal metodologia se preste para uma avaliação dos sítios de ligação disponíveis na superfície da célula, o que pode ser afetado pela dinâmica dos fluxos de externalização e internalização dos receptores num determinado tecido.

Através dos métodos quantitativos empregados no presente estudo, definiu-se que após o primeiro dia de nascimento até a sexagésima semana de vida (senilidade incipiente), não ocorreu mudança significativa na expressão do receptor de insulina em córtex cerebral e cerebelar de ratos. De modo similar ao IR, não houve mudança significativa na expressão da proteína SHC em ambos os tecidos analisados.

Estudos recentes de CATTANEO & PELICCI (1998) e de CONTI e colaboradores (1997) descreveram uma maior expressão de SHC durante a vida embrionária, em comparação com a vida adulta. Entretanto, nenhuma avaliação da variação temporal foi realizada no decorrer da vida adulta.

Ao analisar-se o grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina e de SHC, e da associação entre SHC e GRB2, em córtex cerebral e cerebelar de ratos tratados com salina ou insulina, uma queda progressiva foi observada, desde o primeiro dia de nascimento até a sexagésima semana de vida, em todas as situações estudadas.

CARVALHO e colaboradores, (1996) estudando a fosforilação do receptor de insulina, do IRS-1 e do IRS-2, e a associação e ativação entre os IRSs e a enzima PI-3 quinase, em fígado e músculo de ratos idosos, observaram que nestes tecidos, após estímulo insulínico, ocorriam alterações tanto no grau de fosforilação como no grau de associação destas proteínas, sugerindo que estes eventos poderiam desempenhar um papel na resistência insulínica associada ao envelhecimento.

A regulação da atividade quinase por fosforilações em aminoácidos distintos, como em serina ou treonina, é um importante mecanismo regulador do sinal insulínico em situações fisiológicas e patológicas (KASUGA et al., 1982ab; SMITH et al., 1993;

MYERS & WHITE, 1995). Diversas enzimas com atividade quinase, como a proteína quinase-C (PKC) e a proteína quinase-A (PKA), podem fosforilar substratos em serina ou treonina, interferindo desta forma com a sua atividade (TAKAYAMA et al., 1984; TAKAYAMA, WHITE, KAHN, 1988; SMITH et al., 1993). ISHIZUKA e colaboradores (1993) demonstraram um aumento na quantidade de PKC em tecido adiposo de ratos idosos e, um aumento na atividade desta proteína quinase associada à membrana em tecido muscular. É possível que, o aumento da PKC descrito possa induzir fosforilação em serina do IR, dificultando a interação deste com o SHC ou com outros substratos e, desta forma, modular negativamente o sinal da insulina.

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

Ainda deve ser considerado, como possibilidade que explique a redução da fosforilação dos substratos do receptor de insulina em ratos idosos, a atividade de enzimas que desfosforilam estas proteínas, tais como as fosfotirosina-fosfatases (PTPases). NADIV e colaboradores (1994), demonstraram um aumento da atividade de PTPases em tecido hepático de ratos idosos, sugerindo ser este um possível mecanismo envolvido na redução do grau de fosforilação do IRS-1 e IRS-2 em tecido hepático de ratos senis.

A tirosina-fosfatase SHP2 é uma proteína citosólica, com expressão generalizada no organismo, e que, estruturalmente contém dois domínios SH2 que permitem sua interação com proteínas fosforiladas em tirosina. Sua expressão ocorre em níveis bastante elevados em cérebro (SUSUKI et al., 1995), sendo que, no rato adulto, a expressão é restrita a algumas classes de neurônios (SERVIDEI et al., 1998). Uma vez que se ligue a um resíduo tirosina em um receptor da família dos RTKs, a SHP2 é fosforilada em tirosina e, desta forma, torna-se ativada. A SHP2 pode então agir, promovendo desfosforilação de resíduos tirosina, modular ou potencializar a sinalização (NOGUCHI, et al., 1994; MILARSKI & SALTIEL, 1994; YAMAUCHI et al., 1995; SHI, LU, FENG, 1998). Esta atividade de desfosforilação ainda não foi demonstrada *in vivo*. Estudos recentes entretanto, sugerem que a SHP2 tem papel modulador positivo na transmissão do sinal insulínico (MILARSKI & SALTIEL, 1994; YAMAUCHI et al., 1995; SHI et al., 1998).

No presente estudo, avaliou-se a expressão protéica de SHP2 desde o primeiro dia de nascimento até a sexagésima semana de vida, em cérebro e cerebelo de ratos. Os resultados desta avaliação mostraram uma discreta tendência a aumento na quantidade de proteína entre o primeiro e o sétimo dia de vida, com posterior queda progressiva e significativa até a sexagésima semana.

Apesar de não se ter avaliado, no presente estudo, uma relação direta entre SHP2 e elementos da via de sinalização da insulina, o paralelismo encontrado entre uma progressiva queda nos níveis protéicos da fosfatase em ambos os tecidos analisados e uma diminuição da fosforilação basal e estimulada do IR e de SHC, e da associação

SHC/GRB2, sugere que esta queda contribua para a redução do sinal da insulina nestes tecidos, merecendo futura investigação.

Conclui-se portanto que IR, SHC, GRB2 e SHP2 estão presentes em córtex cerebral e cerebelar de ratos. IR, SHC e GRB2 não sofrem importante modulação na sua expressão protéica entre o nascimento e sessenta semanas de vida, ao passo que SHP2 apresenta queda significativa no período avaliado. Com respeito a resposta à insulina observou-se que, em cerebelo, o hormônio pancreático é capaz de induzir a fosforilação do IR e de SHC e a associação entre SHC e GRB2 em doses fisiológicas, entretanto o mesmo não ocorre em córtex cerebral. Finalmente, entre nascimento e sessenta semanas de idade, observa-se uma progressiva redução na fosforilação basal e insulino-induzida do IR, de SHC e na associação SHC/GRB2, tanto em córtex cerebral como cerebelar. Estes resultados reforçam a hipótese de que a insulina desempenha um papel relacionado a crescimento celular e mitogênese em SNC e, estimula futuros estudos que visem caracterizar os mecanismos e efeitos da ação insulínica em tecido nervoso.



6. Conclusões

O presente estudo investigou a presença e a regulação das proteínas envolvidas no sinal insulínico em córtex de cérebro e cerebelo de ratos.

1. Demonstrou-se a presença do receptor da insulina (IR), SHC, GRB2 e SHP2 em ambos os tecidos.

2. A insulina induziu aumento no grau de fosforilação do IR e de SHC em córtex cerebelar, mas não em córtex cerebral de ratos.

3. A insulina induziu aumento no grau de associação do IR ao SHC e de SHC ao GRB2 em córtex cerebelar, mas não em córtex cerebral.

4. A expressão do IR, SHC e GRB2 entre as idades de 1 dia e 60 semanas se mantiveram constantes em ambos os tecidos estudados.

5. A insulina induziu diminuição progressiva no grau de fosforilação do IR e de SHC e no grau de associação IR/SHC e SHC/GRB2 entre as idades de 1 dia e 60 semanas.

6. A expressão de SHP2 apresentou queda progressiva entre as idades de 1 dia e 60 semanas em ambos os tecidos.



7. Summary

Insulin, acting through its protein tyrosine kinase receptor (IR), induces a series of tissue-specific responses that are mediated by different intracellular pathways. One of these pathways, which promotes mitogenic and growth-related effects involve SHC and GRB2. In the present study insulin signaling was evaluated through the SHC/GRB2 pathway in the central nervous system (CNS) of rats.

Initially we determined the presence and amounts of IR, SHC and GRB2 in forebrain cortex and cerebellum. All three proteins were found at similar concentrations in both tissues. However, when the experimental animals were submitted to treatment with insulin we found significant increase in IR and SHC phosphorylation and SHC/GRB2 association only in cerebellum, but not in forebrain cortex.

Next we determined the IR, SHC, GRB2 and SHP2 concentrations during postnatal development. Concerning protein expression, only SHP2 was shown to suffer a progressive fall from day one to week sixty of life. When acutely treating with insulin, we observed a progressive, time-dependent decrease on both basal and insulin-stimulated phosphorylation of IR and SHC and SCH/GRB2 association in forebrain cortex and cerebellum.

We conclude that, the elements involved in the intracellular pathway of insulin signaling are present in the CNS, their functional status suffer variation with age and there is a site-specific variation in the response to insulin.



181

8. Referências Bibliográficas

ABBOTT, M-A.; WELLES, D.G.; FALLON, J.R. – The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. **J. Neurosc.**, **19**:7300-8, 1999.

ALESSI, D.R. & DOWNES, C.P. – The role of PI 3-kinase in insulin action. **Biochim. Biophys. Acta**, **1436**:151-64, 1998.

ANDERSON, D.; KOCH, C.A.; GREY, L.; ELLIS, C.; MORAM, M.; PAWSON, T. - Binding of SH2 domains of phospholipase C γ 1, GAP and Src to activated growth factor receptors. **Science**, **250**:979-82, 1990.

ANTONETTI, D.A.; ALGENSTAEDT, P.; KAHN, C.R. - Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. **Mol. Cel. Biol.**, **16**:2195-203, 1996.

ARAKI, T.; YAMADA, M.; OSNISHI, H.; SANO, S.-I.; UETSUKI, T.; HATANAKA, H. – Shp-2 specifically regulates several tyrosine-phosphorylated proteins in brain-derived neurotrophic factor signaling in cultured cerebral cortical neurons. **J. Neurochem.**, **74**:659-68, 2000.

- ARAKI, Y.; NOMURA, M.; TANAKA, H.; YAMAMOTO, H.; YAMAMOTO, T.; TSUKAGUCHI, I. – MRI of the brain in diabetes mellitus. **Neuroradiology**, 36:101-3, 1994.
- BANKS, W.A.; JASPAN, J.B.; KASTIN, A.J.- Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. **Peptides**, 18:1257-62, 1997.
- BARFORD, D. & NEEL, B.G. – Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. **Structure**, 6:249-54, 1998.
- BARON-VAN EVERCOOREN, A.; OLIKHON-BERTHE, C.; KOWALSKI, A.; VISCIANO, G.; VAN OBBERGHEN, E. - Expression of IGF-1 and insulin receptor genes in rat central nervous system: a developmental, regional, and cellular analysis. **J. Neurosci. Res.**, 28:244-53, 1991.
- BASKIN, D.G.; SCHWARTZ, M.W.; SIPOLS, A.J.; D'ALESSIO, D.A.; GOLDSTEIN, B.J.; WHITE, M.F. - Insulin receptor substrate 1 (IRS-1) expression in rat brain. **Endocrinology**, 134:1952-5, 1994.

BAURA, G.D.; FOSTER, D.M.; KAIYALA, K.; PORTE JR, D.; KAHN, S.E.;
SCHWARTZ, M.W. - Insulin transport from plasma into the central
nervous system is inhibited by dexamethasone in dogs. **Diabetes**, **45**:86-
90, 1996.

BAURA, G.D.; FOSTER, D.M.; PORTE JR, D.; KAHN, S.E.; BERGMAN,
R.N.; COBELLI, C.; SCHWARTZ, M.W. - Saturable transport of insulin
from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. **J. Clin.**
Invest., **46**:1824-30, 1993.

BEGLEY, D.J. Peptides and the blood-brain barrier: The status of our
understanding, **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **739**:89-100, 1994.

BENNETT, A.M.; TANG, T.L.; SUGIMOTO, S.; WALSH, C.T.; NEEL, B.G. –
Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth
factor receptor beta to Ras. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **91**:7335-9,
1994.

BIESSELS, G.-J.; CRISTINO, N.A.; RUTTEN, G.-J.; HAMERS, F.P.T.;
ERKELENS, D.W.; GISPEN, W.H. – Neurophysiological changes in the
central and peripheral nervous system of streptozotocin-diabetic rats.
Course of development and effects of insulin treatment. **Brain**, **122**:757-
68, 1999.

BIESSELS, G.-J.; KAPPELLE, A.C.; BRAVENBOER, B.; ERKELENS, D.W.;
GISPEN, W.H. - Cerebral function in diabetes mellitus. **Diabetologia**,
37:643-50, 1994.

BOHANNON, N.J.; CORP, E.S.; WILCOX, B.J.; FIGLEWICZ, D.P.; DORSA,
D.M.; BASKIN, D.G. - Localization of binding sites for insulin-like
growth factor-I (IGF-I) in the rat brain by quantitative autoradiography.
Brain. Res., **444**:205-13, 1988.

BOTHWELL, M. – Insulin and somatomedin MSA promote nerve growth
factor-independent neurite formation by cultured chick dorsal root
ganglionoc sensory neurons. **J. Neurosci. Res.**, **8**:225-31, 1982.

BRADFORD, M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of
microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Anal.**
Biochem., **72**:248-54, 1976.

BRETELER, M.M.B. - Association of diabetes mellitus and dementia: The Rotterdam study. **Diabetologia**, **39**:1392-97, 1996.

BUSIGUINA, S.; CHOWEN, J.A.; ARGENTE, J.; TORRES-ALEMAN, I. - Specific alterations of insulin-like growth factor I system in the cerebellum of diabetic rats. **Endocrinology**, **137**:4980-7, 1996.

CARSTEN, R.E.; WHALEN, L.R.; ISHI, D.N. - Impairment of spinal cord conduction velocity in diabetic rats. **Diabetes**, **38**:730-6, 1989.

CARVALHO, C.R.O.; BRENELLI, S.L.; SILVA, A.C.; NUNES, A.L.B.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.A. - Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3 kinase in liver and muscle of rats. **Endocrinology**, **137**:151-9, 1996.

CATTANEO, E. & PELLICCI, P.G. - Emerging roles for SH2/PTB-containing Shc adaptor proteins in the developing mammalian brain. **TINS**, **21**:476-81, 1998.

CHEATHAM, B. & KAHN, C.R. - Insulin action and the insulin signaling network. **Endocr. Rev.**, **16**:117-42, 1995.

- 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 protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. **J. Biol. Chem.**, **262**:1842-7, 1987.
- CLARKE, D.W.; BOYD, F.T.; KAPPY, M.S.; RAIZADA, M.K. - Insulin binds to specific receptors and stimulates 2-deoxyglucose uptake in cultured glial cells from rat brain, **J. Biol. Chem.**, **259**:11672-5, 1984.
- COKER, G.T.I.; STUDELSKA, D.; HARMON, S.; BURKE, W.; O'MALLEY, K.L. - Analysis of tyrosine hydroxylase and insulin transcripts in human neuroendocrine tissues, **Mol. Br. Res.**, **8**:93-8, 1990.
- CONTI, L.; DE FRAJA, C.; GULISANO, M.; MIGLIACCIO, E.; GOVONI, S.; CATTANEO, E. - Expression and activation of SH2/PTB-containing Shc A adaptor protein reflects the pattern of neurogenesis in the mammalian brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**:8185-90, 1997.
- CRANSTON, I.; MARSDEN, P.; MATYKA, K.; EVANS, M.; LOMAS, J.; SONKSEN, P.; MAISEY, M.; AMIEL, S.A. - Regional differences in cerebral blood flow and glucose utilization in diabetic man: the effect of insulin, **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, **18**:130-40, 1988.

CRONE C. - Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue. **J. Physiol.**, **181**:103-13, 1965.

CUATRECASAS, P. - Affinity chromatography and purification of the insulin receptor liver cell membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **69**:1277-81, 1972.

DEJGAARD, A.; GADE, A.; LARSSON, H.; BALLE, V.; PARVING, A.; PARVING, H.H. - Evidence for diabetic encephalopathy. **Diabet. Med.**, **8**:162-7, 1991.

DI CRISTOFANO, A. & PANDOLFI, P.P. - The multiples roles of PTEN in tumor suppression. **Cell**, **100**:387-90, 2000.

DI MARIO, U.; MORANO, S.; VALLE, E.; POZZESSERE, G. - Electrophysiological alterations of the central nervous system in diabetes mellitus. **Diabetes Metab. Rev.**, **11**:259-77, 1995.

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**:704-8, 1987.

ECK, M.J.; PLUSKEY, S.; TRÜB, T.; HARRISON, S.C.; SHOELSON, S.E. - Spatial constraints on the recognition of phosphoproteins by the tandem SH2 domains of the phosphatase SH-PTP2. **Nature**, **379**:277-80, 1996.

ELLIS, L.; CLAUSER, E.; MORGAN, D.O.; EDERY, M.; ROTH, R.A.; RUTTER, W.J. Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. **Cell**, **45**:721-32, 1986.

ERMISCH, A.; BRUST, P.; KRETZSCHMAR, R.; RÜHLE, H.-J. - Peptides and blood-brain barrier transport. **Physiol. Rev.**, **73**:489-527, 1993.

FEHLMAN, M.; PERYRON J.; SAMSON, M.; VAN OBBERGHEN, E.; BRANDENBURG, D.; BROSSETE, N. - Molecular association between major histocompatibility complex class I antigens and insulin receptors in mouse liver membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **82**:8634-7, 1985.

- FENG, G.S.; HUI, C.C.; PAWSON, T. – SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. **Science**, **259**:1607-11, 1993.
- FOLLI, F.; BONFANTI, L.; RENARD, E.; KAHN, C.R.; MERIGHI, A. - Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) distribution in the rat central nervous system. **J. Neurosci.**, **14**:6412-22, 1994.
- FREEMAN, R.M.; PLUTZKY, J.; NEEL, B.G. - Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homology of Drosophila corkscrew. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**:11239-43, 1992.
- FREYCHET, P.; ROTH, J.; NEVILLE, D.M.Jr. - Insulin receptor in the liver. - Specific binding of [¹²⁵I] insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **68**:1833-7, 1971.
- GARAFOLO, R.S. & ROSEN, A.M. - Insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptors during Central Nervous System development: expression of two immunologically distinct receptor β subunits. **Mol. Cell. Biol.**, **9**:2806-17, 1989.

- GRUNBERGER G.; LOWE W.L.J.; MCEL DUFF A.; GLICK R.P. - Insulin receptor of human cerebral glioma: structure and function. **J. Clin. Invest.**, 77:997-1005, 1986.
- GUSTAFSON, T.; HE, W.; CRAPARO, A.; SCHAUB, C.; O'NEILL, T. - Phosphotyrosine-dependent interaction of Shc and IRS-1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. **Mol. Cell. Biol.**, 15:2500-8, 1995.
- HAVRANKOVA, J.; ROTH, J.; BROWSTEIN, M. - Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. **Nature**, 272:827-9, 1978a.
- HAVRANKOVA, J.; SCHEMECHEL, D.; ROTH, J.; BROWSTEIN, M. - Identification of insulin in the rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 75:5737-41, 1978b.
- HEIDENREICH, K. A.; DE VILLIS, G.; GILMORE, P.R. - Functional properties of subtype of insulin receptor found in neurons. **J. Neurochem.**, 51:878-87, 1988.

