

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA
NO FÍGADO E MÚSCULO DE
RATOS WISTAR ALIMENTADOS COM
DIETA RICA EM FRUTOSE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência da Nutrição.

Candidata: *Mirian Ueno*

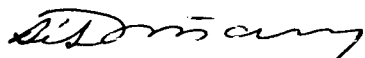
Orientadora: *Prof^a. Dr^a. Débora de Queiroz Tavares*

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

PARECER

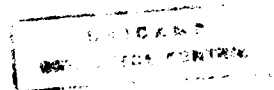
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Mirian Ueno aprovada pela Comissão Julgadora em 06 de agosto de 1998.

Campinas, 06 de agosto de 1998.



Prof^a. Dra. DÉBORA DE QUEIROZ
TAVARES - Presidente da Banca

Campinas
1998



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
De	Ex
TOMBO BC/	35327
PROJ.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	03/10/98
N.º CPD	

CM-00116652-0

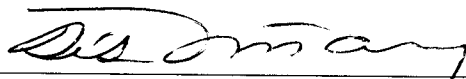
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

UE5e Ueno, Mirian
Etapas iniciais da ação insulínica no fígado e músculo de
ratos wistar alimentados com dieta rica em frutose / Mirian
Ueno. – Campinas: SP [s.n.], 1998.

Orientador: Débora de Queiroz Tavares
Co-orientador: Mario José Abdalla Saad
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

I.Insulina. 2.Insulina – Receptores. 3.Frutose. I.Tavares,
Débora de Queiroz. II.Saad, Mario José Abdalla.
III.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. IV.Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado



Prof. Dr.ª. Débora de Queiroz Tavares
Orientadora



Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero
Membro



Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan
Membro

Prof. Dr. Sigisfredo Luis Brenelli
Membro

Curso de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

*Dedico este trabalho
a meus pais, Julio e Vitória, e ao Gustavo*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Débora de Queiroz Tavares pela orientação e por ter propiciado condições para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad pela orientação segura e competente, e pela oportunidade de aprender a fazer ciência de maneira séria e ao mesmo tempo divertida e agradável.

Às amigas Rosângela e Maria pelo apoio em todos os momentos, pela paciência, troca e transmissão de conhecimentos e pela inestimável amizade, tornando o dia-a-dia sempre melhor.

À todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular, em especial à Carla, por sua colaboração em todas as fases deste trabalho. E aos funcionários Sr. Luiz Janeri e Sra. Conceição Aparecida da Silva, pelo grande auxílio nos experimentos e pela amizade.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, especialmente à Yara, não só pela ajuda competente e constante, mas também pela boa amizade, à Sra. Esmeralda pelo difícil trabalho do biotério, à Eliete pela colaboração nos experimentos, e à Suzana e Derlange pelo apoio e companhia de muitos almoços.

À amiga Daniéla, pelo apoio constante, pela grande amizade e pelo companheirismo no convívio diário. À Monize e Luciana, pelo apoio e antiga amizade.

Aos membros da banca examinadora, pela colaboração na correção e pelas valiosas sugestões.

À Vepê Indústria Alimentícia Ltda., pela doação de toda a frutose utilizada no preparo das dietas.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
SUMMARY.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Insulina e suas funções.....	2
1.2. Ação insulínica.....	2
1.3. Resistência à insulina.....	8
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Animais e Dietas.....	15
3.2. Material.....	15
3.3. Soluções utilizadas.....	16
3.4. Métodos.....	18
3.4.1. Extração dos tecidos.....	18
3.4.2. <i>Immunoblotting</i> ou <i>Westernblotting</i>	19
3.4.3. Imunoprecipitação.....	20
3.4.4. Avaliação da ação insulínica através do teste de tolerância à insulina (ITT) curto.....	21
3.4.5. Determinação da glicose plasmática, insulina sérica, colesterol e triacilglicerídeos séricos.....	22

3.4.6. Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Características dos ratos Wistar.....	24
4.1.2. Velocidade de redução da glicose nos animais controles e alimentados com dieta rica em frutose.....	24
4.2. Efeito da dieta rica em frutose nas etapas iniciais da ação insulínica nos ratos Wistar.....	25
4.2.1. Efeito da dieta rica em frutose na regulação do receptor de insulina e da pp185 (IRS-1/IRS-2) no fígado.....	25
4.2.2. . Efeito da dieta rica em frutose na regulação do receptor de insulina e da pp185 (IRS-1/IRS-2) no músculo.....	27
5. DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÕES.....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
9. ANEXOS.....	70

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Evolução do peso dos animais.....	28
Figura 2: Velocidade de redução da glicose.....	28
Figura 3: Avaliação do nível protéico do receptor de insulina em tecido hepático.....	29
Figura 4: Avaliação do grau de fosforilação do receptor de insulina em tecido hepático	30
Figura 5: Avaliação do nível protéico do IRS-1 em tecido hepático.....	31
Figura 6: Avaliação do grau de fosforilação da pp185 em tecido hepático.....	32
Figura 7: Avaliação do nível protéico do receptor de insulina em tecido muscular.....	33
Figura 8: Avaliação do grau de fosforilação do receptor de insulina em tecido muscular	34
Figura 9: Avaliação do nível protéico do IRS-1 em tecido muscular.....	35
Figura 10: Avaliação do grau de fosforilação da pp185 em tecido muscular.....	36

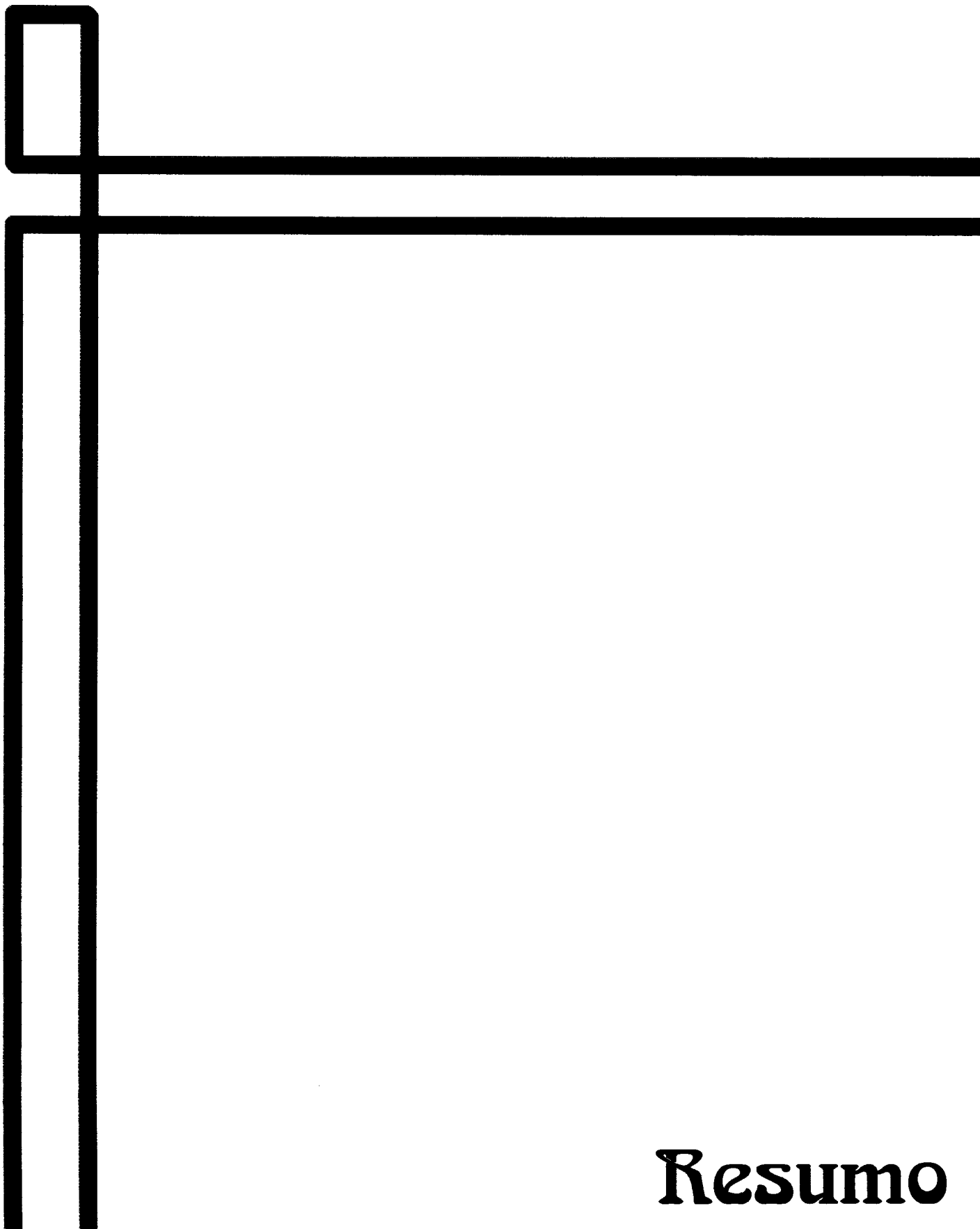
LISTA DE ABREVIATURAS

μCi	microCuri
^{125}I	isótopo de iodo 125
AIN	American Institute of Nutrition
ATP	adenosina trifosfato
DAG	diacilglicerol
DNA	ácido desoxiribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FAK	proteína quinase de adesão focal
GLUT	transportador de glicose
GRB2	proteína ligadora do receptor para fator de crescimento
GTP	guanosina trifosfato
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IR	receptor de insulina
IRS-1	substrato 1 do receptor de insulina
IRS-2	substrato 2 do receptor de insulina
IRS-3	substrato 3 do receptor de insulina
IRS-4	substrato 4 do receptor de insulina
ITT	teste de tolerância à insulina
JAK 2	proteína citoplasmática quinase da família Janus

* Os termos estão apresentados de acordo com o uso genérico, o que explica a tradução literal de alguns termos e ausência de tradução em outros.

Kitt	constante de redução da glicose
LDL	low-density-lipoprotein
Ln	logaritmo neperiano
MAPK	proteína quinase ativadora da mitogênese
PI 3-k	fosfatidilinositol 3-quinase
PMSF	fluoreto de fenilmetil sulfonila
pp120	proteína fosforilada de 120 kDa
pp15	proteína fosforilada de 15 kDa
pp185	proteína fosforilada de 185 kDa
pp60	proteína fosforilada de 60 kDa
Ras	proteína originalmente identificada como um oncogene, tem participação na regulação do metabolismo e crescimento celular
RNA	ácido ribonucléico
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SH2	segunda homologia ao Src
SH3	terceira homologia ao Src
Shc	molécula adaptadora e substrato do receptor de insulina
SHPTP2	fosfotirosina fosfatase ativada pelo IRS-1 fosforilado em tirosina
SHR	linhagem de ratos espontaneamente hipertensos
Src	oncogene originalmente definido como produto do sarcoma virus Rous
Tris	tri(hidroximetil)-aminometano
VLDL	very-low-density lipoprotein

* Os termos estão apresentados de acordo com o uso genérico, o que explica a tradução literal de alguns termos e ausência de tradução em outros.



ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA NO FÍGADO E MÚSCULO DE RATOS WISTAR ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM FRUTOSE.

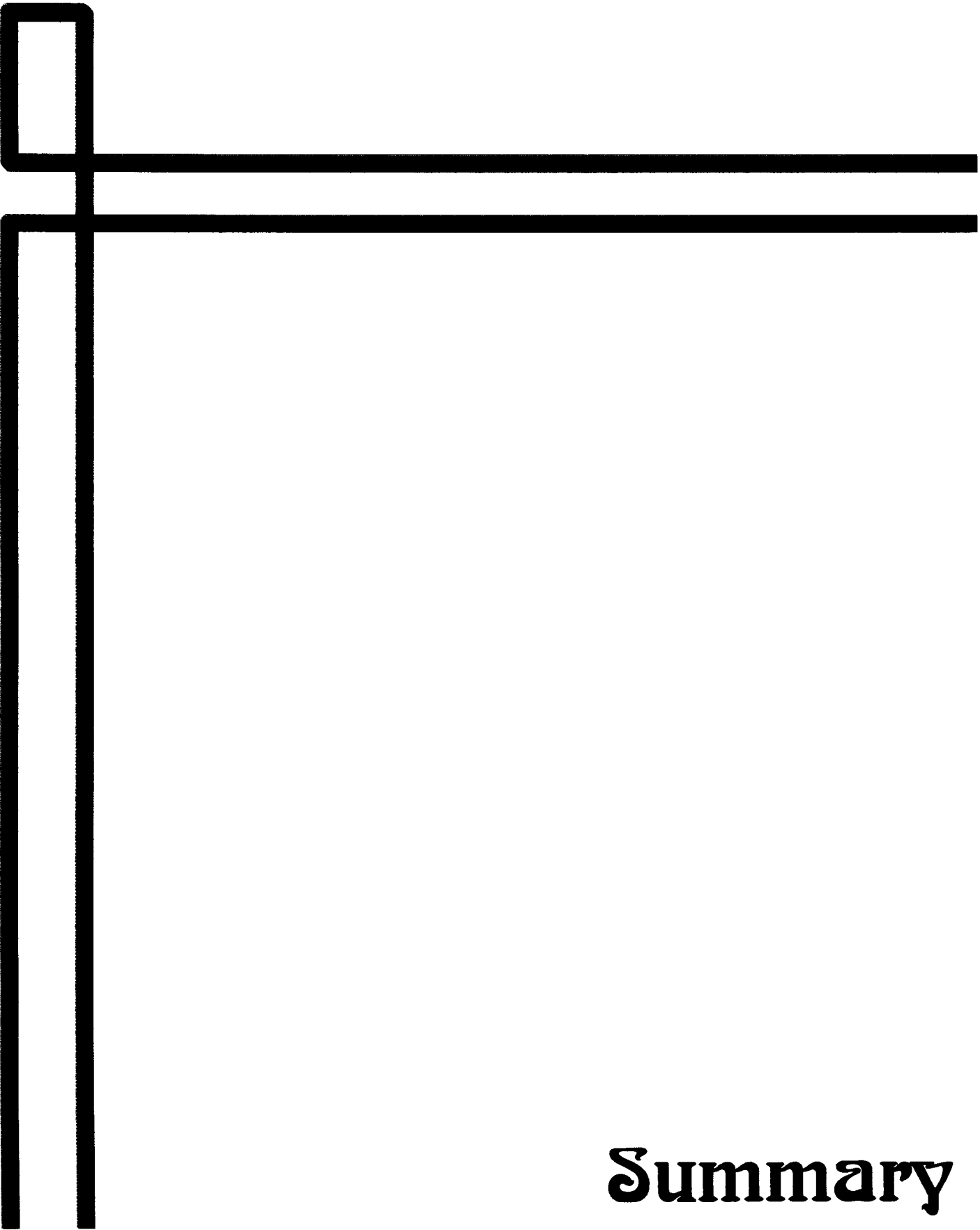
A insulina estimula a atividade tirosina quinase de seu receptor levando à fosforilação de proteínas citoplasmáticas, como a pp185 que é constituída de pelo menos dois substratos: os substratos 1 e 2 do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2). Os substratos, por sua vez, associam-se à fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase), ativando-a. Sabe-se que animais alimentados com dietas ricas em frutose apresentam resistência insulínica, entretanto o mecanismo molecular envolvido nesta situação não está totalmente esclarecido.

No presente estudo, investigaram-se os níveis teciduais e o grau de fosforilação, produzidos após o estímulo insulínico do receptor de insulina e da pp185 (IRS-1 e 2) no fígado e músculo de ratos Wistar alimentados com dieta rica em frutose (66% das calorias totais provenientes de frutose), por *immunoblotting* com anticorpos específicos.

A alimentação com a dieta rica em frutose por 28 dias induziu discreta resistência à insulina, a qual foi demonstrada pela diminuição significativa da velocidade de redução dos níveis de glicose. Os animais deste grupo apresentaram níveis séricos elevados de triglicérides, e ausência de alterações significativas dos níveis de glicemia, insulinemia ou colesterol, quando comparados ao grupo controle. Não ocorreu variação no número de receptores de insulina nos tecidos hepático e muscular dos dois grupos, alimentados com a dieta rica em frutose e com a ração comercial. Entretanto, em amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR e incubadas com anticorpo antifosfotirosina, a autofosforilação do receptor, estimulada pela insulina, mostrou-se reduzida para $72 \pm 4\%$ ($p < 0,0001$) no fígado de ratos alimentados com a dieta rica em frutose. O nível protéico do IRS-1, como determinado por *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1, não apresentou alterações nos dois tecidos do grupo que recebeu a dieta rica em frutose, comparado com o grupo controle. Em contraste, após estímulo insulínico, os ratos alimentados com a dieta rica em frutose demonstraram redução significativa do grau de fosforilação da pp185 (IRS-1 e 2), tendo atingido $83 \pm 5\%$ ($p < 0,05$) no fígado, e $77 \pm 4\%$ ($p < 0,0001$) no músculo.

Os dados sugerem que estas alterações das etapas iniciais da transmissão do sinal

insulínico possam ter significado importante no mecanismo de resistência à insulina encontrada neste modelo animal.



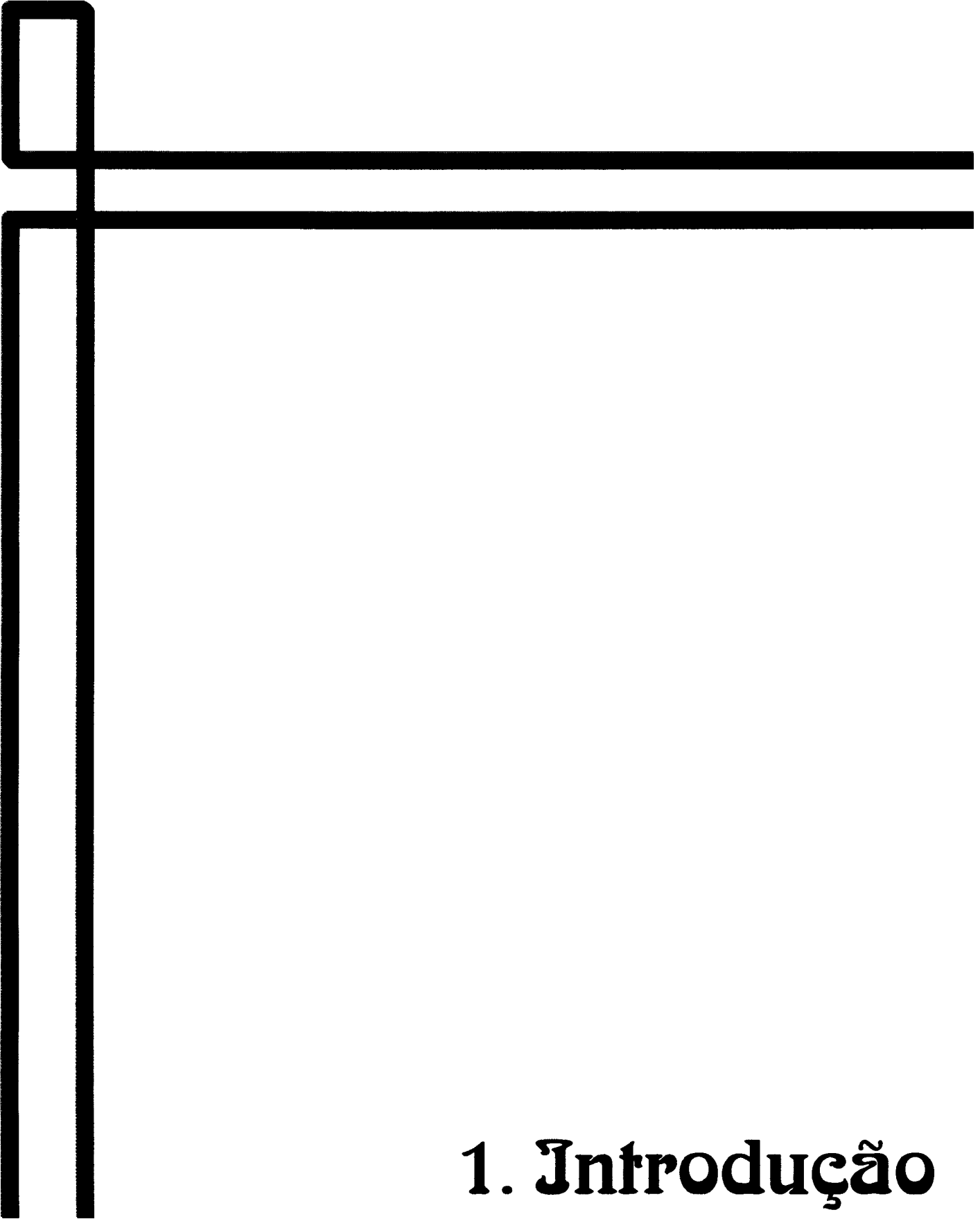
Summary

Insulin stimulates the tyrosine kinase activity of its receptor resulting in the tyrosine phosphorylation of cytoplasmic proteins called pp185, which contain at least two substrates: insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2). These two substrates in turn associate with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), thereby activating the latter. Feeding animals with high fructose diets results in insulin resistance. However the exact molecular mechanism is unknown.

In the present study, we have investigated the levels and phosphorylation status of the insulin receptor and pp185 (IRS-1/2) protein, in both liver and muscle of Wistar rats fed a high-fructose diet (66% total calories as fructose) by immunoblotting with specific antibodies.

Feeding fructose for 28 days induced a discrete insulin resistance, as demonstrated by the insulin tolerance test (ITT). Plasma glucose, serum insulin and cholesterol of the two groups of rats (fructose and control) were similar, whereas the plasma triglyceride concentrations increased significantly in the rats eating the fructose diet ($p < 0.05$). There were no changes in the insulin receptor concentration in the liver and muscle of both the high-fructose and the commercial chow fed rats. However, in samples previously immunoprecipitated with anti-IR antibody and blotted with antiphosphotyrosine antibody, insulin-stimulated receptor autophosphorylation was reduced by $72 \pm 4\%$ ($p < 0.0001$) in the liver of rats fed high-fructose diet. The IRS-1 protein levels, as determined by immunoblotting with anti-IRS-1 antibody, were similar in both liver and muscle of the two groups of rats. In contrast, there was a significant decrease in pp185 (IRS-1/2) phosphorylation, to $83 \pm 5\%$ ($p < 0.05$) in liver and $77 \pm 4\%$ ($p < 0.0001$) in muscle, after insulin stimulation of the rats fed high fructose diet.

These data suggest that changes in the early steps of insulin signal transduction may have an important role in the insulin resistance observed in animals treated with high-fructose diet.



1. Introdução

1.1. INSULINA E SUAS FUNÇÕES

A insulina, exercendo um efeito dominante no controle da glicemia, com ação metabólica e de promoção de crescimento, atua no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, bem como na síntese de RNA e DNA através da modificação da atividade de uma variedade de enzimas e sistemas de transporte intracelular.

Em praticamente todos os mamíferos, seus efeitos glicoregulatórios são predominantemente exercidos nos três tecidos de maior importância na homeostase da glicose: hepático, muscular e adiposo. No fígado, a insulina estimula o armazenamento de glicogênio ou inibe a gliconeogênese e a glicogenólise. Nos tecidos periféricos (muscular e adiposo), a insulina estimula a captação, armazenamento e utilização da glicose (FELIG & BERGMAN, 1990). Somando-se a estes efeitos principais, a insulina também estimula o metabolismo de glicose em outros tecidos que têm pequeno ou nenhum papel na homeostase da glicose como um todo. A insulina age nestes tecidos como fator de crescimento, e de alguma maneira, modifica ou aumenta a função de outros reguladores do metabolismo destas células (KAHN *et al.*, 1993).

Desde a descoberta da insulina, cerca de 75 anos atrás, muito têm sido feito na tentativa de entender os mecanismos moleculares da ação insulínica. A importância do entendimento da ação da insulina justifica-se pelos quadros de menor efeito biológico do hormônio, isto é, resistência à insulina, que tem importante papel na patogênese de muitas doenças, incluindo diabetes mellitus, obesidade, hipertensão, e na intolerância à glicose associada a muitas outras doenças endócrinas (DeFRONZO, 1988; REAVEN, 1988; MOLLER & FLIER, 1991).

1.2. AÇÃO INSULÍNICA

A insulina, como outros hormônios, inicia suas ações a nível celular através da ligação a um receptor específico, uma glicoproteína presente na membrana plasmática (FREYCHET *et al.*, 1971; CUATRECASAS, 1972; KAHN, 1985).

O receptor de insulina está presente praticamente, em todos os tecidos de mamíferos, contudo sua quantidade varia de 40, em eritrócitos na circulação, a mais de 200.000 em adipócitos e hepatócitos (KAHN, 1985). É uma glicoproteína heterotetramérica constituída por duas subunidades α e duas subunidades β , cada uma com peso molecular de 135.000 e 95.000, respectivamente, ligadas entre si covalentemente por pontes dissulfeto, formando uma estrutura β - α - α - β (MASSAGUE *et al.*, 1981; KASUGA *et al.*, 1982a). A subunidade α é totalmente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina, enquanto que a subunidade β é uma proteína de localização transmembrânica, responsável pela transmissão do sinal insulínico (KASUGA *et al.*, 1982a, 1982b).

