

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

**DIETA RICA EM FRUTOSE PROMOVE
ALTERAÇÕES NAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO
INSULÍNICA EM FÍGADO E MÚSCULO DE
RATOS WISTAR**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Rosângela Maria Neves Bezerra aprovada pela Comissão Julgadora em 02 de junho de 1999.

Campinas, 02 de junho de 1999



Prof. Dra. Carla Roberta de
Oliveira Carvalho
Presidente da Banca

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutora em Ciência da Nutrição.

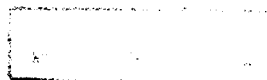
Candidata: Rosângela Maria Neves Bezerra

Orientadora: Prof^a. Dra. Carla Roberta O. Carvalho

Co-orientadora: Prof^a. Dra Débora de Queiroz Tavares

Campinas

1999



9915193

BC
Ex.
07/38331
229/99
R\$ 11,00
11/08/99

CM-00125399-7

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

B469d

Bezerra, Rosângela Maria Neves

Dieta rica em frutose promove alterações nas etapas iniciais da ação insulínica em fígado e músculo de ratos wistar. / Rosângela Maria Neves Bezerra. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Carla Roberta O. Carvalho.

Co-Orientador: Débora de Queiroz Tavares.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Frutose. 2. Resistência à insulina. 3. Receptor - Insulina. 4. Pressão arterial. I. Carvalho, Carla Roberta O. II. Tavares, Débora de Queiroz. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA



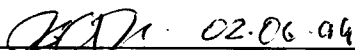
Carla Roberta O. Carvalho
orientadora



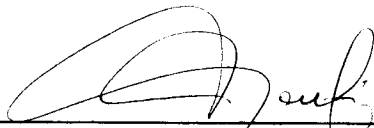
Antônio Carlos Boschero
IB – UNICAMP



Everardo Magalhães Carneiro
IB – UNICAMP

 02.06.94

Jaime Amaya Farfan
FEA - UNICAMP



José Antônio R. Gontijo
FCM – UNICAMP

Sigisfredo Luis Brenelli
FCM – UNICAMP

Ubiratan Fabres Machado
ICB - USP

*Aos meus pais,
Laurentino e Maria Jaci,
a meu esposo Márcio e a minha
filha Ana Beatriz*

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À Prof^a Carla Roberta de Oliveira Carvalho, pela sua amizade e o convívio agradável, pelas críticas e sugestões a este trabalho, e pela maneira simples e entusiástica de transmitir conhecimentos

Ao Prof. Mario José Abdalla Saad, pela gentileza com que acolheu-me em seu laboratório e por todos as valiosas sugestões e conhecimentos transmitidos.

Às minhas amigas e companheiras, Maria Sebastiana Silva e Mirian Ueno, que participaram ativamente de todos os momentos deste trabalho, agradeço pelo seu carinho, atenção e pela prontidão em colaborar.

Ao Márcio, por sua compreensão, apoio, incentivo e sugestões durante a realização deste trabalho.

À Ana Beatriz, que foi capaz de entender e aceitar a minha ausência, agradeço por sua doçura, carinho e amor.

Ao Prof. José Antônio Rocha Gontijo, por suas sugestões e participação na realização deste trabalho.

À Prof^a Debora de Queiroz Tavares, por sua acolhida no departamento e por permitir a interação com outros laboratórios.

Aos funcionários Luiz, Conceição, Iara, Iná, Eliete, Esmeralda, pelo auxílio no trabalho de bancada e no trato dos animais.

Aos amigos e companheiros da pós-graduação que direta ou indiretamente participaram com sua ajuda, amizade e agradável convívio.

À VEPÊ Indústria e Comércio S.A., pela doação da frutose utilizada neste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO	<i>i</i>
---------------------	----------

INTRODUÇÃO	1
-------------------------	---

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Mecanismo molecular da insulina.....	4
--------------------------------------	---

Metabolismo de frutose.....	10
-----------------------------	----

Frutose x Resistência à insulina.....	11
---------------------------------------	----

Frutose x Hipertensão.....	13
----------------------------	----

ARTIGO 1	16
-----------------------	----

Abstract.....	17
---------------	----

Introduction.....	18
-------------------	----

Material and Methods.....	19
---------------------------	----

Results.....	22
--------------	----

Discussion.....	25
-----------------	----

Table.....	29
------------	----

Figure Legends.....	30
---------------------	----

Figures.....	31
--------------	----

References.....	33
-----------------	----

ARTIGO 2	37
-----------------------	----

Abstract.....	38
---------------	----

Introduction.....	39
-------------------	----

Material and Methods.....	40
---------------------------	----

Results.....	43
--------------	----

Discussion.....	44
Table.....	48
Figure Legend.....	49
Figure.....	50
References.....	51
CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXO	
Material e Métodos.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

AIN	American Institute of Nutrition
AKT	proteína serina/treonina quinase B
AKT2	proteína serina/treonina quinase B - 2
ATP	adenosina trifosfato
cAMP	adenosina monofosfato na forma cíclica
células 3T3 L1	linhagem de células de fibroblastos
células CHO	células de ovário de hamster chinês
Crk	oncoproteína
DAG	diacilglicerol
DNA	ácido desoxiribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
GLUT-4	transportador de glicose -4
GH	hormônio de crescimento
GRB2	proteína ligadora do receptor para fator de crescimento
GMP	guanosina monofosfato
GS3K	glicogênio sintetase 3 quinase
¹²⁵ I	radioisótopo do iodo
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
ITT	teste de tolerância à insulina
JAK 2	proteína citoplasmática quinase da família Janus
Kitt	constante de redução da glicose
Ln	logaritmo neperiano
MAPK	proteína quinase ativadora da mitogênese
Nck	oncoproteína
p21 ^{Ras}	proteína de 21 kDa da família Ras

p70 ^{S6K}	proteína de 70 kDa da família das quinases ribossomal S6
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PKC	proteína quinase dependente de cálcio
pp185	proteína fosforilada de aproximadamente 185 kDa
PI 3-kinase	fosfatidilinositol 3-quinase
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoreto
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
SH2	segunda homologia ao oncogene Src
Shc	molécula adaptadora e substrato do receptor de insulina
SHP2 ou Syp	fosfotirosina fosfatase
SHR	linhagem de ratos espontaneamente hipertensos
SOS	Son-of-sevenless, fator de troca de nucleotídeo guanina
Src	oncogene, produto do sarcoma virus Rous
Tris	tri(hidroximetil)-aminometano
VLDL-TG	fração de triacilglicerol presente em lipoproteínas de muito baixa densidade



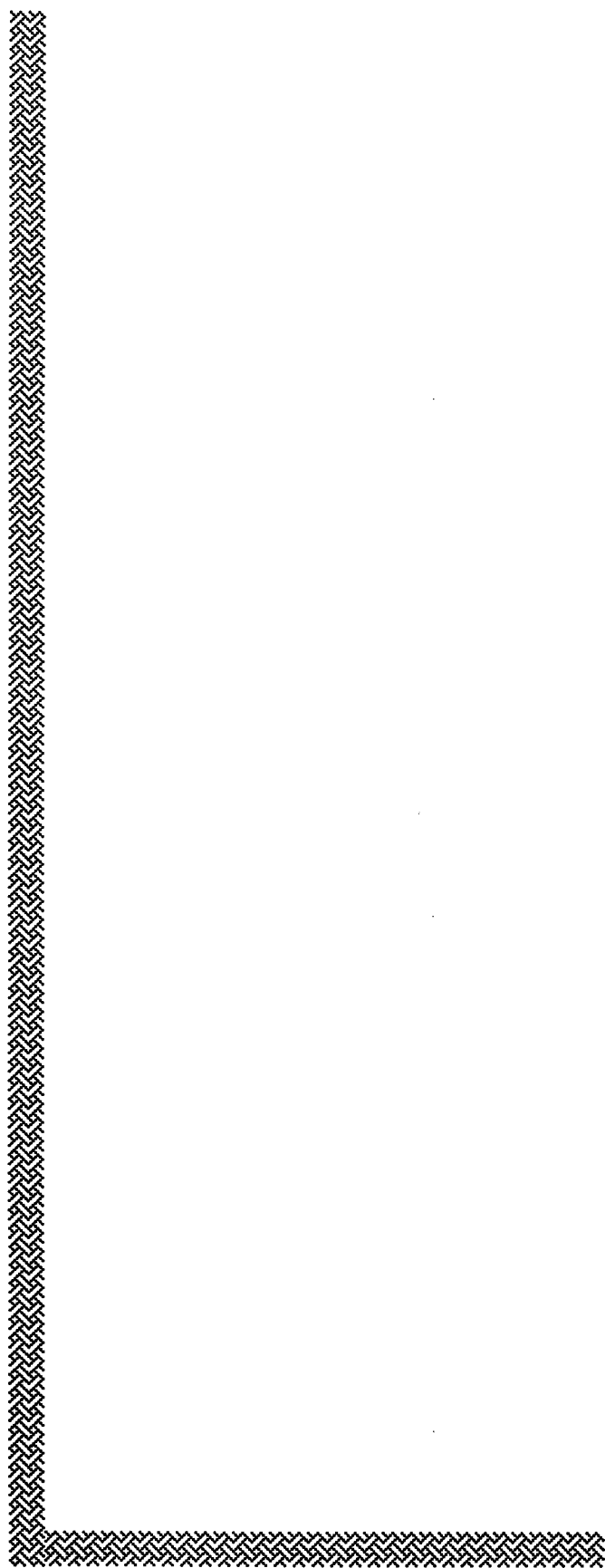
RESUMO

A interação da insulina com o seu receptor, estimula a porção tirosina quinase do receptor, levando à autofosforilação e a fosforilação de substratos citossólicos, substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e substrato 2 do receptor de insulina (IRS-2). Estes substratos fosforilados associam-se a proteínas com domínio SH2. Ratos alimentados com dieta rica em frutose são um modelo experimental já descrito de resistência à insulina, hipertriacilgliceridemia, hiperinsulinemia e hipertensão. Entretanto, o mecanismo molecular envolvido na resistência à insulina ainda não foi totalmente esclarecido.

Neste estudo, utilizando da técnica de imunoprecipitação e “immunoblotting”, avaliamos a quantidade protéica e o grau de fosforilação, após estímulo insulínico, do receptor de insulina (IR) e do IRS-1, bem como a associação do IRS-1 com a PI 3-quinase e IRS-1 com a fosfotirosina fostatase (SHP2) em fígado e músculo de ratos alimentados com dieta rica em frutose. Não houve mudanças na concentração do receptor de insulina e do IRS-1 em fígado e músculo dos animais alimentados com dieta rica em frutose. Entretanto, o grau de fosforilação do receptor de insulina foi reduzido para $71 \pm 2\%$ ($P < 0,05$) nas amostras de fígado do grupo frutose. Nas amostras imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e incubadas com anticorpo antifosfotirosina, houve diminuição do grau de fosforilação para $70 \pm 6\%$ ($P < 0,05$) e $76 \pm 5\%$ ($P < 0,05$) respectivamente, em fígado e músculo dos ratos com dieta rica em frutose. A associação IRS-1/PI 3-quinase reduziu para $84 \pm 3\%$ ($P < 0,05$) no fígado e para $84 \pm 4\%$ ($P < 0,05$) no músculo do grupo frutose. A associação IRS-1/SHP2 foi reduzida para $79 \pm 5\%$ ($P < 0,05$) no fígado dos animais alimentados com frutose. Esses dados sugerem que alterações nas etapas iniciais da via de sinalização da insulina podem ter significado importante no mecanismo de resistência à insulina encontrada neste modelo.

Os animais alimentados por 28 dias com dieta rica em frutose apresentaram moderada resistência à insulina, demonstrada pela diminuição da velocidade de redução da glicose, e uma aumento significativo da concentração de triacilglicerol sérico. Entretanto, diferentemente da maioria dos estudos, não houve alteração na concentração de insulina nem na pressão arterial destes animais comparados ao grupo controle. Como existe uma heterogeneidade na composição de gordura e sódio destas dietas, foi avaliada a influência da adição

de sódio na dieta rica em frutose, na sensibilidade à insulina, na pressão arterial e no grau de fosforilação do IRS-1 no fígado destes animais. A adição de sódio não teve efeito na sensibilidade à insulina medida pelo teste de tolerância à insulina curto, nem na fosforilação induzida pela insulina do IRS-1, como demonstrada pela técnica de “immunoblotting”. Entretanto, a adição de sódio promoveu um aumento significativo na pressão arterial indireta dos animais controle e com dieta rica em frutose (C: 117 ± 3 mmHg x C-Na: 141 ± 4 mmHg, $P<0,05$ e F: 118 ± 3 mmHg x F-Na: 132 ± 4 mmHg, $P<0,05$). Esses resultados demonstram que a alimentação por 28 dias com uma dieta rica em frutose, não induz a hiperinsulinemia, nem a hipertensão. Essas observações sugerem que a gordura saturada e a quantidade de sódio na dieta podem agir sinergisticamente com as alterações metabólicas induzidas pela frutose, favorecendo a elevação da insulina sérica e da pressão arterial neste modelo animal.



INTRODUÇÃO

A insulina para exercer suas ações celulares em processos metabólicos e de crescimento celular, utiliza como mediador inicial o seu receptor transmembrana. O receptor de insulina é uma proteína heterotetramérica composta de duas subunidades α , contendo o sítio de ligação da insulina, e duas subunidades β onde encontra-se a porção tirosina quinase. A insulina após ligar-se ao seu receptor promove uma alteração conformacional em sua estrutura protéica, expondo e ativando a porção tirosina quinase em direção a seus próprios resíduos tirosina (autofosforilação), e em direção a substratos endógenos como o IRS-1 (SUN *et al.*, 1991) e o IRS-2 (SUN *et al.*, 1995). As proteínas IRS's apresentam múltiplos sítios de fosforilação em resíduos serina, treonina e tirosina. Após o estímulo insulínico, nove sítios de fosforilação em tirosina presentes numa seqüência repetitiva YMXM ou YXXM (onde o Y é o aminoácido tirosina; X qualquer aminoácido e M é o aminoácido metionina), são capazes de interagir com outras moléculas sinalizadoras, particularmente contendo o domínio SH2 (BACKER *et al.*, 1992; SUN *et al.*, 1993; KUHNE *et al.*, 1993). Dentre várias proteínas com domínio SH2, a associação do IRS-1/IRS-2 à PI 3-quinase é de grande importância na propagação do sinal insulínico. Além das proteínas IRS's, outras proteínas foram descritas como sendo fosforiladas após o estímulo com a insulina, dentre estas estão a ecto-ATPase (LIN & GUIDOTTI, 1989), a Sch (KOVACINA & ROTH, 1993) e o JAK2 (SAAD *et al.*, 1996).