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**:11980-5, 1986.

HILL, J.M.; LESNIAK, M.A.; PERT, C.B.; ROTH, J. - Autoradiographic localization of insulin receptors in the rat brain: prominence in the olfactory and limbic areas. **Neuroscience**, **17**:1127-38, 1986.

HOYER, S. - Risk factors for Alzheimer's disease during aging. Impact of glucose/energy metabolism. **J. Neural Transm.**, **54**:187-94, 1998.

HUBBARD, S.R.; WEI, L.; ELLIS, L.; HENDRICKSON, W.A. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. **Nature**, **372**:746-54, 1994.

ISAKOFF, S.J.; YU, Y-P.; SU, Y-C.; BLAIKIE, P.; YAJNIK, V.; ROSE, E.; WEIDNER, K.M.; SACHS, M.; MARGOLIS, B.; SKOLNIK, E.Y. - Interaction between the phosphotyrosine binding domain of Shc and the insulin receptor is required for Shc phosphorylation by insulin in vivo. **J. Biol. Chem.**, **271**:3959-62, 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, 42:420-5, 1993.
- KAHN, C.R. - Current concepts of the molecular mechanism of insulin action.
Annu. Rev. Med., 36:429-51, 1985.
- KAPPY, M.S. & RAIZADA, M.K. - Adult-level insulin binding is present in
term fetal rat CNS membranes. **Brain Res.**, 249:390-2, 1982.
- KASUGA, M.; HEDO, J.A.; YAMADA, K.M.; KAHN, C.R. - Structure of
insulin receptor and its subunits. **J. Biol. Chem.**, 257:10392-9, 1982a.
- KASUGA, M.; KARLSSON, F.A.; KAHN C.R. - Insulin stimulates the
phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor.
Science, 215:185-7, 1982 b.

KASUGA, M.; ZICK, Y.; BLITHE, D.L.; CRETAAZ, M.; KAHN, C.R. - Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. **Nature**, **298**:667-9, 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**:8570-4, 1986.

KAZLAUSKAS, A.; FENG, G.S.; PAWSON, T.; VALIUS, M. - The 64-kDa protein that associates with platelet-derived growth factor receptor beta subunit via Tyr-1009 is the SH-2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**:6939-43, 1993.

KERN, W.; SCHLOSSER, C.; KERNER, W.; PIETROWSKY, R.; BORN, J.; FEHM, H.L. - Evidence for effects of insulin on sensory processing in humans. **Diabetes**, **43**:351-6, 1994.

KILANDER, L.; BOBERG, M.; LITHELL H. - Peripheral glucose metabolism and insulin sensitivity in Alzheimer's disease. **Acta. Neurol. Scand.**, **87**:284-98, 1993.

KOCH, C.A.; ANDERSON, D.; MORAN, M.F.; ELLIS, C.; PAWSON, T. - SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. **Science**, **252**:668-74, 1991.

KROOK, A.; MOLLER, D.E.; DIB, K.; O'RAHILLY, S. - Two naturally occurring mutant insulin receptors phosphorylate insulin receptor substrate-1 (IRS-1) but fail to mediate the biological effects of insulin. **J. Biol. Chem.**, **271**:7134-40, 1996.

KU, J.; KOIVISTO, K.; MYKKÄNEN, L.; HELKALA, E-L.; VANHANEN, M.; HÄNNINEN, T.; KERVINEN, K.; KESÄNIEMI, Y.A.; RIEKKINEN, P. J.; LAAKSO, M. - Association between features of insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease independently of apolipoprotein E4 phenotype: cross section population-based study. **B.M.J.**, **315**:1045-9, 1997.

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

LAVAN, B.E. & LIENHARD, G.E. - The insulin-elicited 60-kDa phosphotyrosine protein in rat adipocytes is associated with phosphatidylinositol 3-kinase. **J. Biol. Chem.**, **268**:5921-8, 1993.

LAZAR, D.F.; WIEAE, R.J.; BRADY, M.J. - Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. **J. Biol. Chem.**, **270**:20801-7, 1995.

LE ROITH, D.; WERNER, H.; BEITNER-JOHNSON, D.; ROBERTS Jr., C.T. - Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor I receptor. **End. Rev.**, **16**:143-63, 1995.

LECHLEIDER, R.; FREEMAN, R.M.; NELL B.G. - Tyrosyl phosphorylation and growth factor receptor association of human corkscrew homologue. SU-PTP2. **J. Biol. Chem.**, **268**:13434-8, 1993.

LEIBSON, C.L.; ROCCA, W.A.; HANSON, V.A.; CHA, R.; KOKMEN, E.; O'BRIEN, P.C.; PALUMBO, P.J. - Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. **Am. J. Epidemiol.**, **145**:301-8, 1997.

LESNIAK, M.A.; HILL, J.A.; KIESS, W.; ROJESKI, M.; PERT, C.B.; ROTH, J.- Receptors for insulin-like growth factors I and II: autoradiographic localization in rat brain and comparison to receptors for insulin. **Endocrinology**, **123**:2089-99, 1988.

LI, W.; NISHIMURA, R.; KASHISHIAN, A.; BATZER, A.G.; KIM, W.J.; COOPER, J.A.; SCHLESSINGER, J. – A new function for a phosphotyrosine phosphatase; linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase. **Mol. Cell. Biol.**, 14:509-17, 1994.

LOWESTEIN, E.; MOHAMMADI, M.; MARGOLIS, B.; SCHLESSINGER J. - The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathway. **Science**, 260:1953-5, 1993.

MARGOLIS, B. - Proteins with SH2/SH3 domains transducers in the tyrosine kinase signaling pathway. **Cel. Growth Differ.**, 3:73-80, 1992.

MASSAGUE, J.P.; PILCH, P.F.; CZECH, M.P. - Eletrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unit stoichiometries. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 77:7137-41, 1981.

MATOSAKI, T. & KASUGA, M. – Roles of protein-tyrosine phosphatases in growth factor signaling. **Cell. Signal.**, 8:13-9, 1996.

MCCALL, A.L.- The impact of diabetes on CNS. **Diabetes**, 41:557-70, 1992.

- MC GLADE, J.A.; CHENG, G.; PELICCI, P.; PELICCI, G.; PAWSON, T. -Shc proteins are phosphorylated and regulated by the v-Src and v-Fps protein-tyrosine kinases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**:8869-73, 1992.
- MILARSKI, K.L. & SALTIEL, A.R. - Expression of catalytically inactive Syp phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin. **J. Biol. Chem.**, **269**:21239-43, 1994.
- MILLER, T.M.; TANSEY, M.G.; JOHNSON, E.M.Jr.; CREEDON, D.J. - Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization- and insulin-like growth factor I-mediated survival of cerebellar granule cells. **J. Biol. Chem.**, **272**:9847-53, 1997.
- MIRALPEIX, M.; SUN, X.J.; BACKER, J.M.; MYERS, M.G.; ARAKI, E.; WHITE, M.F. - Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of multiple high molecular weight substrates in FAO hepatoma cells. **Biochemistry**, **31**:9031-9, 1992.
- MOORADIAN, A.D. - Diabetic complications of central nervous system. **Endocr. Rev.**, **9**:346-56, 1988.

MOROO, I.; YAMADA, T.; MAKINO, H.; TOOYAMA, I.; MCGEER, P.L.;
MCGEER, E.G.; HIRAYAMA, K. - Loss of insulin receptor
immunoreactivity from the substantia nigra pars compacta neurons in
Parkinson's disease. **Acta Neuropathol.**, **87**:343-8, 1994.

MOSS, A.M.; UNGER, J.W.; MOXLEY, R.T.; LIVINGSTON, J.N. -
Localization of phosphotyrosine-containing proteins by
immunocytochemistry in the rat forebrain corresponds to the distribution of
the insulin receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**:4453-7, 1990.

MYERS, M.G.Jr & WHITE, M.F. - Insulin signal transduction and the IRS
proteins. **Annu. Rev. Pharmacol. Metab.**, **6**:209-15, 1995.

MYERS, M.G.Jr. & WHITE, M.F. - The new elements in insulin signaling:
insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains. **Diabetes**,
42:643-50, 1993.

MYERS, M.G.Jr.; BACKER, J.M.; SUN, X.J.; SHOELSON, S.E.; HU, P. - IRS-
1 activates the phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with the src
homology 2 domains of p85. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**:10350-4,
1992.

- 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**:443-50, 1994.
- NAKAMURA, H.; SHITARA, N.; TAKAKURA, K. - Insulin binds to specific
receptors and stimulates macromolecular synthesis in C6 glioma cells.
Acta Neurochir., **93**:10-2, 1988.
- NEEL, B.G. & TONKS, N.K. - Protein tyrosine phosphatases in signal
transduction. **Curr. Opin. Cell Biol.**, **9**:193-204, 1997.
- NOGUCHI, T.; MATOZAKI, T.; HOKITA, K.; FUJIOKA, Y.; KASUGA, M. -
Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2
domain, in insulin-stimulated Ras activation. **Mol. Cell. Biol.**, **14**:6674-
82, 1994.
- O'BRYAN, J.P.; MARTIN, C.B.; SONGYANG, Z.; CANTLEY, L.C.; DER,
C.J.- Binding specificity and mutational analysis of the phosphotyrosine
binding domain of the brain-specific adaptor protein Shc C. **J. Biol.**
Chem., **271**:11787-91, 1996 a.

- O'BRYAN, J.P.; SONGYANG, Z.; CANTLEY, L.; DER, C.J.; PAWSON, T. -
A mammalian adaptor protein with conserved Src homology 2 and
phosphotyrosine-binding domains is related to Shc and is specifically
expressed in the brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **93**:2729-34, 1996 b.
- OBERMEIER, A.; LAMMERS, T.; WEISMULLER, K-H.; JUNG, G.;
SCHLESSINGER, J.; ULLRICH, A. - Identification of Trk binding sites
for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a
multimeric signaling complex. **J. Biol. Chem.**, **268**:22963-6, 1993.
- OCRANT, I.; VALENTINO, K.L.; ENG, L.F.; HINTZ, R.L.; WILSON, D.M.;
ROSENFELD, R.G. - Structural and immunohistochemical
characterization of insulin-like growth factor I and II receptors in the
murine central nervous system. **Endocrinology**, **123**:1023-33, 1988.
- OKADA, S.; YAMAUCHI, K.; PESSIN, J.E. - Shc isoform-specific tyrosine
phosphorylation by the insulin and epidermal growth factor receptors. **J.
Biol. Chem.**, **270**:20737-41, 1995.
- OTT, A.; STOLK, R.P.; HOFMAN, A.; VAN HARSKAMP, F.; GROBBEE,
D.E.; BRETELER, M.M.B. - Association of diabetes mellitus and
dementia: The Rotterdam study. **Diabetologia**, **39**:1392-7, 1996.

OWENS, D.M.; VAN DER ZON, G.C.M.; PRONK, G.J.; BOSS, J.L.;
MOLLER, W.; CHEATHAM, B. - A mutant insulin receptor induces
formation of a Shc-Growth factor receptor bound protein 2 (Grb2)
complex and p21^{ras}-GTP without detectable interaction of insulin
receptor substrate 1 (IRS-1) with Grb2. **J. Biol. Chem.**, **269**:33116-22,
1994.

PARDRIGE, W.M. - Receptor-mediated peptide transport through the blood-
brain barrier. **Endocr. Rev.**, **7**:314-30, 1986.

PAWSON, T. - Protein modules and signalling network. **Nature**, **373**:573-80,
1995.

PEINADO, J.M. & MEYERES, R.D. - Norepinephrine release from PVN and
lateral hypothalamus during perfusion with 2-DG or insulin in the sated
and fasted rat. **Pharm. Biochem. Behav.**, **27**:751-21, 1991.

PELICCI, G.; DENTE, L.; DE GIUSEPPE, A.; VERDUCCI-GALLETTI, B.; GIULI, S.; MELE, S.; VETRIANI, C.; GIOIRGIO, M.; PANDOLFI, P.P.; CESARENI, G.; PELICCI, P.G.- A family of Shc proteins with conserved PTB'CH1 and SH2 regions. **Oncogene**, 13:633-41, 1996.

PELICCI, G.; LANFRANCONE, L.; GRIGNANI, F.; MCGLADE, J.; CAVALLO, F.; FORNI, G.; NICOLETTI, I.; GRIGNANI, F.; PAWSON, T.; PELICCI, P.G. - A novel transforming protein (Shc) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. **Cell**, 70:93-104, 1992.

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.**, 264:8946-50, 1989.

PERROTI, N.; ACCILI, D.; MARCUS SAMUELS, B.; REES JOONES, R.W.; TAYLOR, S.I. - Insulin stimulates phosphorylation of a 120-kDa glycoprotein substrate (pp120) for the receptor-associated protein kinase in intact H-35 hepatoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 84:3137-40, 1987.

POMERANCE, M.; GAVARET, J.-M. ; JACQUEMIN, C.; MATRICON, C.;
TORU-DELBAUFFE, D.; PIERRE, M. - Insulin and insulin-like growth
factor 1 during postnatal development of rat brain. **Dev. Brain. Res.**,
42:77-83, 1988.

PORTE Jr., D.; SEELEY, R.J.; WOODS, S.C.; BASKIN, D.G.; FIGLEWICZ,
D.P.; SCHWARTZ, M.W. - Obesity, diabetes and central nervous
system. **Diabetologia**, **41**:863-81, 1998.

POSNER, B.I.; KELLY, P.A.; SHIU, R.P.C.; FRIESEN, H.G.- Studies of
insulin, growth hormone and prolactin binding: tissue distribution, species
variations and characterization. **Endocrinology**, **95**:521-31, 1974.

POZZESSERE, G.; VALLE, E.; DE CRIGNIS, S.; CORDISCHI, V.M.;
FATTAPPOSTA, F.; RIZZO, P.A.; PIETRAVALLE, P.; CRISTINA, G.;
MORANO, S.; DI MARIO, U. - Abnormalities of cognitive functions in
IDDM revealed by P300 event-related potential analysis. **Diabetes**, **40**:
952-8, 1991.

PRONK, G.; McGLADE, J.; PELICCI, G.; PAWSON, T.; BOS, J. - Insulin-induced phosphorylation of the 46- and 52-kDa Shc proteins. **J. Biol. Chem.**, **268**:5748-53, 1993.

PRUET, W.; YUAN, Y.; ROSE, E.; BATZER, A.G.; HARADA, N.; SKOLNIK, E.Y. - Association between insulin receptor substrate 1 and the insulin- and epidermal growth factor-induced activation of p21^{ras}. **Mol. Cell. Biol.**, **14**:1778-85, 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**:1939-51, 1993.

ROCCHI, S.; TARTATE-DECKERT, S.; SAWKA-VERHELLE, D.; GAMHA, A.; VAN OBERGHEN, E. - Interaction of SH-2 containing protein tyrosine phosphatase 2 with the insulin receptor and insulin-like growth factor-I receptor: Studies of the domain involved using the yeast two-hybrid system. **Endocrinology**, **137**:4944-52, 1996.

- ROSE, D.; SALTIEL, A.; MAJUMDAR, M.; DECKER, S.; OLEFSKY, J. - Insulin receptor substrate-1 is required for insulin-mediated mitogenic signal transduction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **91**:797-801, 1994.
- ROZAKIS-ADCOCK, M.; MCGLADE, J.; MBAMALU, G.; PELICCI, G.; DALY, R.; LI, W.; BATZER, A.; THOMAS, S.; BRUGGE, J.; PELICCI, P.G.; SCHLESSINGER, J.; PAWSON, T. - Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of Ras pathway by tyrosine kinases. **Nature**, **360**:689-92, 1992.
- RUBINI, R.; BIASIOLO, F.; FOGAROLO, F.; MAGNAVITA, V.; MARTINI, A.; FIORI, M.G. - Brainstem auditory evoked potentials in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, **16**:19-25, 1992.
- SAAD, M.J.A. - Molecular mechanisms of insulin resistance. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **27**:941-57, 1994a.
- SAAD, M.J.A. & KAHN, C.R. - Alterations in insulin receptor and substrate phosphorylation in hypertensive rats. **J. Am. Soc. Nephrol.**, **3**:S69-S77, 1992a.

SAAD, M.J.A.; ARAKI, E.; MIRALPEIX, M.; ROTHENBERG, P.L.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. - Regulation of insulin receptro substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, **90**:1839-49, 1992b.

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**:22100-4, 1996.

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**:545-57, 1994b.

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**:1579-88, 1995a.

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**:2065-72, 1993.

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**:755-9, 1995b.

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**:131-4, 1995c.

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**:179-86, 1997.

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**:741-4, 1995d.

SASAOKA, T.; DRAZNIN, B.; LEITNER, J.W.; LANGLOIS, W.J.; OLEFSKY, J.M. - Shc is the predominant signaling molecule coupling insulin receptors to activation of guanine nucleotide releasing factor and p21ras-GTP formation. **J. Biol. Chem.**, **269**:10734-8, 1994a.

SASAOKA, T.; ISHIHARA, H.; SAWA, T.; ISHIKI, M.; MORIOKA, H.; IMAMURA, T.; USUI, I.; TAKATA, Y.; KOBAYASHI, M. - Functional importance of amino-terminal domain of Shc for interaction with insulin and epidermal growth factor receptors in phosphorylation-independent manner. **J. Biol. Chem.**, **271**:20082-7, 1996.

SASAOKA, T.; ROSE, D.; JHUN, B.; SALTIEL, A.; DRAZNIN, B.; OLEFSKY, J. - Evidence for a functional role of Shc proteins in mitogenic signaling induced by insulin, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor. **J. Biol. Chem.**, **269**:13689-94, 1994b.

- SCHWARTZ, M.W.; FIGLEWICZ, D.P.; BASKIN, D.G.; WOODS, S.C.;
PORTE, JR.D. - Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy
balance. **Endocr. Rev.**, **13**:387-414, 1992.
- SCHWARTZ, M.W.; WOODS, S.C.; PORTE, D.JR.; SEELEY, R.J.; BASKIN,
D.G. - Central Nervous system control of food intake. **Nature**, **404**:661-
71, 2000.
- SEGATO, O.; PELICCI, G.; GIULI, S.; DIGIESI, P.; Di FIORI, P.P.;
McGLADE, J. - Shc products are substrates of erbB-2 kinase. **Oncogene**,
8:2105-12, 1993.
- SERVIDEI, T., BHADE, P.G.; HUANG, Z.; MOSKOWITZ, M.A.; HARSH, G.;
REEVES, S.A. - The protein tyrosine phosphatase SHP2 is expressed in
glial and neuronal progenitor cells, postmitotic neurons and reactive
astrocytes. **Neuroscience**, **82**:529-43, 1998.
- SHEPHERD, P.R.; WITHERS, D.J.; SIDDLE, K. - Phosphoinositide 3-kinase:
the key switch mechanism in insulin signaling. **Biochem.**, **333**:471-90,
1998.