Uma propriedade importante da subunidade β do receptor de insulina é o fato desta ser uma proteína com atividade quinase que, estimulada pela insulina é capaz de autofosforilar-se e fosforilar outros substratos em resíduos tirosina (KASUGA *et al.*, 1982b). As proteína-quinases são enzimas envolvidas na transferência de grupos fosfato do ATP para aminoácidos específicos de proteínas. Então, após a ligação da insulina à subunidade α , há uma mudança conformacional do receptor e a atividade quinase da subunidade β é estimulada, levando a transferência de grupos fosfato do ATP para aminoácidos tirosina do receptor, e promovendo um aumento da atividade quinase com a fosforilação de substratos protéicos intracelulares (KASUGA *et al.*, 1982b; WHITE *et al.*, 1984; ROSEN, 1987; KAHN & WHITE, 1988).

A subunidade β do receptor de insulina consiste de quatro partes, divididas de acordo com sua função: domínio justamembrana, importante na ligação de substratos e internalização do receptor; região catalítica, que contém o sítio de ligação do ATP (lisina na posição 1030); região de autofosforilação em tirosina, envolvida na regulação da atividade quinase; e a porção COOH-terminal contendo dois sítios adicionais de fosforilação em tirosina, bem como alguns sítios de fosforilação em serina e treonina. Nesta última, encontram-se as maiores diferenças entre o receptor da insulina e do IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*). O polipeptídeo IGF-1 apresenta estrutura semelhante à insulina porém com efeitos sobre o crescimento celular mais importantes do que os metabólicos. A porção COOH-terminal da subunidade β é considerada como elemento responsável pela diferenciação entre os efeitos metabólicos e de crescimento celular da insulina (KASUGA *et al.*, 1982b; WHITE *et al.*, 1984).

O resultado da autofosforilação do receptor de insulina, é a fosforilação de pelo menos seis resíduos tirosina em regiões intracelulares da subunidade β : tirosina na posição 972 da região justamembrana; tirosinas nas posições 1158, 1162 e 1163, na porção regulatória; e tirosinas nas posições 1328 e 1334 da porção COOH-terminal (WHITE *et al.*, 1988).

Há consideráveis evidências indicando que a atividade tirosina quinase do receptor de insulina é absolutamente essencial no processo de sinalização insulínica; baseando-se em analogia de reações com outras quinases, este resíduo de aminoácido é provavelmente o sítio de ligação do ATP (EBINA *et al.*, 1985; ELLIS *et al.*, 1986; EBINA *et al.*, 1987; ROSEN, 1987). Estudos de mutações *in vitro* no receptor de insulina, demonstraram que a capacidade do receptor sofrer autofosforilação é prejudicada quando ocorre substituição da lisina na posição 1030 do receptor por outros aminoácidos (metionina, arginina ou alanina). Quando as mutações se expressam nas células, a ligação da insulina ocorre normalmente porém seus receptores são inativos como quinases e sem eficiência para mediar seus efeitos no metabolismo celular (ELLIS *et al.*, 1986; CHOU *et al.*, 1987; EBINA *et al.*, 1987; WILDEN *et al.*, 1992). Qualquer diminuição da atividade tirosina quinase do receptor é acompanhada por perda da capacidade de sinalizar os efeitos metabólicos e de crescimento. Comparando a síntese de glicogênio estimulada pela insulina em células expressando diferentes receptores (normais, receptores com 1, 2, ou 3 tirosinas mutantes nas posições 1158, 1162, e 1163, ou receptores totalmente inativos como quinases), verificou-se perda progressiva do efeito biológico e diminuição paralela da atividade quinase do receptor (WILDEN *et al.*, 1992).

O receptor de insulina possui ainda sítios de fosforilação em resíduos de aminoácidos serina e treonina, os quais quando fosforilados, parecem inibir a fosforilação em tirosina, diminuindo ou inibindo a atividade quinase do receptor, prejudicando deste modo a transmissão do sinal insulínico (BOLLAG *et al.*, 1986). A fosforilação em serina/treonina pode ser estimulada pelo tratamento prolongado com insulina, por ésteres de forbol e análogos de AMP cíclico, que são possíveis resultados da ação de proteínas serina/treonina quinases, sobre o receptor. Entre as serina-quinases que podem estar envolvidas na inibição do receptor de insulina, está a proteína quinase-C (PKC), que tem papel importante na transmissão do sinal transmembrânico de vários hormônios, fatores de crescimento, e neurotransmissores. A PKC consiste de uma família de pelo

menos 12 isoformas, que diferem em seus domínios regulatórios e na dependência de cálcio (Ca^{2+}), bem como na sua distribuição tecidual (BOSSENMAIER *et al.*, 1997). Portanto, a regulação da atividade quinase do receptor de insulina por multisítios de fosforilação, tem um importante papel no mecanismo de sinalização da insulina em estados fisiológicos e patológicos (TAKAYAMA *et al.*, 1984; TAKAYAMA *et al.*, 1988).

Assim, a insulina induz a fosforilação do receptor, que ativa a capacidade quinase do mesmo, o qual desencadeia uma cascata de fosforilações de um ou mais dos seus substratos intracelulares (WHITE *et al.*, 1985; KARASIK *et al.*, 1988; SUN *et al.*, 1991). Com o objetivo de investigar os possíveis substratos do receptor de insulina, diversos laboratórios utilizaram anticorpos antifosfotirosinas e identificaram em culturas de células e em tecidos, uma fosfoproteína estimulada por insulina, denominada inicialmente de pp185, por migrar entre 165-185 kDa em SDS-PAGE. (WHITE *et al.*, 1985). Um componente da pp185 foi purificado e clonado de várias fontes, recebendo o nome de substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) (ROTHENBERG *et al.*, 1991; SUN *et al.*, 1991; ARAKI *et al.*, 1993). Este foi o primeiro e mais estudado substrato do receptor de insulina.

O importante papel da fosforilação da pp185/IRS-1 na ação insulínica fica bem claro, após estudos com mutagênese *in vitro* da tirosina de posição 972, situada na região justamembrana do receptor de insulina. O receptor mutante se liga normalmente à insulina, com total ativação da capacidade tirosina quinase *in vitro*. Tal resultado é possível porque a tirosina nesta posição não é o sítio de autofosforilação e não é parte do domínio de atividade quinase. Contudo, quando transfectado em células, este receptor mutante não consegue fosforilar a pp185, e portanto, não é capaz de transmitir os sinais da ação insulínica (WHITE *et al.*, 1988).

O IRS-1 é uma proteína encontrada na maioria dos tecidos e altamente conservado entre as espécies. Com base em análise sequencial, o DNA complementar do IRS-1 de fígado de rato apresenta 1235 aminoácidos, com as seguintes características: é uma proteína de localização totalmente citoplasmática, possui uma sequência de aminoácidos compatível com a sequência de ligação para mononucleotídeos (ATP ou GTP), ainda que não apresente nenhuma homologia com proteínas quinases conhecidas, e possui múltiplos sítios de fosforilação em serina, treonina e

tirosina. A capacidade do IRS-1 ser fosforilado em tirosina após estimulação insulínica, e de participar na transmissão do sinal, depende de uma característica estrutural, que é a presença de sítios tirosina em localizações estratégicas (SUN *et al.*, 1993). Existem 22 sítios potenciais de fosforilação em tirosina no IRS-1. Destes, dez possuem as seqüências repetitivas: YMXM ou YXXM, onde Y é tirosina, M é metionina e X é qualquer outro aminoácido (SHOELSON *et al.*, 1992). Seguindo-se à estimulação insulínica, estas tirosinas bem como outras tirosinas potenciais na molécula de IRS-1 são rapidamente fosforiladas, resultando em ligações do IRS-1 com proteínas intracelulares específicas (BACKER *et al.*, 1992; MYERS & WHITE, 1993). Estas proteínas celulares específicas caracterizam-se pela presença de domínios SH2 (*src homology 2*), assim chamados por apresentarem homologia com o produto de oncogênese viral *Src*. Para propagar o sinal, a maioria dos receptores tirosina-quinase, uma vez autofosforilados, utilizam a seqüência YMXM para ligarem-se diretamente à proteínas contendo domínios SH2. Como o receptor de insulina não tem a seqüência YMXM, é o IRS-1 que se liga à proteínas com porção SH2 para propagar o sinal insulínico (SHOELSON *et al.*, 1992).

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

A enzima PI 3-quinase apresenta duas subunidades, uma catalítica de 110 kDa e outra regulatória de 85 kDa que contém duas porções SH2 e uma SH3 (CARPENTER & CANTLEY, 1990). A associação e ativação entre o IRS-1 e a PI 3-quinase envolve as tirosinas fosforiladas do IRS-1 próximas à metioninas, YMXM, e à porção SH2 da subunidade regulatória da enzima PI 3-quinase. A insulina aumenta a concentração intracelular de fosfatidilinositol 3-fosfato, sugerindo que a PI 3-quinase foi ativada durante a estimulação com este hormônio (FOLLI *et al.*, 1992). Embora a subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase seja fosforilada após estímulo com outros fatores de crescimento (CARPENTER & CANTLEY, 1990), isto parece não ocorrer após estímulo com insulina. Ao invés disso, a ativação parece resultar da ligação do IRS-1 à PI 3-

quinase (BACKER *et al.*, 1992).

A associação-ativação do IRS-1 com a PI 3-quinase parece estar envolvida na translocação dos transportadores de glicose (GLUT 4), de um pool intracelular para a membrana plasmática. Este efeito é principalmente observado nos tecidos muscular e adiposo. Os transportadores de glicose são responsáveis pela captação de glicose em diversos tecidos. Foram identificados 5 grupos distintos apresentando alguma especificidade quanto ao tipo de tecido: GLUT 1, responsável pelo transporte da glicose na placenta, cérebro, rim, cólon e ocorrendo pequena quantidade destes receptores no tecido adiposo e muscular; GLUT 2, está presente no fígado e células β pancreáticas, parece estar envolvido no mecanismo regulado pela glicose que leva à secreção de insulina; GLUT 3 é encontrado no cérebro, placenta e rim; GLUT 4, é o único que parece ser regulado pela insulina e é encontrado exclusivamente em tecidos sensíveis ao hormônio, que incluem músculo esquelético e cardíaco e tecido adiposo, e o GLUT 5 o qual predomina no intestino delgado. Em estado basal, os GLUT 4 estão localizados em um pool vesicular intracelular. Após a estimulação com insulina, ocorre rápida translocação destas vesículas ricas em GLUT 4, causando a inserção destes receptores na membrana plasmática, dando início ao transporte de glicose para dentro da célula (BELL *et al.*, 1990; BIRNBAUM, 1992). Recentemente descreveu-se novos grupos de transportadores, porém sua regulação e expressão nos diversos tecidos não estão completamente esclarecidas (ROGERS *et al.*, 1998)

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

Além da PI 3-quinase, outras proteínas com porção SH2 também interagem com o IRS-1, como SHPTP2 (*syk*) (KUHNE *et al.*, 1993), GRB2 (SKOLNIK *et al.*, 1993; TOBE *et al.*, 1993) e Nck (LEE *et al.*, 1993). A proteína SHPTP2 é uma fosfotirosina fosfatase que contém duas porções SH2, que pode ter importância no crescimento celular e exercer uma auto-regulação no sinal gerado pela insulina. A GRB2 é uma proteína citoplasmática com duas porções SH3 e uma SH2. Esta proteína age como uma molécula adaptadora, que compõe um complexo ativador da

proteína *ras*, ativadora das MAP quinases (proteínas de ativação da mitogênese). A Nck, é uma proteína adaptadora com três porções SH3 e uma SH2, e que une o IRS-1 às vias de crescimento celular (CHEATHAM & KAHN, 1995).

Mais recentemente, demonstrou-se que outra proteína com peso molecular discretamente maior do que o IRS-1, também migra na banda pp185, e foi denominado IRS-2 (TAMEMOTO *et al.*, 1994; ARAKI *et al.*, 1994; SUN *et al.*, 1995). Esta proteína foi purificada, e a sequência cDNA (DNA complementar) foi determinada. O IRS-1 e IRS-2 dividem regiões sequenciais e possuem forte homologia, tendo aproximadamente 43% de semelhança total. A região NH2-terminal, que proporciona a ligação molecular aos receptores de membrana ativados, é muito bem conservada. Ao contrário, a porção COOH-terminal é pouco conservada entre os dois substratos sendo que, com poucas exceções, a similaridade é restrita aos sítios potenciais de fosforilação em resíduos tirosina (SUN *et al.*, 1995). Considera-se até o momento que a ampla banda de 185 kDa, visualizada em extratos totais com anticorpos antifosfotirosina, constitui-se de pelo menos duas proteínas, IRS-1 e IRS-2. Assim como o IRS-1, o IRS-2 aparece na maioria das células e tecidos e é rapidamente fosforilado em tirosina em resposta à insulina, associando-se e ativando substratos que contém domínios SH2, incluindo a PI 3-quinase, a proteína Grb2, e fosfotirosinas fosfatases como SHPTP2 (SUN *et al.*, 1995; PATTI *et al.*, 1995).

O IRS-1 e IRS-2 são proteínas de grande importância no processo de transmissão do sinal da insulina, localizadas estrategicamente na fase inicial da sinalização, e atuando como ancoradouros de enzimas e adaptadores moleculares. Como resultado, promoverão uma cascata de reações intracelulares covalentes e não-covalentes, que multiplicarão o sinal e efeitos biológicos finais. O estudo da regulação do receptor de insulina e de seus substratos em tecidos de modelos animais de resistência à insulina, vem contribuindo para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares pós-receptores de alteração na sensibilidade à insulina.

1.3. RESISTÊNCIA À INSULINA

Vários modelos animais de resistência à insulina têm sido estudados, demonstrando que

alterações nas etapas iniciais da ação insulínica em tecidos insulino-sensíveis, podem desempenhar um papel importante na dessensibilização à ação deste hormônio. Alguns dos modelos já estudados são: ratos Wistar submetidos a jejum prolongado (SAAD *et al.*, 1992), ratos espontaneamente hipertensos - SHR (KAHN & SAAD, 1992), ratos Wistar tratados com dexametasona (SAAD *et al.*, 1993), ratos Wistar sépticos (NUNES *et al.*, 1994), ratos Wistar tratados agudamente com adrenalina (SAAD *et al.*, 1995a), tratados agudamente com glucagon (SAAD *et al.*, 1995b), ratos Wistar idosos (CARVALHO *et al.*, 1996), tratados com GH (THIRONE *et al.*, 1997), e ratas grávidas (SAAD *et al.*, 1997).

Entretanto, outros modelos de resistência insulínica não foram ainda caracterizados, entre eles o quadro de resistência à insulina induzida por dietas ricas em açúcares simples, principalmente frutose. Diversos trabalhos têm mostrado que animais alimentados com dietas ricas em frutose (60 - 69% do total calórico) desenvolvem resistência à insulina, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipertensão (ZAVARONI *et al.*, 1980; SLEDER *et al.*, 1980; ZAVARONI *et al.*, 1982; TOBEY *et al.*, 1982; HWANG *et al.*, 1987; REAVEN *et al.*, 1989; MARTINEZ *et al.*, 1994). Em estudos com humanos, não seria possível oferecer uma dieta com estas porcentagens de frutose, pois poderia causar diarreia (COOPER, 1979). Porém, algumas das características encontradas nos estudos com animais, já foram descritas também em humanos consumindo cerca de 15 - 20% das calorias totais de frutose (BECK-NIELSEN *et al.*, 1980; HALLFRISCH *et al.*, 1983). Entretanto, há controvérsias, uma vez que diversos estudos com pacientes diabéticos ou não, demonstraram que não houve alteração nos níveis de glicose ou insulina após consumo de quantidades moderadas de frutose (CRAPO & KOLTERMAN, 1984; CRAPO *et al.*, 1986; THORBURN *et al.*, 1990; MALERBI *et al.*, 1996).

A frutose é uma hexose com poder adoçante maior que o da sacarose, e por isso recomendada para pessoas que querem perder peso (COOPER, 1979). É considerada benéfica por promover um índice glicêmico relativamente mais baixo, e recomendada como adoçante a ser utilizado até por diabéticos (SHAFRIR, 1985). Seu consumo tem aumentado principalmente na dieta ocidental (PARK & YETLEY, 1993), justificando a quantidade de estudos realizados para determinar os efeitos das dietas ricas em frutose.

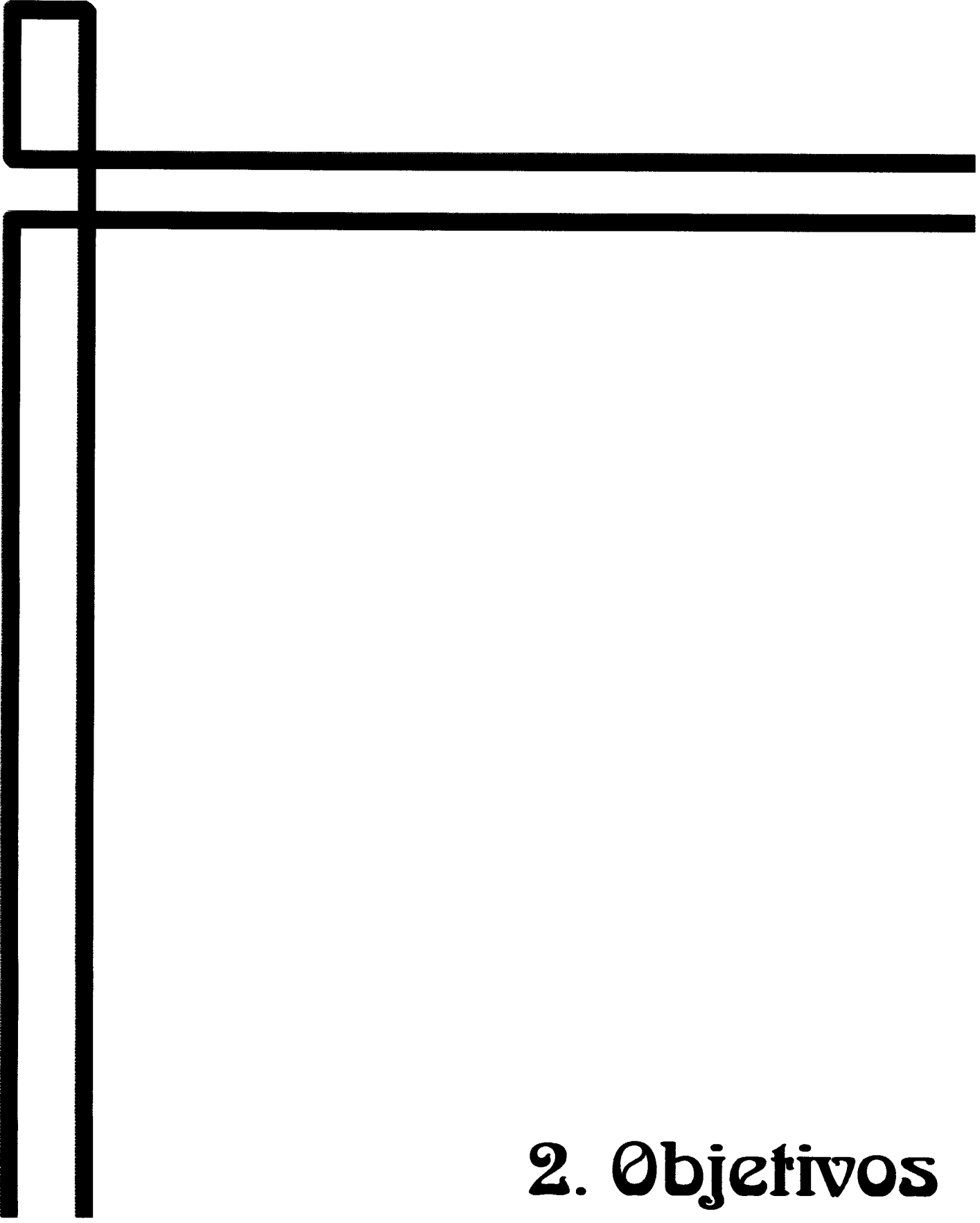
A maioria dos estudos explora possíveis mecanismos de resistência à insulina induzida pela dieta, e efeitos de outras variáveis tais como idade, exercício, ou uso de drogas capazes de diminuir os níveis de lipídeos (ZAVARONI *et al.*, 1980; SLEDER *et al.*, 1980; TOBEY *et al.*, 1982; THORBURN *et al.*, 1989; STORLIEN *et al.*, 1993). Nestes estudos foram utilizados métodos de avaliação da sensibilidade à insulina *in vivo* e algumas técnicas *in vitro*. Para investigar o efeito da alimentação rica em frutose em ratos, ZAVARONI *et al.* (1980), utilizando testes de tolerância à frutose e glicose, demonstraram associação da hiperglicemia e hiperinsulinemia com a resistência à insulina, nos animais alimentados com frutose em relação aos controles. SLEDER *et al.* (1980), observaram o desenvolvimento de hiperinsulinemia associada à hipertrigliceridemia em ratos que ingeriram dieta rica em frutose. Através da técnica de perfusão de fígado e músculo, TOBEY *et al.* (1982), confirmaram níveis de glicose e insulina mais elevados em animais do grupo frutose. Adicionalmente, sugeriram que o fígado, mais do que o músculo, é provavelmente o tecido responsável pelo declínio da utilização de glicose estimulada pela insulina no animal intacto e que, conseqüentemente, a resistência à insulina desenvolvida nos ratos alimentados com frutose seria secundária ao metabolismo anormal de glicose hepática. THORBURN *et al.* (1989), utilizando *clamp* hiperinsulinêmico euglicêmico encontraram perda de sensibilidade à insulina no fígado e tecidos periféricos, e níveis elevados de triacilglicerídeos plasmáticos em ratos alimentados com dieta rica em frutose; não encontraram entretanto diferenças na glicemia e insulinemia pós-prandial.

STORLIEN *et al.* (1993) demonstraram resistência à insulina induzida pela frutose, importante elevação de triacilglicerídeos circulantes, e concomitante elevação da pressão arterial; as alterações foram abrandadas no grupo com a dieta rica em frutose pela administração de um agente hipolipidêmico.

O mecanismo molecular pelo qual, a alimentação rica em frutose induz resistência à insulina não está claro. EIFFERT *et al.* (1991), investigaram os efeitos combinados de idade, dieta rica em sacarose e exercício físico sobre o número de receptores de insulina e a atividade tirosina quinase em músculo de ratos com doze e vinte e quatro meses de idade. Utilizando técnicas *in vitro*, a partir da incubação de receptores de insulina parcialmente purificados em diferentes concentrações de insulina, demonstraram redução do número de receptores nos ratos velhos

alimentados com dieta rica em sacarose, e diminuição da atividade tirosina quinase no músculo esquelético de ratos jovens que receberam a dieta de sacarose. Além disso, observaram que o exercício preveniu a diminuição das funções do receptor de insulina (ligação da insulina e atividade tirosina quinase) tanto nos animais de doze como de vinte e quatro meses de idade, alimentados com a dieta rica em sacarose.