Nos últimos 7 anos, vários modelos animais de resistência à insulina foram estudados, demonstrando que alterações nestas etapas iniciais da ação insulínica em tecidos insulino-sensíveis, podem ter um papel importante nas alterações da sensibilidade à insulina. Dentre os modelos animais já estudados estão: ratos submetidos a jejum prolongado (SAAD *et al.*, 1992), ratos com hipertensão espontânea-SHR (KAHN & SAAD, 1992), ratos tratados cronicamente com dexametazona (SAAD *et al.*, 1993), ratos velhos (CARVALHO *et al.*, 1996), ratos tratados com GH (THIRONE *et al.*, 1997), ratas grávidas (SAAD *et al.*, 1997). Entretanto, ainda não se investigou a regulação destas etapas iniciais em modelo animal de resistência à insulina induzida por dieta rica em frutose.

O consumo de quantidade normais de frutose isoladamente ou como parte de uma refeição manifestou um menor efeito na glicemia pós-prandial que outros carboidratos (BANTLE, 1989). O consumo desta hexose como adoçante natural vem crescendo principalmente na dieta ocidental (HALLFRISCH, 1990). Diversos trabalhos utilizaram uma dieta rica em frutose como modelo experimental de resistência à insulina, associado com hipertriacilgliceridemia, hiperinsulinemia e hipertensão arterial (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 humanos, estudos utilizando diferentes concentrações de frutose, indicaram respostas semelhantes às encontradas nos estudos animais (BECK-NIELSEN *et al.*, 1980; HALLFRISCH *et al.*, 1983), embora outros autores tenham observado resultados conflitantes destas alterações (BOSSETTI *et al.*, 1984; CRAPO *et al.*, 1986; MALERBI *et al.*, 1996).

Existem evidências de que os componentes da dieta, especialmente o conteúdo e tipo de lipídeo, podem influenciar os efeitos do metabolismo de carboidratos e lipídeos observados em dietas com concentração elevada de frutose (MATSUI *et al.*, 1997). Alguns dos estudos descritos utilizaram uma dieta frutose-banha de porco, onde a quantidade de sódio da dieta era superior àquela utilizada na dieta controle (HWANG *et al.*, 1987, HWANG *et al.*, 1989).

Para avaliar os efeitos exclusivos da frutose nas alterações metabólicas e nas vias iniciais da sinalização da insulina, utilizamos de uma dieta rica em frutose, onde a fonte lipídica foi semelhante a encontrada na dieta controle, ou seja gordura vegetal, com quantidades normais de minerais. Para avaliar os efeitos da elevação do conteúdo de sódio na dieta, utilizamos uma dieta rica em frutose acrescida de sódio. Com este modelo experimental objetivamos avaliar o teor de proteína tecidual e o grau de fosforilação após o estímulo insulínico do receptor de insulina e do IRS-1, bem como a associação deste substrato com a PI 3-quinase e a SHP2 em fígado e músculo de ratos alimentados com dieta rica em frutose. Para caracterizar as alterações metabólicas e na pressão arterial induzidas pela dieta rica em frutose, e os efeitos associados do consumo elevado de sódio, foram realizadas as seguintes análises: teste de tolerância à insulina de

curta duração, dosagens de glicose, insulina, triacilglicerol e colesterol sérico, e medida da pressão arterial indireta.

*REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA*

MECANISMO MOLECULAR DE AÇÃO DA INSULINA

A insulina é um potente hormônio secretado pelas células β do pâncreas em resposta a elevação dos níveis de glicose no sangue, apresentando múltiplos efeitos na célula. Sua ação mais imediata envolve a captação de glicose do sangue e seu metabolismo, nos tecidos muscular e adiposo, e a inibição da neoglicogênese no tecido hepático (WHITE & KAHN, 1994). Além de seus efeitos primários no controle da homeostase de glicose, a insulina participa em numerosos outros eventos celulares incluindo mudanças na expressão de genes pela regulação da transcrição do DNA, além de mudanças na taxa de tradução, síntese de DNA, síntese e degradação de proteínas, e regulação do transporte de íons e aminoácidos, em praticamente todas as células (CHEATHAM & KAHN, 1995).

Para promover seus efeitos metabólicos e no crescimento celular, a insulina necessita ligar-se a seu receptor específico presente na membrana celular de praticamente todos os tecidos de mamíferos. Entretanto, a concentração do receptor de insulina é variável, sendo encontrado em menor número em eritrócitos e cérebro, e numa concentração que varia de 200.000 a 300.000 receptores/células em tecidos insulino-sensíveis, como o tecido hepático e adiposo (KAHN, 1985). O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica, composta de duas subunidades α e duas subunidades β . Uma região rica em resíduos cisteína nas subunidades α e resíduos de cisteína das subunidades β , permite uma ligação covalente inter- e intra-subunidades, através de pontes dissulfeto, resultando numa estrutura heterotetramérica $\alpha_2\beta_2$ (MASSAGUE *et al.*, 1980; KASUGA *et al.*, 1982). Cada subunidade α com peso molecular de 135.000 Da, é exclusivamente extracelular, e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade β é uma proteína transmembrana que apresenta peso molecular de 95.000 Da, e contém uma sequência de aminoácidos que lhe confere capacidade enzimática tirosina kinase, responsável pela transmissão do sinal insulínico (KASUGA *et al.*, 1982; KASUGA *et al.*, 1982b).

Este receptor comporta-se como uma enzima alostérica, com uma subunidade α regulatória e uma subunidade β catalítica (KASUGA *et al.* 1982a; KASUGA *et al.*, 1982b). Quando a insulina se liga à subunidade α ocorre uma alteração na sua conformação, fazendo com que a porção tirosina quinase na subunidade β seja estimulada (HERRERA & ROSEN, 1986; PERLMAN *et al.*, 1989; WILDEN *et al.*, 1990), transferindo grupos fosfato do ATP para vários resíduos tirosina do receptor. O padrão de autofosforilação do receptor é complexo, e envolve no mínimo 5 resíduos tirosinas. A fosforilação de três resíduos tirosinas (Tyr^{1158/1162/1163}) na alça regulatória da subunidade β , estabiliza a mudança conformacional que expõem a porção catalítica para ativação da porção quinase do receptor (HUBBARD *et al.*, 1994), amplificando desta maneira, a atividade quinase em direção a outras proteínas citosólicas.

Evidências consideráveis têm sugerido que a atividade tirosina quinase do receptor tem um papel essencial na mediação dos efeitos metabólicos agudos e dos efeitos prolongados sob o crescimento celular estimulados pela insulina (ULLRICH *et al.*, 1985; EBINA *et al.*, 1987; CHOU *et al.*, 1987; Mc CLAIN *et al.*, 1987; WILDEN *et al.*, 1992). Estudos de mutagenese *in vitro* onde a Lisina¹⁰³⁰, localizada no sítio de ligação do ATP, foi substituída por um dos vários outros aminoácidos, demonstraram que esses mutantes expressos em linhagens de células, eram capazes de promover a ligação da insulina ao seu receptor, entretanto não ocorria a ativação da porção quinase do receptor de insulina. Esses receptores mutantes foram totalmente ineficientes e incapazes de mediar os efeitos metabólicos e promotores de crescimento da insulina (EBINA *et al.*, 1987; CHOU *et al.*, 1987; Mc CLAIN *et al.*, 1987; STUMPO & BLACKSHEAR, 1991; KROOK *et al.*, 1996). Mutações nos sítios de fosforilação em tirosina (Tyr^{1158/1162/1163}) mostraram alterações similares, tendo o receptor mutante apresentado uma redução na capacidade de autofosforilação e na atividade tirosina quinase (ELLIS *et al.*, 1986; WILDEN *et al.*, 1990; WILDEN *et al.*, 1992; WILDEN *et al.*, 1992a).

O receptor em seu estado basal encontra-se fosforilado nos resíduos serina e treonina. A diminuição na atividade quinase do receptor e perda da sensibilidade à insulina é provavelmente o resultado da ação das proteínas quinase C ou A, serinas/treoninas quinases, que são potencialmente ativadas por diacilglicerol, éster de forbol e cAMP (TAKAYAMA *et al.*, 1988; STADTMAUER & ROSEN, 1986; LEWIS *et al.*, 1990; CHIN *et al.*, 1993). A fosforilação do receptor em múltiplos resíduos de aminoácidos parece estar envolvida no mecanismo de regulação da atividade quinase do receptor, proporcionando um mecanismo importante para a regulação da sinalização da insulina em estados fisiológicos e patológicos (TAKAYAMA *et al.*, 1988).

Nos últimos anos, um grande progresso foi feito no sentido de definir as etapas intracelulares específicas envolvidas nas vias de transmissão do sinal da insulina. Embora muitas das proteínas intermediárias sejam ainda desconhecidas, atualmente, já está claro que a insulina induz a autofosforilação de seu receptor, ativando a sua porção tirosina-quinase, o que o torna capaz de fosforilar um ou mais substratos proteicos intracelulares. A fosforilação de seus substratos inicia uma série de eventos envolvendo uma cascata de reações de fosforilação e defosforilação que resultam em seus efeitos metabólicos e de crescimento (SUN *et al.*, 1991; WHITE & KAHN, 1994; WHITE, 1997).

O primeiro substrato a ser identificado foi uma proteína citosólica de aproximadamente 185 kDa, denominada pp185 por sua mobilidade eletroforética (WHITE *et al.*, 1985). Na tentativa de melhor caracterizar a interação receptor de insulina e seus substratos, PAZ *et al.* (1996) utilizando peptídios contendo a sequência de aminoácidos da região justamembrana do receptor de insulina, que foram incubados com extratos de células CHO, observaram que a interação IR/pp185 ocorria no motivo NPEY, onde N= asparagina, P= prolina, E= ácido glutâmico, Y= tirosina, independente da fosforilação da tirosina 960. Estudos de mutação do receptor de insulina, na tirosina⁹⁶⁰ da porção justamembrana, demonstraram que associado a diminuição na fosforilação da pp185 induzida pela insulina, havia uma redução nos efeitos biológicos finais deste hormônio, sugerindo que esta proteína tem um papel importante na via de transmissão do

sinal da insulina (WHITE & KAHN, 1994). A purificação e clonagem da pp185 revelou a sequência do DNA complementar (cDNA) do primeiro substrato do receptor de insulina (IRS-1) (SUN *et al.*, 1991; ROTHENBERG *et al.*, 1991). Posteriormente, foi observado que uma outra proteína de 190 kDa, inicialmente denominada 4PS, é rapidamente fosforilada em tirosina em resposta a insulina (WANG *et al.*, 1993; ARAKI *et al.*, 1994; TOBE *et al.*, 1995). A purificação e o sequenciamento do cDNA mostraram uma grande homologia ao IRS-1, sendo então denominada de IRS-2 (SUN *et al.*, 1995). Recentemente foi purificado e clonado uma proteína de 60 kDa, presente em tecido adiposo, que apresenta características muito semelhantes a de outras proteínas IRS's, sendo assim foi então denominada de IRS-3 (LAVAN *et al.*, 1997). Essas proteínas compõem uma família de proteínas sinalizadoras, que em resposta a estimulação da insulina, fosforilaram os resíduos tirosina localizados nos motivos YMXM ou YXXM, sendo Y= tirosina, M= metionina, e X= outro aminoácido (SAAD, 1994; WHITE & KAHN, 1994; CHEATAM & KAHN, 1995; WHITE, 1997), servindo de proteínas porto para proteínas intracelulares contendo domínios *src*-homology 2 (SH2).

A fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) é a mais bem estudada molécula sinalizadora ativada pelo IRS-1. Ela tem um papel importante em muitos processos celulares, incluindo proliferação celular e captação de glicose. Esta enzima é composta de uma subunidade catalítica de 110 kDa e de 5 isoformas da subunidade regulatória (p85 α , p85 β , p55^{PIK}, p55 α ou p50 α) contendo 2 domínios SH2. A molécula do IRS-1 fosforilada em tirosina, permite a associação de seus motivos YMXM ao domínio SH2 da subunidade regulatória da PI 3-quinase, levando a ativação desta enzima (RUDERMAN *et al.*, 1990; KAPELIER *et al.*, 1991; BACKER *et al.*, 1992). Esta enzima ativa, catalisa a fosforilação do fosfatidilinositol (PI), do fosfatidilinositol-4-fosfato (PI-4P), e do fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PI-4,5PP), resultando na estimulação do transporte de glicose (RUDERMAN *et al.*, 1990).

Estudos com os inibidores (wortmannin, benzopyran-4-one) da PI 3-quinase em adipócitos de ratos (OKADA *et al.*, 1994), em células 3T3 L1 (CLARKE *et al.*, 1994) e células CHO (KANAI *et al.*, 1993) demonstraram uma redução na

atividade da PI 3-quinase e na translocação dos transportadores de glicose - GLUT4 (KANAI *et al.*, 1993, OKADA *et al.*, 1994; CLARKE *et al.*, 1994, CHEATHAM *et al.*, 1994). HARA *et al.* (1994) desenvolveram um mutante da subunidade p85 com deleção no sítio de ligação da subunidade catalítica. Essa construção quando expressa em células CHO superexpressando o receptor de insulina, não afetou a atividade quinase do receptor e a fosforilação do IRS-1, entretanto a atividade da PI 3-quinase foi reduzida. Quando esse mutante foi expresso em células 3T3-L1 a translocação de GLUT4 e a produção de PI 3,4,5 trifosfato foram inibidas, sugerindo que esse lipídio possa ser um mediador nas vias posteriores a PI 3-quinase nos efeitos no transporte de glicose.

Recentemente foi demonstrado que a PI 3-quinase é uma serina/treonina kinase que fosforila o IRS-1, entretanto a significação biológica dessa atividade é ainda desconhecida (LAM *et al.*, 1994). Algumas enzimas, como a p70^{S6K} e AKT (proteína quinase B - PKB ou Rac) são provavelmente ativadas pela via ligada a PI 3-quinase (CHEATHAM *et al.*, 1994; SHEPHERD *et al.*, 1998). Essas enzimas são serina/treonina quinases com um papel importante na regulação da expressão de genes e no crescimento celular em resposta a numerosos estímulos (YENUSH & WHITE, 1997). Mais recente, foi observado em tecido adiposo, que a AKT 2 em resposta ao estímulo da insulina encontra-se ligada a vesículas contendo o transportador de glicose- GLUT4 (KUPRIYANOVA & KANDROR, 1999).

Uma outra enzima que interage com o IRS-1 fosforilado é a SHP2, uma proteína de 66kDa com atividade fosfatase fosfotirosina específica, que é ativada pela ligação de seu domínio SH2 as tirosinas 1172 e 1222 do IRS-1, em cultura de células (ECK *et al.*, 1996). Embora o papel dessa enzima seja ainda muito controverso, estudos utilizando mutantes sugerem que ela module o grau de fosforilação em tirosina do IRS-1, e esteja ligada a alguns aspectos da síntese de DNA estimulada pela insulina (UGI *et al.*, 1996).