SHERRARD, R.M.; RICHARDSON, N.A.; SARA, V.R.- Localization of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) immunoreactivity in the olivocerebellar system of developing and adult rats. **Dev. Brain Res.**, **98**:102-13, 1997.

SHI, Z.Q.; LU, W.; FENG, G.S. – The Shp-2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-jun NH-terminal mitogen-activated protein kinases. **J. Biol. Chem.**, **273**:4904-8, 1998.

SKOLNIK, E.Y.; BATZER, A.; LI, N.; LEE, C-H.; LOWESTEIN, E.; MOHAMMADI, M.; MARGOLIS, B.; SCHLESSINGER, J. - The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. **Science**, **260**:1953-5, 1993a.

SKOLNIK, E.Y.; BATZER, A.; LI, N.; LEE, C-H.; MYERS, M.G.Jr.; BACKER, J.M.; SUN, X.J.; SHOELSON, S.E.; HU, P. - IRS-1 activates the phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with the src homology 2 domains of p85. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**:10350-4, 1992.

SKOLNIK, E.Y.; LEE, C-H.; BATZER, A.; VICENTINI, L. M.; ZHOU, M.; DALY, R.; MYERS, JR.M.J.; BACKER, J.M.; ULLRICH, A.; WHITE, M.F.; SCHLESSINGER, J. - The SH2\SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine phosphorylated IRS 1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. **EMBO J.**, 12:1929-36, 1993b.

SMITH, L.K.; BRADSHAW, M.; CROAL, D.E.; GARNER, C.W. - The insulin receptor substrate (IRS-1) is a PEST protein that is susceptible to calpain degradation in vitro. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 196:767-72, 1993.

SONNTAG, W.E.; LYNCH, C.D.; BENNETT, S.A.; KHAN, A.S.; THORNTON, P.L.; COONEY, P.T.; INGRAM, R.L.; MCSHANE, T.; BRUNSO-BECHTOLD, J.K. - Alterations in insulin-like growth factor-1 gene and protein expression and type 1 insulin-like growth factor receptors in the brain of ageing rats. **Neuroscience**, 88:269-79, 1999.

- STRACHAN, M.W.J. & DEARY, I.J. - Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? **Diabetes Care**, **20**:438-45, 1997.
- SUN, X.J.; ROTHENBERG, P.A.; KAHN, C.R.; BACKER, J.M.; ARAKI, E.; WILDEN, P.A.; CAHILL, D.A.; GOLDSTEIN, B.J.; WHITE, M.F. - Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, **352**:73-7, 1991.
- SUN, X.J.; WANG, L.-M.; ZHANG, Y.; YENUSH, L.; MYERS, M.G.; GLASHEEN, E.; LANE, W.S.; PIERCE, J.H.; WHITE, M.F. - Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. **Nature**, **337**:173-7, 1995.
- SUSUKI, T.; MATOZAKI, T.; MIZOGUCHI, A.; KASUGA, M. - Localization and subcellular distribution of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains, in rat brain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **211**:950-9, 1995.
- TAKAHASHI, M.; YAMADA, T.; TOOYAMA, I.; MOROO, I.; KIMURA, H.; YAMAMOTO, T.; OKADA, H. - Insulin receptor mRNA in the substantia nigra in Parkinson's disease. **Neurosci. Lett.**, **204**:201-4, 1996.

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**:3440-77, 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**:7797-801, 1984.

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.**, **130**:33-42, 1997.

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**:4350-4, 1979.

TUN, P.A.; NATHAN, D.M.; PERLMUTER, L.C. – Cognitive and affective disorders in elderly diabetics. **Clin. Geriatr. Med.**, **6**:741-54, 1990.

- UNGER, J.W.; LIVINGSTON, J.N.; MOSS, A.M. - Insulin receptors in the central nervous system: localization, signaling mechanisms and functional aspects. **Prog. Neurobiol.**, **36**:343-62, 1991a.
- UNGER, J.W.; MCNEILL, T.H.; MOXLEY, III R.T.; WHITE, M.; MOSS, A.; LIVINGSTON, J.N. - Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. **Neuroscience**, **31**:143-57, 1989.
- UNGER, J.W.; MOSS, A.M.; LIVINGSTON, J.N. - Immunohistochemical localization of insulin receptors and phosphotyrosine in the brainstem of the adult rat. **Neuroscience**, **42**:853-61, 1991b.
- USIGUINA, S.; CHOWEN, J.A.; ARGENTE, J.; TORRES-ALEMAN, I. - Specific alterations of insulin-like growth factor I system in the cerebellum of diabetic rats. **Endocrinology**, **137**:4980-7, 1996.
- VAN HOUTEN, M.; POSNER, B.I.; KOPRIWAB, B.M.; BRAWER, J.R. - Insulin binding sites localized to nerve terminals in rat median eminence and arcuate nucleus. **Science**, **207**:1081-3, 1980.
- VAN OBBERGHEN, E. - Signaling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor. **Diabetologia**, **37**:125-34, 1994.

VAN OBBERGHEN, E.; ROSSI, B.; KOWALSKI, A.; GAZZANO, H.; PONZIO, G.- Receptor-mediated phosphorylation of the hepatic insulin receptor: evidence that the Mr 95,000 receptor subunit is its own kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **80**:945-9, 1983.

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**:12490-5, 1996.

VIRKAMÄKI, A.; UEKI, K.; KAHN, C.R. – Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, **103**:931-43, 1999.

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**:2969-80, 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**:9470-8, 1985.

WICKELGEN, I. - Tracking insulin to the mind. **Science**, **280**:517-9, 1998.

WILDEN, P.A.; BACKER, J.M.; KAHN, C.R.; CAHILL, D.A.; SCHROEDER, G.J.; WHITE, M.F. - Characterization of the insulin receptor with an in vivo mutation at tyrosine 1146: evidence for separate insulin receptor signals regulating cellular metabolism and growth. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**:3358-62, 1990.

WILDEN, P.A.; KAHN, C.R.; SIDDLE, K.; WHITE, M.F. - Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. **J. Biol. Chem.**, **267**:16660-8, 1992a.

WILDEN, P.A.; SIDDLE, K.; HARING, E.; BACKER, J.M.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. - The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. **J. Biol. Chem.**, **267**:13719-27, 1992b.

WOODS, S.C. & PORTER, D. Jr. - Relationship between plasma and cerebrospinal fluid insulin level of dogs. **Am. J. Physiol.**, **233**:331-4, 1978.

- YAMADA, M.; OSHNISHI, H.; SANO, S-I.; ARAKI, T.; NAKATANI, A.;
IREUCHI, T.; HATANAKA, H. – Brain-derived neurotrophic factor
stimulates of Shp2 with phosphatidylinositol 3-kinase and Gbr2 in
cultured cerebral cortical neurons. **J. Neurochem.**, **73**:41-9, 1999.
- YAMAUCHI, K.; MILARSKI, K.L.; SALTIEL, A.R.; PESSIN, J.E. – Protein-
tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin
downstream signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92**:664-8, 1995.
- ZAIA, A. & PIANTANELLI, L. - Insulin receptors in mouse brain: age-related
modifications are corrected by thymus graft. **Mech. Ageing Dev.**, **98**:37-
46, 1997.
- ZAIA, A. & PIANTANELLI, L. - Insulin receptors in the brain cortex of aging
mice. **Mech. Ageing. Dev.**, **113**:227-32, 2000.
- ZHANG, F.X.; RUBIN, R.; ROONEY, T.A. - N-methyl-d-aspartate inhibits
apoptosis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cerebellar
granule neurons. **J. Biol. Chem.**, **273**:26596-602, 1998.

ZHAO, W.; CHEN, H.; XU, H.; MOORE, E.; MEIRI, N.; QUON, M.J.; ALKON, D.L. - Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. **J. Biol. Chem.**, **274**:34893-902, 1999.

ZHAO, Z.; TAN, Z.; WRIGHT, J.H.; DILTZ, C.D.; SHEN, S.H.; KREBS, E.G.; FISCHER, E.H. – Altered expression of protein-tyrosine-phosphatase 2C in 293 cells affects protein tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase activation. **J. Biol. Chem.**, **270**:11765-9, 1995.

ZOPPINI, G. & KAHN, C.R. – Effect of phospholipase treatment on insulin receptor signal transduction. **Diabetologia**, **35**:109,15, 1992.



9. Publicações

Reprinted from

BRAIN RESEARCH

Brain Research 826 (1999) 74–82

Research report

Insulin induces tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and SHC, and SHC/GRB2 association in cerebellum but not in forebrain cortex of rats

Maria Luiza de L.A. Fernandes ^{a,b}, Mário J.A. Saad ^b, Lício A. Velloso ^{b,*}

^a *Pedro Ernesto University Hospital, Department of Internal Medicine, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

^b *Department of Internal Medicine, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil*



ELSEVIER

BRAIN RESEARCH

SCOPE AND PURPOSE

BRAIN RESEARCH provides a medium for the prompt publication of articles in the fields of neuroanatomy, neurochemistry, neurophysiology, neuroendocrinology, neuropharmacology, neurotoxicology, neurocommunications, behavioural sciences, molecular neurology and biocybernetics. Clinical studies that are of fundamental importance and have a direct bearing on the knowledge of the structure and function of the brain, the spinal cord, and the peripheral nerves will also be published.

TYPES OF PAPERS

1. **Interactive Reports** are papers describing original, high quality, fundamental research in any area of Neuroscience. These will first appear electronically on the WWW (<http://www.elsevier.com/locate/bres> or <http://www.elsevier.nl/locate/bres>) and published soon after in the relevant section of *Brain Research*. The on-line version may include additional data sets, 3-D/confocal images, animations, etc., and be linked to relevant on-line databases. Comments from readers may be appended later in a linked *Discussion Forum* at the discretion of an appointed Moderator.
2. **Research Reports** reporting results of original fundamental research in any branch in the brain sciences. It is expected that these papers will be published about three months after acceptance.
3. **Short Communications** reporting on research which has progressed to the stage when it is considered that the results should be made known quickly to other workers in the field. The maximum length allowed will be 1500 words or equivalent space in tables and illustrations. It is expected that Short Communications will be published about two months after acceptance.
4. **Protocols:** full-length protocols in any area of Neuroscience, to be published in the journal section *Brain Research Protocols*. Updates on published protocols submitted by the authors thereof, describing new developments which are of sufficient interest to the neuroscience community, but which do not warrant a completely new submission, will be published as **Protocol Updates**. The maximum length allowed will be 1500 words or equivalent space in tables and illustrations. Comments on published Protocols describing useful hints and "tricks" related to any aspect of the Protocol, such as timing, equipment, chemicals, troubleshooting, etc., will be published in the on-line version of the journal as linked **Technical Tips** at the discretion of the Editor.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Submission of a paper to *Brain Research* is understood to imply that it deals with original material not previously published (except in abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all listed authors concur with the submission and that a copy of the final manuscript has been approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out. If accepted, the article shall not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editors and Publisher. The Publisher and Editor regret that they are unable to return copies of submitted articles except in the case of rejected articles, where only one set of manuscript plus figures will be returned to the author.

Manuscripts in English should be organised according to the *Brain Research Guidelines for the Submission of Manuscripts* and sent to the appropriate address shown below. Authors should state clearly the section of the journal for which the article/Interactive Report should be considered.

Research Reports & Short Communications:
Professor D.P. Purpura
Brain Research, Office of the Dean
Albert Einstein College of Medicine
Jack and Pearl Resnick Campus
1300 Morris Park Avenue
Bronx, NY 10461, USA
Tel.: (1) (718) 430-2387
Fax: (1) (718) 430-8980
E-mail: brain@aecom.yu.edu

Interactive Reports:
Professor F.E. Bloom
Brain Research Interactive
Dept. of Neuropharmacology
The Scripps Research Institute
10666 N. Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, USA
Fax: (1) (619) 784-8851
E-mail: smart@scripps.edu
Website: <http://smart.scripps.edu>

Protocols & Protocol Updates:
Dr. Floris G. Wouterlood
Department of Anatomy
Faculty of Medicine
Free University
van der Boechorststraat 7
1081 BT Amsterdam
The Netherlands
Fax: (31) (20) 444-8054
E-mail: fg.wouterlood.anat@med.vu.nl

Correspondence regarding accepted manuscripts relating to proofs, publication and reprints should be sent to:

Brain Research, Elsevier Science B.V., P.O. Box 2759, 1000 CT Amsterdam, The Netherlands. Tel.: (31) (20) 485-3415; Fax: (31) (20) 485-2431; E-mail: a.brakel@elsevier.nl

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief: **Dominick P. Purpura** (Bronx, NY, USA)

G.K. Aghajanian (New Haven, CT, USA)
B.W. Agranoff (Ann Arbor, MI, USA)
A.J. Aguayo (Montreal, Que., Canada)
P. Andersen (Oslo, Norway)
E.C. Azmitia (New York, NY, USA)
M.V.L. Bennett (Bronx, NY, USA)
L.I. Benowitz (Boston, MA, USA)
J.M. Besson (Paris, France)
A. Björklund (Lund, Sweden)
F.E. Bloom (La Jolla, CA, USA)
D. Choi (St. Louis, MO, USA)
R.E. Coggeshall (Galveston, TX, USA)
H. Colléwijn (Rotterdam, The Netherlands)
W.M. Cowan (Bethesda, MD, USA)
A.C. Cuello (Montreal, Que., Canada)
M.S. Cynader (Vancouver, BC, Canada)
J.E. Dowling (Cambridge, MA, USA)
J.J. Dreifuss (Geneva, Switzerland)
R. Dubner (Baltimore, MD, USA)
S.B. Dunnett (Cambridge, UK)
P.C. Emson (Cambridge, UK)
S.J. Enna (Kansas City, KS, USA)
J. Feldman (Los Angeles, CA, USA)
H.L. Fields (San Francisco, CA, USA)
F.H. Gage (San Diego, CA, USA)
J. Glowinski (Paris, France)
P.S. Goldman-Rakic (New Haven, CT, USA)

S. Grillner (Stockholm, Sweden)
B. Gustafsson (Göteborg, Sweden)
A. Hamberger (Göteborg, Sweden)
U. Heinemann (Köln, Germany)
K.-P. Hoffmann (Bochum, Germany)
T.G.M. Hökfelt (Stockholm, Sweden)
R.L. Isaacson (Binghamton, NY, USA)
M. Ito (Saitama, Japan)
B.L. Jacobs (Princeton, NJ, USA)
E.G. Jones (Irvine, CA, USA)
P. Kalivas (Pullman, WA, USA)
K. Kogure (Saitama, Japan)
G.F. Koob (La Jolla, CA, USA)
L. Kruger (Los Angeles, CA, USA)
J. LaVail (San Francisco, CA, USA)
M. Le Moal (Bordeaux, France)
C.L. Masters (Parkville, Vic., Australia)
M. Mattson (Lexington, KY, USA)
B.S. McEwen (New York, NY, USA)
E.G. McGeer (Vancouver, BC, Canada)
R.Y. Moore (Pittsburgh, PA, USA)
P. Morell (Chapel Hill, NC, USA)
W.T. Norton (New York, NY, USA)
J.M. Palacios (Barcelona, Spain)
M. Palkovits (Budapest, Hungary)
R. Quirion (Verdun, Que., Canada)

C.S. Raine (Bronx, NY, USA)
G. Raisman (London, UK)
P. Rakic (New Haven, CT, USA)
H.J. Ralston III (San Francisco, CA, USA)
S.I. Rapoport (Bethesda, MD, USA)
C.E. Ribak (Irvine, CA, USA)
P. Rudomin (Mexico, DF, Mexico)
M. Schachner (Hamburg, Germany)
B.K. Siesjö (Honolulu, HI, USA)
E.J. Simon (New York, NY, USA)
R.S. Sloviter (Tucson, AZ, USA)
S.H. Snyder (Baltimore, MD, USA)
C. Sotelo (Paris, France)
J. Stone (Sydney, NSW, Australia)
D.F. Swaab (Amsterdam, The Netherlands)
L. Swanson (Los Angeles, CA, USA)
L. Terenius (Stockholm, Sweden)
M. Tohyama (Osaka, Japan)
S. Tucek (Prague, Czech Republic)
K. Unsicker (Heidelberg, Germany)
S.G. Waxman (New Haven, CT, USA)
F.G. Wouterlood (Amsterdam, The Netherlands)
R.J. Wurtman (Cambridge, MA, USA)
I.S. Zagon (Hershey, PA, USA)
W. Zieglgänsberger (Munich, Germany)
R.S. Zukin (Bronx, NY, USA)

GUIDELINES FOR THE SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

These can be found on the *Brain Research Interactive* Website (<http://www.elsevier.com/locate/bres> or <http://www.elsevier.nl/locate/bres>) as well as in the "front matter" of every first issue of even-numbered volumes of the journal.

The preferred medium of submission is on disk with accompanying manuscript (see "Electronic manuscripts").

Research report

Insulin induces tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and SHC, and SHC/GRB2 association in cerebellum but not in forebrain cortex of rats

Maria Luiza de L.A. Fernandes ^{a,b}, Mário J.A. Saad ^b, Lício A. Velloso ^{b,*}^a *Pedro Ernesto University Hospital, Department of Internal Medicine, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*^b *Department of Internal Medicine, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil*

Accepted 5 January 1999

Abstract

A growth-related branch of the insulin-signaling pathway was studied in the forebrain cortex and cerebellum of Wistar rats. Anesthetized rats received a bolus injection of saline or insulin through the cava vein after which fragments of cerebellum and forebrain cortex were excised and immediately homogenized. Insulin receptor and p46^{SHCA} phosphorylation, and p46^{SHCA}/GRB2 association were detected by immunoprecipitation and blotting with specific antibodies. Insulin stimulated the rapid phosphorylation of its receptor in cerebellum, followed by p46^{SHCA} phosphorylation and GRB2 recruitment. The optimal insulin dose for the induction of p46^{SHCA}/GRB2 binding was 60 µg, and time-course experiments showed that maximum phosphorylation/binding occurred 2–3 min after stimulation. Although insulin receptors and SHC were present in forebrain cortex, there was no increase in their phosphorylation, nor was there any recruitment of GRB2 following stimulation with insulin. Thus, although elements involved in the early intracellular response to insulin are present in the central nervous system, differences in their activation/regulation may account for the functional roles of insulin in these tissues. © 1999 Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Insulin; SHC; GRB2; Insulin receptor; Brain; Cerebellum

1. Introduction

Recent evidences suggest that insulin may act as an afferent metabolic signaler to the central nervous system (CNS). Various functions for insulin in the CNS have been suggested, including a role in neuronal growth and differentiation [37], neuronal and glial cell metabolism [37], and the central regulation of autonomic function and body weight [51].