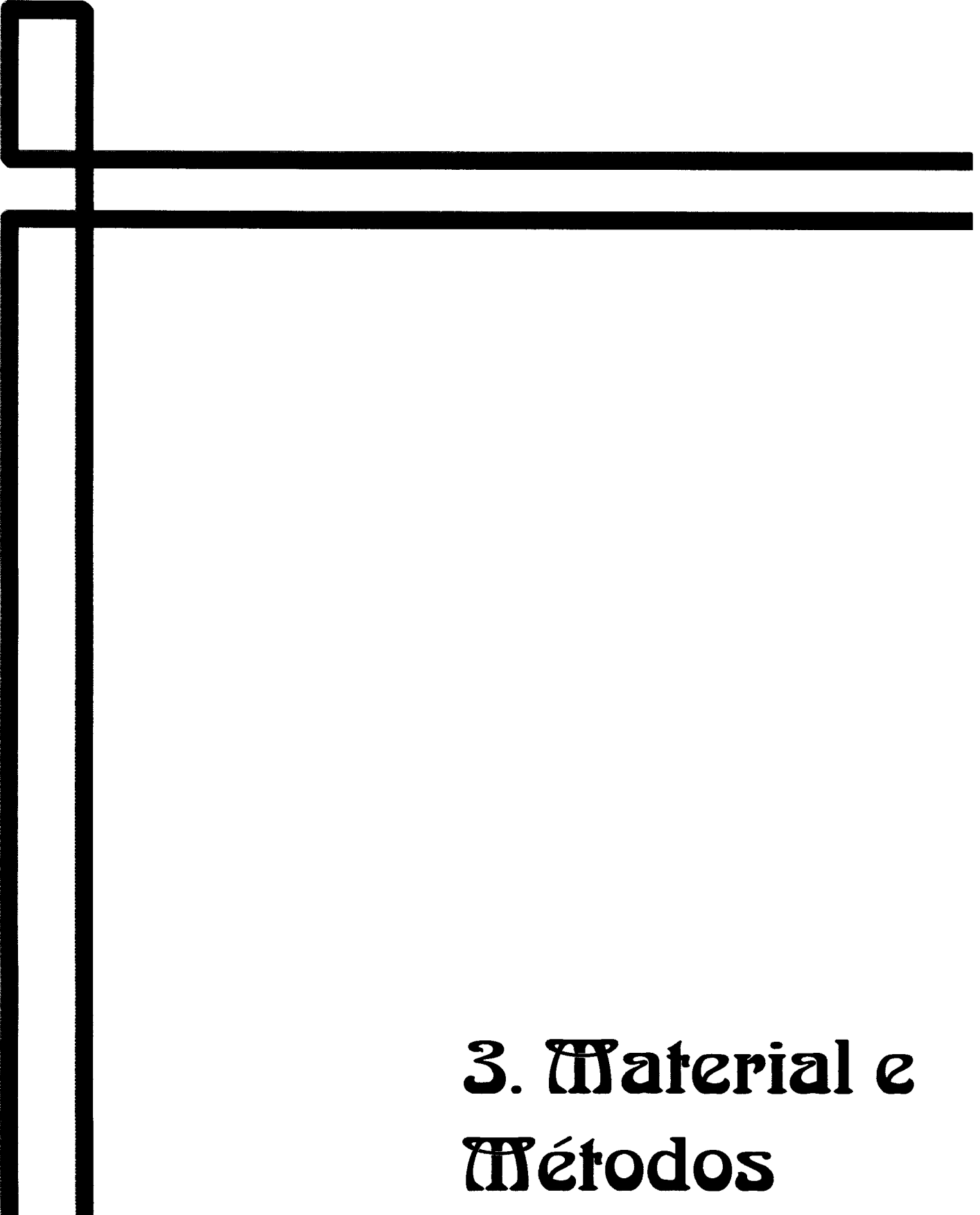
As etapas iniciais da transmissão do sinal insulínico em modelos animais com resistência à insulina induzida por uma dieta rica em frutose não foram ainda estudados. O estudo deste modelo de resistência é importante, já que a frutose vem sendo mais consumida e a dieta alimentar é fundamental para o controle metabólico do diabetes.



2. Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram:

- Induzir um estado de resistência à insulina em ratos alimentados com dieta rica em frutose.
- Estudar os níveis teciduais e o grau de fosforilação, após o estímulo insulínico, do receptor de insulina e da proteína pp185 (IRS-1/IRS-2), no fígado e músculo de ratos alimentados com uma dieta rica em frutose.



3. Material e Métodos

3.1. ANIMAIS E DIETAS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, variedade albina), da linhagem Wistar-Hannover, machos, jovens, com 5 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP (CEMIB), Campinas-SP. Após o desmame, os animais eram acomodados em gaiolas plásticas, até completarem 5 semanas de idade e alimentados com ração comercial Nuvilab CR-1, marca Nuvital.

Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Permaneceram em ciclos de 12h de luz (06:00-18:00h) e 12h de escuro (18:00-06:00h), recebendo água e dieta “*ad libitum*” durante 28 dias.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: Controle e Experimental. O Grupo Controle continuou com a mesma ração comercial para ratos, contendo 64% das calorias de carboidratos complexos, 9,5% de gordura (óleo vegetal) e 26,5% de proteína, enquanto o Grupo Experimental recebeu uma dieta semi-purificada rica em frutose, contendo 66% das calorias de frutose, 12% de gordura (óleo de soja) e 22% de proteína, sendo que as quantidades de fibra, vitaminas e minerais seguiram recomendações da AIN-93 (REEVES *et al.*, 1993).

O controle de peso foi realizado 3 vezes por semana, durante todo o experimento. Para a execução de todas as fases experimentais e por necessidade de trabalhar com faixas etárias restritas, utilizaram-se 15 lotes experimentais com número variável em função do teste a ser realizado.

3.2. MATERIAL

Os reagentes e aparelhos utilizados para eletroforese em dodecil sulfato de sódio e gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram adquiridos da *Bio-Rad* (Richmond, CA, USA).

Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina, ditioneitol (DTT), triton X-100, tween 20, e glicerol foram fornecidos pela *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, Mo). A Proteína A com iodo radioativo (^{125}I) procedia da *Amersham* (Amersham, UK), e a Proteína A Sepharose 6 MB da *Pharmacia* (Uppsala, Suécia). A membrana de nitrocelulose (*Hybond ECL*, 0,45 μm) foi obtida da *Amersham* (Aylesbury, UK). O agente anestésico tiopental sódico foi adquirido da *Cristália* (Itapira/SP, Brasil) e a Insulina regular humana (Humulin R) da *Biobrás* (BH, Brasil). Os anticorpos anti receptor de insulina e anti IRS-1, e o anticorpo policlonal antifosfotirosina, foram todos da *Santa Cruz Biotechnology* (Santa Cruz, CA, USA). A frutose utilizada no preparo da dieta foi doada pela *Vepê** (São Bernardo, SP).

3.3. SOLUÇÕES UTILIZADAS

- **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 10 mM e ortovanadato de sódio 10 mM. O ortovanadato foi colocado no momento de utilização do tampão.

- **Tampão de Laemmli (5X):** usado para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese (SDS-PAGE), contém: azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%.

- **Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):** contém: Trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0,4%. Para uso, a solução foi diluída 1:4.

- **Solução tampão para transferência:** empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose, contém: Trisma base 25 mM, glicina

192 mM, Metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Foi estocada a 4°C.

- **Solução tampão para SDS-PAGE - Gel de resolução (*resolving*):** tampão composto de EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

- **Solução tampão para SDS-PAGE - Gel da fase de empilhamento (*stacking*) das proteínas:** contém: EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 50 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

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

- **Solução bloqueadora:** utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose, após a transferência, contém: 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal.

- **Solução tampão de extração B, para imunoprecipitação:** utilizada para a extração de proteínas celulares dos tecidos estudados, que foram posteriormente imunoprecipitadas. Contém: Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM (diluído em álcool etílico), triton X-100 1% e 0,1 mg/ml de aprotinina. A solução foi mantida a 4°C, sendo que o ortovanadato, o PMSF e a aprotinina foram acrescentados no momento do uso.

- **Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado:** contém: Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 2 mM e triton X-100 0,5%.

- **Solução para anticorpos:** solução contendo anticorpos específicos que marcaram as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal. Os anticorpos utilizados foram: anticorpo

antifosfotirosina, anticorpo anti-receptor de insulina (anti-IR) e anti-IRS-1.

- **Solução com proteína A marcada com ^{125}I :** permite a visualização das bandas em autoradiografia, contém 0,1% de leite desnatado, dissolvido em solução basal com 2 μCi de proteína A ^{125}I .

3.4. MÉTODOS

3.4.1. Extração dos tecidos:

Ao final de 28 dias de período experimental, 12 lotes com 4 animais (2 com dieta controle e 2 com dieta rica em frutose) foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental sódico, na dose de 80 mg/kg peso corporal, e submetidos à laparotomia após a perda dos reflexos corneano e caudal. Uma incisão foi feita sobre a pele expondo a musculatura abdominal e ampliada para permitir também o acesso à musculatura da extremidade posterior da pata traseira.

Nos animais do grupo negativo (sem estímulo de insulina), foram removidos fragmentos do fígado e do músculo gastrocnêmio, respectivamente. Para os animais do grupo positivo (com estímulo de insulina), foi injetada insulina regular na veia porta em concentração 10^{-5} M , ou seja, 1,5 U ou 60 μg de insulina.

SAAD et al., 1992, demonstraram que a fosforilação máxima do receptor de insulina e do IRS-1, após a infusão com insulina na veia porta, se dava entre 30 e 60 segundos no fígado e entre 1 e 4 minutos no músculo, em concentrações de 6 a 60 μg de insulina, respectivamente. Uma vez que usamos os intervalos de tempo descritos acima, nossas amostras foram colhidas no pico do evento de fosforilação.

Após 30 segundos da injeção de insulina, retirava-se um fragmento de fígado, o qual era colocado imediatamente em tubo tipo *falcon* contendo tampão de extração A, que já

estava em banho-maria fervente. O tecido era homogeneizado durante 20 segundos com processador do tipo “polytron”, operado em velocidade máxima. Após o procedimento, o material homogeneizado era mantido em banho-maria a 100°C durante 10 minutos, com a finalidade de desnaturar completamente as fosfatases que poderiam desfosforilar o receptor de insulina e seus substratos. E 90 segundos após a injeção de insulina era então retirado o fragmento do músculo gastrocnêmio, e trabalhado da mesma forma.

Após os dez minutos de inativação enzimática, os materiais extraídos e homogeneizados, foram mantidos em gelo para transporte e centrifugação. Utilizou-se a velocidade de 12000 rpm por 40 minutos a 4°C, para remover o material insolúvel, utilizando-se o sobrenadante para as etapas seguintes: uma parte foi utilizada para determinar a concentração protéica de cada amostra pelo método colorimétrico de biureto (BRADFORD, 1976); outra parte foi utilizada para separação das proteínas em SDS-PAGE, com tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970), acrescido de DTT 200 mM, em proporção de 5:1, mantido sempre a 4°C até o momento de submeter à fervura a 100°C durante 5 minutos, e posteriormente aplicados em gel de poliacrilamida.

3.4.2. Immunoblotting ou Westernblotting:

Aliquotas contendo 200 µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 2 mm de espessura. No mesmo gel foi aplicado uma amostra padrão de proteínas, ou seja, o marcador de peso molecular com pesos moleculares conhecidos: miosina (205 kDa), beta galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (80 kDa) e ovalbumina (49 kDa). As proteínas apareciam sob coloração azul no gel de eletroforese e na membrana de nitrocelulose, permitindo a orientação quanto ao peso molecular das bandas observadas.

A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da *Bio Rad* (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 25 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (*stacking*) e 120 volts

até o final do gel de resolução (*resolving*). A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da *Bio Rad*, e a solução tampão para transferência mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas (TOWBIN, STAEHLIN & GORDON, 1979), sob refrigeração contínua por gelo.

As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por 2 horas, a temperatura ambiente ou durante uma noite (*overnight*) a 4°C, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal por 3 sessões de 10 minutos, e incubadas com anticorpos específicos, antifosfotirosina, anti-receptor de insulina ou anti-IRS-1, diluídos em solução tampão por 4 horas, a temperatura ambiente sob agitação constante, ou durante uma noite a 4°C. Foram então lavadas novamente com solução basal por 3 sessões de 10 minutos e incubadas a seguir em solução com proteína A, marcada com ^{125}I , durante 2 horas a temperatura ambiente. O excesso de proteína A foi lavado com solução basal e então, as membranas expostas ao filme de RX (Kodak XAR - Rochester, NY), com intensificador (Cronex Lightning Plus - DuPont, Wilmington, DE) em cassete mantido a -80°C. Após 12 - 48 horas, os filmes foram revelados na forma convencional.

A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das autoradiografias reveladas por densitometria óptica, utilizando o equipamento e programa Eagle Eye *scanner* (Stratagene). Os dados obtidos dos diferentes grupos, ou seja, a comparação das bandas foram analisadas estatisticamente. Os resultados finais foram apresentados através da variação percentual entre os ratos controles e os ratos que receberam a dieta rica em frutose.

3.4.3. Imunoprecipitação:

Em 4 lotes de experimentos, os dois tecidos estudados foram extraídos e homogeneizados no tampão de extração B, em banho de gelo, e mantido nesta temperatura durante todo o processo. Após centrifugação por 25 minutos, a 12.000 rpm a 4°C, volumes das amostras com a mesma concentração protéica foram utilizadas para imunoprecipitação com

anticorpo anti-receptor de insulina. As amostras foram colocadas sob incubação durante 12-14 horas a 4°C, sob agitação contínua. Em seguida acrescentou-se proteína A-Shepharose 6MB em todas as amostras para precipitação dos complexos proteína/anti-IR, sendo mantidas em agitação contínua por mais duas horas. Após nova centrifugação por 15 minutos, a 12000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o material precipitado lavado por três vezes com a solução tampão específica para lavagem.

As proteínas precipitadas, a seguir, foram tratadas com tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) contendo 100 mM de DTT, aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. As proteínas foram então submetidas a eletroforese em SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. A determinação das proteínas segue as etapas descritas anteriormente no item 3.4.2. Nestes experimentos de imunoprecipitação, as membranas foram submetidas ao *blotting* com anticorpo antifosfotirosina.

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

Cerca de 7 lotes de animais, de ambos os grupos, controles e alimentados com dieta rica em frutose, foram submetidos ao teste endovenoso de tolerância à insulina. Após jejum noturno de 12 a 14 horas, os animais foram anestesiados e coletadas pequenas amostras de sangue através do corte na extremidade da cauda. Foi efetuada a laparotomia e os ratos receberam 60 µg de insulina regular na veia porta, e após 4, 8 12 e 16 minutos da infusão, houve coleta de sangue para dosagem de glicose. As amostras foram desproteinizadas em ácido tricloroacético, e após 5 minutos de centrifugação, determinou-se a dosagem plasmática de glicose pelo método da glicose oxidase (TRINDER, 1969).

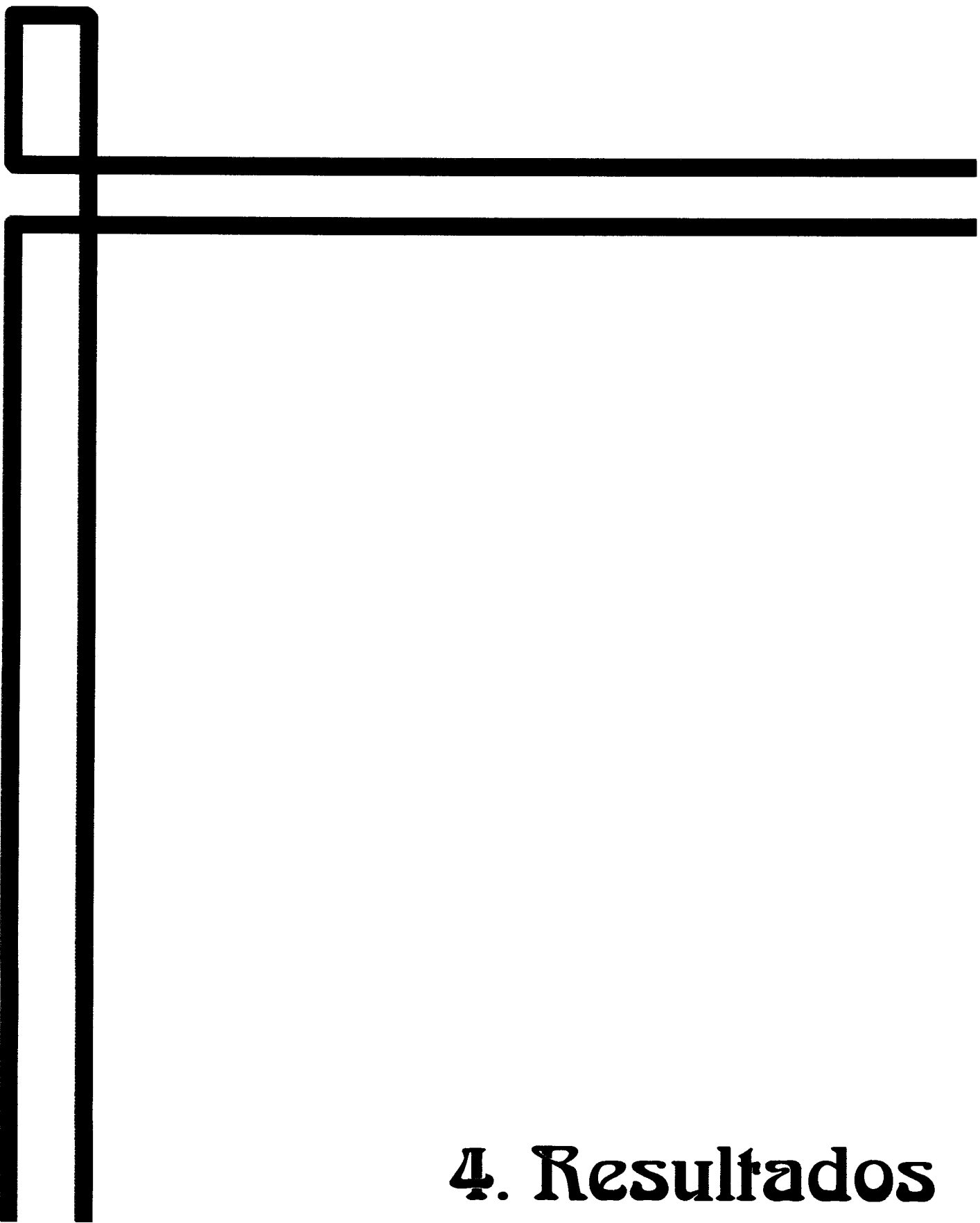
A velocidade de redução da glicose plasmática (Kitt) foi calculada pela fórmula $\ln 2/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose (BONORA et al., 1989).

3.4.5. Determinação da glicose plasmática, insulina sérica, colesterol e triacilglicerídeos séricos:

A dosagem da glicose plasmática foi realizada pelo método enzimático colorimétrico de glicose oxidase (TRINDER, 1969). Os resultados foram expressos em mg/dl. As amostras de sangue dos dois grupos, Controle e Experimental, foram obtidas após 12-14 horas de jejum. Para a dosagem da insulina sérica foi utilizada técnica de radioimunoensaio. Os resultados foram expressos em $\mu\text{U/ml}$. Para a determinação dos níveis de colesterol e triacilglicerídeos séricos, utilizaram-se *kits* comerciais de reações enzimáticas. Os resultados foram expressos em mg/dl. As amostras de sangue para determinação da insulina sérica, colesterol e triacilglicerídeos, dos diferentes grupos de animais foram obtidos por punção cardíaca após jejum de 06 horas.

3.4.6. Análise estatística:

Os experimentos foram realizados, estudando-se comparativamente o grupo Controle e o grupo Experimental. A análise estatística dos resultados empregou o teste *t* de student, não pareado, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$), sendo os resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($X \pm \text{E.P.M.}$), e posteriormente representados em porcentagem de variação em relação aos controles, aos quais se atribuiu o valor de 100%.



4. Resultados

4.1. CARACTERÍSTICAS DOS RATOS WISTAR

A FIGURA 1 mostra a evolução do peso durante os 28 dias de período experimental dos animais do grupo controle alimentados com ração comercial e do grupo que recebeu dieta rica em frutose. Não houve diferença no peso dos animais entre os dois grupos. O peso inicial médio dos ratos controles foi de 127 ± 8 g, e dos ratos alimentados com dieta rica em frutose 129 ± 8 g. Os pesos finais dos grupos foram 271 ± 6 g e 270 ± 5 g, respectivamente, não tendo demonstrado diferença significativa ($p=0,893$).

Os valores semanais de peso estão no ANEXO 1.

A TABELA 1 apresenta os valores de glicose plasmática, níveis séricos de insulina, de colesterol e de triacilglicerídeos pós-prandiais dos dois grupos de animais. Apenas o nível de triacilglicerídeos mostrou-se significativamente superior nos animais alimentados com dieta rica em frutose.

TABELA 1. Glicose plasmática e níveis séricos de insulina, colesterol e triglicerídeos após 28 dias de ensaio. O número mostrado entre parênteses refere-se ao número de animais.

Grupos	Glicemia (mg/dl)	Insulina (μ U/ml)	Colesterol (mg/dl)	Triacilglicerídeos (mg/dl)
Controles	76 ± 3 (23)	44 ± 4 (13)	65 ± 2 (13)	128 ± 9 (11)
Frutose	82 ± 6 (15)	44 ± 5 (8)	72 ± 4 (9)	219 ± 31 (7)*

Os resultados estão expressos como Média $\pm$ desvio padrão, e a significância expressa em * $p<0,05$, entre os grupos controle e experimental.

Os valores relatados acima estão discriminados por animal no ANEXO 2.

4.1.2. Velocidade de redução da glicose nos animais controles e alimentados com dieta rica em frutose - caracterização da sensibilidade à insulina

A FIGURA 2 mostra a velocidade de redução da glicose (Kitt) durante o teste de tolerância à insulina curto, realizado nos primeiros 16 minutos após a infusão de insulina na veia porta dos animais. O Kitt mostrou-se significativamente menor nos animais alimentados com a dieta rica em frutose, sendo a média de $2,91 \pm 0,22$ %/min, quando comparado à média dos animais controles, $3,94 \pm 0,29$ %/min ($p < 0,02$).

Com o resultado do teste endovenoso de tolerância à insulina, constatamos que os animais alimentados com a dieta rica em frutose apresentaram um estado leve de resistência à insulina, caracterizado por 25% de diminuição na velocidade de redução da glicose.

Os valores individuais relatados acima estão descritos no ANEXO 3.

4.2. EFEITO DA DIETA RICA EM FRUTOSE NAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA NOS RATOS WISTAR

4.2.1. Efeito da dieta rica em frutose na regulação do receptor de insulina e da pp185 (IRS-1/IRS-2) no fígado

Através da determinação por *immunoblotting* com anticorpo anti-receptor de insulina verificou-se não ocorrer alteração do nível protéico do receptor de insulina no fígado dos ratos tratados com frutose em relação aos controles (FIGURA 3A). A análise, por densitometria óptica de sete experimentos na FIGURA 3B, mostra que os níveis teciduais de receptor de insulina nos animais alimentados com a dieta rica em frutose foram $93 \pm 7\%$, em relação aos animais controle ($p=0,781$).

Uma vez que a fosforilação da subunidade β do receptor de insulina não foi visualizada em experimentos de extrato total do tecido hepático, amostras de fígado foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-receptor de insulina e posteriormente, submetidas a *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina (FIGURA 4A). Como resultado, observa-se que a fosforilação em tirosina estimulada pela insulina da subunidade β de 95 kDa do

receptor de insulina, apresentou diminuição significativa entre os dois grupos de animais. Em sete experimentos, a FIGURA 4B mostra que a fosforilação do receptor de insulina no grupo de frutose reduziu-se para $72 \pm 4\%$ ($p < 0,0001$), em relação aos controles.

O nível tecidual do IRS-1 no fígado, obtido através do uso de anticorpos específicos anti-IRS-1 (FIGURA 5A), foi semelhante entre os ratos alimentados com dieta rica em frutose e os controles, (dieta controle = $100 \pm 7\%$ vs dieta de frutose = $98 \pm 7\%$, $p = 0,873$) (FIGURA 5B).

A FIGURA 6A mostra o efeito da insulina sobre a fosforilação em tirosinas de proteínas celulares do tecido hepático de ratos controles e alimentados com a dieta rica em frutose. Observou-se uma banda ampla, com peso molecular entre 110 e 130 kDa; a banda foi inicialmente descrita como sendo a FAK - proteína quinase de adesão focal (YAMAUCHI *et al.*, 1995). Porém não é possível descartar a possibilidade de que outras proteínas fosforiladas em tirosina possam também migrar nesta banda; por isso, será denominada genericamente de pp120. O comportamento desta banda após o estímulo com insulina é heterogêneo e classicamente não se considera que para esta banda migrem substratos do receptor de insulina. Como ela é insignificante para a análise dos eventos iniciais da ação insulínica, seu comportamento não será descrito em detalhes. Uma outra banda que migra entre 165 e 185 kDa, também aparece após o estímulo insulínico, sendo classicamente denominada pp185. Esta banda foi identificada como contendo o substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), como componente principal (ROTHENBERG *et al.*, 1991).

Após estímulo com insulina observou-se um aumento marcante no grau de fosforilação da pp185 (IRS-1/IRS-2) nos dois grupos de animais, sendo o aumento menor nos animais tratados com frutose (dieta controle = $100 \pm 5\%$ vs dieta frutose = $83 \pm 5\%$, $p < 0,05$) (FIGURAS 6A e 6B).

Os valores individuais relatados no item 4.2.1 estão nos ANEXOS 4, 5, 6 e 7.

4.2.2. Efeito da dieta rica em frutose na regulação do receptor de insulina e da pp185 no músculo

A alimentação com dieta rica em frutose não produziu alterações significativas no nível protéico do receptor de insulina no tecido muscular dos animais (FIGURA 7A). A FIGURA 7B demonstra que o nível tecidual do receptor de insulina em ratos que receberam a dieta rica em frutose foi $111 \pm 6\%$ ($p=0,202$) em comparação aos ratos do grupo controle, determinado por *immunoblotting* com anticorpo anti-IR.

Ao estudo da fosforilação da subunidade β do receptor de insulina no tecido muscular, foi necessário proceder imunoprecipitação com anticorpo anti-receptor de insulina e em seguida *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina (FIGURA 8A), de maneira semelhante ao tecido hepático. Após o estímulo com insulina o grau de fosforilação do receptor no tecido muscular não apresentou alteração significativa entre os dois grupos (FIGURA 8B).