As proteínas IRS também interagem com várias proteínas adaptadoras, incluindo Grb2, nck e crk (YENUSH & WHITE, 1997). Nck e crk foram identificadas como proto-oncogenes, sugerindo que elas tenham um papel

regulatório na estimulação do crescimento celular (LEE *et al.*, 1993; BEITNER-JOHNSON *et al.*, 1996). A Grb2 é uma molécula adaptadora contendo domínios SH2 e SH3, que ativa a via p21^{ras}/MAPK ligando-se ao fator de troca de nucleotídeo guanina chamado mSOS (son-of-sevenless) (SKOLNIK *et al.*, 1993; SKOLNIK *et al.*, 1993a). Esta proteína participa na via de sinalização das proteínas ativadoras de mitogênese (MAP quinases), as quais tem um papel importante na ativação de fatores de transcrição (DEFRONZO, 1997).

Portanto, a insulina após ligar-se e ativar o seu receptor tirosina-quinase, desencadeia uma cascata de reações de fosforilação e defosforilação, inicialmente envolvendo as proteínas IRS's, que resultam na associação e ativação de uma série de enzimas/proteínas importantes para a amplificação do sinal insulínico. Logo, estudos da regulação destes primeiros passos da ação da insulina, em modelos animais de resistência à insulina, contribuem para uma melhor entendimento das alterações de sensibilidade a este hormônio, encontrada em muitos estados fisiológicos e patológicos.

Vários modelos animais de resistência à insulina, dentre estes os camundongos obesos (SAAD *et al.*, 1992), ratos submetidos à jejum prolongado (SAAD *et al.*, 1992), ratos espontaneamente hipertensos (KAHN & SAAD, 1992), ratos tratados com dexametasona (SAAD *et al.*, 1993), ratos sépticos (NUNES *et al.*, 1994), ratos tratados com adrenalina ou glucagon (SAAD *et al.*, 1995; SAAD *et al.*, 1995a), ratos idosos (CARVALHO *et al.*, 1996), ratos tratados com hormônio de crescimento (THIRONE *et al.*, 1997), e ratas grávidas (SAAD *et al.*, 1997), demonstraram alterações nas etapas iniciais da ação da insulina em tecidos insulino-sensíveis.

Ratos alimentados com uma dieta rica em frutose são um modelo descrito e caracterizado de resistência à insulina associada a hipertriacilgliceridemia, hiperinsulinemia e hipertensão arterial. Entretanto, as alterações moleculares nas etapas iniciais da ação insulínica não foram ainda descritas.

METABOLISMO DE FRUTOSE

Em dietas, a frutose pode ser fornecida pelas frutas e vegetais, como adoçantes e pela sacarose, que no intestino delgado, pela ação da sacarase, fornece uma molécula de glicose e uma molécula de frutose. A frutose é absorvida principalmente através de difusão facilitada, sendo então transportada pela veia porta para o fígado, onde é inicialmente metabolizada (UUSITUPA, 1994).

No fígado, o metabolismo da frutose, independente da ação da insulina, é iniciado com a fosforilação da frutose por uma das duas enzimas, hexoquinase ou frutoquinase. A hexoquinase está presente em todos os tecidos e pode fosforilar no carbono 6 de vários açúcares, incluindo a frutose. O produto da fosforilação da frutose pela hexoquinase é a frutose-6-fosfato, que é também um intermediário no metabolismo da glicose. Entretanto, a hexoquinase tem somente uma baixa afinidade pela frutose se comparada a glicose. Portanto, a frutose é principalmente metabolizada no fígado (e potencialmente nos rins e intestino delgado) pelo processo envolvendo a frutoquinase. Esta enzima, fosforila rapidamente a molécula de frutose em seu carbono 1, formando a frutose-1-fosfato, que diferentemente da frutose-6-fosfato, não necessita de fosforilação para ser quebrada, e produzir duas trioses (UUSITUPA, 1994; FRAYN & KINGMAN, 1995).

Esse desvio na via metabólica da frutose, permite um fluxo maior no metabolismo, se comparado a glicose. As duas trioses formadas são: a dihidroxiacetona e o gliceraldeído. Este último composto é então fosforilado formando o gliceraldeído-3-fosfato, e desta forma pode entrar na via glicolítica. Utilizando de uma via alternativa, o gliceraldeído é convertido a glicerato, que é então fosforilado a 2-fosfoglicerato, um intermediário mais abaixo na via glicolítica. Em aerobiose, o piruvato formado é oxidado pela piruvato desidrogenase, produzindo acetil-CoA, que segue a via do ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou é utilizado na lipogênese. Além deste caminho, o gliceraldeído pode ser convertido a glicerol, e posteriormente a glicerol-3-fosfato,

potencializando a produção de acilgliceróis, e portanto facilitando a produção de triacilglicerol (FRAYN & KINGMAN, 1995).

Em condições normais, a frutose é principalmente convertida a glicose, glicogênio, e lactato, e em menor proporção a triacilgliceróis. Devido a sua absorção lenta, o efeito sob a elevação da glicemia é menor que após a ingestão de outros carboidratos. A ingestão de frutose tem uma resposta insulínica menor que a glicose e a sacarose (JENKINS *et al.*, 1981; HENRY *et al.*, 1991). Quantidades moderadas de frutose podem ser utilizadas por indivíduos normais e diabéticos, entretanto, o seu uso em quantidades elevadas pode induzir a um aumento acentuado dos níveis de triacilglicerol sérico em indivíduos susceptíveis a hipertriacilgliceridemia (HALLFRISCH *et al.*, 1983; CRAPO *et al.*, 1986; KOH *et al.*, 1988).

Há mais de 30 anos, já existem relatos da elevação na concentração de lipídio sanguínea em resposta a quantidades excessivas de açúcares na dieta, particularmente frutose e sacarose (MacDONALD & BRAITHWAITE, 1964). O mecanismo exato pelo qual a frutose ou a sacarose aumentam os níveis de triacilglicerol, não é totalmente esclarecido. Uma das hipóteses é que o fluxo aumentado de glicose ou frutose na via glicolítica, levaria a um aumento na produção de acetil CoA e portanto estimularia a síntese de ácidos graxos, favorecendo a maior síntese de triacilglicerol (FRAYN & KINGMAN, 1995). Um dos efeitos tardios do consumo elevado de açúcares, pode ser a indução de resistência à insulina. Vários estudos em animais, demonstraram que altas quantidades de frutose ou sacarose na dieta, levam a perda da sensibilidade à insulina (ZAVARONI *et al.*, 1980; SLEDER *et al.*, 1980; BLAKELY *et al.*, 1981; TOBEY *et al.*, 1982; ZAVARONI *et al.*, 1982; THORBURN *et al.*, 1989).

FRUTOSE X RESISTÊNCIA À INSULINA

A resistência à insulina é uma alteração metabólica característica do diabetes mellitus tipo 2 (DM tipo 2), definida como uma ação anormal ou insuficiente da insulina para manter a homeostase de glicose. Notáveis avanços

nesta área foram feitos nos últimos anos, e a condição de resistência à insulina pode estar envolvido na etiologia de várias doenças além do DM tipo 2, como doenças cardiovasculares, obesidade, hipertensão arterial, dislipidemias – particularmente hipertriacilgliceridemia e níveis reduzidos de HDL colesterol, hiperuricemia, e síndrome de ovário policístico (REAVEN, 1988; O'DOHERTY *et al.*, 1997). A presença de resistência à insulina, hipertensão arterial e dislipidemia foi caracterizada por REAVEN (1988) como “Síndrome X”.

Os fatores envolvidos no desenvolvimento da resistência à insulina são de origem genética e ambiental. Estudo de mutações específicas que levam a resistência à insulina desenvolvidas em diferentes grupos étnicos, demonstraram existir um componente genético implicado no desenvolvimento deste quadro (MOLLER *et al.*, 1996). Entretanto permanece ainda a dúvida se existe um gene maior responsável pelo desenvolvimento da resistência à insulina, ou se é um caráter poligênico. Fatores ambientais como: dieta (excesso de calorias, altas concentrações de açúcares simples e/ou concentração de gordura saturada), atividade física, certas drogas como glicocorticóides podem influenciar no nível de resistência à insulina (O'DOHERTY *et al.*, 1997).

Um modelo animal de resistência à insulina associada a hiperinsulinemia, hipertriacilgliceridemia (ZAVARONI *et al.*, 1980; SLEDER *et al.*, 1980; TOBEY *et al.*, 1982; ZAVARONI *et al.*, 1982; THORBURN *et al.*, 1989) e hipertensão arterial (HWANG *et al.*, 1987; REAVEN *et al.*, 1988; REAVEN *et al.*, 1989; HWANG *et al.*, 1989) são os ratos alimentados com dieta rica em frutose. É provável que a diminuição na supressão da produção hepática de glicose pela insulina em ratos alimentados com frutose, se deva a uma diminuição na ação da insulina em um dos passos envolvidos na síntese de glicogênio ou na glicogenólise ou na gliconeogênese (TOBEY *et al.*, 1982). Há estudos demonstrando que a dieta rica em frutose, altera a atividade de algumas enzimas reguladoras do metabolismo de carboidratos no fígado, como a glicose-6-fosfatase e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase, levando a resistência à insulina hepática (TUOVINEN *et al.*, 1975, BLAKELY *et al.*, 1981).

Para um melhor entendimento do mecanismo de resistência à insulina observado nos ratos alimentados com dieta rica em frutose, é importante o conhecimento das possíveis alterações nas etapas iniciais da ação insulínica, que levam aos efeitos biológicos finais deste hormônio.

FRUTOSE X HIPERTENSÃO

Ratos normotensos alimentados cronicamente com dieta rica em frutose além de apresentar alterações na sensibilidade à insulina, nos níveis de insulina e triacilglicerol sérico, apresentam elevação moderada na pressão arterial (HWANG *et al.*, 1987; HWANG *et al.*, 1989; REAVEN *et al.*, 1989). O mecanismo pelo qual a frutose promove esta elevação na pressão arterial não é muito bem definido. Há trabalhos indicando a frutose como o fator envolvido na indução da hipertensão neste modelo animal (HWANG *et al.*, 1987; HWANG *et al.*, 1989; REAVEN *et al.*, 1989), entretanto há pesquisadores que não observaram aumento da pressão arterial neste mesmo modelo animal (KOBAYASHI *et al.*, 1993; KOTCHEN *et al.*, 1997; MATSUI *et al.*, 1997). Esses resultados conflitantes podem ser atribuídos às diferenças na composição das dietas, que variam quanto a fonte de gordura e conteúdo de sódio, bem como no tempo de tratamento, idade e espécie de ratos (REED *et al.*, 1994).

A resistência à insulina associada a hiperinsulinemia é normalmente implicada no desenvolvimento da hipertensão neste modelo experimental. Estudo em humanos observou uma correlação entre concentrações elevadas de insulina plasmática e hipertensão (MUSCELLI, SAAD & GONTIJO, 1991). REAVEN *et al.* (1988; 1989) demonstraram que ratos alimentados com dieta rica em frutose submetidos ao exercício físico ou recebendo infusão de somatostatina apresentaram uma melhora na sensibilidade à insulina, com redução na concentração de insulina plasmática, e na pressão arterial. BHANOT *et al.* (1994) demonstraram que o uso de sulfato de vanadil (um potente inibidor de fosfatase) além de melhorar a sensibilidade à insulina, promoveu uma redução dos níveis plasmáticos de insulina e na pressão arterial de animais alimentados com dieta rica em frutose. Diferentes classes

de agentes antihipertensivos como inibidores da enzima conversora de angiotensina (delapril), antagonistas do receptor de angiotensina II (losartan) e bloqueador de canal de cálcio (mibefradil), além da redução na pressão arterial, promoveram melhora na sensibilidade à insulina e nos níveis plasmáticos de insulina em ratos alimentados com dieta rica em frutose (IIMURA *et al.*, 1995; NAVARRO-CID *et al.*, 1995; VERMA *et al.*, 1997).

Há evidências demonstrando que alterações no metabolismo de cátions divalentes, aumento na concentração de Ca^{2+} e diminuição na concentração de Mg^{2+} , poderiam contribuir para a resistência a ação vasodilatadora da insulina, resultando em aumento da resistência vascular periférica associada a resistência à insulina (SOWERS, 1997). BALON *et al.* (1994) observaram uma redução nos níveis plasmáticos de insulina e na pressão arterial de ratos alimentados com dieta rica em frutose suplementada com magnésio. Um estudo *in vitro* com artéria isolada mostrou uma redução significativa na resposta contrátil, em concentrações elevadas de glicose extracelular. É provável que haja uma interação entre o mecanismo de transporte de glicose e a mobilização de Ca^{2+} envolvido na mediação da vasoconstrição (NAVA *et al.*, 1997).

Além da associação entre resistência à insulina e hiperinsulinemia, outros fatores, tais como o sistema nervoso simpático, a ingestão de sal e o sistema renina-angiotensina, contribuem para a patogênese da hipertensão (SOWERS, 1997). Quanto aos efeitos do sistema nervoso simpático, estudo recente observou que a remoção da influência simpática, através simpatectomia química, impediu completamente o desenvolvimento tanto de hiperinsulinemia como de hipertensão em ratos alimentados com frutose (BHANOT *et al.*, 1996), sugerindo que existe uma relação entre hiperinsulinemia, resistência à insulina, estímulo simpático elevado, e os efeitos vasculares da insulina no estado de hipertensão. A ingestão de sódio dietético apresenta controvérsias quanto aos seus efeitos na elevação da pressão arterial. DENGEL *et al.* (1997) demonstraram que a ingestão de 10g/dia de sódio na dieta não alterou significativamente a pressão arterial, nem a tolerância à glicose oral ou a sensibilidade à insulina em idosos hipertensos e resistente à insulina. Em modelo animal de dieta rica em frutose, esse efeito varia

em função da espécie de rato (REED *et al.*, 1994). O sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA) está intimamente envolvido na manutenção da homeostase de sódio no organismo. A angiotensina II aumenta a resistência vascular e aumenta a reabsorção de sal nos rins por efeitos tubulares e pela estimulação da produção de aldosterona (GURTHRIE 1995). O papel deste sistema na patogênese da hipertensão induzida por uma dieta rica em frutose não está muito claro. HWANG *et al.* (1989) não detectaram alteração na atividade renina plasmática apesar de terem demonstrado uma redução nos níveis de aldosterona no plasma de ratos alimentados com dieta rica em frutose. É possível que neste modelo animal haja um complexo mecanismo envolvendo o sistema RAA, conteúdo ingerido de sódio e hiperatividade simpática na produção da hipertensão arterial.

A complexidade dos mecanismos e suas interdependência dificultam a determinação da relação causa-efeito, no conjunto de alterações metabólicas e fisiopatológicas que estão presentes no modelo experimental de hipertensão arterial induzida por uma dieta rica em frutose.

ARTIGO 1

submetido – Am. J. Clin. Nutr.

HIGH FRUCTOSE DIET INDUCES CHANGES IN EARLY STEPS OF INSULIN ACTION IN MUSCLE AND LIVER OF RATS.

Bezerra, R.M.N., Ueno, M., Silva, M, Tavares, D.Q., Carvalho, C.R., Saad, M.J.A.

Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, FEA e Departamento de Clínica Médica, FCM, UNICAMP, Campinas, SP., Brasil.

Please address correspondence to:

Mario J.A. Saad, MD

Departamento de Clínica Médica

FCM – UNICAMP

Campinas, SP., Brasil

13081-970

Fax: + 55192393114

ABSTRACT

High fructose-fed rats are known to induce insulin resistance, though the exact molecular mechanism involved is unknown. In the present study, we examined the levels and phosphorylation status of the insulin receptor and IRS-1, as well as the association of the IRS-1 with PI 3-kinase, and SHP2 in the liver and muscle in 28 days of high fructose-fed rats. Immunoprecipitation and immunoblotting were utilized for this purpose. No changes were observed in the insulin receptor and the IRS-1 protein levels in the liver and muscle of high fructose-fed rats. However, tyrosine-phosphorylation of the insulin receptor after insulin stimulation was reduced to $71 \pm 2\%$ ($P < 0.05$) in the liver samples of the fructose-fed group. In the samples previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and blotted with antiphosphotyrosine antibody, the insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation levels in the livers and muscles of fructose-fed rats decreased to $70 \pm 6\%$ ($P < 0.05$) and $76 \pm 5\%$ ($P < 0.05$) respectively. The insulin-stimulated IRS-1 association with PI 3-kinase decreased to $84 \pm 3\%$ ($P < 0.05$) in the liver and to $84 \pm 4\%$ ($P < 0.05$) in the muscle of the fructose-fed group. Insulin-stimulated IRS-1 associated to SHP2 was reduced to $79 \pm 5\%$ ($P < 0.05$) in liver of the fructose-fed rats. These data suggest that changes in the early steps of insulin signal transduction may have an important role in the insulin resistance observed in these rats.

Keywords: fructose, insulin resistance, insulin receptor, IRS-1, PI 3-kinase, SHP2

INTRODUCTION

Insulin plays a central role in the regulation of glucose homeostasis, and acts in a coordinated fashion on cellular events that include the regulation of ion and amino acid uptake, protein synthesis and degradation, gene transcription and mRNA turnover, and cellular growth and differentiation (1, 2). The insulin receptor β -subunit, which contains an intrinsic tyrosine kinase, undergoes tyrosyl autophosphorylation and is activated in response to insulin binding to the extracellular α -subunit (3). Subsequent steps in the insulin signal transduction are mediated via phosphorylation of specific intracellular proteins, including insulin receptor substrate-1 (IRS-1) (4). The tyrosine phosphorylated IRS-1, in peptide motifs with the sequence Tyr-Met-x-Met (YMXM) or Tyr-x-x-Met (YXXM), serves as a docking protein that interacts with the signaling proteins containing src-homology 2 (SH2) domain, including the 85 kDa subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), phosphotyrosine phosphatase (SHP₂) and other SH2 containing proteins (5).

Impairment of insulin action (insulin resistance) is involved in many diseases as NIDDM, obesity, hypertension, and cardiovascular diseases (6). The high fructose-fed rats were described to be animal models of insulin resistance associated with hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia (7, 8, 9, 10) and hypertension (11). Although, it has been shown that fructose diet alters the activity of several enzymes regulating hepatic carbohydrate metabolism, leading to hepatic insulin resistance (12, 13), the mechanisms by which fructose excess produces these effects are unknown. The role of the phosphorylation of insulin receptor and IRS-1, as well as its association with PI 3-kinase and SHP2 in vivo have not been examined in insulin resistance induced by high fructose diet. In the present study, we have investigated insulin-induced insulin receptor and IRS-1 tyrosine phosphorylation levels, and the association of the latter with PI 3-Kinase and SHP2 in the liver and muscle of fructose-fed rats.

MATERIALS AND METHODS

Materials: Reagents for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoreses (SDS-PAGE) and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, Calif., USA). Tris, phenylmethylsulfonylfluoride (PSMF), aprotinin, dithiothreitol (DTT), Triton X-100, Tween 20 and glycerol were from Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo., USA). Protein A-Sepharose 6 MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden), [¹²⁵I]protein A was from Amersham (Aylesbury, UK) and nitrocellulose paper (Hybond ECL, 0.45 µm) was from Schleicher & Schuell (Keene, N.H., USA). Human recombinant insulin (Humulin R) was from Biobrás (Belo Horizonte, MG, Brazil) and sodium thiopental was from Cristália (Itapira, SP, Brazil). Monoclonal antiphosphotyrosine antibody, polyclonal anti-insulin receptor, anti-IRS-1, and anti-SHP2 antibodies were from Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA), and polyclonal anti-PI 3-kinase antibody was from Upstate Biotechnology Incorporated (Lake Placid, N.Y., USA). The fructose was kindly provided by Vepê (S. José dos Campos, SP, Brazil)

General Protocol: Male Wistar rats (UNICAMP, Central Breeding Center, SP, Brazil) being approximately 5 weeks old and weighing approximately 120g, were kept on a 12-hour light/dark (7 a.m./7 p.m.) cycle. The rats were distributed in two groups and kept on isocaloric diets. The control group ate standard rat chow (pelleted Nuvilab CR-1, Nuvital, Curitiba, PR) containing (as percent of calories) 64 % vegetable starch, 9.5% unsaturated oils and 26.5% animal protein and the experimental group ate a diet containing (as percent of calories) 66% fructose, 22% casein and 12% unsaturated oil. The two groups of rats were given water and feed *ad libitum* for 28 days. The animal groups were weighed weekly in order to record their body weight gain.

Methods:

Tissue extracts. The rats were anaesthetized with sodium thiopental (80mg/kg body weight, i.p.) and worked on as soon as the losses of pedal and corneal

reflexes were assured. The abdominal cavity was opened, the portal vein exposed, and 60 μ g insulin was injected. In 30 s, the liver sample was removed, minced coarsely and homogenized immediately in 10 volumes of solubilization buffer (1% Triton-X 100, 100mmol/l Tris [pH 7.4], 100mmol/l sodium pyrophosphate, 100mmol/l sodium fluoride, 10mmol/l EDTA, 10mmol/l sodium vanadate, 2mmol/l PSMF and 0.1mg of aprotinin/ml) at 4°C, using a polytron PTA 20S generator (model PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, N.Y., USA) and operated at maximum speed for 20 s.

Approximately 90 s after the insulin injection, hindlimb muscle samples were excised and homogenized as described above. The tissue extracts were centrifuged at 12,000 rpm at 4°C for 20 min for the removal of insoluble material, and the supernatant was used as sample for immunoprecipitation with anti-insulin receptor or anti-IRS-1 antibody and Protein A-Sepharose 6 MB.

Protein analysis by immunoblotting

The immunoprecipitated proteins were treated with Laemmli buffer (14) containing 100mmol/l DTT, heated in a boiling water bath for 4 min, and subjected to SDS-PAGE (6% bis-acrylamide) in a Bio-Rad miniature lab gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad). The electrotransfer of proteins from the gel to the nitrocellulose was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean) as described by Towbin et al. (15), but with 0.02% SDS added to the transfer buffer to enhance the elution of high molecular mass proteins. The non-specific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter for 2h at 22°C in blocking buffer (5% nonfat dry milk, 10mmol/l Tris, 150mmol/l NaCl, and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blot was incubated for 4 h at 22°C with anti-phosphotyrosine antibody (anti-PY), anti-insulin receptor antibody (anti-IR), anti-IRS-1 antibody, anti-PI 3-kinase antibody or anti-SHP2 antibody diluted in blocking buffer (3% nonfat dry milk, 10mmol/l Tris, 150mmol/l NaCl, and 0.02% Tween 20); and washed for 30 min with blocking buffer without milk. The blots were then incubated with 2 μ Ci of [125 I]protein A (30 μ Ci/ μ g) in 10 ml of blocking buffer (1%

nonfat dry milk) for 1 h at 22°C and washed again as described above. [¹²⁵I]protein A bound to antibodies was detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film (Eastman Kodack, Rochester, N.Y., USA) with Cronex Lightning Plus intensifying screens (DuPont, Wilmington, D.E., USA) at -80°C for 12-48h. Band intensities were quantitated by optical densitometry of the developed autoradiographs.

Other assays.

Fructose and standard chow-fed rats in the post-absorptive state were anesthetized with sodium thiopental (80 mg/kg body weight, i.p.) after a 5-h fast, and the blood samples were collected by cardiac puncture. After centrifugation, the serum was stored frozen in aliquots for the determination of triacylglycerol by the enzymatic method (Labtest, Campinas, SP, Brazil), and insulin concentrations by double-antibody radioimmunoassay (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA).

The effect of fructose feeding on the insulin ability to stimulate glucose disposal was estimated by the intravenous insulin tolerance test (ITT). The animals after a 14h fast interval, were anesthetized with thiopental (8 mg/100g body weight) and tail blood samples were drawn before insulin injection (60 µg) at 0 (basal), 4, 8, 12, and 16 min after the injection. The blood samples before insulin infusion were utilized in the determination of basal glucose levels (enzymatic method, Labtest, Campinas, SP, Brazil). The constant rate for plasma glucose disappearance (Kitt) was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$. The plasma glucose $t_{1/2}$ was calculated by the slope of the least square analysis of the plasma glucose concentrations during the linear decay phase (16).

Statistical analysis.

Experiments were always performed by analyzing samples from the fructose-fed rats parallel to a control group. The Student's unpaired *t*-test was used for comparisons. The level of significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Animal characteristics

Rats given the fructose diet ate identical amounts of food (22g/rat per day) during the 4-week experimental period, and gained the same amount of weight as the animals on the standard diet. Despite these similarities in food consumption and weight gain, serum triacylglycerol concentration was significantly higher in the group eating fructose than in the control (104 ± 13 vs. 201 ± 32 mg/dl, $P < 0.05$). The basal serum glucose, cholesterol and insulin concentration did not change after 4 weeks in the experimental group. In order to demonstrate that the fructose-fed rats were insulin resistant, the animals from both groups were submitted to an insulin tolerance test. The glucose disappearance rate (Kitt) during this test was significantly lower in fructose-fed rats than in control rats (4.3 ± 0.3 vs. 2.9 ± 0.2 %/min), thus demonstrating a moderate state of insulin resistance (table 1).

Effects of high fructose-diet on the phosphorylation induced by insulin on insulin receptor and IRS-1, the IRS-1/PI 3-kinase association, and the IRS-1/SHP2 association in rat livers

There was no change in the insulin receptor and IRS-1 protein levels (fig 1) in the livers of control and fructose-fed rats, as determined by immunoblot with anti-IR and anti-IRS-1 antibodies. However, after stimulation with insulin, samples previously immunoprecipitated with anti-IR antibody and immunoblotted with anti-PY antibody had a clear decrease in insulin-stimulated IR autophosphorylation to 71 ± 2 % of the control values ($P < 0.05$) in fructose-fed animals (fig 1).

In samples from livers previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with anti-PY antibody (fig 1), the insulin-induced IRS-1 phosphorylation in the fructose-fed group was reduced to 70 ± 6 % ($P < 0.05$).

Previous studies (17, 18, 19, 20, 21) have suggest that there is such a relatively stable high affinity between IRS-1 and the 85 kDa subunit of PI 3-kinase, that both proteins are co-precipitated by antibodies to each protein. After stimulation with insulin, the intensity of the band with the expected molecular weight of the regulatory subunit of PI 3-kinase (85 kDa) was increased in anti-IRS-1 antibody immunoprecipitates of the liver samples from both groups of animals. This observation is consistent with a stable association of IRS-1 and PI 3-kinase. However, comparison of the bands stimulated by insulin revealed that the association between IRS-1/PI 3-kinase was slightly reduced to $84 \pm 3\%$ ($P < 0.05$) in fructose-fed rat livers (fig 1).

When the same blots, containing liver samples previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody were subsequently incubated with antibodies directed against SHP2 (fig 1), there was a faint band in the basal state of the animal control and the fructose-fed ones. After insulin stimulation, the intensity of this band increased consistently with a stable association of IRS-1 with SHP2 in both groups of animals. However, the comparison of insulin stimulated bands revealed that the amount of SHP2 associated with IRS-1 was reduced to $79 \pm 5\%$ ($P < 0.05$) in the livers of fructose-fed rats.

Effects of high fructose-diet on the phosphorylation induced by insulin on insulin receptor and IRS-1, the IRS-1/PI 3-kinase association, and the IRS-1/SHP2 association in rat skeletal muscles

As in the liver, fructose diet produced no change in the IR and IRS-1 protein level in rat skeletal muscles (fig 2). However, in contrast to what was observed in the liver, following stimulation with insulin, phosphorylation of the IR had no change in the fructose-fed rats as compared to the control group (fig 2). There was a decrease phosphorylation IRS-1 in fructose-fed rats to $76 \pm 5\%$ ($P < 0.05$) compared to the control group (fig 2). In order to examine the association of the 85 kDa subunit of PI 3-kinase with IRS-1, the same blot immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody was incubated with antibodies against the 85 kDa subunit of PI 3-kinase. As expected, in both groups, a band of

85 kDa was present in the IRS-1 immunoprecipitates after exposure to insulin. A comparison of the bands revealed significant decrease in the fructose group to $84 \pm 4\%$ ($P < 0.05$) compared to the control group (fig 2).

When the same blots from these experiments, were incubated with antibody directed against SHP2, there was SHP2 immunoreactivity in the basal state of both groups. After insulin stimulation, the intensity of the band (66kDa) increased in both groups of animals. However, comparison of the bands stimulated by insulin revealed that the amount of SHP2 associated with IRS-1 did not change in the muscles of high fructose-fed rats (fig 2).

DISCUSSION

Insulin plays a key role in regulating a wide range of cellular processes. However, until recently little was known about the signaling pathways that are involved in linking the insulin receptor with downstream responses (22). Over the past several years, significant progress has been made in the understanding of the insulin signal transduction pathway. It is generally accepted that insulin stimulation results in the activation of the insulin receptor tyrosine kinase, leading to the tyrosine phosphorylation of the IRS family of intracellular docking protein (5). The IRS proteins contain multiple potential tyrosine phosphorylation motifs. Nine of these tyrosine phosphorylation sites are in the repetitive sequence motif YMXM) or YXXM. When phosphorylated, these site as well as others appear to be involved in the interaction of IRS-1 with other signaling molecules, particularly proteins containing SH2 domains (4). These proteins include phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), tyrosine-specific phosphatase (SHP2), tyrosine kinase Fyn, and adapter proteins such as Grb2, Nck, and Crk (23).

The effect of high fructose diet on this early stage of insulin action has not yet been examined. The insulin resistance observed in an animal model on a high fructose diet is associated with glucose intolerance, increased serum triacylglycerol and insulin concentration and decreased insulin sensitivity (7, 9, 10, 11, 13, 24). Our results showed moderate insulin resistance state in the fructose-fed animals, demonstrated by a decreased glucose disappearance rate after insulin infusion, and an increase in plasma triacylglycerol concentration.