The impact of diabetes mellitus on CNS function has been demonstrated at neurochemical, electrophysiological, structural and behavioral levels [8,11,28,32,34,35,42,47,55]. Some studies have reported an association of insulin resistance and diabetes with Alzheimer's disease, and have suggested that senile memory loss may be associated with central resistance to insulin action [29,30,32,42,64]. Indeed, reduced immunoreactivity towards the insulin receptor in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease have been observed [36,56].

The insulin signaling pathway has been widely studied in recent years. Protein blotting and immunocytochemistry have shown that insulin, insulin growth factor-1 (IGF-1) and IGF-2 receptors are expressed in the developing and adult mammalian CNS [9,19,24,26,33,40,46,52,58–60]. Insulin receptor substrate-1 (IRS-1), the main substrate for the insulin receptor, is expressed in several areas of the CNS [2,4,19], although its distribution is distinct from that of insulin and IGF receptors [19]. The lipid-metabolizing enzyme phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), which is involved in insulin-induced glucose uptake by target cells, is also present in various areas of the CNS [19]. SHC and GRB2 [14,38,39,45], two intracellular signaling molecules involved in the mitogenic signals triggered by insulin, together with several growth factors and various cytokines, also occur in the CNS.

SHC is an ubiquitously expressed cytoplasmic protein that serves as a phosphotyrosine substrate for a wide variety of growth factors and cytokine receptors [20,27,41,44]. The mammalian SHC-A gene encodes three overlapping proteins of 46, 52 and 66 kDa that contain a single C-terminal SH2 domain. One of the branches of the insulin-signaling pathway involves SHC phosphorylation fol-

* Corresponding author. Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, 13081-970 Campinas, SP, Brazil. Fax: +55-19-7888925; E-mail: diagnosed@rantac.com.br

lowing autophosphorylation of the insulin receptor in response to insulin binding [41,48]. The tyrosine phosphorylated SHC binds to GRB2, a 23 kDa adaptor protein which is constitutively associated with the proline-rich domain of SOS, a guanylnucleotide exchange factor for p21 Ras [43,49]. Once stimulated, the SHC-GRB2/SOS complex activates a specific mitogenic pathway by removing the mechanism that inhibits initiation of the cell cycle [22,43,53,54,63]. The latter action represents a crucial step in the transmission of the mitogenic signal within the cell.

In the present work, we examined the effect of insulin upon the insulin receptor–p46^{SHCA}–GRB2 branch of the insulin-signaling pathway in the forebrain cortex and cerebellum of rats.

2. Materials and methods

2.1. Antibodies, chemicals and buffers

Antisera against the insulin receptor, SHC and GRB2 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Antibodies against phosphotyrosine were from UBI (Lake Placid, NY). ¹²⁵I-Protein A was from Amersham (Buckinghamshire, UK). Protein A–Sepharose 6MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden). The other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO). Buffer A consisted of 100 mM Tris, 1% Triton X-100, 50 mM Hepes (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 aprotinin/ml. Buffer B contained 100 mM Tris, 10 mM sodium vanadate, 10 mM EDTA and 1% Triton X-100.

2.2. Animals

Male Wistar rats (6 weeks old/150–200 g) from the University's animal breeding facilities were used throughout these experiments. The rats were allowed access to standard rodent chow and water ad libitum. Food was withdrawn 12 h before the experiments. The rats were anesthetized with sodium amobarbital (15 mg/kg body weight, i.p.), and used after the loss of corneal and pedal reflexes.

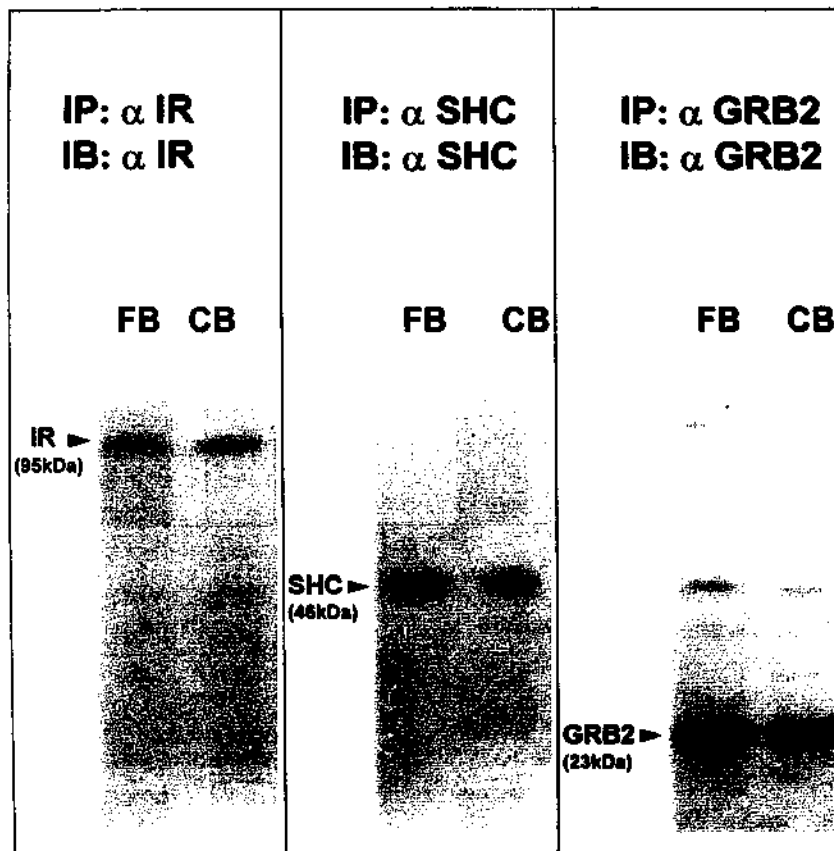


Fig. 1. Presence of IR, SHC and GRB2 in the forebrain cortex (FB) and cerebellum (CB) of rats. Proteins from FB and CB were isolated as described in Section 2. Briefly, rats were anesthetized and fragments from each tissue were excised and homogenized in extraction buffer A at 4°C. After centrifugation, aliquots of the homogenate supernatants containing equal amounts of protein were immunoprecipitated (IP) with anti-IR, anti-SHC or anti-GRB2 antibodies and the immunocomplexes collected with protein A–Sepharose 6MB and then resolved on SDS-PAGE. The protein bands were subsequently transferred to nitrocellulose membranes and detected by immunoblotting (IB) with anti-IR, anti-SHC and anti-GRB2 antibodies and ¹²⁵I-protein A, after which the membranes were autoradiographed.

2.3. Tissue extraction, immunoprecipitation and blotting

Insulin (60 μ g in 500 μ l of saline, or as stated in the dose–response experiments) or saline alone (500 μ l) was injected via the abdominal cava vein. A fragment of the forebrain cortex or cerebellum was excised 3 min later (or as stated in time-course experiments) and immediately homogenized in freshly prepared buffer A. Insoluble material was removed by centrifugation for 45 min (50 000 $\times g$) at 4°C. The protein concentration of the supernatant was determined by the Bradford method [10]. The doses of insulin used in the dose–response experiments and the time lag for tissue extraction in the time-course experiments are presented in Section 3.

Samples containing 3 mg of total protein were incubated with 10 μ L of anti-IR or anti-SHC antiserum at 4°C overnight, followed by incubation with Protein A–Sepharose 6MB for 2 h. The pellets were washed five times in ice-cold buffer B, resuspended in 30 μ l of Laemmli sample buffer [31], and boiled for 5 min prior to loading onto polyacrylamide gels. Electrophoresis, blotting and signal detection using antibodies against phosphotyrosine, IR, SHC and GRB2 were performed as described previously [50,57,62].

2.4. Data presentation and statistical analysis

Where appropriate, the results are expressed as the mean $\pm$ SEM of the indicated number of experiments.

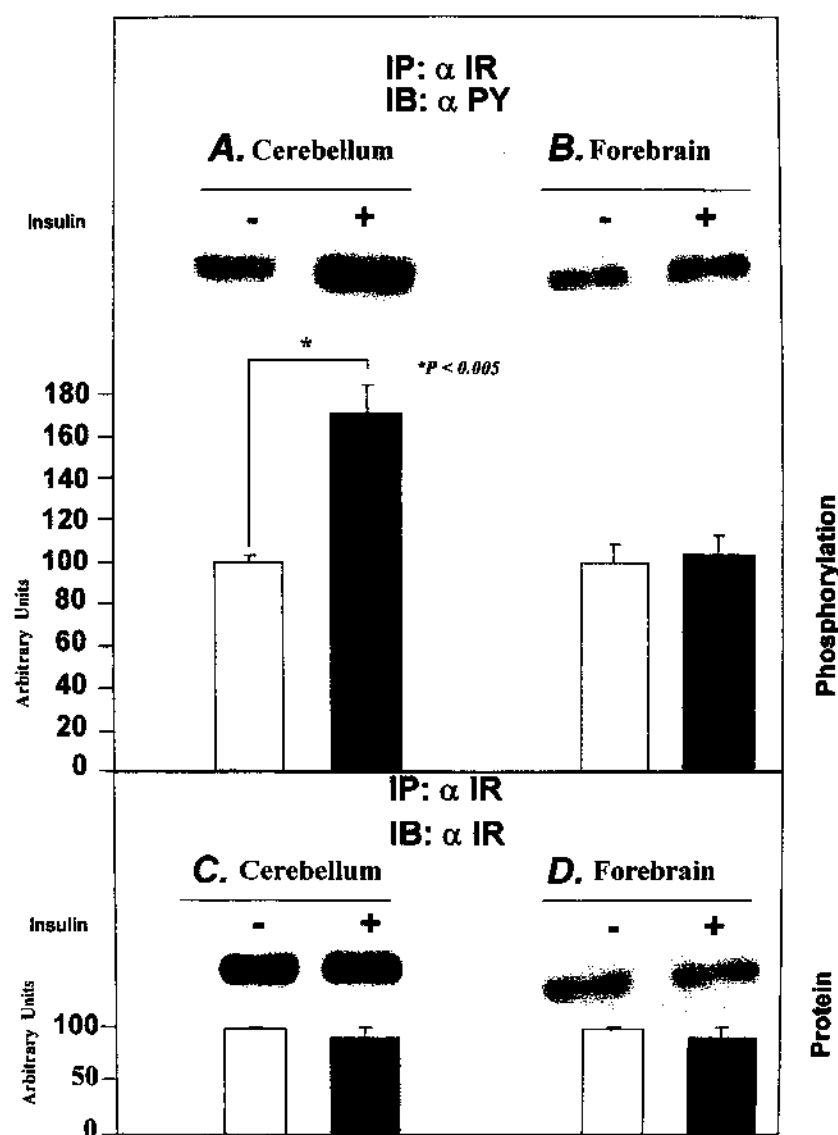


Fig. 2. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IR. Forebrain cortex and cerebellum samples were extracted and homogenized as described in Fig. 1, 4 min after the i.v. injection of saline (–) or 60 μ g of insulin (+), as shown in the figure. Aliquots of the homogenate supernatants containing equal amounts of protein were immunoprecipitated with anti-IR and the immunocomplexes were collected with protein A–Sepharose 6MB and then resolved on 6% SDS-PAGE. The proteins were transferred to nitrocellulose membranes and detected with antiphosphotyrosine (Py) (A/B) or the same antibodies (C/D) and 125 I-protein A followed by autoradiography ($n = 17$, $*p < 0.005$).

Immunoblots are presented as direct comparisons of the bands seen in the fluorographs. The band intensities were quantified by densitometry. Student's *t*-test for paired data was used in all statistical comparisons with $p < 0.05$ indicating significance.

3. Results

The presence of insulin receptor, SHC and GRB2 in forebrain cortex and cerebellum of rats was investigated by

immunoprecipitation and immunoblotting with specific antibodies. All three elements analyzed were readily detected in both tissues (Fig. 1) and the amount of each was similar in all tissues as shown by blotting of tissue extracts. The predominant isoform of SHC observed in forebrain cortex and cerebellum was p46^{SHCA}. For this reason, we referred to this protein only as p46^{SHCA}.

Treatment with insulin significantly increased phosphorylation of the insulin receptor in cerebellum (saline-treated $100\% \pm 2\%$ vs. insulin-treated $171\% \pm 13\%$, $p < 0.005$)

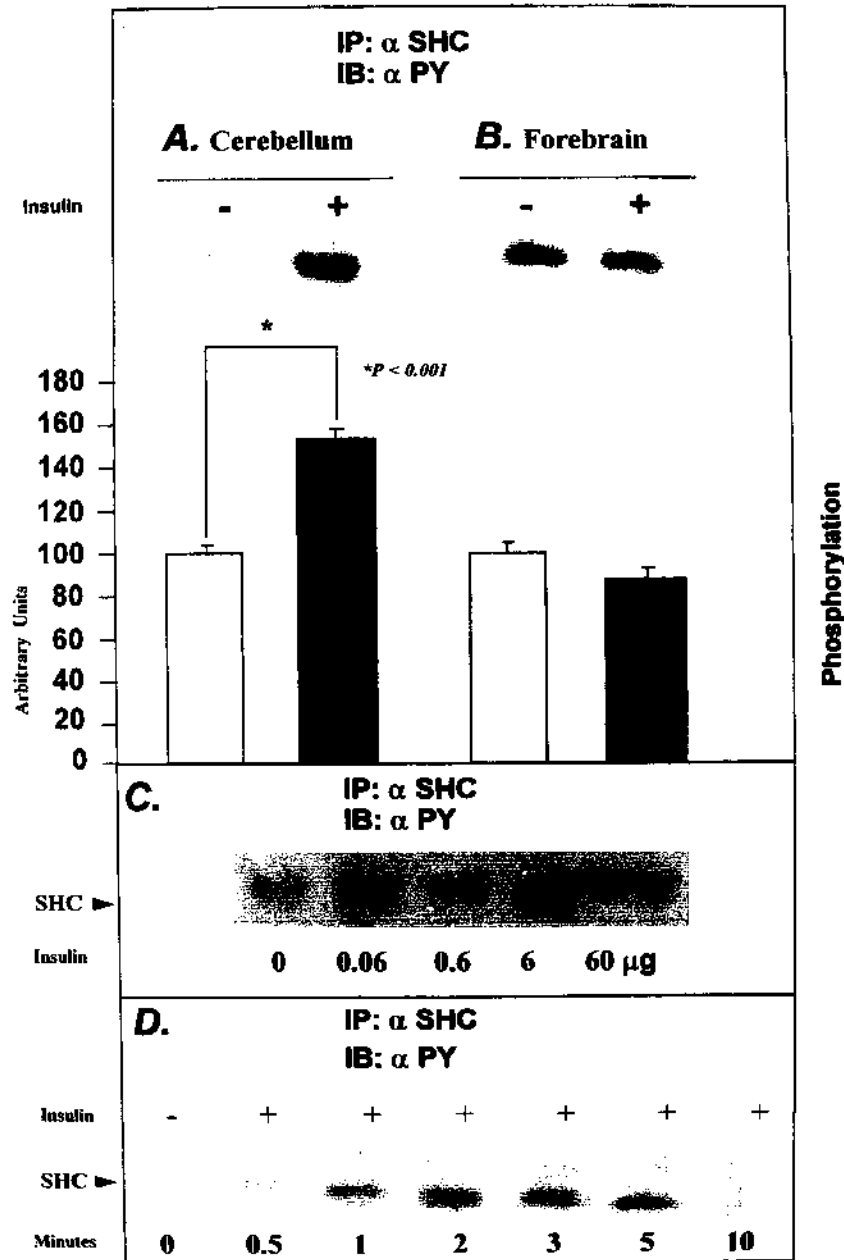


Fig. 3. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of SHC. Forebrain cortex and cerebellum samples were extracted and homogenized as described in Fig. 1. Saline (–) or insulin (+) was administered i.v. as a bolus injection. Aliquots of homogenate supernatants containing equal amounts of protein were immunoprecipitated with anti-SHC and protein A–Sepharose 6MB and then resolved on 10% SDS-PAGE ($n = 13$, $*p < 0.001$) (A/B). In dose–response experiments (C), the forebrain cortex and cerebellum were excised 3 min after insulin infusion and homogenized in extraction buffer at 4°C, immunoprecipitated with anti-SHC antibody and immunoblotted as described in the legend for Fig. 2 ($n = 2$). In time-course experiments (D), 60 μ g of insulin was injected i.v. and the cerebellum was excised and homogenized in extraction buffer at the indicated time ($n = 2$).

(Fig. 2A). No tyrosine phosphorylation was observed in forebrain cortex following an insulin load (Fig. 2B). Stimulation with insulin did not change the amount of insulin receptor protein in forebrain cortex (saline-treated $100\% \pm 4\%$ vs. insulin-treated $82\% \pm 14\%$) (Fig. 2C) or cerebellum (saline-treated $100\% \pm 4\%$ vs. insulin-treated $102\% \pm 10\%$) (Fig. 2D), as detected by immunoprecipitation and blotting of tissue extracts.