Não houve mudanças também quanto ao nível tecidual de IRS-1 no músculo de ratos de ambos os grupos (FIGURA 9A). Em 29 experimentos, a quantidade de IRS-1 nos animais alimentados com a dieta rica em frutose foi $112 \pm 5\%$ ($p=0,130$) (FIGURA 9B), quando comparados aos animais controles.

A fosforilação da pp185 (IRS-1/IRS-2) no tecido muscular apresentou um comportamento similar ao do tecido hepático. Após estímulo insulínico, observa-se um aumento no grau de fosforilação da pp185 no músculo de ambos os grupos de animais. Entretanto, o aumento nos animais tratados com a dieta rica em frutose é significativamente menor quando comparado ao grupo controle (dieta controle = 100 ± 4 vs dieta frutose = $77 \pm 4\%$, $p<0,0001$) (FIGURAS 10A e 10B).

Os valores individuais relatados no item 4.2.2 estão descritos nos ANEXOS 8, 9, 10 e 11.

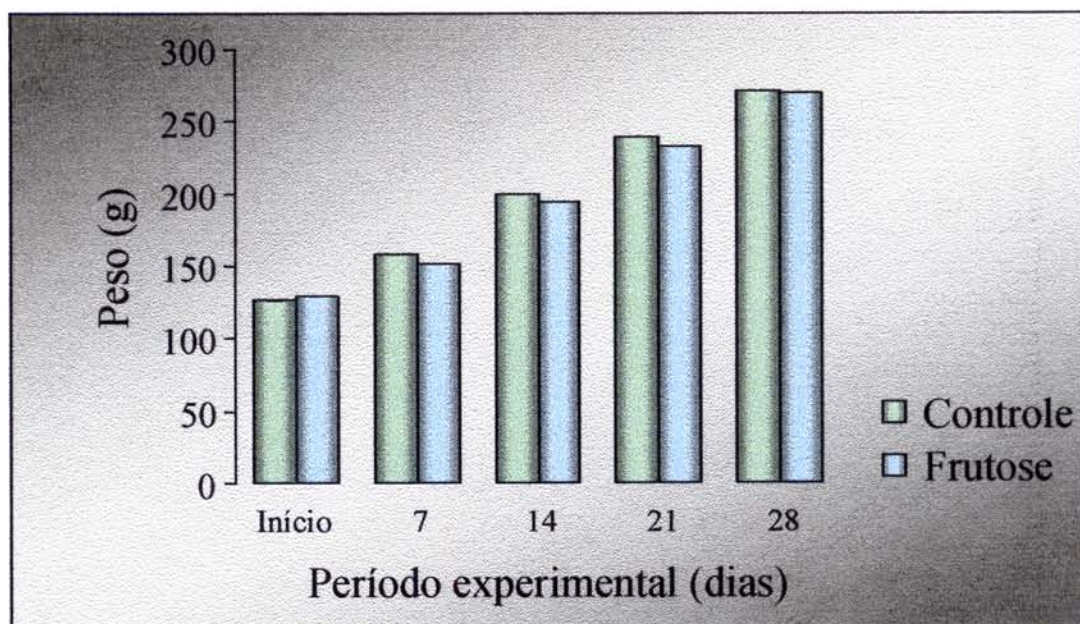


Figura 1. Evolução do peso dos animais (g) durante períodos experimentais de 28 dias. Os valores são expressos como média de 10 grupos experimentais (n = 4 animais/grupo experimental).

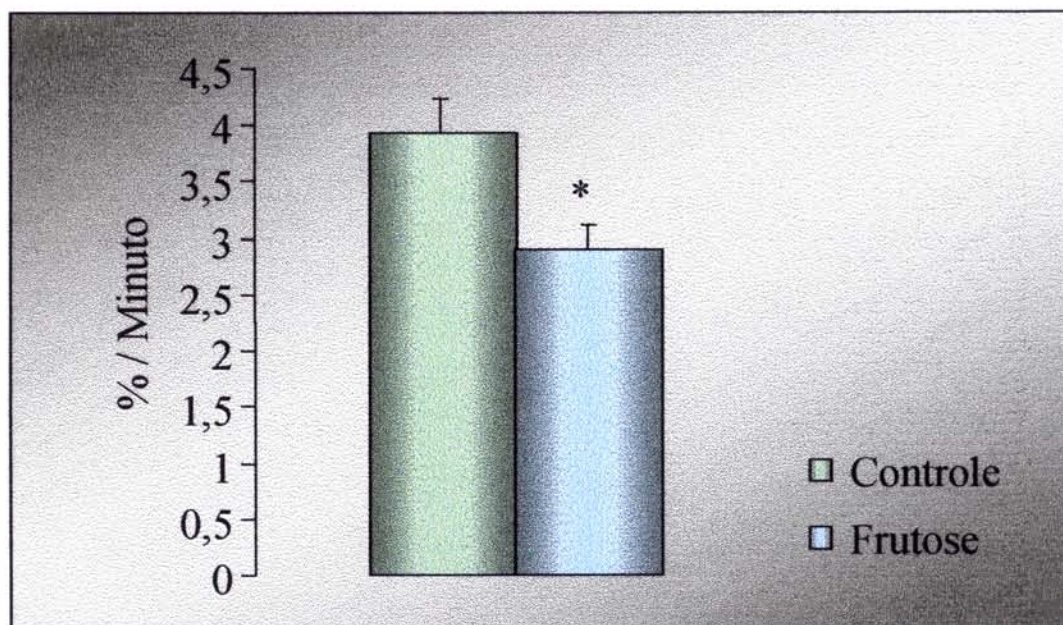
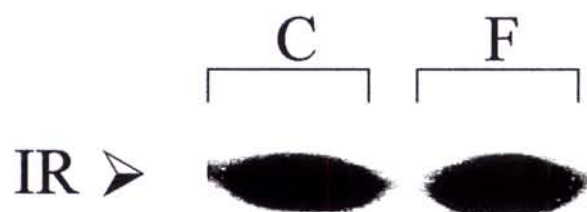


Figura 2. Velocidade de redução da glicose (Kitt) em ratos controle e alimentados com a dieta rica em frutose. O itt foi calculado como descrito em Métodos, e os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

A. Blot.: α IR



B. Nível protéico do receptor de insulina

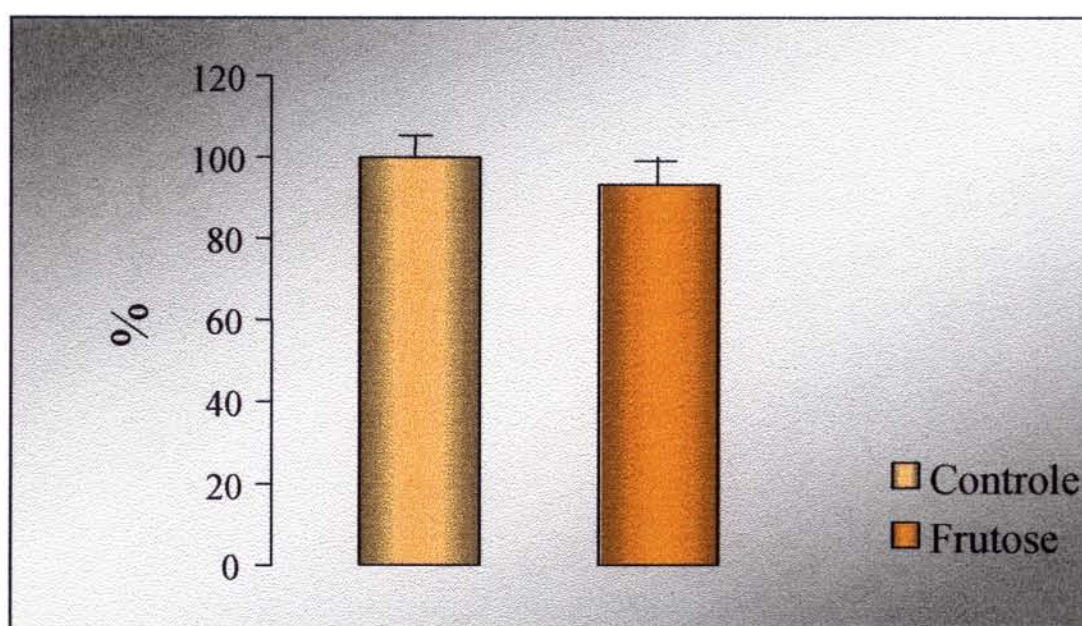
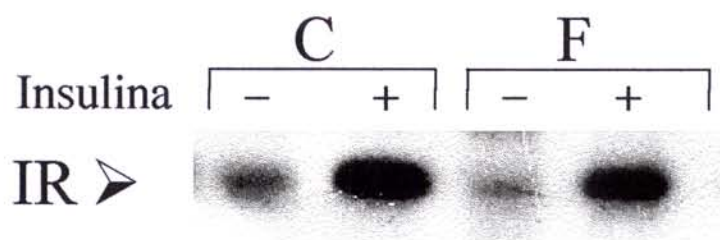


Figura 3. Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas à *immunoblotting* com anticorpo anti-receptor de insulina. **A:** Avaliação do nível protéico do receptor de insulina (IR) em tecido hepático de ratos controles (C) e alimentados com a dieta rica em frutose (F). **B:** Efeito da dieta rica em frutose sobre a concentração protéica do IR no fígado de ratos dos dois grupos. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 7 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p < 0,05$.

A. IP: α IR

Blot.: α PY



B. Fosforilação do receptor de insulina

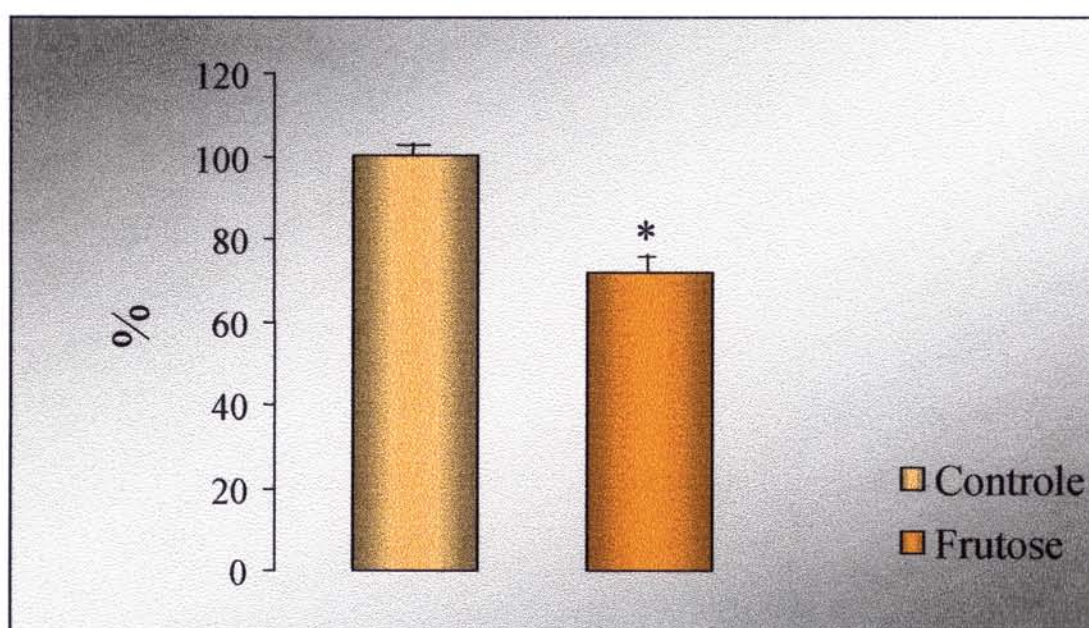
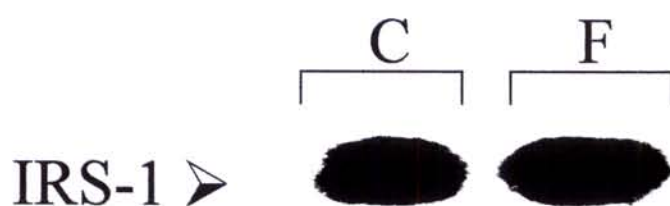


Figura 4. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. **A:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina (IR) em tecido hepático de ratos controles (C) e alimentados com a dieta rica em frutose (F), antes (-) e após (+) infusão de insulina. **B:** Efeito da dieta rica em frutose sobre o grau de fosforilação do IR no fígado de ratos dos dois grupos. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 7 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p < 0,05$.

A. Blot.: α IRS-1



B. Nível protéico do IRS-1

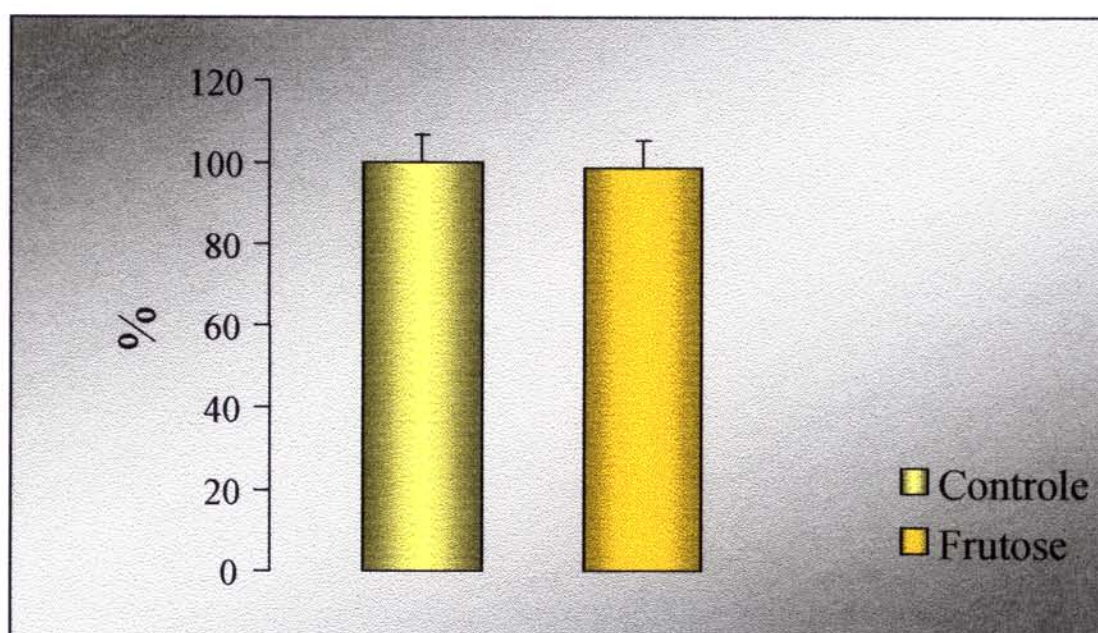
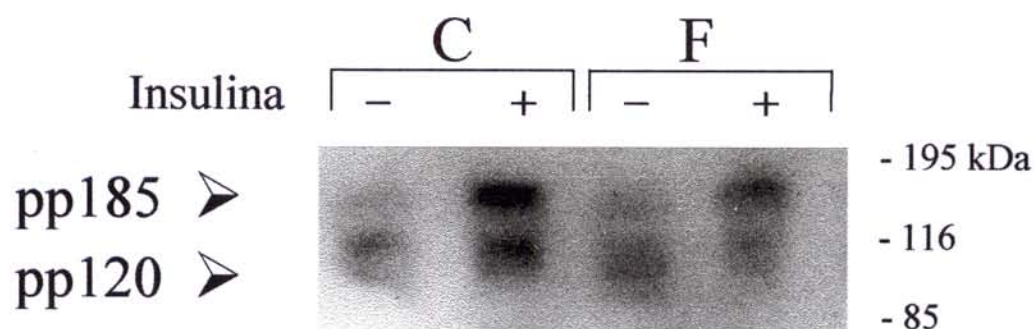


Figura 5. Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas à *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1. **A:** Avaliação do nível protéico do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) em tecido hepático de ratos controles (C) e alimentados com a dieta rica em frutose (F). **B:** Efeito da dieta rica em frutose sobre a concentração protéica do IRS-1 no fígado de ratos dos dois grupos. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 28 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p < 0,05$.

A. Blot.: α PY



B. Fosforilação da pp185

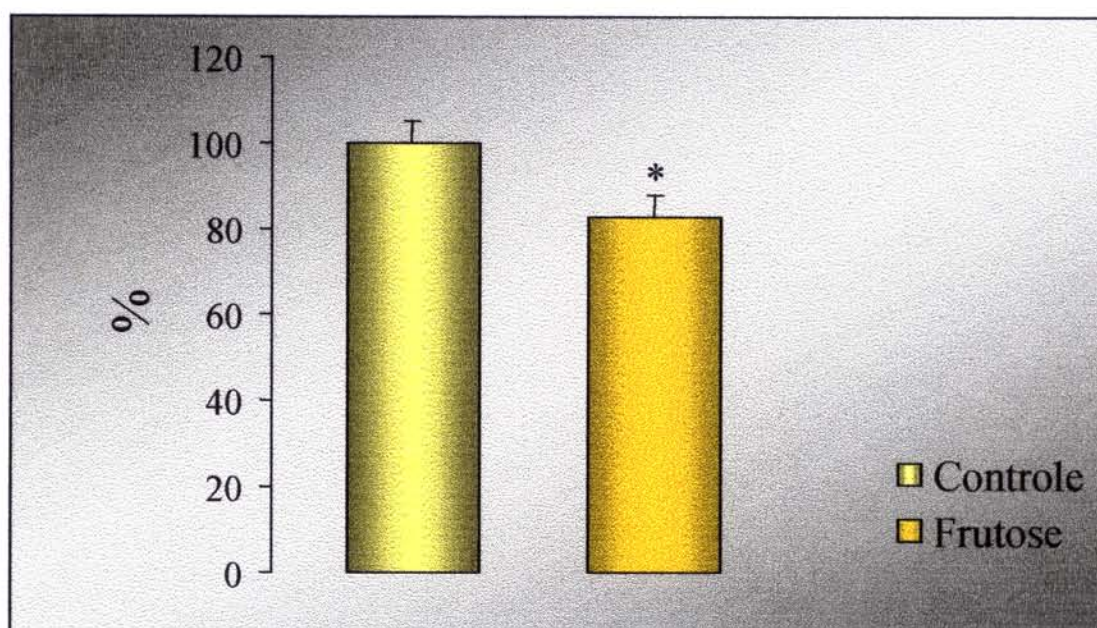
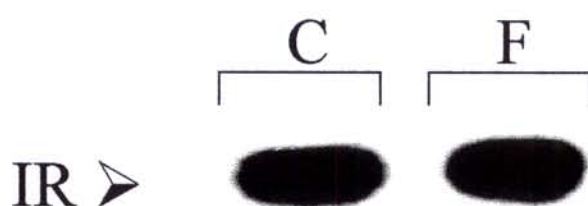


Figura 6. Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. **A:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 em tecido hepático de ratos controles (C) e alimentados com a dieta rica em frutose (F), antes (-) e após (+) infusão de insulina. **B:** Efeito da dieta rica em frutose sobre o grau de fosforilação da pp185 no fígado de ratos dos dois grupos. A densitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 5 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p < 0,05$.

A. Blot.: α IR



B. Nível protéico do receptor de insulina

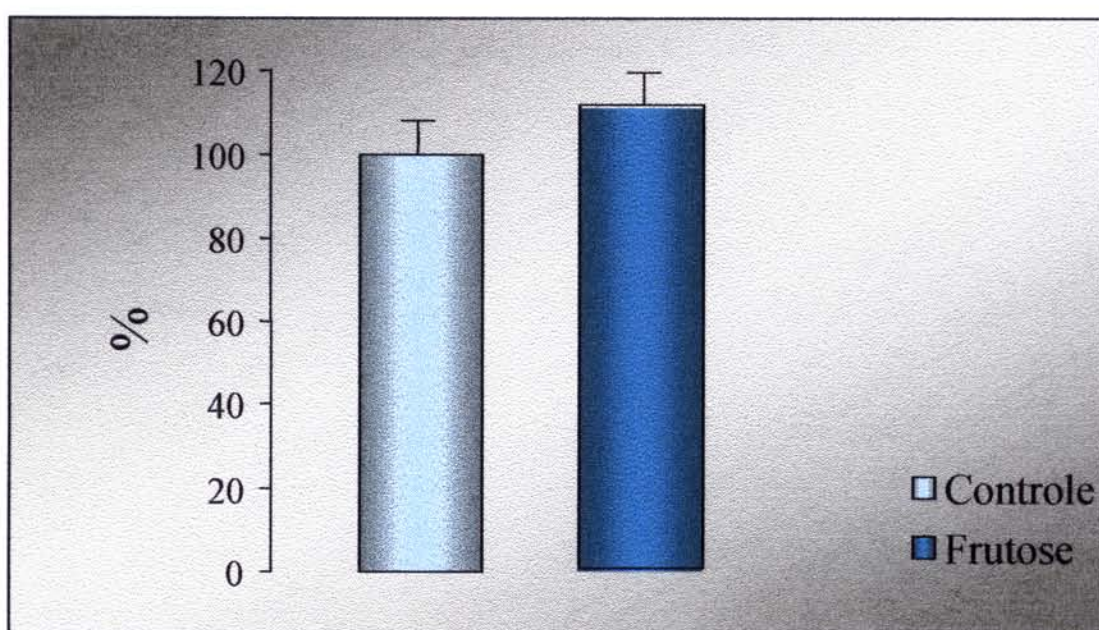
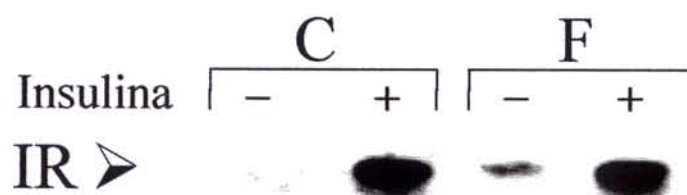


Figura 7. Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas à *immunoblotting* com anticorpo anti-receptor de insulina. **A:** Avaliação do nível protéico do receptor de insulina (IR) em tecido muscular de ratos controles (C) e alimentados com a dieta rica em frutose (F). **B:** Efeito da dieta rica em frutose sobre a concentração protéica do IR no músculo de ratos dos dois grupos. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 7 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p < 0,05$.

A. IP: α IR
Blot.: α PY



B. Fosforilação do receptor de insulina

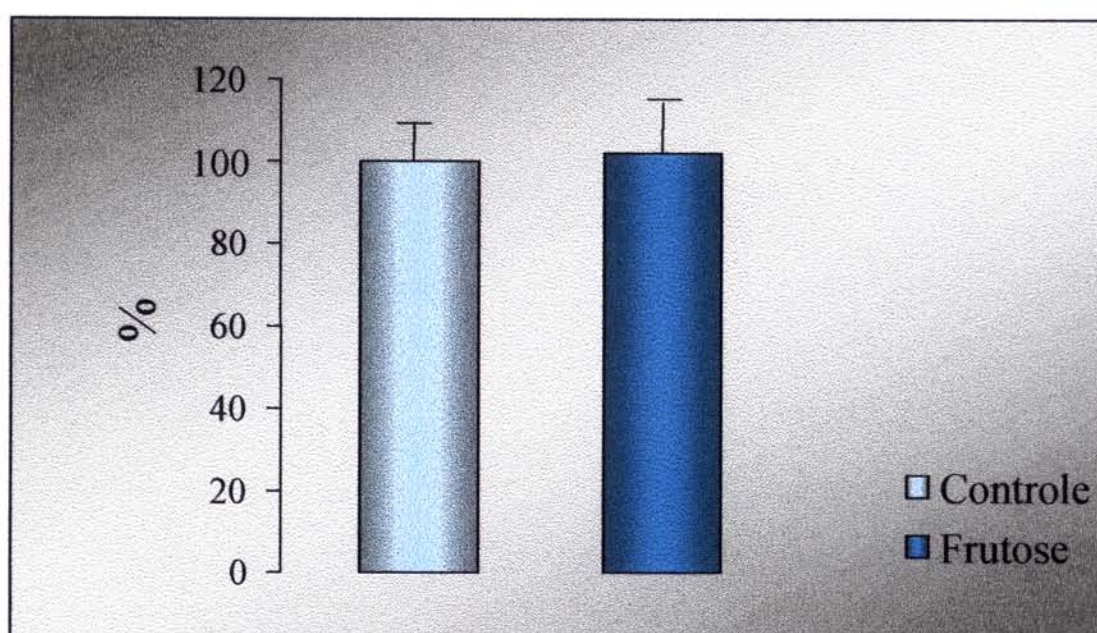
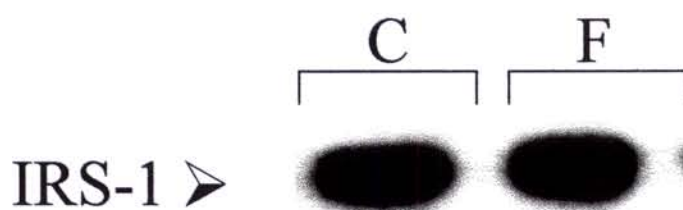


Figura 8. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR, e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. **A:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina (IR) em tecido muscular de ratos controles (C) e alimentados com a dieta rica em frutose (F), antes (-) e após (+) infusão de insulina. **B:** Efeito da dieta rica em frutose sobre o grau de fosforilação do IR no músculo de ratos dos dois grupos. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 7 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p < 0,05$.