Despite the normal number of insulin receptors in the livers and muscles of fructose-fed rats, there was a 29% reduction in insulin receptor autophosphorylation in the liver after insulin stimulation *in vivo*. The reduction observed in our study may be of biological significance, because a decrease in receptor phosphorylation has been correlated with insulin resistance in different animal models (25, 26, 27). Meanwhile, our results were different of the observed from Deutsch (28), where no change in insulin receptor kinase activity was reported in fructose-fed animals. In that study the insulin receptors were purified

from liver samples and the kinase assay was performed *in vitro* using exogenous phosphoacceptor (28). This difference is probably due to the amount and way of the dietary administration, and also the conditions of the assays.

The results of the present study demonstrated that there is a significant decrease in the level of hepatic and muscle IRS-1 tyrosine phosphorylation, followed by a decrease in IRS-1/PI 3-kinase association in the liver and in the muscle. It is interesting that previous studies demonstrated that in fructose-fed rats a decreased insulin ability to suppress hepatic glucose production has been implicated as one of the elements of insulin resistance in this model (9, 11). The IRS-1/PI 3-kinase association induced by insulin is necessary and in some cases sufficient to elicit many of the insulin effects on glucose and lipid metabolisms. The lipid products of PI 3-kinase act as both membrane anchors and allosteric regulators, serving to localize and activate downstream enzymes and these protein substrates (29). The glucose 6-phosphatase is a key enzyme of glucose homeostasis inasmuch as it catalyzes the ultimate biochemical reaction of both glycogenolysis and gluconeogenesis. Insulin might regulate this enzyme across the competitive inhibition of the microsomal glucose-6-phosphatase by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, PIP₃, the main lipid product of PI 3-kinase (30). Previous study observed that high fructose-diet fed rats for 4 and 12 weeks demonstrated increase in liver glucose-6-phosphatase (12). The phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), is another regulatory enzyme for gluconeogenesis. Recent reports demonstrated that inhibitors of PI 3-kinase are able to block insulin effects on PEPCK gene transcription in liver cells (31) suggesting that the control of insulin over PEPCK is mediated by PI 3-kinase. There is a previous study demonstrating that the PEPCK activity is increased in high fructose-fed animal model (13). Putting these previous studies together with our results, we can speculate that the reduction of the IRS-1/PI 3-kinase association in high fructose-fed animals can reduce the effects of insulin on glucose-6-phosphatase activities and PEPCK expressions in these animal models. In addition, there is evidence demonstrating a correlation between PI 3-kinase activity and glycogen metabolism (32). One of the downstream effectors of PI3P lipid signaling is the serine-threonine protein kinase (PKB or Akt) (29). The

glycogen synthase 3-kinase (GS3K), is an enzyme that regulates the glycogen synthesis for the phosphorylated glycogen synthase inactivation. The PKB activation has been demonstrated to be both necessary and sufficient for insulin-induced GS3K inactivation (32). In this insulin resistance animal model it was previously reported reduction in the hepatic glycogen concentration (11, 33). Thus, it is reasonable to speculate that the reduction in IRS-1/PI 3-kinase association in the livers of fructose-fed rats may have a role in the insulin resistance of these animals.

The regulation of blood glucose concentration is one of the most important physiological functions of insulin. An important aspect of this process is the ability of insulin to stimulate translocation of GLUT4 transporters from an intracellular pool to the plasma membrane, thus increasing the rate of glucose uptake in the insulin-responsive tissues, muscle and adipose tissue (34). Although the molecular mechanism that regulates the intracellular trafficking of GLUT4-containing vesicles was not yet completely known, several effector molecules have recently been identified, such as the well documented targeting and /or activation of PI 3-kinase that is involved in GLUT4 translocation (29). In addition to the reduction glucose disappearance rate (Kitt), our results showed that the IRS-1/PI 3-kinase association in muscle samples was reduced in high fructose-fed rats. Therefore, we can speculate that there are probably alterations of PI 3-kinase-dependent pathways in glucose transport translocation in these animal models.

IRS-1 contains over 30 potential serine/threonine phosphorylation sites in motifs recognized by various kinases such as PKC, MAP kinases, and cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent protein kinases (4, 35, 36). Serine phosphorylation may play a role in the regulation of IRS-1 signaling. It is known that agents which raise intracellular cAMP levels increase phosphorylation of the insulin receptor and IRS-1 at serine and threonine residues, reduce insulin-mediated IR phosphorylation on tyrosine, and inhibit the insulin-dependent tyrosine protein kinase activity of the receptor (37). The enhanced synthesis of triacylglycerol observed in high fructose-diet models is associated with the increase of 1,2-sn-

diacylglycerol (DAG) and the increased expression of one isoenzyme of PKC in these rats (38). Thus, it is possible that some increase in the PKC activity may play a role in the alteration in the phosphorylation level of the IRS-1 observed in this study.

Similarly to the activation of the PI 3-kinase, the association of SHP2 with IRS-1 may activate this phosphatase (39). The SHP2 may modulate postreceptor signaling by dephosphorylating the phosphotyrosyl form of cellular proteins that are substrates for the insulin receptor (22). Recent data suggest that SHP2 plays a role in insulin-stimulated mitogenesis and also indicates that this phosphatase is necessary for the insulin-stimulated expression of GLUT1 (40). There is evidence that SHP2 can dephosphorylate IRS-1 (41, 42), although this has not been uniformly observed (43, 44). Our results showed that the association of IRS-1/SHP2 after insulin stimulation was also reduced in the livers of fructose-fed rats, suggesting that the alteration in this association does not account for the reduction in IRS-1 phosphorylation in these animals.

In summary, this study has shown that a reduction in the phosphorylation of IRS-1 in the livers and muscles of fructose-fed rats, led up to a decrease in the IRS-1/PI 3-kinase association. These changes may help to explain some aspects of insulin resistance in this animal model.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Vêpe Indústria & Comércio S.A (São José dos Campos-SP, Brazil) for kindly providing the fructose, and also Mr. L. Janeri and Ms. C. da Silva for their technical assistance. This work was supported by grants from FAPESP and CAPES.

Table 1: Body weight, insulin test tolerance, fasting plasma glucose, insulin, triacylglycerol and cholesterol at a 4-week dietary manipulation

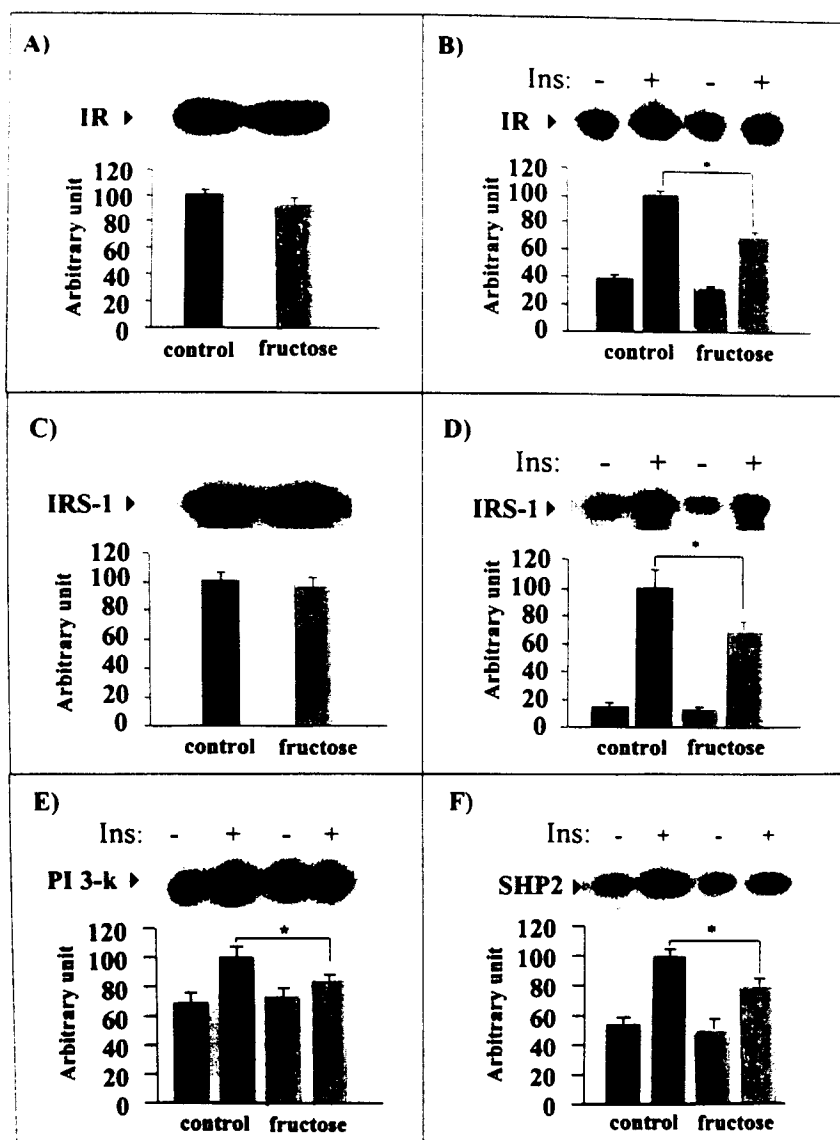
	<i>Weight</i> <i>g</i>	<i>Kitt</i> <i>%/min.</i>	<i>Glucose</i> <i>mg/dl</i>	<i>Insulin</i> <i>μUI/ml</i>	<i>Triacylglycerol</i> <i>mg/dl</i>	<i>Cholesterol</i> <i>mg/dl</i>
Control	288±7 (18)	4.3±0.3 (14)	84±5 (15)	40±4 (7)	104±13 (9)	62±4 (9)
Fructose	277±4 (16)	2.9±0.2* (13)	89±6 (15)	40±3 (7)	201±32 * (9)	72±4 (9)

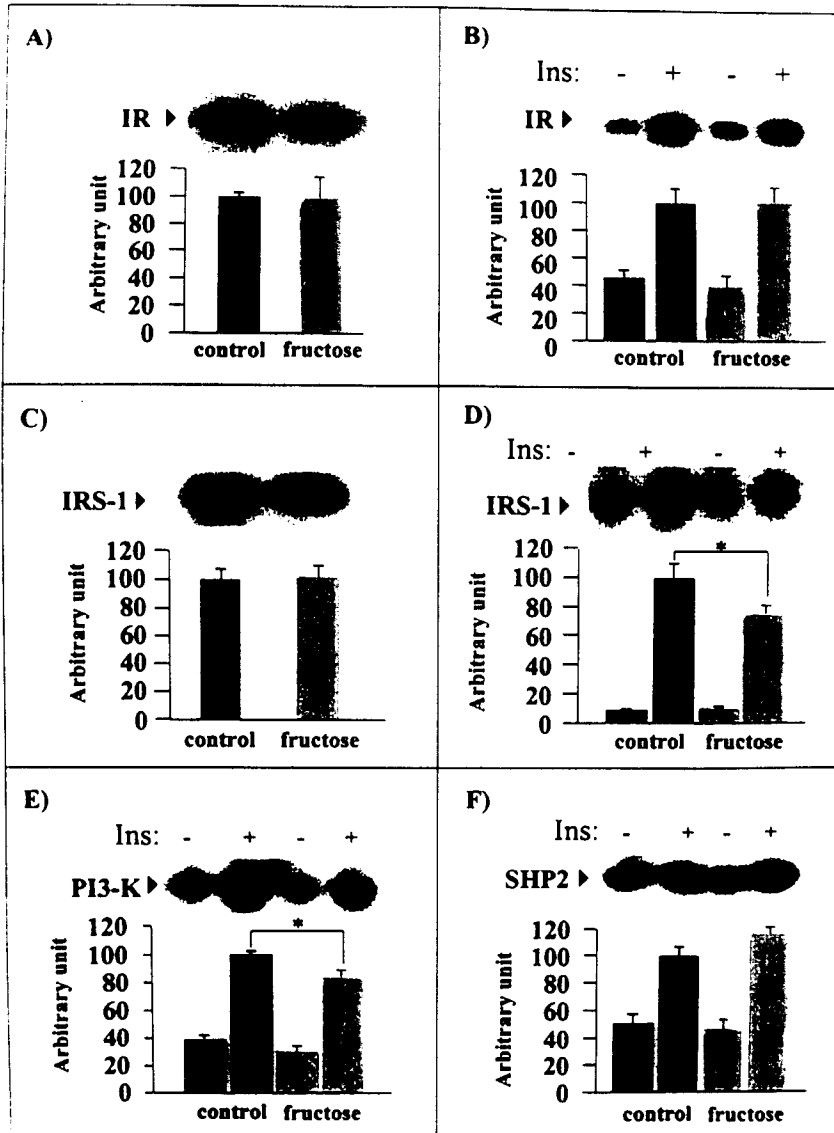
Measurements of total blood glucose were done after overnight fasting (8 a.m.), and insulin, triacylglycerol and cholesterol were measured after a 5 h fasting (8 a.m.-2 p.m.). The results are the mean ± SEM. The number of animals in each group is shown in parentheses. *Significantly different vs. control group, $P<0.05$.

FIGURE LEGENDS

Fig 1. Effects of high fructose-diet on insulin receptor (a) and IRS-1 (c) proteins, IR (b) and IRS-1 (d) phosphorylation levels, and IRS-1/PI3-kinase (e) and IRS-1/SHP2 (f) association in rat livers. The proteins were isolated, as described in Materials and Methods, with extraction buffer and kept on ice. After centrifugation, supernatant aliquots were immunoprecipitated with anti-IR and anti-IRS-1 antibodies, and immunoblotted with anti-IR (a), anti-IRS-1 (c), with antiphosphotyrosine (b, d), with anti-PI 3-kinase (e), and anti-SHP2 (f) antibodies. Scanning densitometry was performed on autoradiograms to determine insulin receptor and IRS-1 concentrations, for tyrosine phosphorylation of proteins, and the association of PI 3-kinase with IRS-1 and the association of SHP2 with IRS-1. The values are expressed as the mean $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$.

Fig 2. Effects of high fructose-diet on insulin receptor (a) and IRS-1 (c) proteins, IR (b) and IRS-1 (d) phosphorylation levels, and IRS-1/PI3-kinase (e) and IRS-1/SHP2 (f) association in rat muscles. The proteins were isolated, as described in Materials and Methods, with extraction buffer and kept on ice. After centrifugation, supernatant aliquots were immunoprecipitated with anti-IR and anti-IRS-1 antibodies, and immunoblotted with anti-IR (a), anti-IRS-1 (c), with antiphosphotyrosine (b, d), with anti-PI 3-kinase (e), and anti-SHP2 (f) antibodies. Scanning densitometry was performed on autoradiograms to determine insulin receptor and IRS-1 concentrations, for tyrosine phosphorylation of proteins, and the association of PI 3-kinase with IRS-1 and the association of SHP2 with IRS-1. The values are expressed as the mean $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$.