The administration of insulin significantly increased p46^{SHCA} phosphorylation in cerebellum (saline-treated $100\% \pm 2\%$ vs. insulin-treated $153\% \pm 6.5\%$, $p < 0.001$)

(Fig. 3A), but not in forebrain cortex (Fig. 3B). Dose-response experiments revealed that maximal insulin-induced p46^{SHCA} phosphorylation occurred between 0.6 μg and 60 μg of insulin (Fig. 3C), while time-course experiments showed maximal stimulation to occur between 2–3 min post-administration, the phosphorylation returned to near-basal levels after 10 min (Fig. 3D). The insulin-induced binding of insulin receptor and p46^{SHCA} was analyzed using 60 μg of insulin and a 3 min exposure. Extracts of forebrain cortex or cerebellum from rats treated with saline or insulin were immunoprecipitated with antiserum against

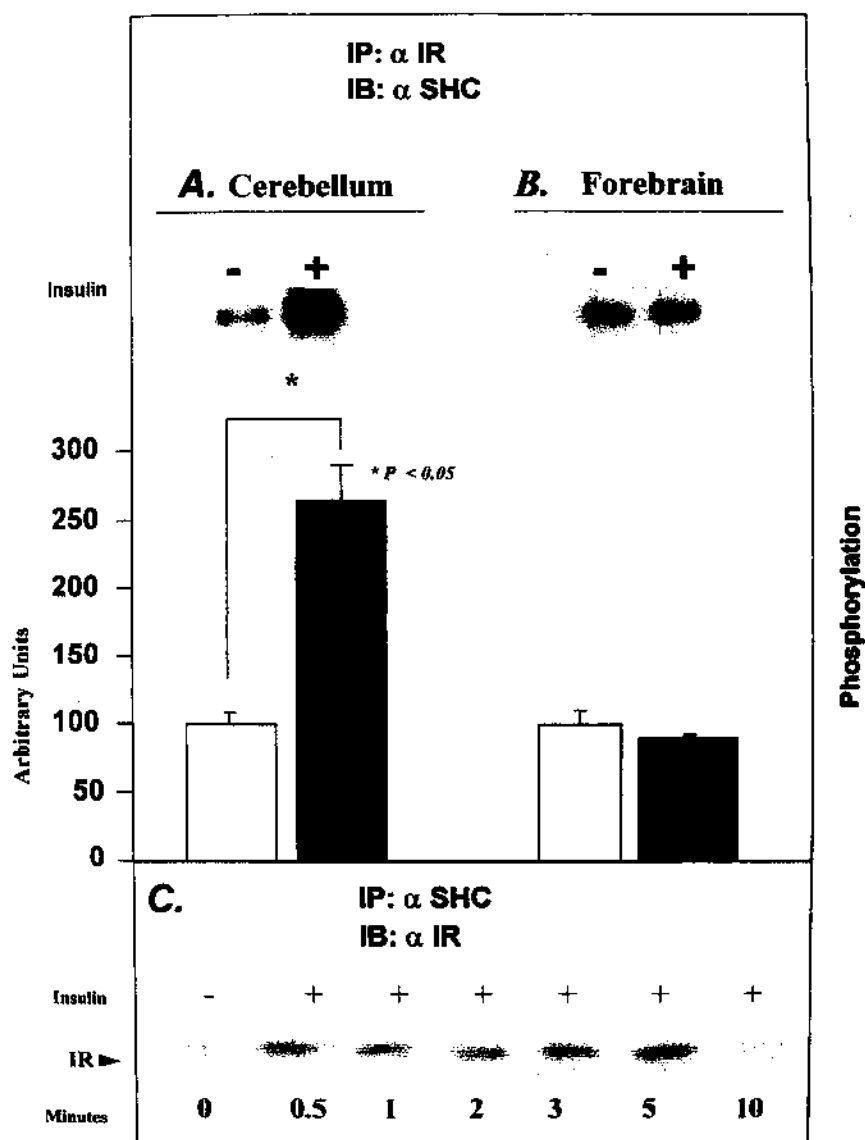


Fig. 4. Insulin-stimulated association of IR/SHC. Forebrain cortex and cerebellum fragments were extracted and homogenized as described in the legend for Fig. 1 after the i.v. injection of saline (–) or 60 μg of insulin (+). Aliquots of the homogenate supernatants containing equal amounts of protein were immunoprecipitated with anti-IR antibodies and then resolved on 6% SDS-PAGE (A/B). The proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and detected with anti-SHC antibody and ^{125}I -protein A followed by autoradiography ($n = 5$, $*p < 0.05$). For the time course of the SHC-IR association in cerebellum (C), saline (–) or 60 μg of insulin (+) was administered i.v. as a bolus injection, and the cerebellum excised and homogenized in extraction buffer A at the indicated time. Aliquots of the homogenate supernatants containing equal amounts of protein were immunoprecipitated with anti-SHC antibodies and then resolved by SDS-PAGE on 6% gels. The proteins were transferred to nitrocellulose membranes and detected with anti-IR antibody and ^{125}I -protein A followed by autoradiography ($n = 2$).

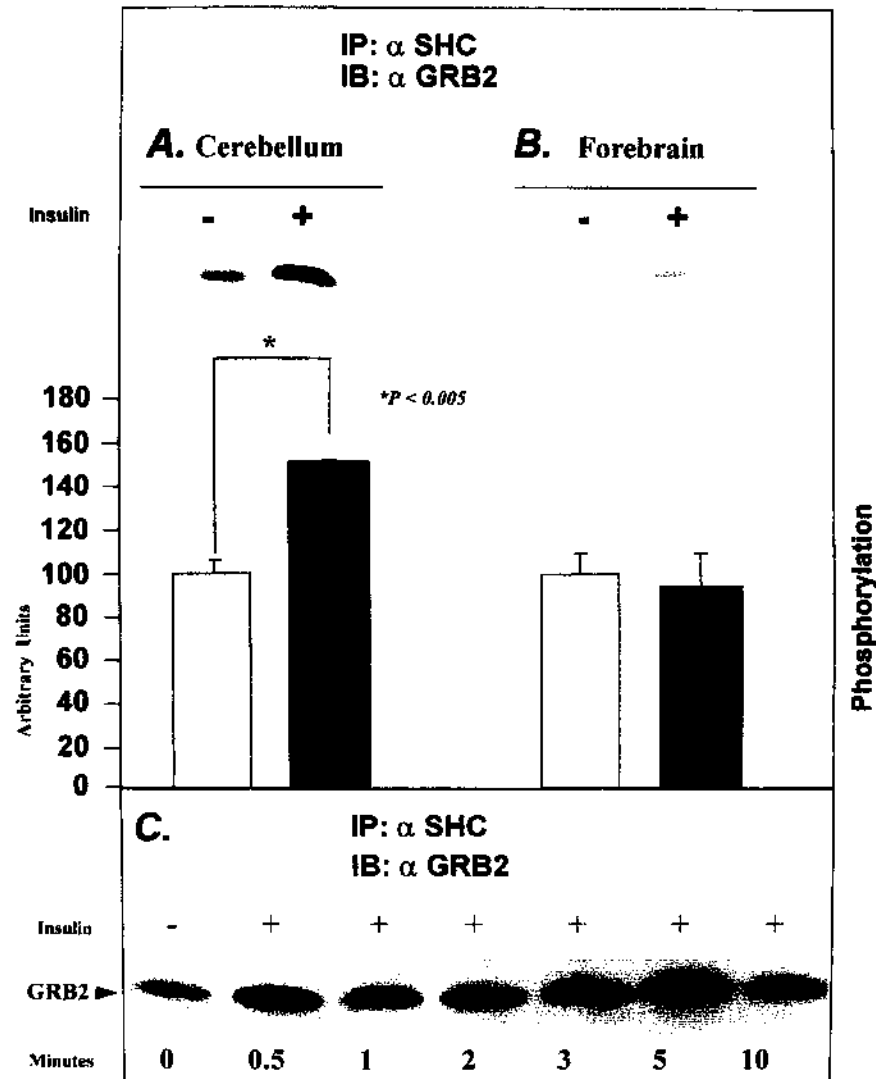


Fig. 5. Insulin-stimulated SHC-GRB2 association. Samples of forebrain cortex and cerebellum were immunoprecipitated with anti-SHC antibodies 3 min after an intra venous injection of saline (–) or 60 μ g of insulin (+). Aliquots of the homogenate supernatants containing equal amounts of protein were immunoprecipitated with anti-SHC antibodies and then resolved by SDS-PAGE on 10% gels (A/B). The proteins were transferred to nitrocellulose membrane and detected with anti-GRB2 antibodies and 125 I-protein A followed by autoradiography ($n = 12$, * $p < 0.005$). For the time-course of the insulin-stimulated SHC/GRB2 association in cerebellum (C), saline (–) or insulin (+) was administrated i.v. and tissue samples then obtained at the indicated time. Aliquots of the homogenate supernatants containing equal amounts of protein were immunoprecipitated and detected as described in Fig. 2 ($n = 2$).

insulin receptor and blots were performed using anti-p46^{SHCA} antibodies. Insulin induced insulin receptor/p46^{SHCA} association in cerebellum (saline-treated 100% $\pm$ 9.5% vs. insulin-treated 257% $\pm$ 26%, $p < 0.05$) but not in forebrain cortex (Fig. 4A,B). Time-course experiments demonstrated that binding of p46^{SHCA} to the insulin receptor in cerebellum occurred within 30 s and was maximal at 2 min (Fig. 4C).

The insulin-induced association p46^{SHCA}/GRB2 was examined in forebrain cortex and cerebellum 3 min after administering 60 μ g of insulin. Insulin increased the association of p46^{SHCA} and GRB2 in cerebellum (saline-treated 100% $\pm$ 3%, vs. insulin-treated 152% $\pm$ 1%, $p < 0.005$) (Fig. 5A), but not in forebrain cortex (Fig. 5B). Time-course experiments showed that increased association was

already present after 30 s and was maximal at 2 min (Fig. 5C).

4. Discussion

The presence of insulin and insulin receptors in the brain indicates that this pancreatic hormone may play a physiological role in the CNS. Initial reports suggested that brain insulin was produced within the CNS [23], although current knowledge points to a pancreatic origin for all insulin in the CNS [13]. The key determinants of insulin levels within the brain are the plasma insulin level and the efficiency with which insulin crosses the blood–brain barrier (BBB) [3,16,18,51]. The likely existence of a special-

ized transport system for insulin across the BBB does not exclude a potentially important role for diffusion as a means of delivering insulin to certain brain areas [7,18]. The circumventricular organs of the brain, for example, are known to be supplied by a vasculature lacking a BBB, and plasma solutes diffuse freely into these areas [7,61]. Few studies have investigated the time-course of plasma insulin uptake by the CNS. Apparently, labeled insulin levels rise slowly and constantly in cerebrospinal fluid (CSF) from 30 min up to 180 min after an infusion of the hormone. However, the presence of labeled insulin is detected much faster (as early as 1 min) in certain regions of the CNS parenchyma [18]. Thus, it is suggested that circulating insulin localize initially in the parenchyma of certain regions, and subsequently in the CSF [3,5,6,51]. The delivery of plasma insulin to the CNS is saturable, and is likely facilitated by an insulin receptor-mediated transport process.

Cranston et al. [15] demonstrated that in diabetic patients cerebellum glucose metabolism was lower than in the cortex and that the ratio between the rate constants for glucose uptake and phosphorylation was reversed. There are regional differences in the cerebral metabolic capacity that could explain why the cerebral cortex is more sensitive to hypoglycemia than the cerebellum. Brain glucose metabolism is not sensitive to the insulin concentration within the physiological range. This suggests that intracerebral insulin receptors have a different role from peripheral receptors.

Most studies of insulin action in the CNS have been performed with cultured cells [2,4,38,39]. Insulin exerts primarily growth promoting and synaptic modulatory effects in neurons [51] and glioma cells [37], while the regulation of glucose metabolism is independent of insulin [51]. Thus, glucose transport, glucose oxidation and glycogen synthesis are not altered in chick embryo neurons exposed to insulin [25]. However, glial cells may be insulin-sensitive since insulin stimulates glucose uptake in rat brain glial cells [12] and human glioblastoma cells [21] and enhances glycogen accumulation in astroglia-rich primary cultures from neonatal rat brain [17].

SHC protein is involved in the coupling of activated tyrosine kinase growth factor receptors to the Ras activation pathway [43,49]. In contrast to IRS-1 and IRS-2 which can associate with a wide variety of downstream effector molecules, the tyrosine phosphorylation of SHC protein leads to specific association with a small 23 kDa adaptor protein, growth factor receptor-bound protein-2, GRB2 [22,43]. GRB2 is constitutively associated with the proline-rich domain of son of sevenless (SOS), a guanyl-nucleotide exchange factor for p21 GTP-binding protein Ras [22,43,63].

The role of SHC activation in the CNS is currently under intense investigation. In neuronal cells, SHC is involved in Ras-dependent MAP kinase activation [37,45], and channels the incoming signals towards cell growth.

The adult mammalian brain comprises many functionally distinct neuronal types which are generated during development as a result of a coordinated signaling cascade that drives neuroblasts from proliferation into differentiation. Conti et al. [14] reported that the expression and activation of SHC A proteins in forebrain were strictly regulated temporally and spatially during embryonic development. These phenomena were peculiar to SHC A since the GRB2 adaptor protein was expressed at a constant level throughout development.

In the present work, we analyzed the activation of the early steps of an intracellular growth-promoting pathway linked to the insulin signal in forebrain cortex and cerebellum of rats. In both sites we detected IR, p46^{SHCA}, and GRB2. In adult rats p46^{SHCA} is not present in the cerebral cortex, but is transiently expressed in certain areas of the embryonic brain. A persistent zone of proliferative activity is present in the forebrain of rats during the first few weeks after birth [1]. The present finding of p46^{SHCA} in forebrain cortex coincides with residual growth activity in this region. Although present in the forebrain and cerebellum, the functional regulation of IR, SHC and GRB2 seems to be different. Thus, in cerebellum, insulin induced a rapid phosphorylation of the insulin receptor which was followed by p46^{SHCA} binding and phosphorylation and GRB2 engagement. Time-course experiments detected the insulin receptor/p46^{SHCA} association as early as 30 s after insulin infusion, and p46^{SHCA} phosphorylation and GRB2 binding followed immediately. Dose-response experiments showed that the events were triggered by physiological concentrations of insulin.

In contrast to cerebellum, no response to insulin was detected in forebrain cortex. In prolonged time-course experiments (up to 20 min) or at high doses of insulin (up to 60 µg), there was no increase in insulin receptor phosphorylation, p46^{SHCA} binding/phosphorylation or p46^{SHCA}/GRB2 binding. The possibility that insulin uptake by forebrain cortex is much slower than by cerebellum cannot be discarded. If insulin does stimulate insulin receptor phosphorylation in the former tissue, it must do so in a manner different from that observed in most other target tissues for insulin.

Acknowledgements

The authors thank A.C. Thirone, C.R. Carvalho, L. Janeri and M.C. Silva for technical assistance. This work was supported by FAPESP, CAPES and CNPq.

References

- [1] J. Altman, Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis: IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb, *J. Comp. Neurol.* 137 (1969) 433–458.

- [2] D.A. Antonetti, P. Algenstaedt, C.R. Kahn, Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 2195–2203.
- [3] W.A. Banks, J.B. Jaspan, A.J. Kastin, Selective, physiological transport of insulin across the blood–brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays, *Peptides* 18 (1997) 1257–1262.
- [4] D.G. Baskin, M.W. Schwartz, A.J. Sipols, D.A. D'Alessio, B.J. Goldstein, M.F. White, Insulin receptor substrate 1 (IRS-1) expression in rat brain, *Endocrinology* 134 (1994) 1952–1955.
- [5] G.D. Baura, D.M. Foster, D. Porte Jr., S.E. Kahn, R.N. Bergman, C. Cobelli, M.W. Schwartz, Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo, *J. Clin. Invest.* 46 (1993) 1824–1830.
- [6] G.D. Baura, D.M. Foster, K. Kaiyala, D. Porte Jr., S.E. Kahn, M.W. Schwartz, Insulin transport from plasma into the central nervous system is inhibited by dexamethasone in dogs, *Diabetes* 45 (1996) 86–90.
- [7] D.J. Begley, Peptides and the blood–brain barrier: the status of our understanding, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 739 (1994) 89–100.
- [8] G.J. Biessels, A.C. Kappelle, B. Bravenboer, D.W. Erkelens, W.H. Gispen, Cerebral function in diabetes mellitus, *Diabetologia* 37 (1994) 643–650.
- [9] N.J. Bohannon, E.S. Corp, B.J. Wilcox, D.P. Figlewicz, D.M. Dorsa, D.G. Baskin, Localization of binding sites for insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the rat brain by quantitative autoradiography, *Brain Res.* 444 (1988) 205–213.
- [10] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–259.
- [11] S. Busiguina, J.A. Chowen, J. Argente, I. Torres-Aleman, Specific alterations of insulin-like growth factor I system in the cerebellum of diabetic rats, *Endocrinology* 137 (1996) 4980–4987.
- [12] D.W. Clarke, F.T. Boyd, M.S. Kappy, M.K. Raizada, Insulin binds to specific receptors and stimulates 2-deoxyglucose uptake in cultured glial cells from rat brain, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 11672–11675.
- [13] G.T.I. Coker, D. Studelska, S. Harmon, W. Burke, K.L. O'Malley, Analysis of tyrosine hydroxylase and insulin transcripts in human neuroendocrine tissues, *Mol. Brain Res.* 8 (1990) 93–98.
- [14] L. Conti, C. De Fraja, M. Gulisano, E. Migliaccio, S. Govoni, E. Cattaneo, Expression and activation of SH2/PTB-containing ShcA adaptor protein reflects the pattern of neurogenesis in the mammalian brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 8185–8190.
- [15] I. Cranston, P. Marsden, K. Matyka, M. Evans, J. Lomas, P. Sonksen, M. Maisey, S.A. Amiel, Regional differences in cerebral blood flow and glucose utilization in diabetic man: the effect of insulin, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18 (1988) 130–140.
- [16] C. Crone, Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue, *J. Physiol.* 181 (1965) 103–113.
- [17] R. Dringen, B. Hamprecht, Glucose, insulin and insulin-like growth factor I regulate the glycogen content of astroglia-rich primary cultures, *J. Neurochem.* 58 (1992) 511–517.
- [18] A. Ermisch, P. Brust, R. Kretzschmar, H.-J. Rühle, Peptides and blood–brain barrier transport, *Physiol. Rev.* 73 (1993) 489–527.
- [19] F. Folli, L. Bonfanti, E. Renard, C.R. Kahn, A. Merighi, Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) distribution in the rat central nervous system, *J. Neurosci.* 14 (1994) 6412–6422.
- [20] S. Giorgetti-Peraldi, E. Ottinger, G. Wolf, B. Ye, T.R. Burke Jr., S.E. Shoelson, Cellular effects of phosphotyrosine-binding domain inhibitors on insulin receptor signaling and trafficking, *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 1180–1188.
- [21] G. Grunberger, W.L.J. Lowe, A. McElduff, R.P. Glick, Insulin receptor of human cerebral glioma: structure and function, *J. Clin. Invest.* 77 (1986) 997–1005.
- [22] T.A. Gustafson, W. He, A. Craparo, C.D. Schaub, T.J. O'Neill, Phosphotyrosine-dependent interaction of Shc and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain, *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 2500–2508.
- [23] J. Havrankova, D. Schemechel, J. Roth, M. Brownstein, Identification of insulin in the rat brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 5737–5741.
- [24] J. Havrankova, J. Roth, M. Brownstein, Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat, *Nature* 272 (1978) 827–829.
- [25] K.A. Heidenreich, G. De Villis, P.R. Gilmore, Functional properties of subtype of insulin receptor found in neurons, *J. Neurochem.* 51 (1988) 878–887.
- [26] J.M. Hill, M.A. Lesniak, C.B. Pert, J. Roth, Autoradiographic localization of insulin receptors in the rat brain: prominence in the olfactory and limbic areas, *Neuroscience* 17 (1986) 1127–1138.
- [27] S.J. Isakoff, Y.-P. Yu, Y.-C. Su, P. Blaikie, V. Yajnik, E. Rose, K.M. Weidner, M. Sachs, B. Margolis, E.Y. Skolnik, Interaction between the phosphotyrosine binding domain of Shc and the insulin receptor is required for Shc phosphorylation by insulin in vivo, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 3959–3962.
- [28] W. Kern, C. Schlosser, W. Kerner, R. Pietrowsky, J. Born, H.L. Fehm, Evidence for effects of insulin on sensory processing in humans, *Diabetes* 43 (1994) 351–356.
- [29] L. Kilander, M. Boberg, H. Lithell, Peripheral glucose metabolism and insulin sensitivity in Alzheimer's disease, *Acta Neurol. Scand.* 87 (1993) 284–298.
- [30] J. Kuusisto, K. Koivisto, L. Mykkanen, E.-L. Helkala, M. Vanhanen, T. Hanninen, K. Kervinen, Y.A. Kesäniemi, P.J. Riekkinen, M. Laakso, Association between features of insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease independently of apolipoprotein E4 phenotype: cross-section population-based study, *BMJ* 315 (1997) 1045–1049.
- [31] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [32] C.L. Leibson, W.A. Rocca, V.A. Hanson, R. Cha, E. Kokmen, P.C. O'Brien, P.J. Palumbo, Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study, *Am. J. Epidemiol.* 145 (1997) 301–308.
- [33] M.A. Lesniak, J.A. Hill, W. Kiess, M. Rojeski, C.B. Pert, J. Roth, Receptors for insulin-like growth factors I and II: autoradiographic localization in rat brain and comparison to receptors for insulin, *Endocrinology* 123 (1988) 2089–2099.
- [34] A.L. McCall, The impact of diabetes on CNS, *Diabetes* 41 (1992) 557–570.
- [35] A.D. Mooradian, Diabetic complications of central nervous system, *Endocr. Rev.* 9 (1988) 346–356.
- [36] I. Moroo, T. Yamada, H. Makino, I. Tooyama, P.L. McGeer, E.G. McGeer, K. Hirayama, Loss of insulin receptor immunoreactivity from the substantia nigra pars compacta neurons in Parkinson's disease, *Acta Neuropathol.* 87 (1994) 343–348.
- [37] H. Nakamura, N. Shitara, K. Takakura, Insulin binds to specific receptors and stimulates macromolecular synthesis in C6 glioma cells, *Acta Neurochir.* 93 (1988) 10–12.
- [38] J.P. O'Bryan, C.B. Martin, Z. Songyang, L.C. Cantley, C.J. Der, Binding specificity and mutational analysis of the phosphotyrosine binding domain of the brain-specific adaptor protein ShcC, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 11787–11791.
- [39] J.P. O'Bryan, Z. Songyang, L. Cantley, C.J. Der, T. Pawson, A mammalian adaptor protein with conserved Src homology 2 and phosphotyrosine-binding domains is related to Shc and is specifically expressed in the brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 2729–2734.
- [40] I. Ocran, K.L. Valentino, L.F. Eng, R.L. Hintz, D.M. Wilson, R.G. Rosenfeld, Structural and immunohistochemical characterization of insulin-like growth factor I and II receptors in the murine central nervous system, *Endocrinology* 123 (1988) 1023–1033.
- [41] S. Okada, K. Yamauchi, J.E. Pessin, Shc isoform-specific tyrosine