A. Blot.: α IRS-1



B. Nível protéico do IRS-1

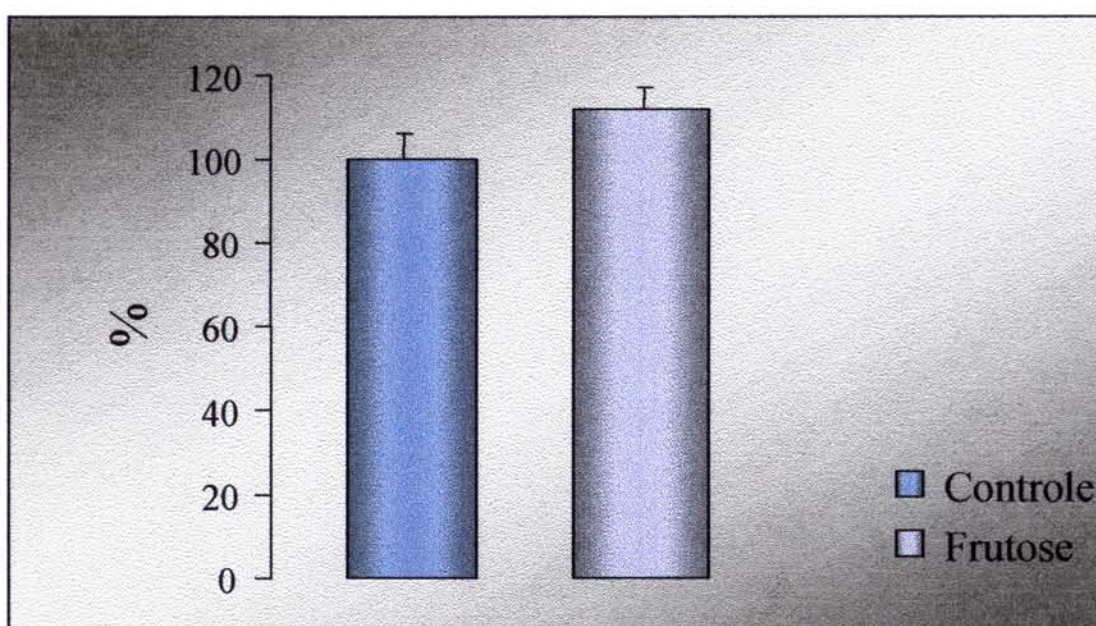
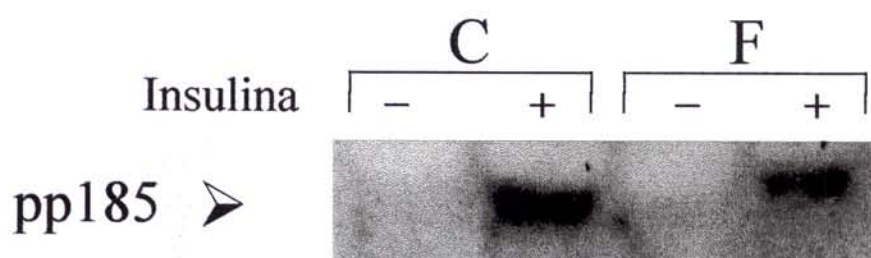


Figura 9. Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas à *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1. **A:** Avaliação do nível protéico do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) em tecido muscular de ratos controles (C) e alimentados com a dieta rica em frutose (F). **B:** Efeito da dieta rica em frutose sobre a concentração protéica do IRS-1 no músculo de ratos dos dois grupos. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 29 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p < 0,05$.

A. Blot.: α PY



B. Fosforilação da pp185

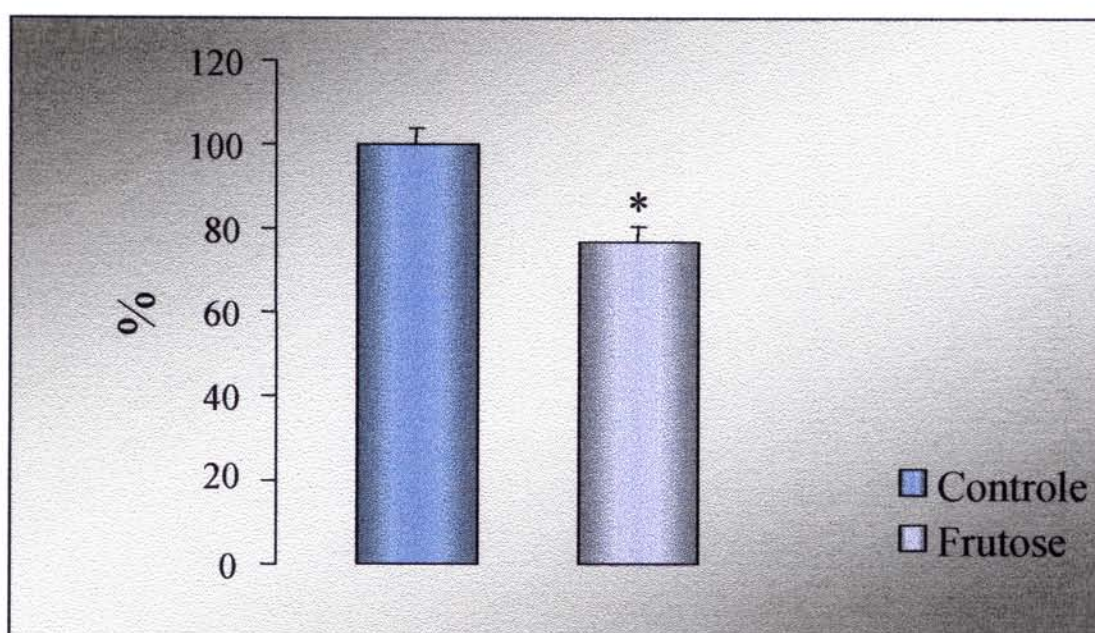
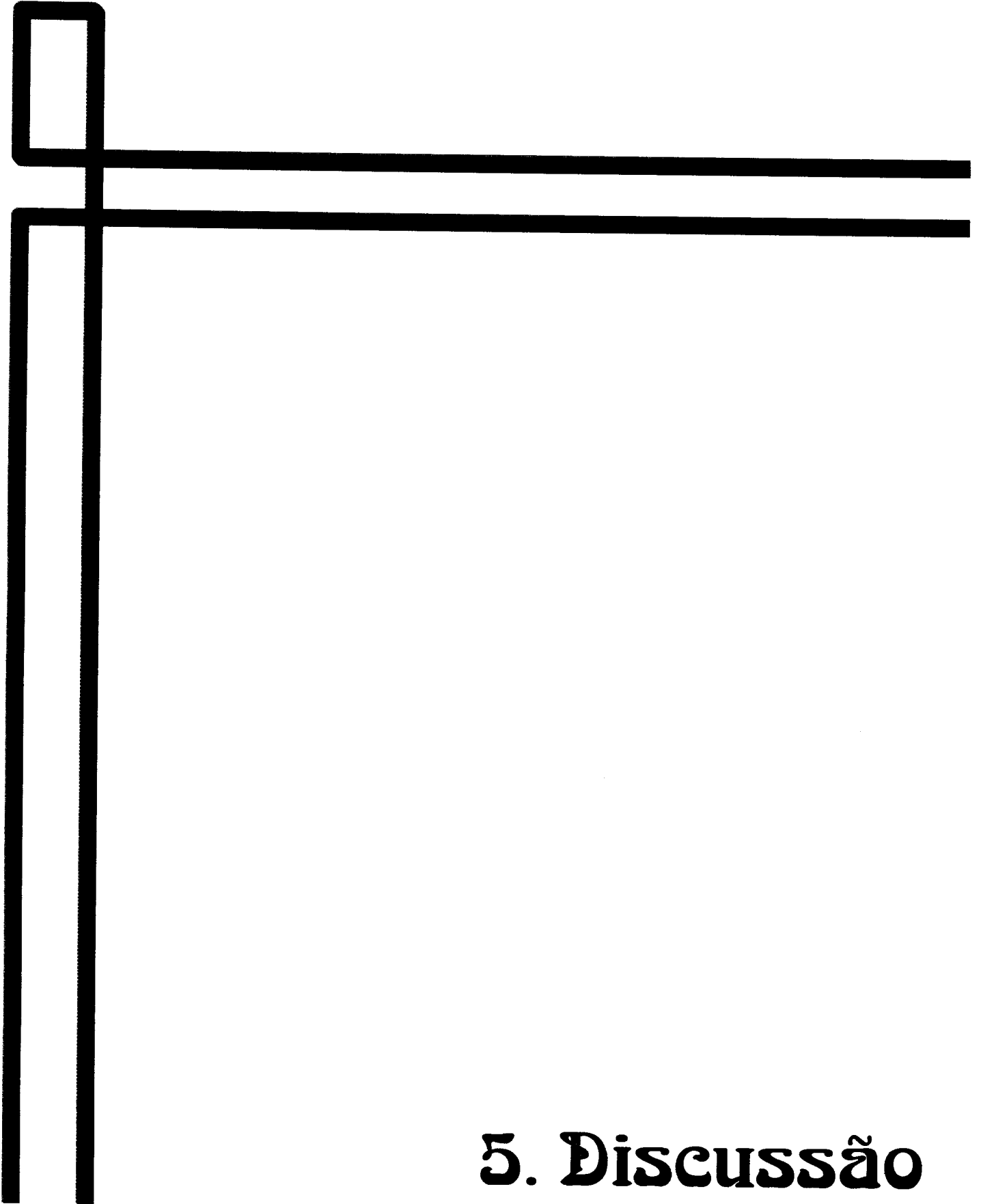


Figura 10. Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina. **A:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 em tecido muscular de ratos controles (C) e alimentados com a dieta rica em frutose (F), antes (-) e após (+) infusão de insulina. **B:** Efeito da dieta rica em frutose sobre o grau de fosforilação da pp185 no músculo de ratos dos dois grupos. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 12 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p < 0,05$.



5. Discussão

Após a insulina ligar-se aos seus receptores na maioria das células, dando início às ações metabólicas e promotoras do crescimento, ocorrerá uma mudança conformacional do receptor e ativação da tirosina quinase da subunidade β intracelular, levando à autofosforilação de resíduos tirosina nesta subunidade. Como resultado, há um aumento da atividade quinase em direção a outras proteínas citoplasmáticas, como a pp185 que é constituída de pelo menos dois substratos: o substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) (SUN *et al.*, 1991; SUN *et al.*, 1992), o melhor caracterizado até o momento; e o substrato-2 do receptor de insulina (IRS-2) (ARAKI *et al.*, 1994; SUN *et al.*, 1995), recentemente identificado. A pp185, ao ser fosforilada após o estímulo com insulina, poderá associar-se diretamente com proteínas contendo domínios SH2 (assim chamadas por apresentarem homologia ao oncogene *Src*) para propagar o sinal (BACKER *et al.*, 1992; FOLLI *et al.*, 1993; KUHNE *et al.*, 1993). A PI 3-quinase é uma das proteínas SH2 que vai se ligar ao IRS-1 (SUN *et al.*, 1991; BACKER *et al.*, 1992; MYERS *et al.*, 1992) e ao IRS-2 (SUN *et al.*, 1995) fosforilados. Adicionalmente aos IRS-1 e 2, muitos outros substratos celulares têm sido descritos para o receptor de insulina, ou seja, proteínas que são também fosforiladas após estimulação insulínica. São elas: a ecto-ATPase (LIN & GUIDOTTI *et al.*, 1989; NAJJAR *et al.*, 1993), a pp15 (BERNIER *et al.*, 1987), a Shc (PELLICI *et al.*, 1992; KOVACINA & ROTH, 1993), a pp60 ou IRS-3 (LAVAN *et al.*, 1997a; SMITH-HALL *et al.*, 1997), o JAK2 (SAAD *et al.*, 1996), e o IRS-4 (LAVAN *et al.*, 1997b).

O estudo da regulação das etapas iniciais da ação insulínica pode ser realizado *in vitro*, utilizando-se receptores de insulina parcialmente purificados e substratos exógenos, ou pode ser realizado *in vivo*, após estímulo com insulina.

Inicialmente, os estudos experimentais sobre o processo de sinalização insulínica utilizavam receptores parcialmente purificados, e a atividade tirosina quinase era determinada *in vitro*, em direção a substratos exógenos tais como histonas (ROTHENBERG *et al.*, 1990). Embora tais procedimentos fossem úteis na compreensão da fisiologia do receptor, eles estavam sujeitos a artefatos bioquímicos resultantes da homogeneização do tecido e da purificação do receptor, como proteólise e desfosforilação, devido a fosfatases contaminantes presentes no meio (KATHURIA *et al.*, 1986). Também, a remoção do receptor da membrana plasmática interferia nas interações com outros componentes celulares, podendo influenciar em sua atividade tirosina

quinase (FEHLMAN *et al.*, 1985). Além disso, a atividade quinase quando estudada *in vitro*, apresenta diferenças dependendo do substrato utilizado (ROTHENBERG *et al.*, 1990).

O método utilizado no presente trabalho foi a estimulação *in vivo* com insulina, extração e homogeneização dos tecidos hepático e muscular, em condições desnaturantes ou em condições apropriadas para imunoprecipitação, e posterior *immunoblotting* com anticorpos específicos. Esta técnica, não estando sujeita às implicações citadas acima, permitiu a determinação direta do grau de fosforilação do receptor de insulina e da pp185 (IRS-1 e IRS-2); ou seja, da atividade quinase *in vivo* do receptor dirigida a seus substratos endógenos, nestes dois tecidos com importante papel na utilização da glicose (SAAD *et al.*, 1989).

A partir desta metodologia, investigamos as etapas iniciais da transmissão do sinal insulínico em fígado e músculo de ratos alimentados com uma dieta rica em frutose, que constitui um modelo de resistência à insulina.

Para caracterizar a resistência insulínica deste modelo animal, utilizamos o teste de tolerância à insulina (ITT) curto. A técnica do *clamp* euglicêmico ou hiperinsulinêmico (DeFRONZO *et al.*, 1979), embora seja um método bastante sensível, e tradicionalmente utilizado na determinação da ação insulínica *in vivo*, tanto em humanos como em animais, é de difícil execução. BONORA e colaboradores demonstraram em indivíduos obesos e diabéticos, que o teste de tolerância à insulina (ITT) curto, o qual determina a velocidade de redução dos níveis da glicose plasmática, pode ser um método alternativo de avaliação da sensibilidade à insulina, apresentando boa correlação com os resultados obtidos com o *clamp*, com a vantagem de ser facilmente executado (BONORA *et al.*, 1989).

A alimentação por 28 dias com uma dieta contendo 66% das calorias provenientes de frutose, induziu discreta resistência à insulina, que foi demonstrada por significativa diminuição da velocidade de redução dos níveis da glicose, sugerindo menor sensibilidade ao hormônio. Somando-se a este resultado, o grupo da dieta de frutose apresentou níveis elevados de triacilglicerídeos, e ausência de alterações significativas dos níveis de glicemia, insulinemia ou colesterol, quando comparados ao grupo controle (TABELA 1).

Os efeitos das dietas ricas em açúcares simples (sacarose, frutose, glicose) têm sido bastante investigados. Em particular a frutose, devido ao consumo cada vez maior, principalmente nos Estados Unidos, e aos resultados demonstrados tanto em estudos animais (ZAVARONI *et al.*, 1980; SLEDER *et al.*, 1980; ZAVARONI *et al.*, 1982; TOBEY *et al.*, 1982; HWANG *et al.*, 1987; HWANG *et al.*, 1989; REAVEN *et al.*, 1989; THORBURN *et al.*, 1989; KOBAYASHI *et al.*, 1993; BHANOT *et al.*, 1994), como em homens, diabéticos (CRAPO *et al.*, 1986) ou não (BECK-NIELSEN *et al.*, 1980; HALLFRISCH *et al.*, 1983; BOSSETTI *et al.*, 1984; CRAPO & KOLTERMAN, 1984).

REISER *et al.* (1979), encontraram em humanos concentrações de insulina de jejum maiores no grupo que recebeu 30% das calorias como sacarose; e o efeito foi ainda maior em homens que já apresentavam hipertriacilgliceridemia. Em um segundo estudo, eles encontraram resultados semelhantes: elevação das concentrações de insulina de jejum como consequência do aumento da ingestão de sacarose (REISER *et al.*, 1981). Investigando os efeitos de quantidades moderadas de frutose, HALLFRISCH *et al.* (1983) encontraram níveis séricos de glicose e insulina pós-prandiais e níveis de glicose de jejum elevados em homens normais e hiperinsulinêmicos após consumirem dietas contendo 7,5 e 15% do total das calorias de frutose por 5 semanas, quando comparados com o grupo da dieta de amido; não se registrando mudança nas concentrações de insulina de jejum. Outros estudos porém não encontraram alterações nos níveis de glicose ou insulina em homens que receberam tratamento com frutose (TURNER *et al.*, 1979; BOSSETTI *et al.*, 1984).

Os resultados diferem também em relação aos níveis de triacilglicerídeos. HALLFRISCH *et al.* (1983) demonstraram que aumentando as quantidades de frutose (0%, 7,5%, e 15% das calorias) nas dietas, aumentos proporcionais ocorriam nos níveis de triacilglicerídeos plasmáticos de homens hiperinsulinêmicos. Contudo, condições semelhantes não produziram alterações em outros trabalhos (BOSSETTI *et al.*, 1984; CRAPO & KOLTERMAN, 1984; CRAPO *et al.*, 1986). Foi sugerido que no sangue, concentrações de triacilglicerídeos elevadas são encontradas em homens com concentrações de insulina de jejum inicialmente elevadas (DALY *et al.*, 1986).

Para investigar a sensibilidade à insulina em humanos que recebiam frutose, BECK-

NIELSEN *et al.* (1980) utilizaram o teste de tolerância à insulina intravenoso (IVITT), e encontraram redução de 25% da sensibilidade insulínica quando comparado ao grupo da dieta de glicose. Enquanto THORBURN *et al.* (1990), através da técnica de *clamp* euglicêmico não encontraram efeitos na sensibilidade à insulina após o consumo de uma dieta com 13% de frutose consumida por três meses.

Resultados conflitantes quanto aos níveis glicêmicos e de triacilglicerídeos podem em parte ser explicados pelas dificuldades encontradas nos estudos com humanos, como interferência nas dietas, controle da ingestão de carboidratos, níveis de atividade física, e finalmente a heterogeneidade entre os açúcares (quantidade e qualidade) oferecidos na ampla gama de estudos. Também se deve considerar que ratos de laboratório são muito mais uniformes geneticamente que os humanos, o que dificulta a visualização dos reais efeitos perante a heterogeneidade das respostas, e ainda o diferente estilo de vida de cada um.

O estudo de dietas ricas em frutose em animais apresenta também algumas diferenças em seus resultados, porém em sua maioria são similares. As características principais dos ratos que receberam uma dieta rica em frutose são: **resistência à insulina** (ZAVARONI *et al.*, 1980; TOBEY *et al.*, 1982; HWANG *et al.*, 1987; THORBURN *et al.*, 1989), **hipertriacilgliceridemia** (SLEDER *et al.*, 1980; ZAVARONI *et al.*, 1982; HWANG *et al.*, 1987; HWANG *et al.*, 1989; REAVEN *et al.*, 1989; THORBURN *et al.*, 1989), **hiperinsulinemia** (SLEDER *et al.*, 1980; ZAVARONI *et al.*, 1980; ZAVARONI *et al.*, 1982; TOBEY *et al.*, 1982; HWANG *et al.*, 1987; HWANG *et al.*, 1989; REAVEN *et al.*, 1989; KOBAYASHI *et al.*, 1993; BHANOT *et al.*, 1994), e **hipertensão** (HWANG *et al.*, 1987; REAVEN *et al.*, 1989; HWANG *et al.*, 1989; BHANOT *et al.*, 1994). Este modelo animal de resistência à insulina induzida pela dieta rica em frutose, tem sido relacionado com as características da Síndrome X desenvolvida em humanos, que apresenta quadro de resistência à insulina associado com hiperinsulinemia, hiperlipidemia e hipertensão, (REAVEN, 1988).

No presente estudo, apesar da resistência insulínica e dos níveis elevados de triacilglicerídeos desenvolvidos nos ratos alimentados com a dieta rica em frutose, não observou-se alteração significativa dos níveis de insulina. O aumento dos valores de triacilglicerídeos foi

discreto quando comparado aos valores dos trabalhos citados no parágrafo anterior. Os efeitos do presente trabalho poderiam ser atribuídos à diferenças da composição da dieta. Nos estudos SLEDER *et al.* (1980); ZAVARONI *et al.* (1982); HWANG *et al.* (1987); HWANG *et al.* (1989); REAVEN *et al.* (1989); e THORBURN *et al.* (1989), utilizaram-se dietas ricas em frutose, contendo 66% das calorias de frutose, 22% de proteína e 12% de gordura animal (banha), enquanto que a dieta utilizada em nossa investigação difere quanto ao tipo de gordura, onde foi empregado o óleo de soja nos dois grupos de estudo por ser uma fonte lipídica mais adequada para os ratos, e para eliminar variáveis que poderiam influenciar nos efeitos da frutose.

Alguns trabalhos demonstraram que componentes da dieta, especialmente o conteúdo de lipídeos (saturado ou poliinsaturado), exercem influência nos efeitos causados pelo conteúdo de açúcar da dieta (LITTLE *et al.*, 1970; BIRCHWOOD *et al.*, 1970; ANTAR *et al.*, 1970; MANN *et al.*, 1973). Ácidos graxos saturados levam ao aumento das concentrações séricas de colesterol total, comparados à ácidos graxos insaturados, e ácidos graxos insaturados n-3 tendem a reduzir as concentrações de triacilglicerídeos. Então, o tipo de gordura pode interagir com a composição de açúcar na dieta (FRAYN & KINGMAN, 1995). Em homens normais, a dieta contendo 34% de calorias sob forma de sacarose, por duas semanas, provocou maior aumento de triacilglicerídeos e colesterol quando se empregou ácidos graxos saturados, comparado aos poliinsaturados (MANN *et al.*, 1973). Em pacientes com hiperlipoproteinemias, a dieta com 40% de sacarose não elevou as concentrações de triacilglicerídeos e colesterol plasmáticos, quando a gordura poliinsaturada foi utilizada, porém as concentrações aumentaram com o uso de gordura saturada (LITTLE *et al.*, 1970; BIRCHWOOD *et al.*, 1970; ANTAR *et al.*, 1970). Em estudo com ratos que receberam dietas contendo 40% de calorias sob forma de frutose, tendo o restante de nutrientes permanecido igual ao da dieta controle (ração comercial), e outro grupo contendo 40% de frutose mais 7% de gordura animal (banha) por 2 semanas, MATSUI e colaboradores encontraram o seguinte: a dieta com frutose e gordura animal diminuiu a sensibilidade à insulina, elevou a pressão sanguínea sistólica, aumentou os níveis plasmáticos de triacilglicerídeos, de ácidos graxos livres, e de VLDL (*very-low-density lipoprotein*) e de LDL (*low-density lipoprotein*), em relação à dieta controle. Enquanto que o grupo que recebeu a dieta composta por frutose sem a gordura animal, não desenvolveu resistência à insulina e não alterou a pressão sanguínea, tendo apenas elevado o nível plasmático de triacilglicerídeos, comparado aos controles (MATSUI *et al.*, 1997). Estas

diferenças sugerem que o conteúdo de frutose bem como o tipo de gordura são importantes no desenvolvimento da resistência à insulina neste modelo animal. Em vista disso, é provável que se o conteúdo de lipídeos da dieta oferecida aos animais do presente estudo, fosse gordura saturada, os níveis de triacilglicerídeos seriam mais elevados, e o quadro de resistência insulínica mais grave.