REFERENCES

1. Kahn C R. Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med* 1985;36:429-451.
2. Rosen O M. After insulin binds. *Science* 1987;237:1452-237.
3. Kasuga M, Karlsson F A, Kahn C R. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000 dalton subunit of its own receptor. *Science* 1982;215:185-187.
4. Sun X J, Rothenberg P A, Kahn C R. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991;352:73-77.
5. White, M. F. The insulin signaling system and the IRS proteins. *Diabetologia*, 1997;40:S2-S17.
6. O'Doherty R, Stein D, Foley J Insulin resistance. *Diabetologia* 1997;40: B10-B15.
7. Zavaroni I., Sander S, Scott S, Reaven G M. Effect of fructose feeding on insulin secretion and insulin action in the rat. *Metabolism*,1980;10:970-973.
8. Sleder J, Chen Y-D I, Cully M D, Reaven G M. Hyperinsulinemia in fructose-induce hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism* 1980;29(4):303-305.
9. Tobey T A, Mondon C E, Zavaroni I, Reaven G M. Mechanism of insulin resistance in fructose-fed rats. *Metabolism* 1982;31(6):608-612.
- 10.Zavaroni I., Chen Y-D I, Reaven G M. Studies of the mechanism of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism* 1982;31(11):1077-1083.
- 11.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* 1989;49:1155-1163.
- 12.Tuovinen C G R, Bender A E. Some metabolic effects of prolonged of starch, sucrose, fructose and carbohydrate-free diet in the rat. *Nutr Metabol* 1975;19:161-172.
- 13.Blakely SR, Hallfrisch J, Reiser S, Prather E. Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. *J Nutr* 1981;111:307-314.
- 14.Laemmlli U. K..Cleavage of structural proteins during the assembly of the head if bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.

15. Towbin H, Staehlin J, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4354.
16. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori 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* 1989;68(2):374-378.
17. Backer JM, Myers Jr MG, Schoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Schlessinger J, White MF. The phosphatidylinositol 3-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J* 1992;11:3469-3479.
18. Lavan BE, Kuhne MR, Garner CW, Anderson D, Rudijk M, Pawson T, Liehard GE, The association of insulin-elicited phosphotyrosine proteins with src homology domains. *J Biol Chem* 1992;267:11631-11636.
19. Folli F, Saad MJA, Backer JM, Kahn CR. Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin resistance and insulin-deficient diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993;92:1787-1794.
20. Kelly KL, Ruderman NB. Insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase. Association with a 185-kDa tyrosine-phosphorylated protein (IRS-1) and localization in a low density membrane vesicle. *J Biol Chem* 1993;268:4391-4398.
21. Araki E, Lipes MA, Patti MA, Bruning JC, Haag B, Jonhson RS, Kahn CR. Alternative pathway of insulin signaling in mice with target disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994;372:186-190.
22. White M F, Kahn C. R. The insulin signaling system. *J Biol Chem* 1994;261:1-4.
23. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 1995;16:117-138.
24. Iimura O, Shimamoto K, Matsuda K, Masuda A Takizawa H, Higashiura K, Miyazaki Y, Hirata A, Ura N, Nakagawa M. Effects of angiotensin receptor antagonist and angiotensin converting enzyme inhibitor on insulin sensitivity in fructose-fed hypertensive rats and essential hypertensives. *Am J Hypertens* 1995;8:353-357.

25. Carvalho CRO, Brenelli S L, Silva AC, Nunes ALB, Velloso LA, Saad MJA. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* 1996;137:151-159.
26. 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* 1993;92:2065-2072.
27. Saad M J A, Maeda L, Brenelli S L, Paiva L A, Velloso L A. Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. *Diabetologia* 1997;40:179-186.
28. Deutsch DD, Jen, K-LC, Grunberger G. Regulation of hepatic insulin receptor tyrosine kinase in rat models of mild insulin resistance. *J Lab Clin Med* 1993;122:421-425.
29. Shepherd P R, Withers D J, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 1998;333:471-490.
30. Mithieux G, Daniele N, Payrastre B, Zitoun C. Liver microsomal glucose-6-phosphatase is competitively inhibited by the lipid products of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1998;273(1):17-19.
31. Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK. Phosphatidylinositol 3-kinase, but not p70/p85 ribosomal S6 protein kinase, is required for the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by insulin. *J Biol Chem*. 1995;270:15501-15506.
32. Van Weeren P C, Bruyn K M T, Vries-Smits A M M, Vanlint J, Burgering B M TH. Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. *J Biol Chem* 1998;273 (21):13150-13156.
33. Rawana S, Clarck K, Zhong S, Buison A, Chackunkal S, Jen K-L C. Low dose fructose ingestion during gestation and lactation affects carbohydrate metabolism in rat dams and their offspring. *J Nutr* 1993;123:2158-2165.
34. Gould G, Holman G D. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J* 1993;295:329-341.
35. Mothe I, Obberghen EV. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612,632,662, and 731, modulates insulin action. *J Biol Chem* 1996;271:1222-11227.

36. Fea DeK, Roth RA. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272:31400-31406.
37. Stadtmauer L, Rosen OM. Increasing the cAMP content of IM-9 cells alters the phosphorylation state and kinase activity of the insulin receptor. *J Biol Chem* 1986;261:3402-3407.
38. Donnelly R, Reed M, Azhar S, Reaven GM. 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* 1994;135:2369-2374.
39. Ugi S, Maegawa H, Kashiwagi A, Adachi M, Olesky J M, Kikkawa R. Expression of dominant negative mutant SHPTP2 attenuates phosphatidylinositol 3-kinase activity via modulation of phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem* 1996;271:12595-12602.
40. Hausdorff SF, Bennett AM, Neel BG, Birnbaum MJ. Different signaling roles of SHPTP2 in insulin-induced GLUT1 expression and GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 1995;270:12965-12968.
41. Kuhné MR, Zhao Z, Rowles J, Lavan BE, Shen SH, Fisher EH, Lienhard GE. Dephosphorylation of insulin receptor substrate 1 by the tyrosine phosphatase PTP2C. *J Biol Chem*. 1994;269:15833-15837.
42. Yamauchi K, Ribon V, Saltiel A R, Jeffrey E P. Identification of the major SHPTP2-binding protein that is tyrosine-phosphorylated in response to insulin. *J Biol Chem* 1995;270:17716-17722.
43. Milarski KL, Saltiel AR. Expression of catalytically inactive Syp phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin. *J Biol Chem* 1994;269:21239-21243.
44. Noguchi T, Matozaki T, Fujioka Y, Yamao T, Tsuda M, Takada T, Kasuga M. Characterization of a 115-kDa protein that binds to SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with src homology 2 domains, in Chinese Hamster Ovary Cells. *J Biol Chem* 1996;271:27652-27658.

ARTIGO 2

submetido - Hypertension

HIGH-FRUCTOSE DIET INDUCES INSULIN RESISTANCE BUT NOT HYPERTENSION IN RATS

Rosângela M.N. Bezerra*, Mirian Ueno*, Maria S. Silva*, Debora Q. Tavares*,
Carla R.O. Carvalho**, Mario J.A. Saad**, José A.R. Gontijo**

*Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, FEA-UNICAMP and

**Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil
1308-970

Please address correspondence to:

José AR. Gontijo, MD

Departamento de Clínica Médica

FCM – UNICAMP

Campinas, SP, Brasil

13081-970

FAX: + 55-19-788-8861

e-mail: gontijo@venus.nmce-fcm.unicamp.br

Rosângela M.N. Bezerra *et al*: High-fructose diet not induces hypertension

ABSTRACT

Rats fed a high fructose diet represent an animal model for insulin resistance and hypertension. However, these diets have variable amounts of fat and sodium. We have recently demonstrated that a high fructose diet containing vegetable oil but normal amounts of sodium induced mild insulin resistance with decreased insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation in the liver and muscle of normal rats, but no hypertension. In this study, we examined the insulin sensitivity, mean blood pressure and IRS-1 tyrosyl phosphorylation in the liver of rats fed a high fructose diet containing sodium. The addition of sodium to control and high fructose diets had no effect on the insulin sensitivity measured by the 15-min insulin tolerance test. Similarly, there was no change in insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation or in the plasma insulin levels. In contrast, the presence of sodium increased blood pressure in the control and high-fructose diets from 117 ± 3 mmHg and 118 ± 3 mmHg to 141 ± 4 mmHg and 132 ± 4 mmHg ($p < 0.05$), respectively. These results demonstrate that fructose alone does not induce hyperinsulinemia or hypertension in rats fed a normal sodium diet, whereas a combination of saturated fat and elevated sodium in the diet may contribute to the insulinemia and elevated blood pressure in this animal model.

Key words: high-fructose diet, insulin resistance, blood pressure, hypertriglyceridemia, insulin receptor, insulin receptor substrate-1

INTRODUCTION

There is considerable evidence suggesting that changes in glucose and insulin metabolism may play a role in the etiopathogenesis of high arterial blood pressure (1,2,3,4). Insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia and high blood pressure can be induced in fructose-fed rats (5,6,7,8,9). However, the precise mechanism by which hypertension develops in these animals has not been defined (2,3,10). We recently showed that a high-fructose diet alters the early steps of insulin action (Bezerra et al, unpublished data, 1999), and may therefore have a role in the insulin resistance observed in these animals.

High-fructose diets are heterogeneous in composition since include a certain amount of animal lard and since variable amounts of sodium are present in experimental and control diets (5,11,12,13). In the present study, we examined the influence of a sodium-containing, high-fructose diet on insulin sensitivity, mean arterial pressure and the *in vivo* tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) in the liver of Wistar rats.

MATERIALS AND METHODS

General protocol

Male Wistar-Hannover rats 5 weeks old (110-130 g) bred in the animal facilities of the State University of Campinas were randomly distributed into four diet groups (control, control plus sodium, high-fructose and high-fructose plus sodium) for the next 28 days. The general guidelines established by the Declaration of Helsinki (1964) for laboratory animals were followed throughout the study. The control diet (C) was standard rodent chow (Nuvilab-Nuvital/Curitiba-Pr) containing vegetable starch (527 g/kg diet), fat as vegetable oils (35 g/kg diet), animal protein (220 g/kg diet), sodium (3 g/kg diet), and potassium (10 g/kg diet). The control diet with added sodium (C-Na) was the same as the standard rodent chow except that it contained more sodium (10 g/kg diet) and potassium (10 g/kg diet). The high-fructose diet (F) contained fructose (624 g/kg diet), fat as vegetable oil (50 g/kg diet), protein (223 g/kg diet), sodium (1.0 g/kg diet), and potassium (3.6 g/kg diet). The high-fructose plus sodium diet (F-Na) contained higher levels of sodium (4.9 g/kg diet) and potassium (4.9 g/kg diet) than usual. The mineral and vitamin mix used in the experimental diets met the criteria specified in AIN93 (14). The rats had free access to food and tap water, were maintained under standard conditions (20-22°C and a 12 h light/dark cycle) and were weighed weekly.

Fifteen-minute insulin tolerance test

After 28 days of treatment, the food was withheld overnight and the rats underwent an insulin tolerance test (60 µg insulin, i.v.) following anesthesia with thiopental (80 mg/kg body weight, i.p.). The rats were used as soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes. The abdominal wall was incised to expose the portal vein and 60 µg of insulin was administered as a bolus injection. Samples for plasma glucose determination were collected at 0 (basal), 4, 8, 12 and 16 min after insulin injection. The rate constant for plasma glucose disappearance (Kitt) was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$. The

plasma glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least square analysis of the plasma glucose concentrations during the linear decay phase.

Biochemical measurements

At the post-absorptive states, the rats were anaesthetized with thiopental (80 mg/kg body weight, i.p.) and blood samples were drawn by cardiac puncture. After centrifugation, the sera were aliquoted and frozen until assayed for the triacylglycerol and cholesterol concentrations by an enzymatic method using a commercial kit (Labtest, Campinas, SP, Brazil), and for insulin concentrations by a double-antibody radioimmunoassay (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA., USA). Samples collected in the basal state prior to the insulin tolerance test were used to determine the plasma glucose concentration by an enzymatic method (Labtest, Campinas, SP, Brazil).

Blood pressure measurement

Twenty-six days after starting the standard and special diets, a tail-cuff system (MKIV, Narco Bio Systems, Austin, Tex.) was used to measure the blood pressure in conscious rats trained to rest quietly in warmed restrainers.

Immunoblotting

Rats were anesthetized with sodium thiopental (80 mg/kg body weight, i.p.) and the abdominal cavity then opened to expose the portal vein for the administration of insulin (60 μ g) injected. Thirty seconds after the injection of insulin, a liver sample was removed, minced coarsely and homogenized immediately in 10 volumes of solubilization buffer (1% Triton-X 100, 100 mmol/l Tris pH 7.4, 100 mmol/l sodium pyrophosphate, 100 mmol/l sodium fluoride, 10 mmol/l EDTA, 10 mmol/l sodium vanadate, 2 mmol/l PSMF and 0.1 mg of aprotinin/ml) at 4°C using a polytron PTA 20S generator (model PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, N.Y., USA) operated at maximum

speed for 20 s. The tissue extracts were centrifuged at 50,000 *g* at 4°C for 20 min to remove insoluble material and the supernatant was used for immunoprecipitation with anti-IRS-1 antibody and protein A-Sepharose 6 MB. The immunoprecipitated proteins were denatured by boiling in Laemmli (15) buffer containing 100 mmol/L DTT, run on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes in Towbin buffer containing 0.02 % SDS and 20% methanol. The membranes were blocked, probed with anti-IRS-1 and antiphosphotyrosine, and developed as described previously (16). The blots were exposed to preflashed Kodak XAR film with Cronex lightning plus intensifying screens at -80°C for 12-48 h.

Statistical analysis

The results are expressed as means $\pm$ SEM. Statistical analysis of the data was performed using one way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures followed by the Newman-Keuls test. A *p* value < 0.05 was considered to indicate significance.

RESULTS

Despite the similarity in weight body gain, the serum triacylglycerol and total cholesterol levels were different among the groups. The triacylglycerol levels were higher in both groups treated with a high-fructose (F) diet when compared to the control (C) diet (C: 1.2 ± 0.1 mmol/L vs F: 2.3 ± 0.4 mmol/L and C-Na: 1.2 ± 0.2 mmol/L vs F-Na: 2.6 ± 0.4 mmol/L, $P < 0.05$). The addition of sodium to the high-fructose diet significantly increased the plasma cholesterol levels from 1.9 ± 0.1 mmol/L to 2.2 ± 0.1 mmol/L compared to the normosodium high-fructose diet (table 1).

To evaluate the effect of a high-fructose diet on insulin sensitivity, rats from the four groups underwent a 15-min insulin tolerance test. The glucose disappearance rate (Kitt) was significantly lower in fructose-fed and fructose-plus sodium-fed rats compared to control rats (C: 4.3 ± 0.3 vs. F: $2.9 \pm 0.2\%$ /min, $P < 0.05$, and C: 4.3 ± 0.3 vs F-Na: $3.0 \pm 0.2\%$ /min, $P < 0.05$) (table 1).