- phosphorylation by the insulin and epidermal growth factor receptors, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 20737–20741.
- [42] A. Ott, R.P. Stolk, A. Hofman, F. Van Harskamp, D.E. Grobbee, M.M.B. Breteler, Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam study, *Diabetologia* 39 (1996) 1392–1397.
- [43] T. Pawson, Protein modules and signalling networks, *Nature* 373 (1995) 573–580.
- [44] G. Pelicci, L. Lanfrancone, F. Grignani, J. McGlade, F. Cavallo, G. Forni, I. Nicoletti, F. Grignani, T. Pawson, P.G. Pelicci, A novel transforming protein (Shc) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction, *Cell* 70 (1992) 93–104.
- [45] G. Pelicci, L. Dente, A. De Giuseppe, B. Verducci-Galletti, S. Giuli, S. Mele, C. Vetriani, M. Giorgio, P.P. Pandolfi, G. Cesareni, P.G. Pelicci, A family of Shc proteins with conserved PTB/CH1 and SH2 regions, *Oncogene* 13 (1996) 633–641.
- [46] B.I. Posner, P.A. Kelly, R.P.C. Shiu, H.G. Friesen, Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: tissue distribution, species variations and characterization, *Endocrinology* 95 (1974) 521–531.
- [47] G. Pozzessere, E. Valle, S. de Crignis, V.M. Cordischi, F. Fattaposta, P.A. Rizzo, P. Pietravalle, G. Cristina, S. Morano, U. di Mario, Abnormalities of cognitive functions in IDDM revealed by P300 event-related potential analysis, *Diabetes* 40 (1991) 952–958.
- [48] G.J. Pronk, J. McGlade, G. Pelicci, T. Pawson, J.L. Bos, Insulin-induced phosphorylation of 46- and 52-kDa Shc proteins, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 5748–5753.
- [49] M. Rozakis-Adcock, J. McGlade, G. Mbamalu, G. Pelicci, R. Daly, W. Li, A. Batzer, S. Thomas, J. Brugge, P.G. Pelicci, J. Schlessinger, T. Pawson, Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of Ras pathway by tyrosine kinases, *Nature* 360 (1992) 689–692.
- [50] M.J.A. Saad, F. Folli, J. Kahn, C.R. Kahn, Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats, *J. Clin. Invest.* 92 (1993) 2065–2072.
- [51] M.W. Schwartz, D.P. Figlewicz, D.G. Baskin, S.C. Woods, D. Porte Jr., Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance, *Endocr. Rev.* 13 (1992) 387–414.
- [52] R.M. Sherrard, N.A. Richardson, V.R. Sara, Localization of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) immunoreactivity in the olivocerebellar system of developing and adult rats, *Dev. Brain Res.* 98 (1997) 102–113.
- [53] E.Y. Skolnik, A. Batzer, N. Li, C-H. Lee, E. Lowenstein, M. Mohammadi, B. Margolis, J. Schlessinger, The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways, *Science* 260 (1993) 1953–1955.
- [54] E.Y. Skolnik, C-H. Lee, A. Batzer, L.M. Vicentini, M. Zhou, R. Daly, M.J. Myers Jr., J.M. Backer, A. Ullrich, M.F. White, J. Schlessinger, The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine phosphorylated IRS 1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling, *EMBO J.* 12 (1993) 1929–1936.
- [55] M.W.J. Strachan, I.J. Deary, Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction?, *Diabetes Care* 20 (1997) 438–445.
- [56] M. Takahashi, T. Yamada, I. Tooyama, I. Moroo, H. Kimura, T. Yamamoto, H. Okada, Insulin receptor mRNA in the substantia nigra in Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* 204 (1996) 201–204.
- [57] H. Towbin, J. Staehlin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4350–4354.
- [58] J.W. Unger, A.M. Moss, J.N. Livingston, Immunohistochemical localization of insulin receptors and phosphotyrosine in the brainstem of the adult rat, *Neuroscience* 42 (1991) 853–861.
- [59] J.W. Unger, J.N. Livingston, A.M. Moss, Insulin receptors in the central nervous system: localization, signaling mechanisms and functional aspects, *Prog. Neurobiol.* 36 (1991) 343–362.
- [60] J.W. Unger, T.H. McNeill, R.T. Moxley III, M. White, A. Moss, J.N. Livingston, Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain, *Neuroscience* 31 (1989) 143–157.
- [61] M. Van Houten, B.I. Posner, B.M. Kopriwab, J.R. Brawer, Insulin binding sites localized to nerve terminals in rat median eminence and arcuate nucleus, *Science* 207 (1980) 1081–1083.
- [62] L.A. Velloso, F. Folli, X.J. Sun, M.F. White, M.J.A. Saad, C.R. Kahn, Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 12490–12495.
- [63] M.F. White, The insulin signaling system and IRS proteins, *Diabetologia* 40 (1997) S2–S17.
- [64] I. Wickelgen, Tracking insulin to the mind, *Science* 280 (1998) 517–519.

Elsevier Science

Fax: (31) (20) 485 2431

Phone: (31) (20) 485 3415

Postal Address:

Brain Research

Elsevier Science

P.O. Box 2759, 1000 CT Amsterdam
The Netherlands

Courier Service Address:

Brain Research

Elsevier Science

Sara Burgerhartstraat 25, 1055 KV Amsterdam
The Netherlands

* * *

If you need information about your accepted manuscript, proof, etc. then phone or FAX us at the above numbers, stating the journal name and article code number. We can FAX this journal's Instructions to Authors to you which can also be found on the World Wide Web: access under <http://www.elsevier.com>

NEW AND FORTHCOMING TITLES IN ELSEVIER'S NEUROSCIENCE PROGRAMME

BRAIN RESEARCH PROTOCOLS

VOLUME 4/1 IS THE APRIL 1999 ISSUE !

For more information, please contact Joyce Hobbelink, Elsevier Science, PO Box 1527,
1000 BM Amsterdam, The Netherlands. Fax: (31) (20) 485 3342, e-mail: j.hobbelink@elsevier.nl

SUBSCRIPTION AND PUBLICATION DATA 1999

Brain Research (including Molecular Brain Research, Developmental Brain Research, Cognitive Brain Research, Brain Research Protocols and Brain Research Reviews) will appear weekly and be contained in 61 volumes (129 issues): Brain Research, Volumes 815-850 (36 volumes in 72 issues), Molecular Brain Research, Volumes 62-73 (12 volumes in 24 issues), Developmental Brain Research, Volumes 112-118 (7 volumes in 14 issues), Cognitive Brain Research, Volume 7 (1 volume in 4 issues), Brain Research Protocols, Volumes 3 and 4 (2 volumes in 6 issues) and Brain Research Reviews, Volumes 29-31 (3 volumes in 9 issues). Please note that Volume 62 (Issues no. 1 and 2) and 63 (Issue no. 1) of Molecular Brain Research, Volume 7 (Issues no. 1 and 2) of Cognitive Brain Research and Volume 3 (Issues no. 1 and 2) of Brain Research Protocols were published ahead of schedule in 1998, in order to reduce publication time. The volumes remain part of the 1999 subscription year.

Separate subscriptions: Molecular Brain Research, Vols. 62-73, Developmental Brain Research, Vols. 112-118, Cognitive Brain Research, Vol. 7, Brain Research Protocols, Vols. 3 and 4 and Brain Research Reviews, Vols. 29-31, may also be ordered separately. Prices are available from the Publisher upon request. Subscriptions are accepted on a prepaid basis only, unless different terms have been previously agreed upon.

Postage and handling charges include surface delivery except to the following countries where air delivery via SAL (Surface Air Lift) mail is ensured: Argentina, Australia, Brazil, Canada, Hong Kong, India, Israel, Japan, Malaysia, Mexico, New Zealand, Pakistan, P.R. China, Singapore, South Africa, South Korea, Taiwan, Thailand and USA. For all other countries airmail rates are available upon request.

Claims for missing issues must be made within six months of our publication (mailing) date, otherwise such claims cannot be honoured free of charge.

Orders, claims, and product enquiries: please contact the Customer Support Department at the Regional Sales Office nearest you: **New York:** Elsevier Science, P.O. Box 945, New York, NY 10159-0945, USA; phone: (+1) (212) 633 3730, [toll free number for North American customers: 1-888-4ES-INFO (437-4636)]; fax: (+1) (212) 633 3680; e-mail: usinfo-f@elsevier.com. **Amsterdam:** Elsevier Science, P.O. Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands; phone: (+31) 20 4853757; fax: (+31) 20 4853432; e-mail: nlinfo-f@elsevier.nl. **Tokyo:** Elsevier Science, 9-15 Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan; phone: (+81) (3) 5561 5033; fax: (+81) (3) 5561 5047; e-mail: info@elsevier.co.jp. **Singapore:** Elsevier Science, No. 1 Temasek Avenue, #17-01 Millenia Tower, Singapore 039192; phone: (+65) 434 3727; fax: (+65) 337 2230; e-mail: asiainfo@elsevier.com.sg. **Rio de Janeiro:** Elsevier Science, Rua Sete de Setembro 111/16 Andar, 20050-002 Centro, Rio de Janeiro - RJ, Brazil; phone: (+55) (21) 509 5340; fax: (+55) (21) 507 1991; e-mail: elsevier@campus.com.br [Note (Latin America): for orders, claims and help desk information, please contact the Regional Sales Office in New York as listed above].

Advertising information. Advertising orders and enquiries can be sent to: **USA, Canada and South America:** Mr Tino de Carlo, The Advertising Department, Elsevier Science Inc., 655 Avenue of the Americas, New York, NY 10010-5107, USA; phone: (+1) (212) 633 3815; fax: (+1) (212) 633 3820; e-mail: t.decarlo@elsevier.com. **Japan:** The Advertising Department, Elsevier Science K.K., 9-15 Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan; phone: (+81) (3) 5561 5033; fax: (+81) (3) 5561 5047. **Europe and ROW:** Rachel Gresle-Farthing, The Advertising Department, Elsevier Science Ltd., The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK; phone: (+44) (1865) 843565; fax: (+44) (1865) 843976; e-mail: r.gresle-farthing@elsevier.co.uk.

ADONIS Identifier. This Journal is in the ADONIS Service, whereby copies of individual articles can be printed out from CD-ROM on request. An explanatory leaflet can be obtained by writing to ADONIS B.V., P.O. Box 17005, 1001 JA Amsterdam, The Netherlands.

Effects of age on elements of the insulin signaling pathway in central nervous system of rats

Maria Luiza de L. A. Fernandes ^{a, b}, Mário J. A. Saad ^a, Lício A. Velloso^{a*}

^aDepartment of Internal Medicine, State University of Campinas, SP, Brazil

^bPedro Ernesto University Hospital, Department of Internal Medicine, State University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

*Corresponding author. Departamento de Clínica Médica, FCM UNICAMP, 13081 970, Campinas SP, Brazil. FAX +55 19 7888925. E-mail lavelloso@uol.com.br

Abstract

Insulin action in central nervous system has been the focus of crescent investigation in the latest years. Besides playing a complementary role in the control of food ingestion and other functions related to metabolic homeostasis commanded by the hypothalamus, insulin may influence learning, memory, and other cognitive functions of the upper brain. Insulin resistance is known to play a pivotal role in type 2 diabetes. Senile individuals, besides being prone to insulin resistance and consequently to type 2 diabetes, manifest diseases of the central nervous system that may be influenced by disturbances of insulin signaling in brain, such as impairment of memory, Parkinson's disease and Alzheimer's disease. In the present report elements involved in the insulin signaling pathway were investigated for their expression and response to insulin in forebrain cortex and cerebellum of rats aged one day to 60 weeks. Protein content of insulin receptor and SHC did not change significantly along the time frame analyzed. However, tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and SHC, and the association of SHC/GRB2 felt significantly from day one to week 60 of life in both tissues investigated. Moreover, the expression of SHP2, a tyrosine phosphatase involved in insulin signal transduction and regulation of the insulin signal, suffered significant decrease during the lifetime studied in both forebrain cortex and cerebellum of rats. Thus, elements involved in the insulin signaling pathway, are regulated at the expression and/or functional level in central nervous system and, such regulation may play a role in insulin resistance in brain.

1. Introduction

Although a metabolic role for insulin in Central Nervous System (CNS) has been contested on the basis of a lack of action upon glucose uptake and metabolism in neuronal cells (33), undisputed evidences demonstrate that insulin acts in CNS influencing feeding behavior by inducing satiety (33). Receptors for insulin are present in several areas of the CNS with highest concentrations being detected in olfactory bulb (OB), paraventricular nucleus (PVN), arcuate nucleus (ARC) and ventromedial nucleus (VMH) (4, 19, 23, 33). In those hypothalamic nuclei insulin might act in concert with other regulators of feeding behavior, as for example leptin, serotonin, CRH and NPY, in order to maintain the homeostasis of the organism, by regulating the ingestion of food, thermogenesis and the stocks of energy (34). Nevertheless, the presence of both insulin and elements of the insulin signaling pathway in other areas of the CNS has evoked a series of studies attempting to characterize the action of the pancreatic hormone on such sites.

During rat embryogenesis both insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor (IGF-R) are highly expressed in several areas of the CNS and may play a role in growth and development (5, 13, 36). Following birth, a progressive decrease in expression is observed for IR in most regions of the brain, however, in forebrain cortex, cerebellum and several hypothalamic nuclei the presence of IR is still detected at high concentrations during adulthood (13, 20, 23, 28, 36, 44). Concerning IGF-1R, both in cerebellum and several sub-areas of the forebrain, the binding of labeled IGF to brain slices increases slightly from birth to middle adulthood and then decreases progressively (10, 28, 37). However, the levels of IGF-1R transcripts and protein are kept constant throughout life, suffering a subtle decrease in senile rats (37).

Aging is a physiologic condition that leads to insulin resistance (2, 15, 21, 42). The mechanisms that link aging to progressive impairment of insulin action are not completely understood but involve a reduction on insulin stimulated IR, IRS-1 and IRS-2 phosphorylation, followed by a reduced IRS-1/2 associated PI 3-kinase activity in muscle and liver of rats (7). One possible reason for the observed changes in the regular patterns of signal transduction through the IR-IRSs-PI 3-kinase pathway is an increase in tyrosine

phosphatase activity, which may modulate negatively the timing of signaling through molecules activated by receptor tyrosine kinases (24, 41).

Although IRSs are present in SNC they are not phosphorylated in response to acute insulin treatment (3, 12). In fact IRS-1 is not encountered in the same neurons expressing either IR or IGF-1R (12) suggesting that this docking protein may participate in the transmission of the signal generated by hormones or growth factors other than insulin or IGF-1. Nevertheless, acute insulin treatment stimulates IR and SHC phosphorylation and SHC/GRB2 association in cerebellum but not in forebrain cortex of adult rats (11). As levels of protein expression of elements involved in insulin signaling may suffer variations from embryonic life to senility, and supposing that this variation may play a role in the function of insulin in CNS, the objective of the present study was to determine age dependent variations in the expression of IR, SHC, GRB2 and SHP2 in forebrain cortex and cerebellum of rats. IR, SHC and SHC/GRB2 association were also evaluated for their responses to acute insulin treatment during different periods of life.

2. Materials and methods

2.1. Antibodies, chemicals and buffers: Antibodies against IR, SHC, GRB2 and SHP2 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The SHC antibodies utilized recognize both the 46 and 52 kDa isoforms, and by molecular mass analyzes it was determined that the major isoform expressed in post-natal CNS is SHC-A 52. Thus, in the present work when referring to SHC we mean SHC-A 52 kDa. Antibodies against phosphotyrosine (py) were from UBI (Lake Placid, NY). ¹²⁵I-Protein A Sepharose was from Amersham (Buckinghamshire, UK). Protein A Sepharose 6MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden). All the remaining chemicals used in the experiments were from Sigma (St. Louis, MO). Buffer A consisted of 100 mM Tris, 1% (v/v) Triton X-100, 50 mM Hepes (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. Buffer B consisted of 100 mM Tris, 10 mM sodium vanadate, 10 mM EDTA and 1% Triton X-100.