Na literatura, os mecanismos responsáveis pela resistência à insulina e pela hipertriacilgliceridemia encontradas nos ratos alimentados com dieta rica em frutose, não estão claros e várias hipóteses têm sido formuladas para explicá-los. A resistência insulínica neste modelo animal se relaciona frequentemente com o desenvolvimento da hipertriacilgliceridemia. Particularmente neste modelo, a hipertriacilgliceridemia é um fator muito importante, já que o alto consumo de frutose favorece níveis elevados de triacilglicerídeos circulantes (HALLFRISCH, 1990). O processo pelo qual a frutose induz a elevação de triacilglicerídeos, parece ser pela alteração da síntese de ácidos graxos no fígado, aumentando a esterificação de triacilglicerídeos e secreção de VLDL hepático (FRAYN & KINGMAN, 1995; BLADES & GARG, 1995). Alguns estudos demonstraram também uma remoção prejudicada de triacilglicerídeos da circulação, em resposta a alimentação com frutose (DALL'AGLIO *et al.*, 1983; MAMO *et al.*, 1991). ZAVARONI e colaboradores demonstraram que nos ratos alimentados com dieta rica em frutose, ocorria secreção aumentada de VLDL, concluindo que a frutose pode agir diretamente no fígado aumentando a secreção de VLDL, e que a hipertriacilgliceridemia induzida pela frutose pode ocorrer na ausência de hiperinsulinemia. Por outro lado, o aumento da concentração de triacilglicerídeos plasmáticos produzido pela frutose foi reduzido dramaticamente nos ratos submetidos a exercício físico, e esta redução foi associada com a diminuição da concentração de insulina plasmática. Finalmente, baseados nestas observações, os autores sugeriram que a alimentação com frutose produziria hipertriacilgliceridemia por efeito direto sobre a secreção hepática de VLDL, bem como por efeito secundário de resistência insulínica e hiperinsulinemia (ZAVARONI *et al.*, 1982). Outro aspecto relevante em estudos da alimentação rica em frutose, foi a melhora da resistência à insulina após a normalização dos níveis de triacilglicerídeos circulantes com o uso de agentes hipolipidêmicos, tais como *dexfenfluramine* (STORLIEN *et al.*, 1989), ou *benfluorex* (STORLIEN *et al.*, 1993).

CRAPO *et al.* (1986) procurando investigar possíveis alterações moleculares na transmissão do sinal insulínico, em adipócitos isolados de humanos que receberam dieta rica em frutose, demonstraram que não ocorria alteração da ligação de insulina ao seu receptor. Entretanto, em estudo anterior, BECK-NIELSEN *et al.* (1980), encontraram diminuição da ligação de insulina nos monócitos circulantes de pacientes que consumiram dieta rica em frutose. Investigando os efeitos positivos da suplementação de óleo de peixe na dieta rica em frutose, HUANG *et al.* (1997), utilizando adipócitos isolados, demonstraram redução significativa da ligação de insulina após estímulo com o hormônio. EIFFERT *et al.* (1991) por sua vez, estudaram os efeitos do envelhecimento, do exercício, e das dietas ricas em sacarose sobre receptores parcialmente purificados de tecido muscular de ratos, e a atividade tirosina quinase *in vitro*. Neste estudo, a alimentação com dieta rica em sacarose resultou na redução do número de receptores nos ratos velhos, e diminuição da atividade tirosina quinase, estimulada por insulina, no músculo esquelético de ratos jovens. Os resultados obtidos sugeriram que a resistência à insulina seria provavelmente nos passos pós-receptor.

No presente estudo, não ocorreu variação do número de receptores de insulina nos tecidos hepático (FIGURAS 3A e 3B) e muscular (FIGURAS 7A e 7B) dos ratos alimentados com a dieta rica em frutose. Ocorreu entretanto uma redução significativa, 28%, no grau de autofosforilação em tirosina do receptor do fígado, após estímulo *in vivo* com insulina. A diminuição da fosforilação do receptor tem sido correlacionada com situações de resistência à insulina como demonstraram os estudos com mutações no receptor de insulina, que devido a perda da atividade tirosina quinase tornou-se incapaz de autofosforilar-se, resultando em defeitos de transmissão do sinal insulínico e falência dos efeitos biológicos deste hormônio (KASUGA *et al.*, 1982a; EBINA *et al.*, 1987; CHOU *et al.*, 1987; GIORGINO *et al.*, 1993; WHITE & KAHN, 1994).

A redução da autofosforilação do receptor do fígado, mas não do músculo de ratos alimentados com a dieta rica em frutose é uma característica presente em outros modelos de resistência à insulina, como ratos tratados com dexametasona (KARASIK & KAHN, 1988; SAAD *et al.*, 1993) e camundongos ob/ob (SAAD *et al.*, 1992). Nos dois modelos, é possível que a exposição crônica dos tecidos a diferentes níveis de insulina contribua para estes resultados,

uma vez que o fígado está exposto a uma concentração maior de insulina do que o músculo, justificando a regulação tecido-específica do grau de fosforilação do receptor de insulina.

Não houve mudanças nos níveis teciduais do IRS-1, nos dois tecidos do grupo que recebeu a dieta rica em frutose, comparado com o grupo controle (FIGURAS 5A e B, 9A e B). Entretanto, observamos redução significativa no grau de fosforilação da pp185 (IRS-1 e IRS-2), sendo 17% no tecido hepático (FIGURAS 6A e B) e 22% no tecido muscular (FIGURAS 10A e B), após estímulo insulínico dos ratos alimentados com a dieta rica em frutose.

No presente trabalho a redução dos graus de fosforilação da pp185 (IRS-1 e 2) nos tecidos hepático e muscular, sugere a possibilidade de redução proporcional na associação destes substratos com a PI 3-quinase, como foi demonstrado por outros modelos de resistência à insulina (FOLLI *et al.*, 1993; SAAD *et al.*, 1995a; SAAD *et al.*, 1995b; SAAD *et al.*, 1997). Uma vez que a associação/ativação entre os IRS-1/2 fosforilados e a PI 3-quinase são etapas importantes da via de sinalização, será importante continuar utilizando este modelo na investigação da ativação da PI 3-quinase nos dois tecidos.

Os mecanismos responsáveis pela redução do grau de fosforilação em tirosina da pp185 nos tecidos hepático e muscular não estão totalmente estabelecidos. Um mecanismo regulatório importante das etapas iniciais da ação insulínica ocorre através da fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1, em resíduos serina e (ou) treonina (WHITE, 1997). Esta fosforilação reduz de maneira importante a capacidade de fosforilação de resíduos tirosina após estímulo com insulina no receptor (TAKAYAMA *et al.*, 1988), e no IRS-1 (TANTI *et al.*, 1994a), dificultando a transmissão do sinal insulínico. Diversas enzimas com capacidade serina quinase como a própria PI 3-quinase, a MAP quinase, a proteína quinase-C, e a proteína quinase-A podem fosforilar o receptor, o IRS-1, e (ou) o IRS-2 em serina ou treonina, induzindo alterações (WHITE & KAHN, 1994). A proteína quinase-C (PKC) é um candidato potencial com relevância fisiológica, exercendo papel importante na transmissão do sinal de vários hormônios, fatores de crescimento, e neurotransmissores (CHIN *et al.*, 1993; De VENTE *et al.*, 1996; BOSSENMAIER *et al.*, 1997). Sua ativação ocorre em resposta ao aumento de diacilglicerol (DAG), produtos de fosfatidilinositol, e exposição a agentes indutores de tumores, tais como éster de forbol (HUG &

Estudos em ratos tratados com uma dieta rica em frutose, demonstraram aumento da formação de diacilglicerol (DAG) e maior expressão da PKC- θ , principal isoforma da PKC no músculo esquelético (OSADA *et al.*, 1992), em frações de membrana (DONNELLY *et al.*, 1994), e aumento da atividade da PKC (DONNELLY *et al.*, 1995). Assim, é possível que o aumento do diacilglicerol e da PKC possa induzir a fosforilação do IRS-1 e (ou) IRS-2 em serina e treonina, tornando-os menos receptivos à fosforilação em resíduos tirosina, explicando sua menor fosforilação, e dificultando a interação destes com o receptor de insulina e com a PI 3-quinase, no modelo de resistência à insulina induzida por dietas ricas em frutose.

Em concordância com esta hipótese, um outro dado interessante foi observado no presente trabalho. Após a estimulação insulínica, a fosforilação reduzida da pp185 (IRS-1 e 2) sofreu leve alteração na mobilidade eletroforética (FIGURA 10A), no tecido muscular de ratos tratados com dieta rica em frutose. Esta característica foi também descrita nos modelos de resistência à insulina em adipócitos tratados com ácido “ocadaico” (TANTI *et al.*, 1994b), e animais tratados com glicocorticóides (GIORGINO *et al.*, 1993). TANTI e colaboradores, demonstraram que a redução na fosforilação em tirosina do IRS-1, após o estímulo insulínico, estava relacionada com a diminuição da mobilidade eletroforética devido a fosforilação em serina/treonina do IRS-1. Foi demonstrado ainda nesse estudo, reduzida ligação do IRS-1 à PI 3-quinase, e finalmente a ação da insulina no transporte de glicose foi bloqueada. Uma diminuição similar na mobilidade eletroforética do IRS-1 acompanhada por reduzida fosforilação em tirosina, apesar de não alterar a autofosforilação do receptor, foi também observada em cultura de células tratadas por uma hora com insulina (MIRALPEIX *et al.*, 1992). Ao contrário, GIORGINO e colaboradores demonstraram que a fosforilação do IRS-1 no músculo esquelético, após a administração de glicocorticóides, estava diminuída e sua mobilidade eletroforética aumentada. Porém, esta alteração não foi associada com mudanças no conteúdo de fosfotirosina da proteína, mas possivelmente seria explicada pela reduzida fosforilação em serina/treonina pelo IRS-1.

Sendo assim, as alterações observadas nos passos iniciais da ação insulínica, como a diminuição da fosforilação da pp185 (IRS-1 e IRS-2) nos tecidos hepático e muscular, e a

migração mais lenta da pp185 em SDS-PAGE, em tecido muscular dos ratos alimentados com a dieta rica em frutose, sugerem a possibilidade de menor fosforilação em resíduos tirosina do IRS-1 e (ou) -2, que poderia ser devido à fosforilação em resíduos serina/treonina, podendo ter como responsável a proteína quinase-C.

Uma vez que o metabolismo de lípidos e carboidratos estão associados no fígado, músculo e tecido adiposo, um aumento no nível de ácidos graxos livres pode ser relevante nos animais tratados com dieta rica em frutose (RANDLE *et al.*, 1963). Porém, alguns estudos demonstraram que não houve alteração significativa nos níveis de ácidos graxos livres nos ratos alimentados com dieta rica em frutose (HWANG *et al.*, 1987; HUANG *et al.*, 1997; MATSUI *et al.*, 1997). Além disso, novamente torna-se relevante o tipo de gordura utilizada na dieta rica em frutose, pois MATSUI *et al.* (1997) demonstraram que os níveis de ácidos graxos livres apresentam-se elevados nos ratos tratados com dieta contendo 40% de calorias provenientes de frutose, somente quando a gordura saturada é utilizada. Como no presente trabalho foi administrado óleo de soja na dieta, a resistência não parece estar relacionada a este mecanismo, e como já discutido anteriormente, não só o conteúdo de frutose da dieta, mas também o tipo de gordura, tem importância no desenvolvimento da resistência à insulina nos ratos.

Outros fatores a serem considerados ainda na resistência insulínica observada nestes animais, é a maior disponibilidade de lípidos circulantes ou intracelulares, já que foi demonstrado que os lípidos podem inibir a utilização de glicose em tecidos alvos, relacionando-se negativamente com a ação da insulina (STORLIEN *et al.*, 1991; PAN *et al.*, 1997), assim como a alteração da composição lipídica da membrana. ZOPPINI & KAHN (1992), utilizando cultura de células tratadas com diferentes composições de ácido graxo, demonstraram variações importantes no grau de fosforilação do receptor e da pp185 induzidas pela insulina, sugerindo que tais alterações estavam associadas à mudanças do conteúdo lipídico da membrana. MATSUI *et al.* (1997) observaram que mudanças da composição de ácidos graxos (aumento da porcentagem de ácidos graxos saturados e monoinsaturados e redução dos poliinsaturados) de triacilglicerídeos do músculo esquelético de ratos alimentados com dieta rica em frutose (40% das calorias) mais gordura animal, foram influenciadas por mudanças na ingestão de gordura da dieta. Em contraste, não foi observado alteração significativa na composição de ácidos graxos de fosfolípidos do

músculo. Esta última observação foi justificada pelo curto tempo de duração (duas semanas) de administração da dieta rica em frutose, uma vez que ratos com diabetes induzida por estreptozotocina não alteraram a composição de ácidos graxos de fosfolípidos da aorta em período de duas a três semanas, mas apresentaram mudanças em maior período, seis semanas (DANG *et al.*, 1988). Embora alguns estudos sugiram que a composição de ácidos graxos dos triacilglicerídeos, mais do que os níveis de triacilglicerídeos circulantes ou armazenados esteja associado ao desenvolvimento da resistência insulínica (MATSUI *et al.*, 1997), outros sugerem que a elevação de triacilglicerídeos circulantes, mais do que seu armazenamento, esteja envolvido com o desenvolvimento da resistência à insulina em ratos alimentados com dietas ricas em frutose (STORLIEN *et al.*, 1993).

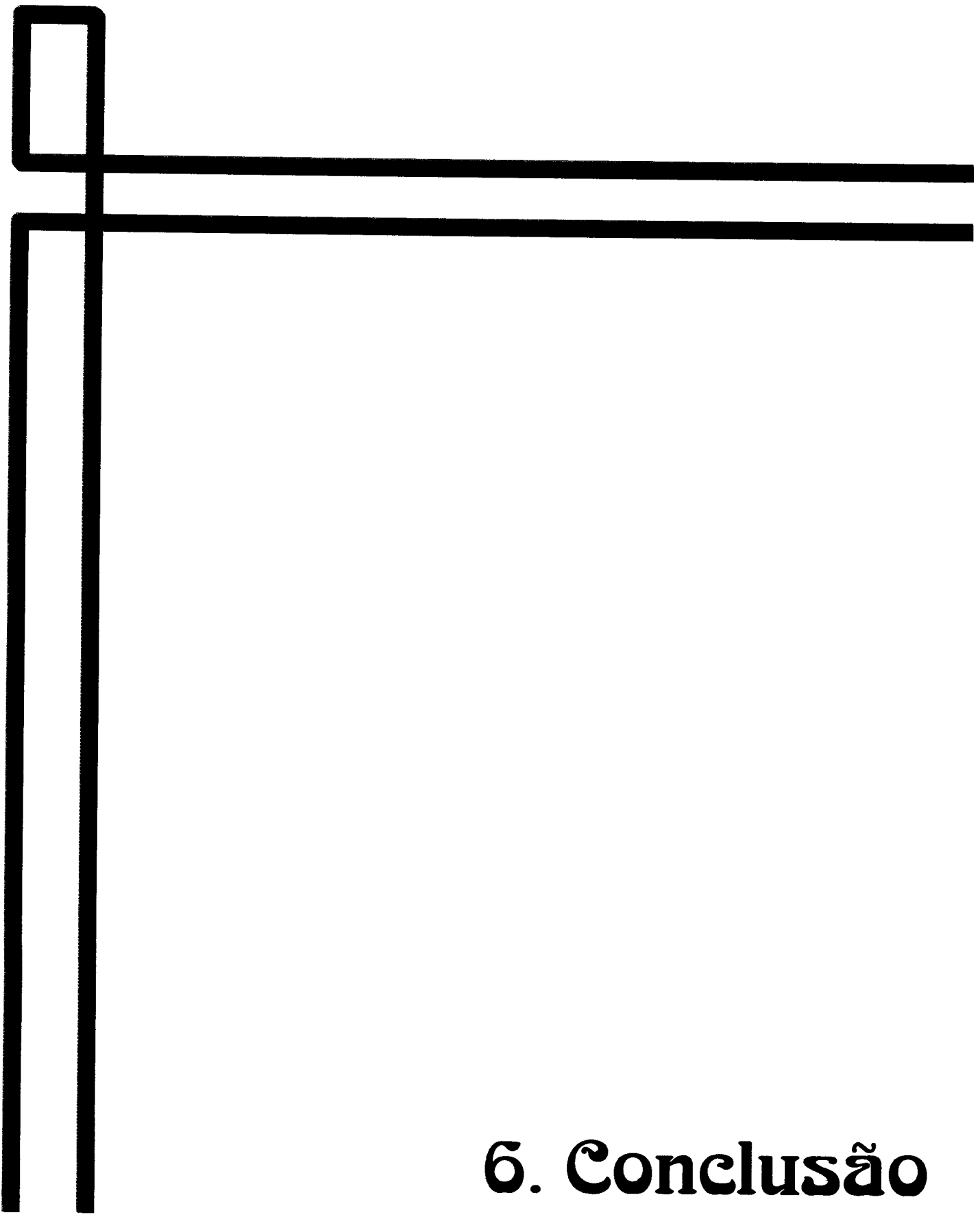
Deve-se considerar também a ação de fosfotirosinas fosfatases (PTPases) como um outro mecanismo regulatório que induziria a maior desfosforilação do IRS-1 e (ou) IRS-2, levando à menor associação destes substratos com a PI 3-quinase. Apesar de não ser conhecido dados na literatura referentes a estas enzimas, e a associação/ativação da PI 3-quinase no modelo de resistência insulínica induzida por dieta rica em frutose, tal efeito merece investigação futura.

A redução da fosforilação da pp185 (IRS-1 e -2) e provavelmente da interação destes com a PI 3-quinase, podem determinar alterações no transporte de glicose no tecido muscular de ratos alimentados com dieta rica em frutose. A insulina, como já descrito anteriormente estimula a captação de glicose em tecidos periféricos, principalmente no músculo, através da translocação de vesículas contendo GLUT4 (transportador de glicose) de um compartimento intracelular para a membrana plasmática (RICE & GARNER, 1994; STEPHENS & PILCH, 1995; QUON *et al.*, 1995). Vários estudos experimentais utilizando diferentes métodos demonstraram que a PI 3-quinase exerce papel fundamental na translocação do GLUT4, estimulada pela insulina (HARA *et al.*, 1994; OKADA *et al.*, 1994; CHEATHAM *et al.*, 1994; HARUTA *et al.*, 1995). Utilizando-se inibidores da PI 3-quinase, a captação da glicose, induzida pela insulina em células adiposas, foi inibida (CLARKE *et al.*, 1994; SANCHES-MARGALET *et al.*, 1994; YEH *et al.*, 1995). E ainda, uma mutação da PI 3-quinase com deleção no sítio de ligação da subunidade p110, inibiu a captação de glicose após estímulo com insulina (HARA *et al.*, 1994). Estes resultados sugerem que a ativação da PI 3-quinase seja necessária para a captação de glicose, estimulada pela insulina.

Evidências demonstraram ainda uma correlação entre a atividade da PI 3-quinase e o metabolismo de glicogênio (CROSS *et al.*, 1994; WELSH *et al.*, 1994).

Assim, a redução da fosforilação da pp185 (IRS-1 e 2) observada nos animais que receberam a dieta rica em frutose, poderá levar à menor associação IRS-1 e (ou) IRS-2/PI 3-quinase, nos tecidos estudados, estando tal redução relacionada à ativação do transporte de glicose no músculo, e síntese de glicogênio no fígado e músculo. A redução nesta associação pode então ter um papel importante na resistência à insulina, no fígado e músculo, dos ratos tratados com dieta rica em frutose.

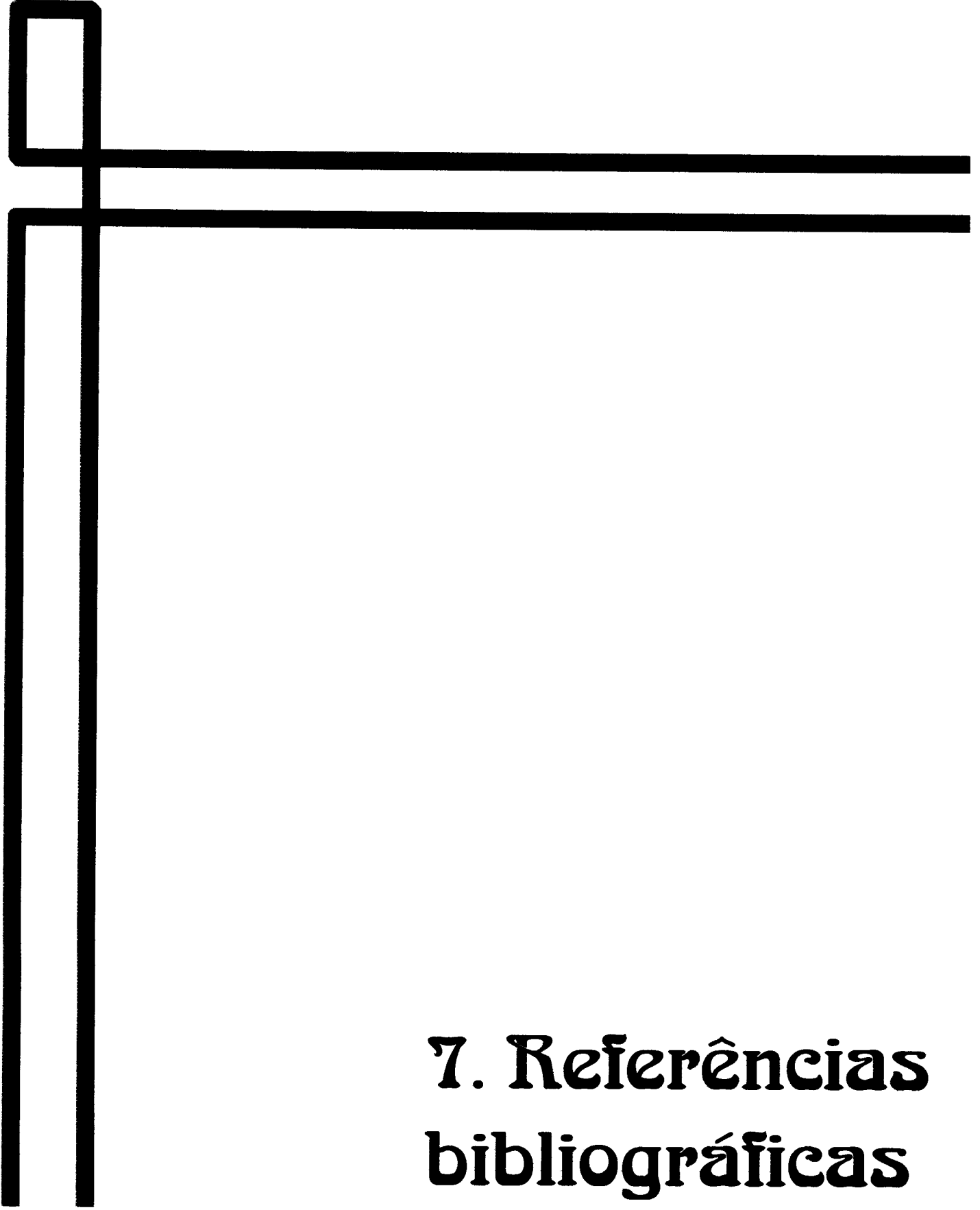
Em resumo, os resultados do presente trabalho demonstram que animais alimentados com dieta rica em frutose durante 28 dias, apresentaram resistência insulínica acompanhada de níveis elevados de triacilglicerídeos, redução da fosforilação do receptor de insulina no tecido hepático e menor fosforilação da pp185 (IRS-1 e IRS-2) nos tecidos hepático e muscular. É possível que a menor autofosforilação do receptor no fígado, tenha contribuído para os eventos subsequentes à estimulação insulínica neste tecido. Estes dados sugerem que alterações nas etapas iniciais da ação insulínica, possam ter significado importante no mecanismo de resistência observada neste modelo animal.



6. Conclusão

Dos resultados do presente trabalho chegou-se às seguintes conclusões:

- A alimentação com dieta rica em frutose induziu resistência à insulina nos ratos Wistar, que foi constatada pela diminuição de 25% na velocidade de redução dos níveis de glicose, em relação aos controles
- Os níveis de glicose, insulina e colesterol não apresentaram diferenças significativas entre o grupo controle e de frutose. Entretanto, os ratos alimentados com a dieta rica em frutose apresentaram níveis de triacilglicerídeos elevados
- O conteúdo de frutose bem como o tipo de gordura são de grande importância no desenvolvimento da resistência à insulina neste modelo animal. Uma vez que no presente trabalho foi utilizado óleo vegetal, é provável que os níveis de triacilglicerídeos seriam mais elevados, e o estado de resistência insulínica mais grave, caso fosse utilizado gordura animal
- Não houve alteração do nível protéico do receptor de insulina (IR) nos dois tecidos estudados dos ratos tratados com a dieta rica em frutose, em relação aos controles. Porém foi observada redução do grau de fosforilação do receptor, após estímulo com insulina, no fígado dos ratos do grupo frutose
- Não houve mudanças também nos níveis teciduais do IRS-1, nos tecidos hepático e muscular do grupo que recebeu a dieta rica em frutose, comparado com o grupo controle. Entretanto, um importante achado, comum a ambos os tecidos foi a diminuição no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2), 17% em fígado e 22% em músculo, após estímulo insulínico nos ratos alimentados com a dieta rica em frutose
- Os dados sugerem que alterações nos passos iniciais da transmissão do sinal insulínico, podem ter papel importante na resistência à insulina observada neste modelo animal.