The blood pressures of the four groups of rats are shown in table 1. An increase in blood pressure occurred only in the high sodium diet groups (C: 117 ± 3 mmHg vs C-Na: 141 ± 4 mmHg, $P < 0.05$, and F: 118 ± 3 mmHg vs F-Na: 132 ± 4 mmHg, $P < 0.05$). There was no significant difference between the blood pressure levels of the high-fructose and control groups, indicating that the ingestion of fructose alone was not sufficient to cause an increase in arterial blood pressure in this model.

There was no change in IRS-1 protein levels in the livers of the control, high-fructose, and high-fructose plus sodium groups, as determined by immunoblotting with anti-IRS-1 antibodies (fig 1a). However immunoprecipitating liver samples with anti-IRS-1 antibody followed by immunoblotting with anti-PY antibody revealed a decrease in insulin-induced IRS-1 phosphorylation in the high-fructose and high-fructose plus sodium groups (fig 1b).

DISCUSSION

Hypertriglyceridemia, hyperinsulinemia and hypertension are common features of animal models of insulin resistance induced by a high-fructose diet (5,6,7,9,11,12,13,17,18). As shown above, fructose-induced hypertension in rats was related to the concentration of sodium used in the high-fructose diet, whereas hypertriglyceridemia was present regardless of the blood pressure level (5,8,9,11,12,13). Hypertriglyceridemia may be secondary to increases in the VLDL-TG secretion rate since elevations in the plasma triacylglycerol levels have been correlated with rises in this rate (17). Previous studies have shown that the VLDL-TG secretion rate in the liver of rats fed a high sucrose-lard or high fructose-lard diet was higher than the controls (12,17). Insulin resistance may contribute to hypertriglyceridemia by reducing the inhibitory effect of insulin on VLDL-TG secretion (19,20). Recent studies have shown that the insulin resistance induced by a high-fructose diet was overcome completely by treatment with the hypolipidemic agents benfluorex and bezafibrate which restored normal triacylglycerol concentrations (21,22).

Although the effects of a high-fructose diet on plasma triacylglycerol levels are often substantial, the response of plasma cholesterol to a fructose-containing diet is not clear. An increase in VLDL synthesis, which contains 10-20% cholesterol and transports triacylglycerol produced in the liver, may account for the increase in plasma cholesterol levels after the consumption of a fructose-containing diet (23). Reiser (24) reported that in two out of 14 animal studies there was an increase in the plasma cholesterol levels after feeding fructose diets. In the present study, the high-fructose fed group had similar plasma cholesterol levels to the control group. However, when the sodium content was elevated in high-fructose diet, the plasma cholesterol concentration rose significantly. Although several reports suggests that fructose intestinal transport occurs by a carrier-mediated mechanism and is Na⁺-independent (25), others studies indicate that in the small intestine fructose accumulates against a concentration gradient by an energy and Na⁺-dependent process (26,27). The increased sodium content of the

high-fructose diet may increase fructose absorption in the small intestine, thus supplying more fructose to the liver.

Although there was no change in the serum insulin level, the high-fructose fed rats showed a reduced glucose disappearance rate in the 15-min insulin tolerance test, confirming the lower insulin sensitivity of these rats. The insulin resistance in this animal model probably results from the impairment of insulin-stimulated glucose uptake in insulin-responsive tissues as well as changes in hepatic glucose metabolism. Using the hyperinsulinemic euglycemic clamp, fructose-fed rats were shown to have an impaired ability to suppress hepatic glucose production and to eliminate peripheral glucose (28). An increase in the gluconeogenic enzymes glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase has been reported for the liver fructose-fed rats (29,30). Furthermore, a high-fructose diet was reported to reduce hepatic glycogen synthesis (28). Insulin may regulate the activities of these enzymes through proteins activated downstream to the insulin receptor (31,32,33). We recently showed that fructose-induced insulin resistance was associated with a slight decrease IRS-1 phosphorylation and IRS-1/PI 3-K association in the liver and muscle of intact rats (Bezerra et al, unpublished data, 1999). In the present study, the high-fructose plus sodium diet had no effect on the proteins involved in the initial steps of the insulin signal transduction pathway compared to the high-fructose diet. These observations support the hypothesis that fructose produces changes in steps beyond the receptor and may be involved in the insulin resistance observed in this animal model.

Hyperinsulinemia is characteristic of this animal model (11,17,30). However, although the high-fructose diet in the present study induced insulin resistance, there were no changes in the serum insulin concentrations. This observation has important implications for our understanding of the association between insulin resistance and hypertension, and suggests the following hypothetical model to link the two phenomena. The balance between pressor and depressor forces sets the vascular tone. Since insulin acts as a vasodepressor, its inability in insulin-resistant models to decrease blood pressure and vascular resistance

would effectively tip the balance in favor of pressor forces (34). Thus, in this situation, insulin resistance rather than hyperinsulinemia acts as a risk factor for the development of hypertension. However, it is important to emphasize that the fat source normally used in this animal model is lard and we used a fat source similar to control diet. It is possible that the effects of lard and fructose are synergistic, in altering the insulin levels of rats fed with a high-fructose diet.

The precise mechanism by which hypertension develops in fructose-fed rats have not yet been elucidated, although an increase in sympathetic activity could be involved (5). Furthermore, circulating catecholamines are elevated in sucrose-fed rats on a high salt diet, and it has been proposed that these mediators may contribute to hypertension through their vasoconstrictor and/or antinatriuretic properties (35). However, catecholamines are probably not the only vasoconstrictor factors involved in the development of hypertension in fructose-fed rats. The role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of fructose-induced hypertension is not well known. Previous studies have shown a normal plasma renin activity in this experimental model (13). On the other hand, the AT₁ receptor antagonist losartan and an angiotensin converting enzyme inhibitor attenuated the magnitude of the blood pressure elevation and improved insulin sensitivity in fructose-fed rats (36,37). Although several reports indicate fructose as a factor involved in hypertension (5,6,13), several investigators have failed to observe an increased blood pressure in fructose-fed rats (22,38,39). These apparently conflicting data have been attributed to differences in the composition of the diets, and to variable blood pressure responses to fructose among different ages and strains of normotensive rats (39). We observed no significant difference in blood pressure between the high-fructose and control groups. In addition, increasing the sodium content of the control and high-fructose diets significantly increased the blood pressure in both groups. Using high fructose and high fructose-lard diets, Matsui (22) observed that the systolic blood pressure was significantly higher in the high fructose-lard group than in the high fructose and control groups. These observations suggest that differences in the sodium and fat content of the diet can play a role in raising of blood pressure in this animal model.

In conclusion, our results confirm previous observations that hypertriglyceridemia develop when rats consume a high-fructose diet. However, a high- fructose diet alone does not induce hyperinsulinemia and hypertension when the sodium levels are normal. Thus, the presence of saturated fat and above normal sodium levels in the diet can affect the insulin concentrations and blood pressure levels in this animal model.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Vêpe Indústria & Comércio S.A. (São José dos Campos, SP, Brazil) for kindly providing the fructose and Mr. L. Janeri and Ms. C. da Silva for technical assistance. This work was supported by grants from FAPESP, CNPq (PRONEX) and CAPES.

Table 1: Body weight, blood pressure, and serum glucose, insulin, triacylglycerol and cholesterol levels in rats fed with control, control plus sodium, fructose or fructose plus sodium diets for four weeks.

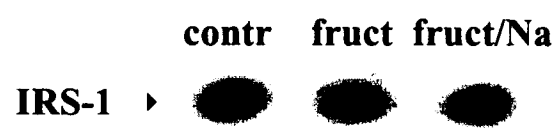
	Control	Control-NA	Fructose	Fructose-Na
<i>Body weight (g)</i>	288 ± 7 (18)	292 ± 5 (16)	277 ± 4 (16)	278 ± 5 (17)
<i>Tail blood pressure (mmHg)</i>	117 ± 3 (12)	141 ± 4 * (12)	118 ± 3 (12)	132 ± 4 * (12)
<i>Kitt (%/min.)</i>	4.3 ± 0.3 (14)	3.5 ± 0.3 (8)	2.9 ± 0.3 * (13)	3.0 ± 0.2 * (14)
<i>Basal glucose (mmol/L)</i>	4.7 ± 0.3 (15)	5.2 ± 0.2 (8)	4.9 ± 0.3 (15)	4.7 ± 0.9 (16)
<i>Insulin (pmol/L)</i>	266 ± 26 (7)	253 ± 10 (6)	266 ± 18 (7)	266 ± 16 (7)
<i>Cholesterol (mmol/L)</i>	1.6 ± 0.1 (9)	1.7 ± 0.1 (8)	1.9 ± 0.1 (9)	2.2 ± 0.1 * (7)
<i>Triacylglycerol (mmol/L)</i>	1.2 ± 0.1 (8)	1.2 ± 0.2 (8)	2.3 ± 0.4 * (8)	2.6 ± 0.4 * (8)

Basal glucose levels were determined after overnight fast (at 8 a.m.). Insulin, triacylglycerol and cholesterol levels were measured in the post-absorptive state (2 p.m.). The results are expressed as the means ± SEM of the number of rats indicated in parentheses.

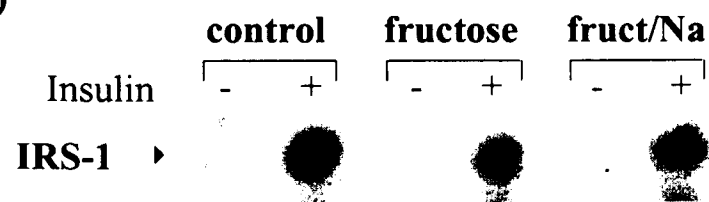
FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effects of high-fructose and high-fructose plus sodium diets on the IRS-1 protein level (**a**) and IRS-1 tyrosine phosphorylation (**b**) in rat liver. The liver proteins were extracted as described in Materials and Methods. After centrifugation, aliquots of the supernatant containing equal amounts of protein were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibodies and immunoblotted with anti-IRS-1 and antiphosphotyrosine antibodies.

a)



b)



REFERENCES

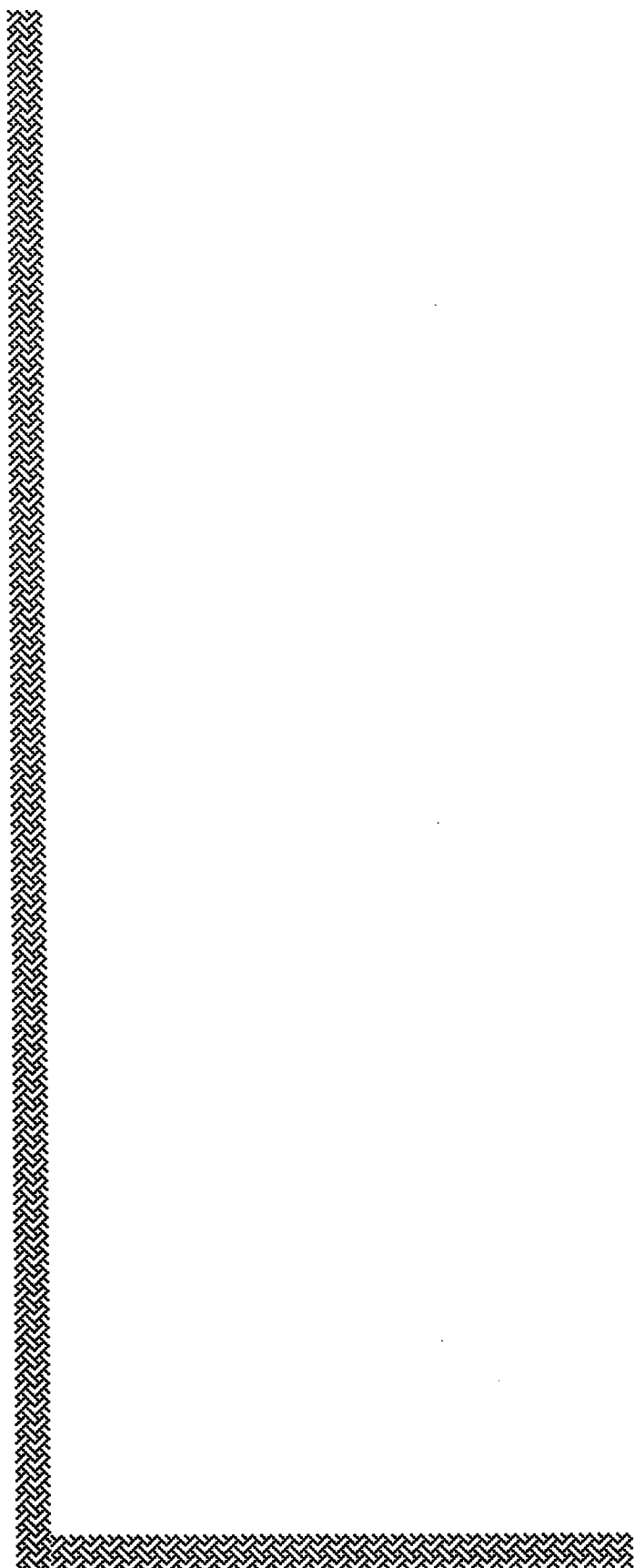
1. Reaven GM. Role of abnormalities of carbohydrate and lipoprotein metabolism in the pathogenesis and clinical course of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;15(suppl.5):S4-S7.
2. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care.* 1991;14:173-194.
3. Reaven GM. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia in the etiology and clinical course of hypertension. *Am. J. Med.* 1991a;90(suppl. 2A):7S-12S.
4. Reaven GM. Relationship between insulin resistance and hypertension. *Diabetes Care.* 1991b;14(suppl. 4):33-38.
5. Hwang I-S, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension.* 1987;10:512-516.
6. Reaven GM, Ho H, Hoffmann BB. Somatostatin inhibition of fructose-induced hypertension. *Hypertension.* 1989;14:117-120.
7. Martinez FJ, Rizza RA, Romero JC. High-fructose feeding elicits insulin resistance, hyperinsulinemia, and hypertension in normal mongrel dogs. *Hypertension.* 1994;23: 456-463.
8. Dai S, McNeil JH. Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Meth.* 1995;33:101-107.
9. Huang Y-J, Fang VS, 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.* 1997;46:1252-1258.
10. Morris AD, Petrie JR, Connell JMC. Insulin and hypertension. *J Hypertens.* 1994;12:633-642.
11. Sleder J, Chen Y-DI, Cully MD, Reaven GM. Hyperinsulinemia in fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism.* 1980;29:303-305.
12. Zavaroni I, Chen Y-DI, Reaven GM. Studies of the mechanism of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism.* 1982;31:1077-1083.
13. Hwang I-S, Huang W-C, Wu J-N, Shian LR, Reaven GM. Effect of fructose-induced hypertension on the renin- angiotensin-aldosterone system and

- atrial natriuretic factor. *Am. J. Hypertens.* 1989;2:424-427.
14. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J. Nutr.* 1993;123:1939-1951.
 15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.
 16. Carvalho ROC, Brenelli SL, Silva AC, Nunes ALB, Velloso LA, Saad MJA. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology.* 1996;137:151-159.
 17. Reaven GM, Risser TR, Chen I, Reaven EP. Characterization of the model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, nonobese rats. *J Lipid Res.* 1979;20:371-378.
 18. Tobey TA, Mondon CE, Zavaroni I, Reaven GM. Mechanism of insulin resistance in fructose-fed rats. *Hypertension.* 1982;31:608-612.
 19. Frayn K. Insulin resistance and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 1993;4:197-204.
 20. Bjorntorp P. Fatty acids, hyperinsulinemia and insulin resistance: which comes first? *Curr Opin Lipidol.* 1994;5:166-174.
 21. Storlien LH, Oakes DN, Pan DA, Kusunoki M, Jenkins AB. Syndromes of insulin resistance in the rat: inducement by diet and amelioration with benfluorex. *Diabetes.* 1993;42:457-462.
 22. 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 triacylglycerol. *Diabetes.* 1997;46:348-353.
 23. Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose. *FASEB J.* 1990;4:2652-2660.
 24. Reiser S. Lipogenesis and blood lipids, in Reiser S, Hallfrisch J (eds): Metabolic effects of dietary fructose. CRC Press, Boca Raton, 1987, pp 83-111.
 25. Sigrist-Nelson K, Hopfer U. A distinct D-fructose transport system in isolated brush border membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1974;367:247-254.
 26. Macrae AR, Neudörffer TS. Support for the existence of an active transport mechanism of fructose in the rat. *Biochim Biophys Acta.* 1972;288:137-144.
 27. Gracey M, Burke V, Oshin A. Active intestinal transport of D-fructose.