2.2. Experimental Animals: All experiments were performed with male Wistar rats from the University of Campinas Breeding Center. Animals were studied at six different ages; day one (D1), day seven (D7), day twenty one (D21), week 6 (W6), week 16 (W16) and week 60 (W60) after birth. Day one and day seven rats were nursed by their progenitors, while the remaining rats were fed standard rodent chow and water *ad libitum*, the experimental animals were housed under a 12 h light and dark cycle at 23 °C. D1 and D7 rats were separated from their progenitors two hours before the experiments, the remaining rats were food deprived 6-8 hs before experimental procedure. All experiments were approved by the University of Campinas Ethical Committee.

2.3. Experimental procedures: Rats were anesthetized by i.p. injection of sodium amobarbital (15 mg/kg body weight) and experiments started after the loss of corneal and pedal reflexes. The abdominal cavity was opened and insulin (500 μ g /kg body weight, diluted 120 μ g/ml in saline) or saline alone (same volume/kg body weight as the insulin solution) was injected. Three minutes after injection (optimal time as previously determined) (11), a fragment of forebrain cortex or cerebellum was excised and immediately homogenized in buffer A at +4 °C. Insoluble material was removed by centrifugation for 45 min (50,000 x g) at +4 °C. Protein quantification in the supernatants were determined by the Bradford method (6). Samples containing 3 mg of total protein were used in immunoprecipitation experiments with anti-IR, anti-SHC or anti-SHP2 antibodies. Immunoprecipitates were evaluated by SDS-PAGE followed transfer and blotting with specific antibodies (21). IR immunoprecipitates were blotted with anti-IR antibodies and with anti-py antibodies, SHC immunoprecipitates were blotted with anti SHC antibodies, anti-py antibodies and anti-GRB2 antibodies and anti-SHP2 immunoprecipitates were blotted with anti SHP2 antibodies. Visualization of blots was performed by incubating membranes with 125 I-Protein A Sepharose and exposure to RX-films. On each set of experiments, samples collected from rats of each of the studied ages were run side by side in the same gel.

2.4. Statistical analyses: Specific bands present in the blots were quantified by densitometry. Data were analyzed by multivariate ANOVA and is presented as means +/- SEM. A $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

3. Results

3.1. IR and SHC expression are kept constant during life: The protein amount of IR suffers no significant variation from birth to senility in forebrain cortex and cerebellum of rats. As observed in Figure 1 A the variation of IR is kept constant in forebrain cortex while in cerebellum there is a tendency to increase from D1 to D7 and then it stabilizes up to W60 (Fig. 1 B). The observed variation in cerebellum had no statistical significance. Similarly, SHC protein concentration was unaffected by age, either in forebrain cortex or in cerebellum. As depicted in Figures 1 C and 1 D the constancy in SHC protein expression in forebrain cortex or cerebellum is clear and not even the tendency of increase observed for IR in cerebellum in initial days of life was present.

3.2. Tyrosine phosphorylation of IR decreases progressively during life: When IR immunoprecipitates from saline or insulin treated rats were analyzed for tyrosine phosphorylation, a significant and progressive decrease in the ratio of phosphorylation was detected in both forebrain cortex (Fig. 2 A) and cerebellum (Fig. 2 B). In either tissue greater variation occurred from D1 to D7 or from D1 to D21, thereafter the rate of decrease was lower, and only in saline treated IR precipitates from cerebellum, there was again an intensified decrease from W16 to W60 (Fig. 2 A and Fig. 2 B). As no variation occurred in the protein amount of IR in forebrain cortex or cerebellum during the life span analyzed, the observed reduction in phosphorylation was due to reduced incorporation of phosphorus in tyrosine per IR molecule on a stoichiometric basis.

3.3. SHC tyrosine phosphorylation and SHC/GRB2 association decrease progressively during life: SHC immunoprecipitates blotted with anti-py antibodies revealed a progressive decrease in tyrosine phosphorylation in either saline or insulin treated rats, both in forebrain cortex and in cerebellum. As observed in Figures 3 A and 3 B a significant decrease occurred from D1 to W60, with no major oscillations in the various situations analyzed. Similarly to what was observed for IR the decrease in phosphorylation of SHC was due to

reduced phosphorus incorporation per SHC molecule and not due to reduction in SHC concentration.

Insulin-induced association of SHC and GRB2 suffered progressive and significant decrease during lifetime, both in forebrain cortex and in cerebellum (Fig. 4 A and Fig. 4 B). The rate of decrease was similar to that observed for SHC tyrosine phosphorylation. Once more, as SHC and GRB2 (data not shown) protein levels remained stable during the life span analyzed, the observed reduction in SHC/GRB2 association induced by insulin, was a specific phenomena linked to aging and not dependent on substrate availability.

3.4. SHP2 levels decrease during life: The tyrosine phosphatase SHP2 may play an important role as a modulator of hormone and growth factor signaling through receptor tyrosine kinases. As levels of phosphorylation of IR and SHC decreased progressively during life in both forebrain cortex and cerebellum of rats in spite of the constancy of the protein amounts of either signaler, we decided for studying the protein levels of SHP2 during lifetime in the CNS of rats. In both forebrain cortex and cerebellum the levels of SHP2 fell significantly from D1 to W60. From D1 to D7 it was observed a subtle increase in protein amount and thereafter there was a continuous descendent slope until W60, in both tissues analyzed (Fig. 5 A and Fig. 5 B).

4. Discussion

Insulin action in target cells begins with the binding of the hormone to the α subunit of the IR, which leads to the activation of tyrosine kinase activity in the transmembrane β subunit (18, 27, 40). Once activated, the IR undergoes autophosphorylation and subsequently recruits a series of intracellular substrates that will act as docking proteins, directing the insulin message towards specific subcellular compartments and thus modulating cell behavior (39). The main docking proteins of the insulin signaling pathway are the insulin receptor substrates 1 and 2 (IRS 1 and IRS 2), and SHC (26, 39). The IRS proteins are apparently specialized in transmitting the insulin and the IGF-1 signal and only a few other hormones have been shown to activate this pathway (31, 38, 39). The same is not true for SHC, which is an ubiquitous protein expressed as three different isoforms (46 kDa, 52 kDa,

and 66 kDa), and enrolled as an intracellular signal transducer in several signaling pathways (25, 32, 35). SHC is phosphorylated by the IR through a phosphotyrosine binding (PTB) domain located at its amino-terminus (8, 14). Once phosphorylated SHC binds to the GRB2 – SOS complex inducing the relocation of SOS to a juxta-membrane intracellular compartment. At this site SOS promotes the exchange of GDP to GTP associated to Ras, and through this mechanism activates Ras, which will lead to MAPK activation and stimulation of cellular growth and mitogenesis (8).

Insulin action and signal transduction has been mostly evaluated in liver, muscle and adipose tissue, sites of prevailing metabolic importance for the organism (7, 29, 30). Until recently only a few studies had focused on the roles of insulin in CNS. As neuronal cells do not depend on insulin to internalize glucose, diabetologists and endocrine physiologists emphasized their studies on the traditional targets of insulin action. However, since 1978 with the description of insulin (17) and insulin receptors (16) in brain, a rapidly increasing number of publications have been dealing with the characterization of insulin action in CNS. We already have learned that IR is widely distributed in brain with highest concentration in hypothalamus; that IRS-1 is present in CNS but does not coincide with the distribution of IR or IGF-1R (13); and that SHC, GRB2, SHP2 and elements of the MAP kinase signaling pathway are also expressed in various brain regions (1, 11).

In the present study, age dependent variations in the expression of various elements of the insulin signaling pathway were analyzed in forebrain cortex and cerebellum. Some few previous studies have evaluated the variations of IR in brain, most of these studies analyzing binding sites (28, 43, 44) and not protein content (13). When analyzing binding sites for insulin most authors detected a progressive decrease from birth to senility (37), however, Kappy and Raizada (20) working with purified rat brain membranes found no differences in insulin binding sites between term fetus and adults. Analyses of IGF-1 binding sites in brain follows the same pattern, with most authors finding a progressive decrease from birth to adulthood (37). In forebrain cortex and cerebellum extracts evaluated in the present investigation we found no significant changes in the protein amounts of IR and IGF-1R (data not shown) from day 1 to week 60 in male Wistar rats. From an extensive review of the literature we found only one study where IR and IGF-1R expression were evaluated using immuno-reactive methods (13). In this report Garofalo and Rosen (13),

using a panel of antibodies cross-reactive with the beta-subunit of IR and IGF-1R, describe a progressive fall in immunoreactive forms of both receptors from embryonic life to adulthood. Differently of the methodology employed in our study, those authors used non-specific antibodies, performed blots in total brain extracts and based their conclusions in the densitometric quantitations of only two experiments. Concerning a fall in insulin and IGF-1R binding sites described in most studies we believe that it serves as an evaluation of available binding sites at cell surface and may be affected by the dynamics of receptor cycling from internal pools to membrane. By the quantitative methods employed in the present study we define that from day one after birth to week 60 of life (incipient senility) no significant changes occur in the expression of IR in forebrain cortex and cerebellum of rats.

Similarly to IR, no significant variations occurred in the expression of the protein SHC in either tissue analyzed. In recent studies Cattaneo and Pellicci (8) and Conti and collaborators (9) describe a much higher expression of SHC during embryonic life than in adulthood. However, no evaluation of variability during post-natal lifetime was performed.

When analyzing the tyrosine phosphorylated forms of IR and SHC, and the magnitude of SHC/GRB2 association in forebrain cortex and cerebellum of saline or insulin treated rats, a progressive fall from D1 to W60 was encountered in every situation studied. Since activity of the SHC – GRB2 branch of the insulin signaling pathway depends on SHC tyrosine phosphorylation and SHC/GRB2 association we believe that aging may induce impairment of signal transduction through this channel. The signal driven by SHC/GRB2 and SOS leads to Ras and MAPK activation and modulates positively multiple cellular events linked to development, growth and mitogenesis.

Impairment of insulin stimulated phosphorylation of IR, IRS-1/-2 and IRSs/PI3-kinase association/activation was described in muscle and liver of aging rats (7). The results of those experiments and other reports (7, 15, 24) suggested that increased tyrosine phosphatase activity in older rats could be one of the mediators of such observations, and these phenomena could be implicated in the well known insulin resistance observed in aging animals or humans (2, 21, 15). As the tyrosine phosphatase SHP2 is widely expressed in CNS, and is a potential regulator of insulin signaling in brain, we measured SHP2 protein expression during life in forebrain cortex and cerebellum of rats and found that after

a subtle increase from D1 to D7 the level of the protein fell progressively to W60. Although no analyses of direct interaction between SHP2 and the insulin stimulated SHC/GRB2 pathway was performed in the present study, the progressive fall of SHP2 expression in both the tissues analyzed, occurring in parallel with the decrease in IR and SHC phosphorylation, and SHC/GRB2 association is suggestive of a reduction on insulin signal transductor.

In conclusion, during life time, in forebrain cortex and cerebellum of rats the amounts of IR and SHC are kept constant, while basal or insulin stimulated IR and SHC phosphorylation, and SHC/GRB2 association undergo progressive, age dependent fall. During the same period of evaluation the levels of SHP2 protein fall progressively.

Acknowledgments:

The authors thank L. Janeri and R. Pithon for technical assistance. This work was supported by FAPESP, CAPES and CNPq.

References:

1. Araki, T., Yamada, M., Osnishi, H., Sano, S.-I., Uetsuki, T., Hatanaka, H. Shp-2 specifically regulates several tyrosine-phosphorylated proteins in brain-derived neurotrophic factor signaling in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.* 74 (2000) 659-668.
2. 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 (1992) E619-E626.
3. Baskin, D.G., Schwartz, M.W., Sipols, A.J., D'Alessio, D.A., Goldstein, B.J., White, M.F. Insulin receptor substrate 1 (IRS-1) expression in rat brain, *Endocrinology* 134 (1994) 1952-1955.
4. Baskin, D.G., Wilcox, B.J., Figlewicz, D.P., Dorsa, D.M. Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *TINS* 11 (1988) 107-111.

5. Bondy C.R. Transient IGF-1 gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J. Neurosci.* 11(1991) 3442-3455.
6. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-259.
7. Carvalho, C.R.O., Brenelli, S.L., Silva, A.C., Nunes, A.L.B., Velloso, L.A., Saad, M.J.A. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3 kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* (1996), 137: 151-159.
8. Cattaneo, E., Pellicci, P.G., Emerging roles for SH2/PTB-containing Shc adaptor proteins in the developing mammalian brain. *TINS* 21 (1998) 476-481.
9. Conti, L., De Fraja, C., Gulisano, M., Migliaccio, E., Govoni, S., Cattaneo, E. Expression and activation of SH2/PTB-containing Shc A adaptor protein reflects the pattern of neurogenesis in the mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 8185-8190.
10. D'Costa, A. P., Xu, X., Ingram, R.L., Sonntag, W.E. Insulin-like growth factor-1 stimulation of protein synthesis is attenuated in cerebral cortex of aging rats. *Neuroscience* 65 (1995) 805-813.
11. de L.A. Fernandes, M.L., Saad, M.J., Velloso, L.A. Insulin induces tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and SHC, and SHC/GRB2 association in cerebellum but not in forebrain cortex of rats. *Brain Res.* 826 (1999) 74-82.
12. Folli, F., Bonfanti, L., Renard, E., Kahn, C.R., Merighi, A. Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) distribution in the rat central nervous system. *J. Neurosci.* 14 (1994) 6412-6422.
13. Garafolo, R.S., Rosen, A.M. Insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptors during Central Nervous System development: expression of two immunologically distinct receptor β subunits. *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 2806-2817.
14. Giorgetti-Peraldi, S., Ottinger, E., Wolf, G., Ye, B., Burke Jr, T.R., Shoelson, S.E. Cellular effects of phosphotyrosine-binding domain inhibitors on insulin receptor signaling and trafficking. *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 1180-1188.

15. 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 (1983) E93-E100.
16. Havrankova, J., Roth, J., Browstein, M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272 (1978) 827-829.
17. Havrankova, J., Schemechel, D., Roth, J., Browstein, M. Identification of insulin in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 5737-5741.
18. 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 (1986) 11980-11985.
19. Hill, J.M., Lesniak, M.A., Pert, C.B., Roth, J. Autoradiographic localization of insulin receptors in the rat brain: prominence in the olfactory and limbic areas. *Neuroscience* 17 (1986) 1127-1138.
20. Kappy, M., Raizada, M.K. Adult-level insulin binding is present in term fetal rat CNS membranes. *Brain Res.* 249 (1982) 390-392.
21. 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 (1990) E27-E35.
22. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.
23. Moss, A.M., Unger, J.W., Moxley, R.T., Levinngston, J.N. Location of phosphotyrosine-containig proteins by immunocytochemistry in the rat forebrain corresponds to the distribution of the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 4453-4457.
24. 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 (1994) 443-450.
25. Obermeier, A., Lammers, T., Weismuller, K.-H., Jung, G., Schlessinger, J., Ullrich, A. Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 22963-22966.

26. Pérez-Espinoso, V., Carvalho, C.R.O., Alvarez-Rojas, F., Janeri, L., Velloso, L.A., Boschero, A.C., Saad, M.J.A. Insulin induces tyrosine phosphorylation of Shc and stimulates Shc/Grb2 association in insulin-sensitive tissues of the intact rats, *Endocrine* 8 (1998) 193-200.
27. 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 (1989) 8946-8950.
28. Pomerance, M., Gavaret, J.-M., Jacquemin, C., Matricon, C., Toru-Delbauffe, D., Pierre, M. Insulin and insulin-like growth factor 1 receptors during postnatal development of rat brain. *Dev. Brain Res.* 42 (1988) 77-83.
29. 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(1992) 1839-1849.
30. 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 (1993) 2065-2072.
31. 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 (1996) 22100-22104.
32. Sasaoka, T., Rose, D., Jhun, B., Saltiel, A., Draznin, B., Olefsky, J. Evidence for a functional role of Shc proteins in mitogenic signaling induced by insulin, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, 269 (1994) 13689-13694.
33. Schwartz M.W., Figlewicz D.P., Baskin D.G., Woods S.C., Porte Jr. D. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr. Rev.* 13 (1992) 387-414.
34. Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D. Jr., Seeley R.J., Baskin, D.G. Central Nervous system control of food intake. *Nature* 404 (2000) 661-71.
35. Segato, O., Pelicci, G., Giuli, S., Digiesi, P., Difiori, P. P., Mcglade, J. Shc products are substrates of erbB-2 kinase. *Oncogene* (1993) 8 2105-2112.

36. Sherrard, R.M., Richardson, N.A., Sara, V.R., Localization of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) immunoreactivity in the olivocerebellar system of developing and adult rats. *Dev. Brain Res.* 98 (1997) 102-113.
37. Sonntag, W.E., Lynch, C.D., Bennett, S A., Khan, A S., Thornton, P.L., Cooney, P.T., Ingram, R.L., McShane, T., Brunso-Bechtold, J.K. Alterations in insulin-like growth factor-1 gene and protein expression and type 1 insulin-like growth factor receptors in the brain of ageing rats. *Neuroscience* 88 (1999) 269-279.
38. 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 (1996) 12490-12495.
39. Virkamäki, A., Ueki, K., Kahn, C R. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 931-943.
40. 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 (1988) 2969-2980.
41. Yamauchi, K., Milarski, K.L., Saltiel, A.R., Pessin, J.E. Protein tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a require positive effector or for insulin downstream signaling. *Biochemistry* 92 (1995) 664-668.
42. Yoshimasa, Y., Yamada, K., Ida, T., Kakehi, T., Imura, H. Change in insulin action with aging in conscious rats determined by euglycemic clamp. *Am. J. Physiol.* 264 (1988) E319- E327.
43. Zaia, A., Piantanelli, L. Insulin receptors in mouse brain: age-related modifications are corrected by thymus graft. *Mech. Ageing Dev.* 98 (1997) 37-46.
44. Zaia, A., Piantanelli, L. Insulin receptors in the brain cortex of aging mice, *Mech. Ageing Dev.* 113 (2000) 227-132.