7. Referências bibliográficas

- ANTAR, M.A.; LITTLE, J.A.; LUCAS, C.; ET AL. - Interrelationship between the kinds of dietary carbohydrate and fat in hyperlipoproteinemic patients. Part 3. Synergistic effects of sucrose and animal fat on serum lipids. **Atherosclerosis**, 11:191-201, 1970.
- ARAKI, E.; LIPES, M.A.; PATTI, M.A.; BRUNING, J.C.; HAAG, B.; JOHNSON, R.S. & KAHN, C.R. - Alternative pathway of insulin signaling in mice with target disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, 372:186-190, 1994.
- ARAKI, E.; SUN, X.J.; HAAG, B.L.; CHUANG, L.M.; ZHANG, Y.; YANG-FENG, T.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. - Human skeletal muscle insulin receptor substrate-1: characterization of the cDNA, gene and chromosomal localization. **Diabetes**, 42:1041-1054, 1993.
- BACKER, J.M.; MYERS, M.G.Jr; SHOELSON, S.E.; CHIN, D.J.; SUN, X.J.; MIRALPEIX, M.; HU, P.; MARGOLIS, B.; SKOLNIK, E.Y.; SCHLESSINGER, J.; WHITE, M.F. - The phosphatidylinositol 3-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **EMBO J.**, 11:3469-3479, 1992.
- BECK-NIELSEN, H.; PEDERSEN, O.; LINDSKOV, H.O. - Impaired cellular insulin binding and insulin sensitivity induced by high-fructose feeding in normal subjects. **Am.J.Clin.Nutr.**, 33:273-278, 1980.
- BELL, G.I.; KAYANO, T.; BUSE, J.B.; BURANT, C.F.; TAKEDA, J.; LIN, D.; FUKUMOTO, H.; SEINO, S. - Molecular biology of mammalian glucose transporters. **Diabetes Care**, 13:198-208, 1990.
- BERNIER, M.; LAIRD, D.M. & LANE, M.D. - Insulin-activated tyrosine phosphorylation of a 15-kilodalton protein in intact 3T3-L1 adipocytes. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.**, 84:1844-1848, 1987.
- BHANOT, S.; McNEILL, J.H.; BRYER-ASH, M. - Vanadyl sulfate prevents fructose-induced hyperinsulinemia and hypertension in rats. **Hypertension**, 23:308-312, 1994.
- BIRCHWOOD, B.L.; LITTLE, J.A.; ANTAR, M.A.; ET AL. - Interrelationship between the kinds of dietary carbohydrate and fat in hyperlipoproteinemic patients. Part 2. Sucrose and

- starch with mixed saturated and polyunsaturated fats. **Atherosclerosis**, 11:183-190, 1970.
- BIRNBAUM, M.J. - The insulin-sensitive glucose transporter. **Int.Rev.Cytol.**, 137:239-297, 1992.
- BLADES, B. & GARG, A. - Mechanisms of increase in plasma triacylglycerol concentrations as a result of high carbohydrate intakes in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Am.J.Clin.Nutr.**, 62:996-1002, 1995.
- BOLLAG, G.E.; ROTH, R.A.; BEAUDOIN, J.; MOCHLY-ROSEN, D. & KOSHLAND JR., D.E. - Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor *in vitro* and reduces its protein-tyrosine kinase activity. - **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, 83:5822-5824, 1986.
- BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIOTORI, V.; CORGNATI, A. & MUGGEO, M. - Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J.Clin.Endocrinol.Metabol.**, 68(2):374-378, 1989.
- BOSSENMAIER, B.; MOSTHAF, L.; MISCHAK, H.; ULLRICH, A.; HÄRING, H.U. - Protein kinase C isoforms $\beta 1$ and $\beta 2$ inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor. **Diabetologia**, 40:863-866, 1997.
- BOSSETTI, B.M.; KOCHER, L.M.; MORANZ, J.F.; FALKO, J.M. - The effects of physiologic amounts of simple sugars on lipoprotein, glucose, and insulin levels in normal subjects. **Diabetes Care**, 7:309-312, 1984.
- BRADFORD, M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Anal.Biochem.**, 72:248-154, 1976.
- CARPENTER, C.L. & CANTLEY, I.C. - Phosphoinositide kinases. **Biochem.**, 29:11147-11156, 1990.
- 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**, 137:151-159,

1996.

CHEATHAM, B. & KAHN, C.R. - Insulin action and the insulin signalling network. **Endocr.Rev.**, 16:117-142, 1995.

CHEATHAM, B.; VLAHOS, C.J.; CHEATHAM, L.; WANG, L.; BLENIS, J. AND KAHN, C.R. - Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. **Mol.Cel.Biol.**, 14:4902-4911, 1994.

CHIN, J.E.; DICKENS, M.; TAVARES, J.M.; ROTH, R.A. - Overexpression of protein kinase C isoenzymes α , β I, γ , and θ in cells overexpressing the insulin receptor. **J.Biol.Chem.**, 268:6338-6347, 1993.

CHOU, C.K.; DULL, T.J.; RUSSEL, D.S.; GHERZI, R.; LEWOHL, D.; ULLRICH, A. & ROSEN, O.M. - Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack proein tyrosine kinse activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. **J.Biol.Chem.**, 262:1842-1847, 1987.

CLARKE, J.F.; YOUNG, P.W.; YONEZAWA, K.; KASUGA, M. & HOLMAN, G.D. - Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. **Biochem.J.**, 300:631-635, 1994.

COOPER, J.T. - In: **Dr. Cooper's fabulous fructose diet**. Fawcett Crest, New York, 9-14, 1979.

CRAPO, P.A. & KOLTERMAN, O.G. - The metabolic effects of 2-week fructose feeding in normal subjects. **Am.J.Clin.Nutr.**, 39:525-534, 1984.

CRAPO, P.A.; KOLTERMAN, O.G.; HENRY, R.R. - Metabolic consequence of two-week fructose feeding in diabetic subjects. **Diabetes Care**, 9:111-119, 1986.

CROSS, D.A.E.; ALESSI, D.R.; VANDENHEEDE, J.R.; McDOWELL, H.E.; HUNDAL, H.S.; COHEN, P. - The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein

- kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. **Biochem.J.**, 303:21-26, 1994.
- CUATRECASAS, P. - Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membrane. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, 69:1277-1281, 1972.
- DALL'AGLIO, E.; CHANG, F.; CHANG, H.; STERN, J.; REAVEN, G. - Effect of exercise and diet on triglyceride metabolism in rats with moderate insulin deficiency. **Diabetes**, 32:46-50, 1983.
- DALY, M.E.; VALE, C.; WALKER, M.; ALBERTI, K.G.M.M.; MATHERS, J.C. - Dietary carbohydrates and insulin sensitivity: a review of the evidence and clinical implications. **Am.J.Clin.Nutr.**, 66:1072-1085, 1997.
- DANG, A.Q.; FAAS, F.H.; LEE, J.A.; CARTER, W.J. - Altered fatty acid composition in the plasma, platelets, and aorta of the streptozotocin-induced diabetic rat. **Metabolism**, 11:1065-1072, 1988.
- De FRONZO, R.A. - The triumvirate: beta-cell, muscle, liver: a collusion responsible for NIDDM. **Diabetes**, 37:667-687, 1988.
- De VENTE, J.E.; CAREY, J.O.; BRYANT, W.O.; PETTIT, G.J.; WAYS, D.K. - Transcriptional regulation of insulin receptor substrate 1 by protein kinase C. **J.Biol.Chem.**, 271:32276-32280, 1996.
- DeFRONZO, R.A. - Glucose intolerance and aging: evidence for tissue insensitivity to insulin. **Diabetes**, 28:1095-1101, 1979.
- DONNELLY, R.; CHANG, H.; AZHAR, S.; REAVEN, G.M. - Tissue-dependent activation of protein kinase C in fructose-induced insulin resistance. **Endocrine**, 3:129-133, 1995.
- DONNELLY, R.; REED, M.J.; AZHAR, S.; REAVEN, G.M. - Expression of the major isoenzyme of protein kinase C in skeletal muscle, α -PKC, varies with muscle type and in response to fructose-induced insulin resistance. **Endocrinology**, 135:2369-2374, 1994.
- 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.U.S.A.**, 84:704-708, 1987.
- EBINA, Y.; ELLIS, L.; JARNAGIN, K. - The human insulin receptor cDNA: The structure basis for hormone-activated transmembrane signalling. **Cell**, 40:7447-7458, 1985.
- EIFFERT, K.C.; McDONALD, R.B.; STERN, J.S. - High sucrose diet and exercise: effects on insulin-receptor function of 12- and 24-mo-old Sprague-Dawley rats. **J.Nutr.**, 121:1081-1089, 1991.
- 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**, 45:721-732, 1986.
- FEHLMAN, M.; PERYRON J.; SAMSON, M.; VAN OBBERGHEN, E.; BRANDENBURG, D. & BROSSETE, N.- Molecular association between major histocompatibility complex class I antigens and insulin receptors in mouse liver membranes. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**. 82:8634-8637,1985.
- FELIG, P. & BERGMAN, M. - Integrated physiology of carbohydrate metabolism. In: Rifkin, H. & Porte, D., eds. - **Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus**. 4.ed. Elsevier, New York, 1990.
- FOLLI, F.; SAAD, M.J.A.; BACKER, J.M. & KAHN, C.R. - Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with IRS-1 in liver and muscle of the intact rat. **J.Biol.Chem.**, 267:22171-22177, 1992.
- FOLLI, F.; SAAD, M.J.A.; BACKER, J.M. & KAHN, C.R. - Regulation of phosphatidylinositol 3-Kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. **J.Clin.Invest.**, 92:1787-1794, 1993.
- FRAYN, K.N. & KINGMAN, S.M.: Dietary sugars and lipid metabolism in humans.

- FREYCHET, P.; ROTH, J. & NEVILLE JR, D.M. - Insulin receptor in the liver: Specific binding of [125 I] insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, 68:1833-1837, 1971.
- GIORGINO, F.; ALMAHFOUZ, A.; GOODYEAR, L.J. & SMITH, R.J. - Glucocorticoid regulation of insulin receptor and substrate IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle *in vivo*. **J.Clin.Invest.**, 91:2020-2030, 1993.
- HALLFRISCH, J. – Metabolic effects of dietary fructose. **FASEB J.**, 4:2652-2660, 1990.
- HALLFRISCH, J.; ELLWOOD, K.C.; MICHAELIS IV, O.E.; REISER, S.; O'DORISIO, T.M.; PRATHER, E.S. - Effects of dietary fructose on plasma glucose and hormone responses in normal and hyperinsulinemic men. **J.Nutr.**, 113:1819-1826, 1983.
- HARA, K.; YONEZAWA, K.; SAKAUE, H.; ANDO, A.; KOTON, K.; KITAMURA, T.; KITAMURA, Y.; UEDA, H.; STEPHENS, L.; JACKSON, T.R.; HAWKINS, P.T.; DHAND, R.; CLARK, A.E.; HOLMAN, G.D.; WATERFIELD, M.D. & KASUGA, M. - Phosphoinositide 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for ras activation in CHO cells. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.**, 91:7415-7419, 1994.
- HARUTA, M.T.; MORRIS, A.J.; ROSE, D.W.; NELSON, J.G.; MUECKLER, M.; OLEFSKY, J.M. - Insulin stimulated GLUT4 translocation is mediated by a divergent intracellular signalling pathway. **J.Biol.Chem.**, 270:27991-27994, 1995.
- HUANG, Y.-J.; FANG, V.S.; JUAN, C.-C.; CHOU, Y.-C.; KWOK, C.-F.; HO, L.-T. - Amelioration of insulin resistance and hypertension in a fructose-fed rat model with fish oil supplementation. **Metabolism**, 46:1252-1258, 1997.
- HUG, H. & SARRE, T.F. - Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? **Biochem.J.**, 291:329-343, 1993.
- HWANG, I.-S.; HUANG, W.-C.; WU, J.-N.; SHIAN, L.R.; REAVEN, G.M. - Effect of fructose-induced hypertension on the renin-angiotensin-aldosterone system and atrial natriuretic

- factor. **Am.J.Hypertens.**, 2:424-427, 1989.
- HWANG, I-S.; HO, H.; HOFFMAN, B.B.; REAVEN, G.M. - Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**, 10:512-516, 1987.
- KAHN, C.R. - Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. **Annu.Rev.Med.**, 36:429-451, 1985.
- KAHN, C.R. & SAAD, M.J.A. - Alterations in insulin receptor and substrate phosphorylation in hypertensive rats. **J.Am.Soc.Nephrol.**, 3:S69-S77, 1992.
- KAHN, C.R. & WHITE, M.F. - The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. **J.Clin.Invest.**, 82:1151-1156, 1988.
- KAHN, C.R.; WHITE, M.F.; SHOELSON, S.E.; BACKER, J.M.; ARAKI, E.; CHEATHAM, B.; CSERMELY, P.; FOLLI, F.; GOLDSTEIN, B.J.; HUERTAS, P.; ROTHENBERG, P.L.; SAAD, M.J.A.; SIDDLE, K.; SUN, X.-J.; WILDEN, P.A.; YAMADA, K.; KAHN, S.A. - The insulin receptor and its substrate: molecular determinants of early events in insulin action. **Recent progress in hormone research**, 48:291-339, 1993.
- KARASAKI, A.; PEPINSKY, R.B.; SHOELSON, S.E. & KAHN, C.R. - Lipocortins 1 and 2 as substrates for the insulin receptor kinase in rat liver. **J.Biol.Chem.**, 263:11862-11867, 1988.
- KARASIK, A. & KAHN, C.R. - Dexamethasone-induced changes in phosphorylation of the insulin and epidermal growth factor receptors and their substrates in intact rat hepatocytes. **Endocrinology**, 123:2214-2222, 1988.
- KASUGA, M.; HEDO, J.A.; YAMADA, K.M. & KAHN, C.R. - Structure of insulin receptor and its subunits. **J.Biol.Chem.**, 257:10392-10399, 1982a.
- KASUGA, M.; KARLSSON, F.A. & KAHN, C.R. - Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science**, 215:185-187, 1982b.
- KATHURIA, S.; HARTMAN, S.; GRUNFELD, C.; RAMACHANDRAN, J. & FUJITA, YAMAGUCHI, Y. - Differential sensitivity of two functions of the insulin receptor to the

associated proteolysis: Kinase action and hormone binding. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, 83:8570-8574, 1986.

KOBAYASHI, R.; NAGANO, M.; NAKAMURA, F.; HIGAKI, J.; FUJIOKA, Y.; IKEGAMI, H.; MIKAMI, H.; KAWAGUCHI, N.; ONISHI, S.; OGIHARA, T. - Role of angiotensin II in high fructose-induced left ventricular hypertrophy in rats. **Hypertension**, 21:1051-1055, 1993.

KOVACINA, K.S. & ROTH, R.A. - Identification of SHC as a substrate of the insulin receptor kinase distinct from the GAP-associated 62 kDa tyrosine phosphoprotein. **Biochem.Biophys.Res.Comm.**, 192:1303-1311, 1993.

KUHNE, M.R.; PAWSON, T.; LIENHARD, G.E. & FENG, G.S. - The insulin receptor substrate-1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. **J.Biol.Chem.**, 268:11479-11481, 1993.

LAEMMLI, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (Lond.)**, 227:680-685, 1970.

LAVAN, B.E.; FANTIN, V.R.; CHANG, E.T.; LANE, W.S.; KELLER, S.R.; LIENHARD, G.E. - A novel 160 kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. **J.Biol.Chem.**, 272:21403-21407, 1997b.

LAVAN, B.E.; LANE, W.S.; LIENHARD, G.E. - The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. **J.Biol.Chem.**, 272:11439-11443, 1997a.

LEE, C.-H.; LI, W.; NISHIMURA, R.; ZHOU, M.; BATZER, A.; MYERS, M.G.Jr.; WHITE, M.F.; SCHLESSINGER, J.; SKOLNIK, E.Y. - Nck associates with the SH2 domain docking proteins IRS-1 in insulin stimulated cells. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, 90:11713-11717, 1993.

LIN, S.-H. & GUIDOTTI, G. - Cloning and expression of a cDNA coding for a rat liver plasma

membrane ecto-ATPase. **J.Biol.Chem.**, 264:14408-14414, 1989.

LITTLE, J.A.; BIRCHWOOD, B.L.; SIMMONS, D.A.; ET AL. - Interrelationship between the kinds of dietary carbohydrate and fat in hyperlipoproteinemic patients. Part I. Sucrose and starch with polyunsaturated fat. **Atherosclerosis**, 11:173-181, 1970.

MALERBI, D.A.; PAIVA, E.S.A.; DUARTE, A.L.; WAJCHENBERG, B.L. - Metabolic effects of dietary sucrose and fructose in type II diabetic subjects. **Diabetes Care**, 19:1249-1256, 1996.

MAMO, J.C.; HIRANO, T.; JAMES, L.; ET AL. - Partial characterization of the fructose-induced defect in very-low-density lipoprotein triglyceride metabolism. **Metabolism**, 40:888-893, 1991.

MANN, J.I.; WATERMEYER, G.S.; MANNING, E.B.; ET AL. - Effects on serum lipids of different dietary fats associated with a high sucrose diet. **Clin.Sci.**, 44:601-604, 1973.

MARTINEZ, F.J.; RIZZA, R.A.; ROMERO, J.C. - High-fructose feeding elicits insulin resistance, hyperinsulinism, and hypertension in normal mongrel dogs. **Hypertension**, 23:456-463, 1994.

MASSAGUE, J.P.; PILCH, P.F. & CZECH, M.P. - Electrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unit stoichiometries. **Proc.Nat.Acad.Sci.USA.**, 77:7137-7141, 1981.

MATSUI, H.; OKUMURA, K.; KAWAKAMI, K.; HIBINO, M.; TOKI, Y.; ITO, T. - Improved insulin sensitivity by *bezafibrate* in rats. Relationship to fatty acid composition of skeletal-muscle triglycerides. **Diabetes**, 46:348-353, 1997.

MIRALPEIX, M.; SUN, X.J.; BACKER, J.M.; MYERS, M.G.; ARAKI, E.; WHITE, M.F. - **Biochemistry**, 31:9031-9039, 1992.

MOLLER, D.E. & FLIER, J.S. - Insulin resistance - mechanisms, syndromes, and implications. **N.Engl.J.Med.**, 26:938-948, 1991.

- MYERS, Jr.M.G. & WHITE, M.F. - The new elements of insulin signaling: Insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains. **Diabetes**, 42:643-650, 1993.
- MYERS, M.G.Jr.; BACKER, J.M.; SUN, X.J.; SHOELSON, S.E.; HU, P.; ET AL. - IRS-1 activates the phosphatidylinositol 3-kinase by associating with the src homology 2 domains of p85. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, 89:10350-10354, 1992.
- NAJJAR, S.M.; ACCILI, D.; PHILIPPE, N.; JERNBERG, J.; MARGOLIS, R.; TAYLOR, S.I. - PP120/ecto-ATPase, an endogenous substrate of the insulin receptor tyrosine kinase, is expressed as two variably spliced isoforms. **J.Biol.Chem.**, 268:1201-1206, 1993.
- NUNES, A.L.B.; BRENELLI, S.L.; CARVALHO, C.R.O.; SAAD, M.J.A. - Redução da fosforilação do IRS-1 no fígado de ratos sépticos. In: **IX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (resumos)**, 178, 1994.
- OKADA, T.; KAWANO, Y.; SAHIIHARA, T.; HAZEKI, O.; UI, M. - Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. **J.Biol.Chem.**, 269:3568-3573, 1994.
- OSADA, S.-I.; MIZUNO, K.; SAIDO, T.C.; - A new member of the protein kinase C family, nPKC- θ , predominantly expressed in skeletal muscle. **Mol.Cell.Biol.**, 12:3930-3938, 1992.
- PAN, D.A.; LILLIOJA, S.; KRIKETOS, A.D.; MILNER, M.R.; BAUR, L.A.; BOGARDUS, C.; JENKINS, A.B.; STORLIEN, L.H. - Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. **Diabetes**, 46:983-988, 1997.
- PARK, Y.K. & YETLEY, E.A - Intakes and food sources of fructose in the United States. **Am.J.Clin.Nutr.**, 58:737S-747S, 1993.
- PATTI, M.-E.; SUN, X.-J.; BRUENING, J.C.; ARAKI, E.; LIPES, M.A.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. - 4PS/Insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice. **J.Biol.Chem.**, 270:24670-24673, 1995.
- PELLICI, G.; LANFRANCONE, L.; GRIGNANI, F.; McGLADE, J.; CAVALLO, F.; ET AL. -

- A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. **Cell**, 70:93-104, 1992.
- QUON, M.J.; BUTTE, A.J.; ZARNOWSKI, M.J.; SESTI, G.; CUSHMAN, S.W. & TAYLOR, S.I. - Insulin receptor substrate 1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4 translocation in transfected rat adipose cells. **J.Biol.Chem.**, 269:27920-27924, 1995.
- RANDLE, P.J.; GARLAND, P.B.; HALES, C.N. & NEWSHOLME, E.A. - The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, 1:785-789, 1963.
- REAVEN, G.M. - Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, 37:1595-1607, 1988.
- REAVEN, G.M.; HO, H.; HOFFMANN, B.B. - Somatostatin inhibition of fructose-induced hypertension. **Hypertension**, 14:117-120, 1989.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H. & HAHEY, G.C. - AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet., **J.Nutr.**, 123:1939-1951, 1993.
- REISER, S.; BOHN, E.; HALLFRISCH, J.; MICHAELIS IV, O.E.; KEENEY, M.; PRATHER, E.S. - Serum insulin and glucose in hyperinsulinemic subjects fed three different levels of sucrose. **Am.J.Clin.Nutr.**, 34:2348-2358, 1981.
- REISER, S.; HANDLER, H.B.; GARDNER, L.B.; HALLFRISCH, J.; MICHAELIS IV, O.E.; PRATHER, E.S. - Isocaloric exchange of dietary starch and sucrose in humans. II. Effect on fasting blood insulin, glucose, and glucagon and on insulin and glucose response to a sucrose load. **Am.J.Clin.Nutr.**, 32:2206-2216, 1979.
- RICE, K.M. & GARNER, G.R. - Correlation of the insulin receptor substrate-1 with insulin-responsive deoxyglucose transport in 3T3-11 adipocytes. **Biochem.Biophys.Res.Comm.**, 198:523-530, 1994.
- ROGERS, S.; JAMES, D.E.; BEST, J.D. - Identification of a novel facilitative glucose transporter like protein-Glut 8. **Diabetes**, 47:A45, In: Abstract Book - 58th Scientific Sessions ,

Chicago, Illinois, June 13-16, 1998.

ROSEN, O.M. - After insulin binds. **Science**, 237:1452-1458, 1987.

ROTHENBERG, P.L.; LANE, W.S.; KARASIK, A.; BACKER, J.; WHITE, M.F. & KAHN, C.R. - Purification and partial sequence analysis of pp185, the major cellular substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. **J.Biol.Chem.**, 266:8302-8311, 1991.

ROTHENBERG, P.L.; WHITE, M.F. & KAHN, C.R. - The insulin receptor tyrosine kinase. In: Cuatrecasas p, Jacobs S, eds. **Handbook of Experimental Pharmacology**, Vol. 92. Berlin: Springer-verlag, 209-243, 1990.

SAAD, M.J.A.; 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.**, 90:1839-1849, 1992.

SAAD, M.J.A.; CARVALHO, C.R.O.; THIRONE, A.C.P.; VELLOSO, L.A. - Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **J.Biol.Chem.**, 271:22100-22104, 1996.

SAAD, M.J.A.; FOLLI, F.; KAHN, J. & KAHN, C.R. - Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. **J.Clin.Invest.**, 92:2065-2072, 1993.

SAAD, M.J.A.; HARTMANN, L.G.C., CARVALHO, D.S., GALORO, C.A.O.; BRENELLI, S.L. & CARVALHO, C.R.O. - Effect of glucagon on insulin receptor substrate-1 (IRS-1) phosphorylation and association with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase). **FEBS Letters**, 370:131-134, 1995b.

SAAD, M.J.A.; HARTMANN, L.G.C.; CARVALHO, D.S.; GALORO, C.A.O.; BRENELLI, S.L.; CARVALHO, C.R.O. - Modulation of early steps in insulin action in the liver and muscle of epinephrine treated rats. **Endocrine**, 3:755-759, 1995a.

SAAD, M.J.A.; MAEDA, L.; BRENELLI, S.L.; CARVALHO, C.R.O.; PAIVA, R.S.; VELLOSO, L.A. - Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant

rats. **Diabetologia**, 40:179-186, 1997.

SAAD, M.J.A.; PIMENTA, W.P.; PACCOLA, G.M.G.F. - Effect of glucose ingestion on peripheral glucose metabolism in normal man. **Diabete & Met.**, 15:5-10, 1989.

SANCHES-MARGALET, V.; GOLDFINE, I.D.; VLAHOS, C.J. & SUNG, C.K. - Role of phosphatidylinoditol 3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor LY294002. **Biochem.Biophys.Res.Comm.**, 157:140-145, 1994.