Legends of the figures

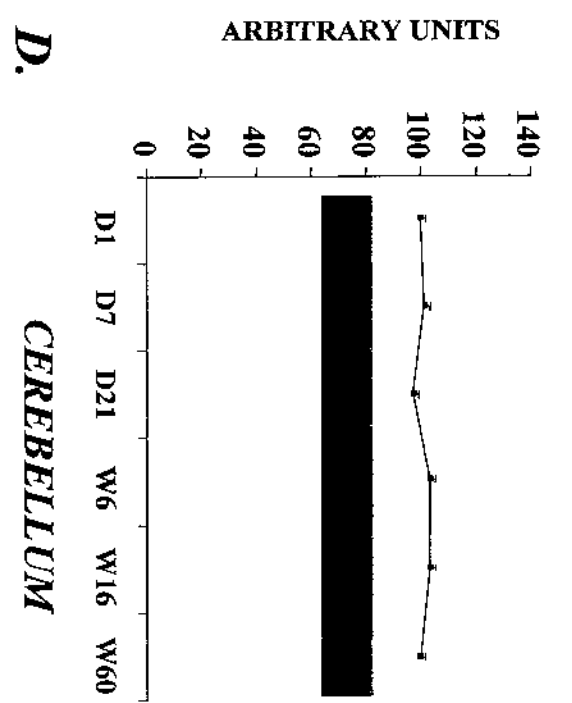
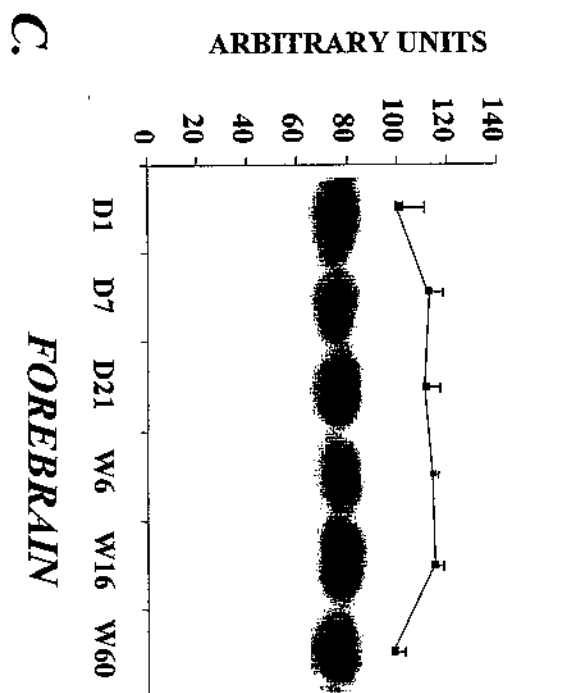
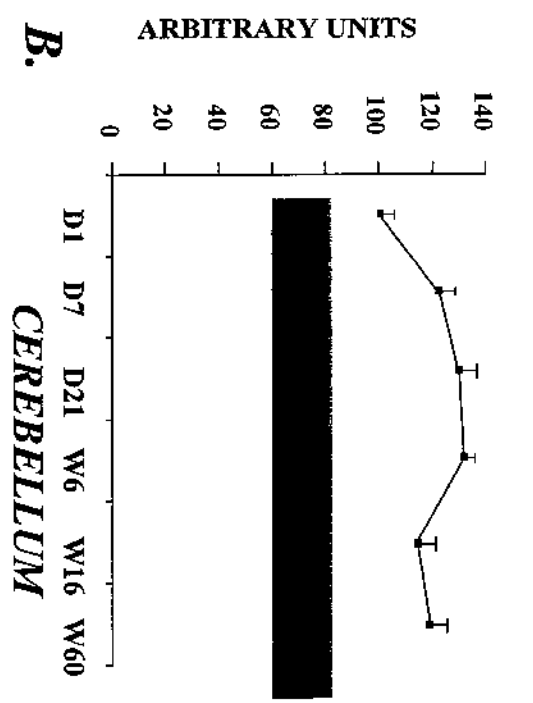
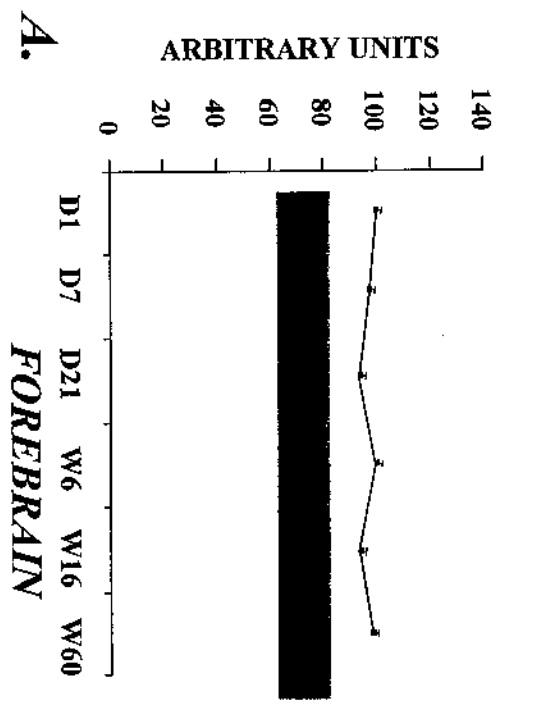
Figure 1. *IR and SHC expression are kept constant during life.* Proteins from forebrain cortex and cerebellum were isolated as described in “Material and Methods”. Briefly, rats were anesthetized and fragments of each tissue were excised and homogenized in extraction buffer B at 4°C. After centrifugation, aliquots of the homogenate supernatants containing equal amounts of protein were immunoprecipitated (IP) with anti-IR or anti-SHC antibodies, the immunocomplexes were collected with protein A-Sepharose 6MB and resolved on SDS-PAGE. The protein bands were subsequently transferred to nitrocellulose membranes and detected by immunoblotting (IB) with anti-IR (A/B) or anti-SHC (C/D) antibodies and ¹²⁵I-protein A, after which the membranes were autoradiographed (n=8, p<0.05).

Figure 2. *Tyrosine phosphorylation of IR decreases progressively during life.* Forebrain cortex and cerebellum were extracted and homogenized as described in Fig. 1, after the i.v. injection of saline (-) or insulin (+). Aliquots of the homogenate supernatants containing equal amounts of protein were immunoprecipitated (IP) with anti-IR and the immunocomplexes were collected with protein A-Sepharose 6MB and then resolved by SDS-PAGE. The proteins were transferred to nitrocellulose membranes and detected with antiphosphotyrosine antibody (py) (A/B) and ¹²⁵I-protein A followed by autoradiography (n=10, p<0.05).

Figure 3. *SHC tyrosine phosphorylation decreases progressively during life.* Forebrain cortex and cerebellum samples were extracted and homogenized as described in Fig. 1. Saline (-) or insulin (+) was administered i.v. as a bolus injection. Aliquots of homogenate supernatants containing equal amounts of protein were immunoprecipitated (IP) with anti-SHC. Immunoprecipitates were resolved on SDS-PAGE. The proteins were transferred to nitrocellulose membranes and detected with antiphosphotyrosine antibody (py) (A/B) and ¹²⁵I-protein A followed by autoradiography (n=10, p<0.05).

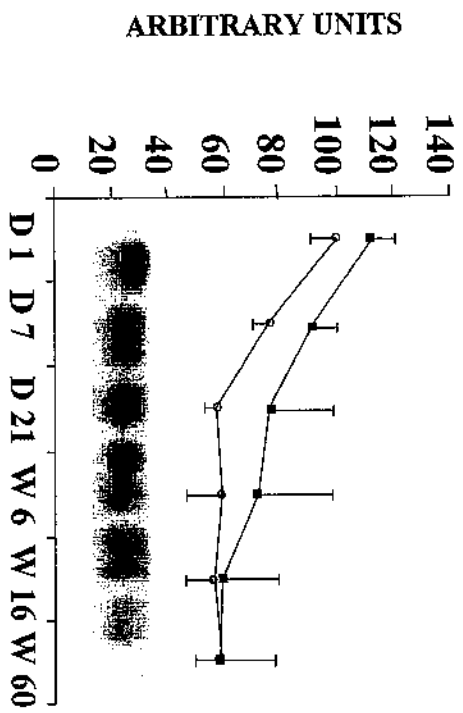
Figure 4. *SHC/GRB2 association decreases progressively during life* Forebrain cortex and cerebellum samples were extracted and homogenized as described in Fig. 1. Saline (-) or insulin (+) was administered i.v. as a bolus injection. Aliquots of homogenate supernatants containing equal amounts of protein were immunoprecipitated (IP) with anti-SHC and resolved on SDS-PAGE. The proteins were transferred to nitrocellulose membranes and detected with anti GRB2 antibodies and 125 I-protein A followed by autoradiography (A/B) (n=10, p<0.05).

Figure 5. *SHP2 levels decrease during life*. Samples of forebrain cortex and cerebellum were immunoprecipitated with anti-SHP2 antibodies. Aliquots of the homogenate supernatants containing equal amounts of protein were immunoprecipitated with anti-SHP2 antibodies and then resolved by SDS-PAGE. The proteins were transferred to nitrocellulose membrane and detected with anti-SHP2 antibodies and 125 I-protein A followed by autoradiography (n=7, p<0.005).



IP: IR
IB: PY

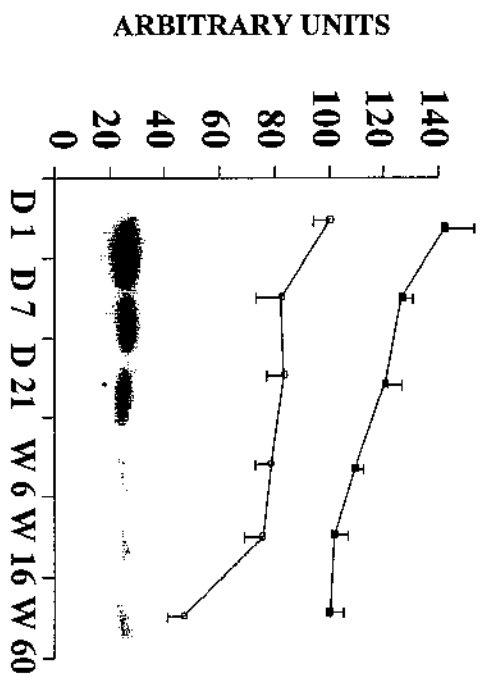
FOREBRAIN



A.

—○— SALINE -
—■— INSULIN +

CEREBELLUM

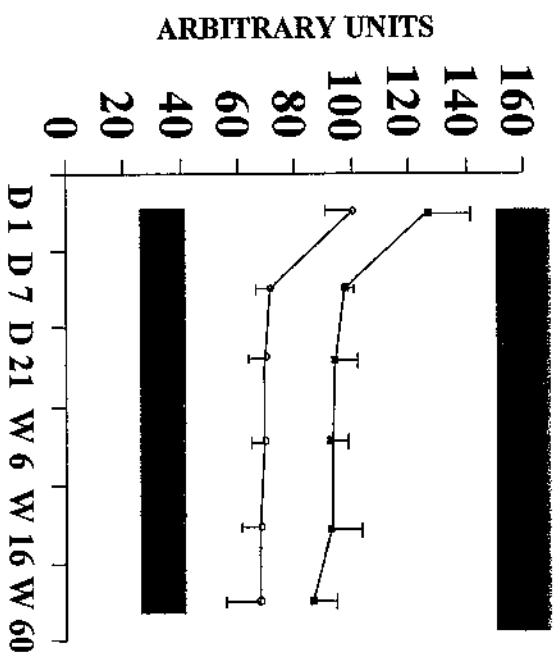


B.

—○— SALINE -
—■— INSULIN +

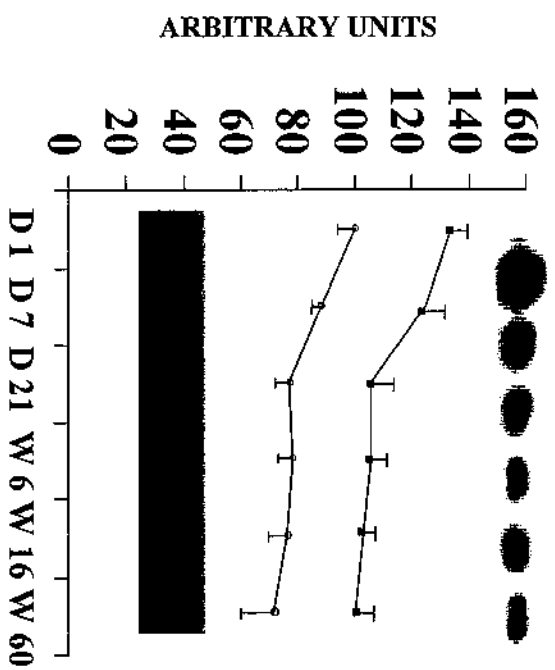
IP: SHC
IB: PY

FOREBRAIN



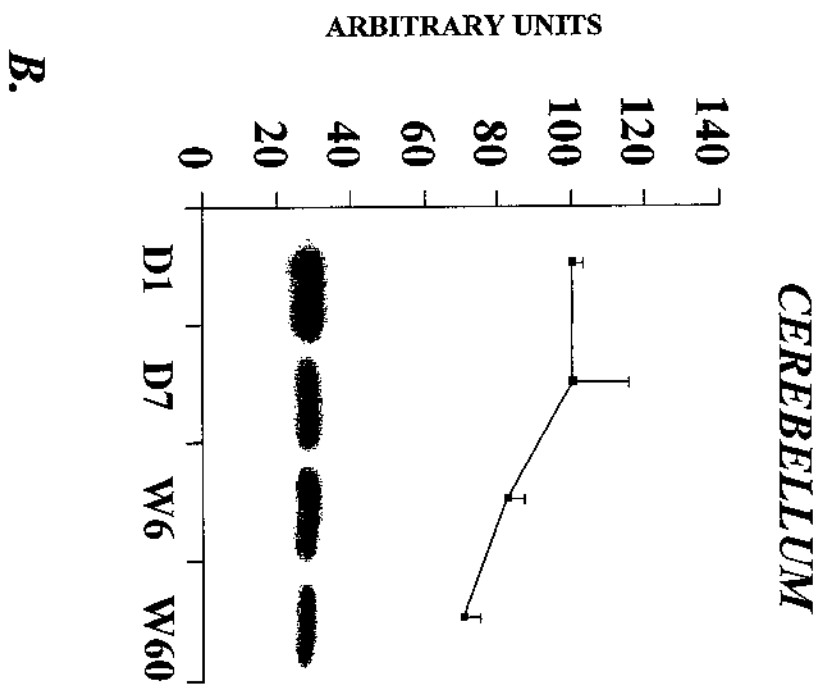
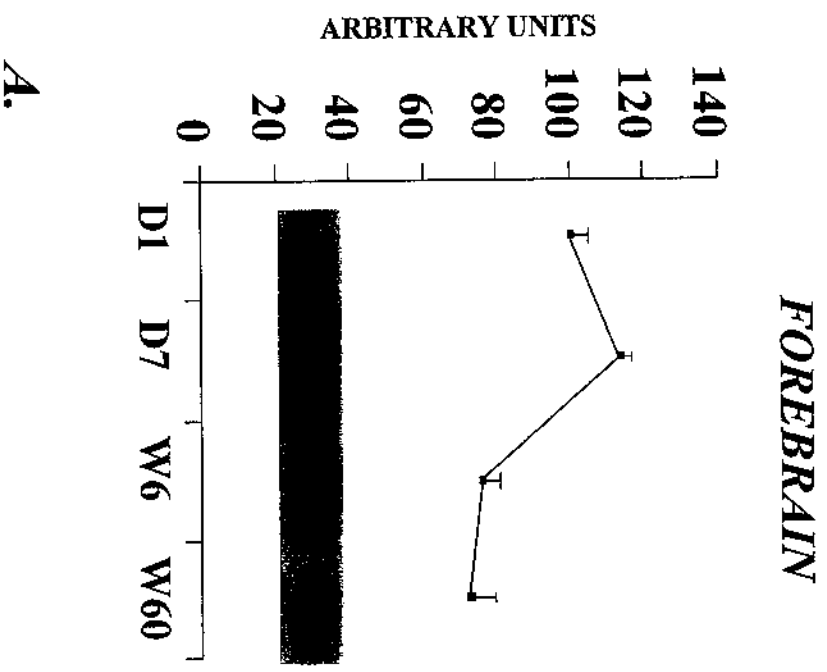
A.

CEREBELLUM



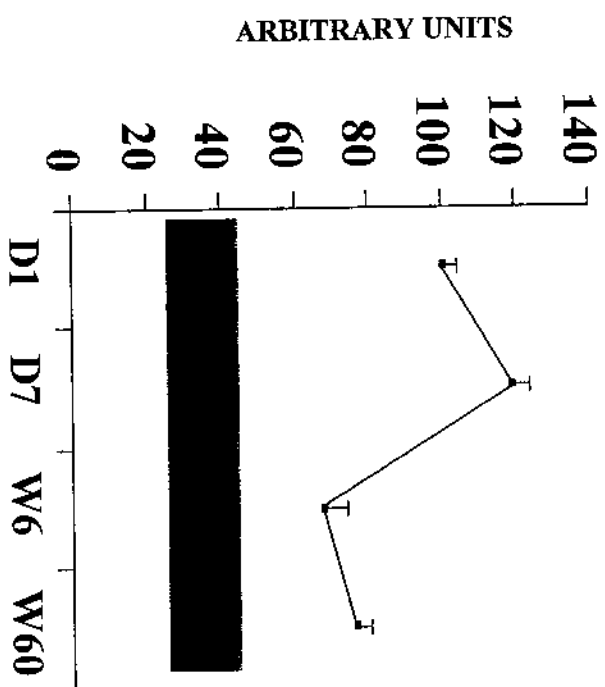
B.

IP: SHC
IB: GRB2



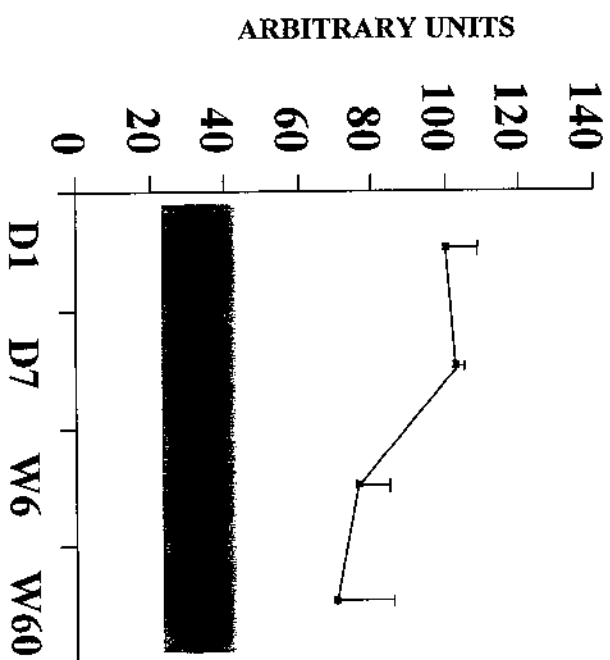
IP: SHP2
IB: SHP2

FOREBRAIN



A.

CEREBELLUM



B.