SHAFRIR, E. - Effect of sucrose and fructose on carbohydrate and lipid metabolism and the resulting consequences. **In: Regulation of carbohydrate metabolism**, Boca Raton, Fl, CRC - USA, ed. Beitner R., Vol.II, 95-140, 1985.

SHOELSON, S.E.; CHATTERJEE, S.; CHAUDHURI, M. & WHITE, M.F. - YMXM motifs of IRS-1 define the substrate specificity of the insulin receptor kinase. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.**, 89:2027-2031, 1992.

SKOLNIK, E.Y.; LEE, C.H.; BATZER, A.; VICENTINI, L.M.; ZHOU, M.; DALY, R.; MYERS, M.J.JR.; BACKER, J.M.; ULRICH, A.; WHITE, M.F.; SCHLESSINGER, J. - The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS and Shc: implications for insulin control of *ras* signalling. **EMBOJ.**, 12:1929-1936, 1993.

SLEDER, J.; CHEN, Y.-D.I.; CULLY, M.D.; REAVEN, G.M. - Hyperinsulinemia in fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. **Metabolism**, 29:303-305, 1980.

SMITH-HALL, J.; PONS, S.; PATTI, M.E.; BURKS, D.J.; YENUSH, L.; SUN, X.L.; KAHN, C.R.; WHITE, M.F. - The 60 kDa receptor substrate functions like na IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells. **Biochemistry**, 36(27):8304-8310, 1997.

STEPHENS, J.M. & PILCH, P.F. - The metabolic regulation regulation and vesicular transport of GLUT4, the major insulin-responsive glucose transporter. **Endocr.Rev.**, 16:529-546, 1995.

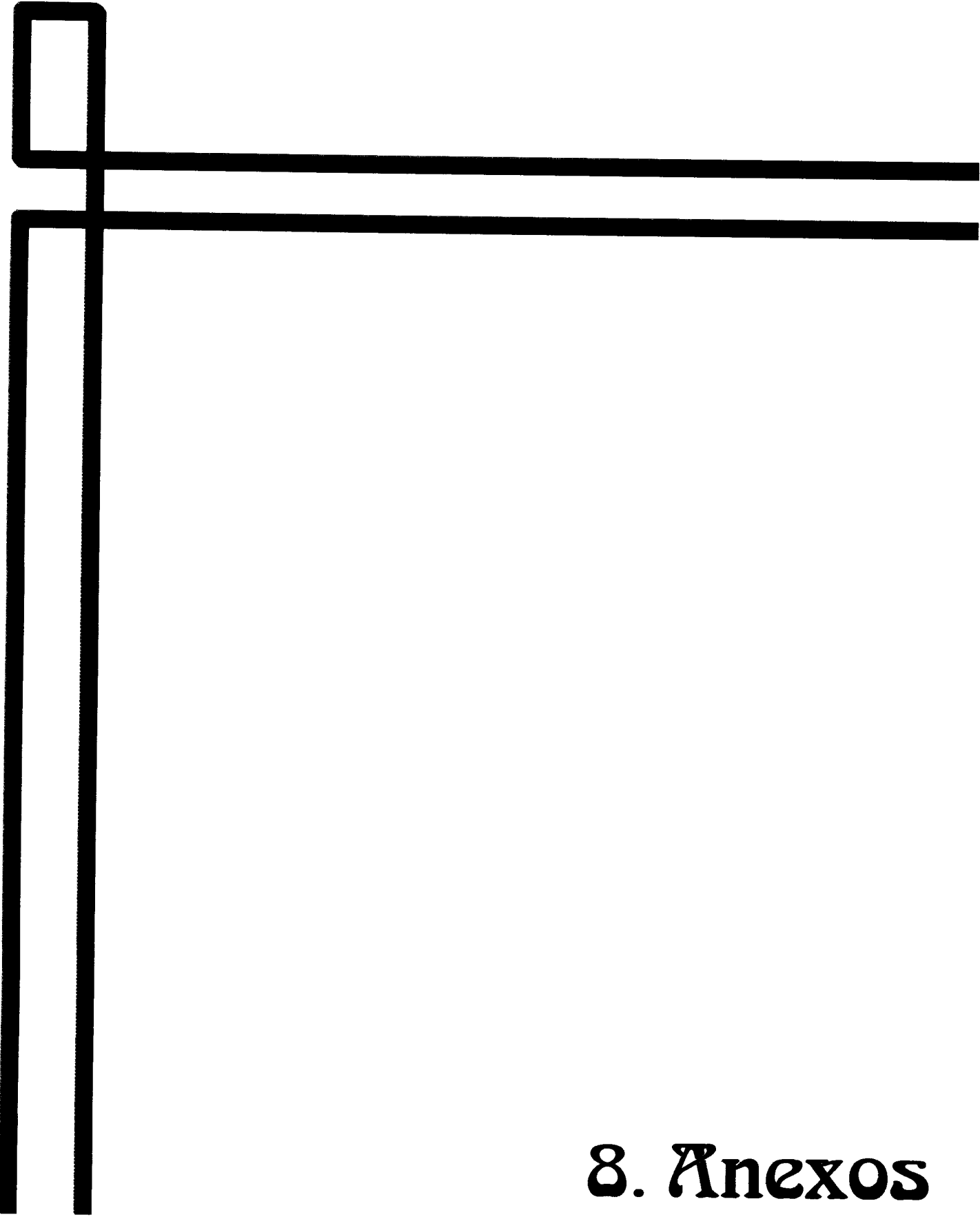
STORLIEN, L.H.; JENKINS, A.B.; CHISHOLM, D.J.; PASCOE, W.S.; KHOURI, S.; KRAEGEN, E.W. - Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. **Diabetes**, 40:280-289, 1991.

- STORLIEN, L.H.; OAKES, N.D.; PAN, D.A.; KUSUNOKI, M.; JENKINS, A.B. - Syndromes of insulin resistance in the rat. Inducement by diet and amelioration with *benfluorex*. **Diabetes**, 42:457-462, 1993.
- STORLIEN, L.H.; THORBURN, A.W.; SMYTHE, G.A.; JENKINS, A.B.; CHISHOLM, D.J.; KRAEGEN, E.W. - Effect of *d-fenfluramine* on basal glucose turnover and fat-feeding-induced insulin resistance in rats. **Diabetes**, 38:499-503, 1989.
- SUN, X.J.; CRIMMINS, D. L.; MIRALPEIX, M.; MYERS, M.G. Jr. & WHITE, M.F. - Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. **Mol.Cell.Biol.**, 13:7418-7428, 1993.
- SUN, X.J.; MIRALPEIX, M.; MYERS, M.G.Jr.; GLASHEEN, E.; BACKER, J.M.; KAHN, C.R. & WHITE, M.F. Expression and function of IRS-1 in signal transmission. **J.Biol.Chem.**, 266:22662-22672, 1992.
- SUN, X.J.; ROTHENBERG, P.A.; KAHN, C.R. & AL. - Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, 352:73-77, 1991.
- SUN, X.J.; WANG, L.M.; PATTI, M.A.; BRUNING, J.C.; HAAG,B.; JOHSON, R.S. & KAHN, C.R. - Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. **Nature**, 337:173-177, 1995.
- TAKAYAMA, S.; WHITE, M.F. & KAHN, C.R. - Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. **J.Biol.Chem.**, 263:3440-3477, 1988.
- TAKAYAMA, S.; WHITE, M.F.; LAURIS, V. & KAHN, C.R. - Phorbol esters modulate insulin receptor phosphorylation and insulin action in hepatoma cells. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, 81:7797-7801, 1984.
- TAMEMOTO, H.; KADOWAKI, T.; TOBE, K.; YAGI, T.; SAKURA, H.; HAYAKAWA, T.; TERAUCHI, Y.; UEKI, K.; SATOH, S.; SEKCHARA, H.; YOHIOKA, S.; HORLKOSHI, H.; FURUTA, Y.; IKAWA, Y.; KASUGA, M.; YAZAKI, Y.; AIZAWA, S. - Insulin resistance and growth retardation in mice lacking, insulin receptor substrate-1. **Nature**,

- TANTI, J.-F.; GREMEAUX, T.; VAN OBERGHEN, E.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. - Insulin receptor substrate-1 is phosphorylated by serine kinase activity of phosphatidylinositol 3-kinase. **Biochem.J.**, 304:17-21, 1994a.
- TANTI, J.-F.; GRÉMEAUX, T.; VAN OBERGHEN, E.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. - Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. **J.Biol.Chem.**, 269:6051-6057, 1994b.
- 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.
- THORBURN, A.W.; CRAPO, P.A.; GRIVER, K.; WALLACE, P.; HENRY, R.R. - Long-term effects of dietary fructose on carbohydrate metabolism in NIDDM. **Metabolism**, 39:58-63, 1990.
- THORBURN, A.W.; STORLIEN, L.H.; JENKINS, A.B.; KHOURI, S.; KRAEGEN, E.W. - Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. **Am.J.Clin.Nutr.**, 49:1155-1163, 1989.
- TOBE, K.; MATUOKA, K.; TAMEMOTO, H.; UEKI, K.; KABUGARI, Y.; ASAI, S.; NOGUCHI, T.; MATSUDA, M.; TANAKA, S.; HATTORI, S.; FUKUI, Y.; AKANUMA, Y.; YAZAKI, Y.; TAKENAWA, T.; KADOWAKI, T. - Insulin stimulates association of insulin receptor substrate-1 with the protein abundant Src homology/growth factor receptor-bound protein 2. **J.Biol.Chem.**, 268:11167-11171, 1993.
- TOBEY, T.A.; MONDON, C.E.; ZAVARONI, I.; REAVEN, G.M. - Mechanism of insulin resistance in fructose-fed rats. **Metabolism**, 31:608-612, 1982.
- TOWBIN, H.; STAEBLIN, J. & GORDON, J. - Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, 76:4350-4354, 1979.

- TRINDER, P. - Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **J.Clin.Path.** 22:158-161, 1969.
- TSAKIRIDIS, T.; McDOWELL, H.E.; WALKER, T.; PETER DOWNES, C.; HUNDAL, H.S.; VRANIC, M. & KLIP, A. - Multiple roles of phosphatidylinositol 3-kinase in regulation of glucose transport, amino acid transport, and glucose transporters in L6 skeletal muscle cells. **Endocrinology**, 136:4315-4322, 1995.
- TURNER, J.L.; BIERMAN, E.L.; BRUNZELL, J.D.; CHAIT, A. - Effect of dietary fructose on triglyceride transport and glucoregulatory hormones in hypertriglyceridemic man. **Am.J.Clin.Nutr.**, 32:1043-1050, 1979.
- WELSH, G.I.; FOULSTONE, E.J.; YOUNG, S.W.; TAVARÉ, J.M. & PROUD, C.G. - Wortmannin inhibits the effects of insulin and serum on the activities of glycogen synthase kinase-3 and mitogen-activated protein kinase. **Biochem.J.**, 303:15-21, 1994.
- WHITE, M.F. - The insulin signalling system and the IRS proteins. **Diabetologia**, 40:S2-S17, 1997.
- WHITE, M.F. & KAHN, C.R. - The insulin signalling system. **J.Biol.Chem.**, 269:1-4, 1994.
- WHITE, M.F.; HARING, H.U.; KASUGA, M.; KAHN, C.R. - Kinetic properties and sites of autophosphorylation of the partially purified receptor from hepatoma cells. **J.Biol.Chem.**, 259:255-264, 1984.
- WHITE, M.F.; MARON, R. & KAHN, C.R. - Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr=185,000 protein in intact cells. **Nature**, 318:183-186, 1985.
- WHITE, M.F.; SHOELSON, S.E.; KEUTMAN, H. & KAHN, C.R. - A cascade of tyrosine autophosphorylation in the β -subunit activates the insulin receptor. **J.Biol.Chem.**, 263:2969-2980, 1988.
- WILDEN, P.A.; KAHN, C.R.; SIDDLE, K. & WHITE, M.F. - Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic functions. **J.Biol.Chem.**, 267:16660-16668, 1992.

- YAMAUCHI, K.; MILARSKI, K.L.; SALTIEL, A.R. & PESSIN, J.E. - Protein tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a require positive effector for insulin downstream signaling. **Biochemistry**, 92:664-668, 1995.
- YEH, J.I.; GULVE, E.A.; RAMEH, L. & BIRBAUM, M.J. - The effects of wortmannin on rat skeletal muscle. Dissociation of signaling pathways for insulin- and contraction-activated hexose transport. **J.Biol.Chem.**, 270:2107-2111, 1995.
- ZAVARONI, I.; CHEN, Y.-D.I.; REAVEN, G.M. - Studies of the mechanism of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. **Metabolism**, 31:1077-1083, 1982.
- ZAVARONI, I.; SANDER, S.; SCOTT, S.; REAVEN, G.M. - Effect of fructose feeding on insulin secretion and insulin action in the rat. **Metabolism**, 29:970-973, 1980.
- ZOPPINI, G. & KAHN, C.R. - Effect of phospholipase treatment on insulin receptor signal transduction. **Diabetologia**, 35:109-115, 1992.



8. Anexos

ANEXO 01

TABELA 01: Valores dos pesos dos animais controles (C) e alimentados com dieta rica em frutose (F), durante o período experimental de 4 semanas. Expressas as Médias $\pm$ Erros Padrão da Média (M), Desvios Padrão da Média (DPM), e a significância expressa em *p.

	Peso inicial		7 dias		14 dias		21 dias		28 dias	
	C	F	C	F	C	F	C	F	C	F
	141,3	140,8	140,7	158,7	206,9	208,4	262,9	256,5	287,8	289,7
	124,1	124,1	159,5	147,8	208,7	199,3	246,0	235,2	279,6	278,4
	124,3	124,7	152,7	150,8	203,3	195,3	246,6	236,3	263,5	274,7
	105,9	105,5	142,7	132,4	183,0	170,3	214,2	207,0	248,3	244,2
	106,5	112,9	148,3	149,0	190,2	189,7	230,6	229,0	274,5	266,1
	126,1	126,8	155,8	141,8	197,3	183,9	242,6	219,7	275,3	267,2
	120,6	121,2	146,9	138,0	183,1	178,1	212,8	214,5	259,4	266,2
	197,5	199,0	233,2	216,5	266,0	247,6	290,2	272,4	313,3	290,9
	114,4	115,7	149,3	141,2	179,4	183,6	226,5	221,2	255,5	252,0
	111,8	115,4	146,6	144,1	184,7	189,9	221,7	225,8	249,8	266,9
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
M	127,2	128,6	157,6	152,0	200,2	194,5	239,4	231,8	270,7	269,6
DPM	26,85	26,50	27,18	23,80	25,45	21,54	23,89	19,75	19,90	14,75
p	0,910		0,632		0,595		0,445		0,893	

ANEXO 02

TABELA 02: Níveis de glicose plasmática expressa em mg/dl, insulina sérica expressa em $\mu\text{U/ml}$, colesterol e triacilglicerídeos séricos, ambos expressos em mg/dl, dos animais controles e dos animais alimentados com dieta rica em frutose. São valores pós-prandiais, com 6 horas de jejum. Os resultados são expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média (**M**), Desvio Padrão da Média (**DPM**), e a significância expressa em ***p**, entre o grupo controle e o grupo frutose.

	Glicose plasmática mg/dl		Insulina sérica $\mu\text{U/ml}$		Colesterol sérico mg/dl		Triacilglicerídeos mg/dl	
	C	F	C	F	C	F	C	F
	79,6	50,0	44,9	33,8	80,1	54,3	117,0	381,7
	57,5	57,0	54,2	45,9	61,9	79,5	119,2	192,1
	69,8	42,6	30,0	83,1	70,4	54,6	109,2	193,9
	79,1	43,9	64,4	39,6	62,6	67,5	116,6	231,2
	63,3	77,5	48,6	30,4	50,0	79,1	97,1	120,8
	76,8	85,6	39,4	71,4	71,9	68,1	94,8	172,8
	64,9	104,8	24,7	52,1	51,7	74,3	167,0	240,5
	63,1	99,4	38,2	40,1	70,2	75,0	227,7	
	77,5	110,6	67,5	38,1	62,0	92,8	170,5	
	76,9	93,0	36,0		68,1		138,2	
	50,0	96,0	50,6		73,3		109,2	
	57,5	83,7	31,4		55,5		171,1	
	76,2	126,7	39,1		73,3			
	57,9	79,4						
	71,2	79,4						
	104,8							
	107,9							
	101,4							
	84,6							
	60,1							
	103,1							
	75,1							
	84,6							
n	23	15	13	9	13	9	12	7
M	76 $\pm$ 3	82 $\pm$ 6	44 $\pm$ 4	48 $\pm$ 6	66 $\pm$ 3	72 $\pm$ 4	137 $\pm$ 11	219 $\pm$ 31
DPM	16,3	24,9	12,9	17,8	9,1	12,3	39,8	81,8
p	0,359		0,499		0,186		*0,008	

ANEXO 03

TABELA 03: Resultados da redução dos níveis de glicose obtidos pelo teste de tolerância à insulina curto (ITT), nos animais controles e tratados com dieta rica em frutose. São apresentados os valores do Kitt que são expressos em %/minuto. Os resultados são expressos como Média ± Erro Padrão da Média (**M**), Desvio Padrão da Média (**DPM**), e a significância expressa em ***p**.

	Controle	Frutose
	2,6	3,5
	3,6	2,8
	2,2	1,2
	5,2	2,6
	5,1	3,1
	5,9	2,3
	2,5	2,9
	6,4	3,5
	4,0	3,9
	3,9	2,7
	3,7	2,1
	5,6	3,4
	4,3	4,0
	4,8	
	3,5	
	3,0	
	2,9	
	2,8	
	2,8	
n	19	13
M	3,9 ± 0,29	2,9 ± 0,22
DPM	1,25	0,79
p	*p<0,01	

ANEXO 04

TABELA 04: Medida da densitometria óptica, das bandas correspondentes à subunidade β do receptor de insulina (**IR**), detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo anti-receptor de insulina, em amostras de tecido hepático de ratos alimentados com a dieta rica em frutose e seus controles. Os resultados são expressos como média, desvio padrão da média e erro padrão da média. A análise estatística utilizada foi o teste *t* não-pareado, e o nível de significância é expresso em *p*, comparando-se os dois grupos. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

	Controle	Frutose
	75.992	67.813
	81.039	70.255
	56.823	57.977
	69.675	53.306
	67.819	55.407
	69.415	79.523
	87.045	89.283
n	7	7
média	72.544	67.652
desvio	9.847	13.323
erro	3.722	5.035
t		0,450
p		0,781
unidades arbitrárias	100 ± 5	93 ± 7

ANEXO 05

TABELA 05: Medida da densitometria óptica, das bandas correspondentes à fosforilação do receptor de insulina (IR), de amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY), em tecido hepático de ratos alimentados com a dieta rica em frutose e seus controles. Os resultados são expressos como média, desvio padrão da média e erro padrão da média. A análise estatística utilizada foi o teste *t* não-pareado, e a significância é expressa em *p*, comparando-se os dois grupos. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

	Controle	Frutose
	19.224	14.976
	18.006	12.634
	19.316	13.825
	19.585	15.191
	20.006	11.342
	20.476	11.591
	16.531	16.023
n	7	7
média	19.021	13.655
desvio	1339	1844
erro	506	697
t		6,230
p		0,000
unidades arbitrárias	100 ± 3	72 ± 4

ANEXO 06

TABELA 06: Medida da densitometria óptica, das bandas correspondentes aos substrato 1 do receptor de insulina (**IRS-1**), detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1 em amostras de tecido hepático de ratos nos dois grupos estudados. Os resultados são expressos como média, desvio padrão da média e erro padrão da média. A análise estatística utilizada foi o teste *t* não-pareado, e a significância é expressa em *p*, comparando-se os dois grupos. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

	Controle	Frutose
	58.903	32.991
	31.794	23.163
	29.744	48.255
	42.941	49.649
	23.845	24.523
	24.523	27.892
	31.541	39.946
	23.495	38.097
	44.451	30.855
	42.912	29.015
	26.477	58.814
	17.363	19.699
	15.076	21.119
	38.222	13.972
	38.768	18.022
	26.275	35.322
	19.885	34.711
	21.631	29.647
	17.239	10.599
	38.326	13.389
	34.164	36.132
	32.504	36.320
	33.181	37.284
	37.125	33.821
	36.473	29.390
	14.339	35.160
	24.335	21.963
	19.244	18.276
		19.394
		24.013
n	28	30
média	30.171	29.714

desvio	10.489	11.164
erro	1982	2038
t		0,160
<i>p</i>		0,873
unidades arbitrárias	100 ± 7	98,5 ± 7

ANEXO 07

TABELA 07: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à fosforilação da pp85 (IRS-1 e/ou IRS-2), detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY), em amostras de tecido hepático de ratos alimentados com a dieta rica em frutose e seus controles. Os resultados são expressos como média, desvio padrão da média e erro padrão da média. A análise estatística utilizada foi o teste *t* não-pareado, e a significância é expressa em *p*, comparando-se os dois grupos. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

	Controle	Frutose
	28.616 29.892 27.462 34.813	26.464 28.908 26.760 21.201 22.570
n	4	5
média	30.196	25.181
desvio	3.234	3.189
erro	1.617	1.426
t		2.330
p		*0,05
unidades arbitrárias	100 ± 5	83,4 ± 5

ANEXO 08

TABELA 08: Medida da densitometria óptica, das bandas correspondentes à subunidade β do receptor de insulina (**IR**), detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo anti-receptor de insulina, em amostras de tecido muscular de ratos alimentados com a dieta rica em frutose e seus controles. Os resultados são expressos como média, desvio padrão da média e erro padrão da média. A análise estatística utilizada foi o teste *t* não-pareado, e o nível de significância é expresso em *p*, comparando-se os dois grupos. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

	Controle	Frutose
	31.470	39.642
	36.176	46.856
	38.566	34.128
	30.364	29.823
	38.744	41.528
		41.444
		39.752
n	5	7
média	35.064	39.025
desvio	3.939	5.523
erro	1.761	2.087
t		- 1,366
p		0,202
unidades arbitrárias	100 ± 5	111,3 ± 6

ANEXO 09

TABELA 09: Medida da densitometria óptica, das bandas correspondentes à fosforilação do receptor de insulina (**IR**), de amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR e submetidas à *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY), em tecido muscular de ratos alimentados com a dieta rica em frutose e seus controles. Os resultados são expressos como média, desvio padrão da média e erro padrão da média. A análise estatística utilizada foi o teste *t* não-pareado, e a significância é expressa em *p*, comparando-se os dois grupos. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

	Controle	Frutose
	3.125	1.559
	3.120	1.877
	1.693	1.596
	1.593	1.977
	1.873	3.648
	1.779	2.588
	2.391	2.641
n	7	7
média	2.225	2.269
desvio	664	746
erro	251	282
t		- 0,118
p		0,908
unidades arbitrárias	100 ± 11	102 ± 12

ANEXO 10

TABELA 10: Medida da densitometria óptica, das bandas correspondentes aos substrato 1 do receptor de insulina (**IRS-1**), detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1 em amostras de tecido muscular de ratos nos dois grupos estudados. Os resultados são expressos como média, desvio padrão da média e erro padrão da média. A análise estatística utilizada foi o teste *t* não-pareado, e a significância é expressa em *p*, comparando-se os dois grupos. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

	Controle	Frutose
	39.142	52.157
	51.512	59.750
	35.291	36.006
	19.033	35.672
	26.658	31.681
	21.197	26.507
	16.171	24.877
	30.867	22.814
	30.083	36.036
	24.094	25.971
	27.795	30.288
	38.612	29.198
	57.916	29.598
	27.007	28.728
	32.186	33.758
	25.925	33.118
	26.912	22.985
	23.927	35.414
	26.873	44.103
	44.607	42.132
	36.175	38.149
	44.398	43.089
	33.595	42.948
	46.050	43.662
	22.352	46.902
	29.551	42.869
		32.400
		36.062
		42.204
n	26	29
média	32.228	36.175
desvio	10.225	8.802

erro	2.005	1.635
t		- 1.538
p		0,130
unidades arbitrárias	100 ± 6	112,2 ± 5

ANEXO 11

TABELA 11: Medida da densitometria óptica das bandas correspondentes à fosforilação da pp85 (IRS-1 e/ou IRS-2), detectadas através do *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina (anti-PY), em amostras de tecido muscular de ratos alimentados com a dieta rica em frutose e seus controles. Os resultados são expressos como média, desvio padrão da média e erro padrão da média. A análise estatística utilizada foi o teste *t* não-pareado, e a significância é expressa em *p*, comparando-se os dois grupos. O resultado final é um valor arbitrário percentual do resultado obtido.

	Controle	Frutose
	5.894	4.564
	7.692	4.086
	6.731	5.158
	5.928	3.479
	5.000	5.768
	6.936	4.108
	6.775	6.137
	6.209	3.818
	5.613	4.854
	7.650	5.252
		5.573
		6.413
n	10	12
média	6.443	4.934
desvio	872	944
erro	276	272
t		3.862
p		*0,000
unidades arbitrárias	100 ± 4	76,6 ± 4