Biochim Biophys Acta. 1974;266:397-406.

28. Thorburn AW, Storlien LH, Jenkins AB, Khouri S, Kraegen EW. Fructose-induced *in vivo* insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am J Clin Nutr*. 1989;49:1155-1163.
29. Tuovinen CGR, Bender AE.. Some metabolic effects of prolonged feeding of starch, sucrose, fructose and carbohydrate-free diet in the rat. *Nut Metabol*. 1975;19:161-172.
30. Blakely SR, Hallfrisch J, Reiser S, Prather ES. Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. *J Nutr*. 1981;111:307-314.
31. Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK. Phosphatidylinositol 3-kinase, but not p70/p85 ribosomal S6 protein kinase, is required for the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by insulin. *J Biol Chem*. 1995;270:15501-15506.
32. Mithieux G, Daniele N, Payraastre B, Zitoun C. Liver microsomal glucose-6-phosphatase is competitively inhibited by the lipid products of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 1998;273:17-19.
33. Van Weeren PC, Bruyn KMT, Vries-Smits AMM, Vanlint J, Burgering BMTH. Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. *J Biol Chem*. 1998;273:13150-13156.
34. Sowers JR. Insulin and insulin-like growth factor in normal and pathological cardiovascular physiology. *Hypertension*. 1997;29:691-699.
35. Johnson MD, Zhang HY, Kotchen TA. Sucrose does not raise blood pressure in rats maintained on a low salt intake. *Hypertension*. 1993;21:779-785.
36. Navarro-Cid J, Maeso R, Perez-Vizcaino F, Cachofeiro V, Ruilope LM, Tamargo J, Lahera V. Effects of losartan on blood pressure, metabolic alterations, and vascular reactivity in the fructose-induced hypertensive rat. *Hypertension*. 1995;26:1074-1078.
37. Iimura O, Shimamoto K, Matsuda K, Masuda A, Takizawa H, Higashiura K, Miyazaki Y, Hirata A, Ura N, Nakagawa M. Effects of angiotensin receptor antagonist and angiotensin converting enzyme inhibitor on insulin sensitivity in fructose-fed hypertensive rats and essential hypertensives. *Am J Hypertens*. 1995;8:353-357.

38. 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*. 1993;21:1051-1055.
39. Kotchen TA, Reddy S, Zhang HY. Increasing insulin sensitivity lowers blood pressure in the fructose-fed rat. *Am J Hypertens*. 1997;10:1020-1026.



CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho demonstraram que:

- * Os animais alimentados com dieta rica em frutose apresentaram um quadro de resistência à insulina moderada, com alterações nos níveis séricos de triacilglicerol.
- * A dieta rica em frutose contendo quantidades normais de sódio não leva a hipertensão arterial. A adição de sódio promoveu um aumento significativo na medida da pressão arterial indireta.
- * A dieta rica em frutose leva a uma redução no grau de fosforilação do receptor de insulina, do IRS-1 e da interação IRS-1/PI 3-quinase e IRS-1/SHP2 em tecido hepático.
- * No músculo destes animais observou-se uma diminuição no grau de fosforilação do IRS-1 e da associação IRS-1/PI 3-quinase
- * A adição de sódio não alterou a fosforilação do IRS-1, no tecido hepático, dos animais alimentados com dieta rica em frutose.
- * Os dados sugerem que essas alterações nas etapas iniciais da transmissão do sinal insulínico promovidas pela dieta rica em frutose podem explicar alguns aspectos da resistência à insulina observada neste modelo animal.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

- ARAKI, E.; LIPES, M.A.; PATTI, M.E.; BRUNING, J.C.; HAAG, B.; JOHNSON, R. S. & KAHN, C.R. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, 372: 186-190, 1994.
- BACKER, J.M.; MYERS, M.G. Jr; SHOELSON, S.E.; CHIN, D.J.; SUN, X.J.; MIRALPEIX, M.; HU, P.; MARGOLIS, B.; SKOINIK, 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.
- BALON, T.W.; JASMAN, A.; SCOTT, S.; MEEHAN, W.P.; RUDE, R.K. & NADLER, J.L. Dietary magnesium prevents fructose-induced insulin insensitivity in rats. **Hypertension**, 23: 11036-1039, 1994
- BANTLE, J.P. Clinical aspects of sucrose and fructose metabolism. **Diabetes Care**, 12: 56-61, 1989.
- 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.
- BEITNER-JOHNSON, D.; BLAKESLEY, V.A.; SHEN-ORR, Z.; JIMENEZ, M. STANNARD, B.; WANG, L.M.; PIERCE, J. & LeROITH, D. The proto-oncogene product c-Crk associates with insulin receptor substrate-1 and 4PS. **J. Biol. Chem.**, 271: 287-290, 1996.
- BHANOT, S.; McNEILL, J.H. & BRYER-ASH, M. Vanadyl sulfate prevents fructose-induced hyperinsulinemia and hypertension in rats. **Hypertension**, 23: 308-312, 1994.
- BHANOT, S.; VERMA, S.; YAO, L.F.; CHUA, D. & McNEILL, J.H. Sympathectomy prevents fructose induced hyperinsulinemia and hypertension in rats. **J. Mol. Cell Cardiol.** 28: M57-A153, 1996.
- BLAKELY, S. R.; HALLFRISCH, J.; REISER, S. & PRATHER, E. Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. **J. Nutr.**, 111: 307-314, 1981.
- 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: 374-378, 1989.
- BOSSETTI, B.M.; KOCHER, L.M.; MORANS, 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.
- 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 30kinase in liver and muscle of rats. **Endocrinology**, 137: 151-159, 1996.
- CHEATHAM, B. & KAHN, C.R. Insulin action and the insulin signaling network. **Endocr. Rev.**, 16: 117-138, 1995.
- CHEATHAM, B.; VIOHOS, C.J.; CHEATHAM, L.; WANG, L.; BLENIS, J. & KAHN, C.R. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis and glucose transporter translocation. **Mol. Cell Biol.**, 14: 4902-1911, 1994.
- CHIN, J. E.; DICKENS, M.; TAVARE, J.M. & ROTH, R.A. Overexpression of protein kinase C isoenzyme α , β I, γ , and ϵ in cells overexpressing the insulin receptor. Effects on receptor phosphorylation and signalling. **J. Biol. Chem.**, 268: 6338-6347, 1993.
- CHOU, C.K.; DULL, T.J.; RUSSEL, D.S.; GHERZI, R.; LEBWOHL, D.; ULLRICH, A. & ROSEN, O.M. Human insulin receptor mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. **J. Biol. Chem.**, 262: 1842-1847, 1987.
- CLARKE, J.F.; YOUNG, O.W.; YONEZAWA, K.; KASUGA, M. & HOLMAN, G.D. Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the PI 3-kinase inhibitor, wortmannin. **Biochem. J.**, 300: 631-635, 1994.
- CONG, L.-N.; CHEN, H.; LI, Y.; ZHOU, L.; MCGIBBON, M.A.; TAYLOR, S.I. & QUON, M.J. Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. **Molecular Endocrinology**, 11: 1881-1890, 1997.
- 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.

- DEFRONZO, R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. **Diabetes Reviews**, 5: 177-269, 1997.
- DENGEL, D.R.; MAYUGA, R.S.; KAIRIS, G.M.; GOLDBERG, A.P.; & WEIR, M.R. Effect of dietary sodium on insulin sensitivity in older, obese, sedentary hypertensives. **Am. J. Hypertens.**, 10: 964-970, 1997.
- 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.
- ECK, M.J.; PLUSKEY, S.; TRUB, T.; HARRISON, S.C. & SHOELSON, S.E. Spatial constraints on the recognition of phosphoproteins by the tandem SH2 domains of the phosphatase SH-PTP2. **Nature**, 379: 277-280, 1996.
- ELLIS, L.; CLAUSER, E.; MORGAN, D.O.; EDERY, M.; ROTH, R.A. & RUTTER, W. J. Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. **Cell**, 45: 721-732, 1986.
- FRAYN, K.N. & KINGMAN, S.M.. Dietary sugars and lipid metabolism in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, 62(suppl): 250S-263S, 1995.
- GURTHRIE, G.P. Angiotensin receptors: physiology and pharmacology. **Clin. Cardiol.**, 18: III29-III34, 1995.
- 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 response in normal and hyperinsulinemic men. **J. Nutr.**, 113: 1819-1826, 1983.
- HALLFRISCH, J.; REISER, S. & PRATHER, E.S. Blood lipid distribution of hyperinsulinemic men consuming three levels of fructose. **Am. J. Clin. Nutr.**, 37: 740-748, 1983.
- HARA, K.; YONEZAWA, K.; SAKAUE, H.; SAKAUE, H.; ANDO, A; KOTANI, 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. Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not Ras activation in CHO cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 7415-7419, 1994.
- HENRY, R.R.; CRAPO, P.A. & THORBURN, A.W. Current issues in fructose metabolism. **Annu. Rev. Nutr.**, 11: 21-39, 1991.
- HERRERA, R. & ROSEN, O.M. Autophosphorylation of the insulin receptor in vitro: Designation of phosphorylation sites and correlation with receptor kinase activation. **J. Biol. Chem.**, 261: 11980-11985, 1986.
- HUBBARD, S.R.; WEI, L.; ELLIS, L. & HENDRICKSON, W.A. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. **Nature**, 372: 746-754, 1994.
- HWANG, I.-S.; HO, H.; HOFFMAN, B.B. & REAVEN, G.M.. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**, 10: 512-516, 1987.
- HWANG, I.-S.; WU, J.-N. H.; 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.
- IIMURA, O.; SHIMAMOTO, K.; MATSUDA, K.; MASUDA, A.; TAKIZAWA, H.; HIGASHIURA, K.; MIYAZAKI, Y.; HIRATA, A.; URA, N. & NAKAGAWA, M. Effects of angiotensin receptor antagonist and angiotensin converting enzyme inhibitor on insulin sensitivity in fructose-fed hypertensive rats and essential hypertensives. **Am. J. Hypertens.**, 8: 353-357, 1995.
- JENKINS, D.J.A.; WOLEVER T.M.S. & TAYLOR R.H.; et al. Glicemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. **Am. J. Clin. Nutr.**, 34: 362-366, 1981.
- 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. A.m. Soc. Nephrol.**, 3: S69-S77,, 1992.
- KANAI, F.; TODAKA, M.; HAYASHI, H.; KAMORHARA, S.; ISHII, K.; OKADA, T.; HAZEKI, O.; UI, M. & EBINA, Y. Insulin-stimulated GLUT4 translocation is

- relevant to the phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI 3-kinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 195: 762-768, 1993.
- KAPELIER, R.; CHEM, K. S.; YOAKUM, M.; SCAFFHAUSEN, B.S.; BACKER, J.M.; WHITE, M.F.; CANTLEY, L.C. & RUDERMAN, N.B. Mutations in the juxtamembrane region of the insulin receptor impair activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. **Mol. Endocrinol.**, 5: 769-777, 1991.
- KASUGA, M.; HEDO, J.A.; YAMADA, K.M. & KAHN, C.R. Structure of insulin receptor and its subunits. **J. Biol. Chem.**, 257: 10392-10399, 1982.
- KASUGA, M.; ZICK, Y.; BLITHE, D.L.; CRETAAZ, M. & KAHN, C.R. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. **Nature**, 298: 667-669, 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.
- 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.
- KOH, E.T.; ARD, N.F. & MENDONZA, F. Effects of fructose feeding on blood parameters and blood pressure in impaired glucose-tolerant subjects. **J. Am. Diet. Assoc.**, 88: 932-938, 1988.
- KOVACINA, K.S. & ROTH, R.A. Identification of Shc as a substrate of insulin receptor kinase distinct from the GAP-associated 62 kDa tyrosine phosphoprotein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 192: 1303-1311, 1993.
- KOTCHEN, T.A.; REDDY, S. & ZHANG, H.Y. Increasing insulin sensitivity lowers blood pressure in fructose-fed rat. **Am. J. Hypertens.**, 10: 1020-1026, 1997.
- KROOK, A.; MOLLER, D.E.; DIB, K. & O'RAHILLY, S. Two naturally occurring mutant insulin receptors phosphorylate insulin receptor substrate-1 (IRS-1) but fail to mediate the biological effects of insulin. **J. Biol. Chem.**, 271: 7134-7140, 1996.

- KUHNÉ, M.R.; PAWSON, T.; LIENHARD, G.E. & FENG, G.-S. The insulin receptor substrate associates with the Sh2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. **J. Biol. Chem.**, 268: 11479-11481, 1993.
- KUPRIYANOVA, T.A. & KANDROR, K.V. Akt-2 binds to Glut-4-containing vesicles and phosphorylates their component proteins in response to insulin. **J. Biol. Chem.**, 274: 1458-1464, 1999.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.
- LAM, K.; CARPENTER, C.L.; RUDERMAN, N.B.; FRIEL, J.H.C. & KELLY, K.L. The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1 stimulation by insulin and inhibition by wortmannin. **J. Biol. Chem.**, 269: 20648-20652, 1994.
- LAVAN, B.E.; LANE, W.S. & LIENHARD, G.E. The 60kDa phosphotyrosine protein in insulin treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. **J. Biol. Chem.**, 272: 11439-11443, 1997.
- LEE, C.-H.; LI, W.; NISHIMURA, R.; ZOU, M.; BATZER, A.; MYERS JR, M.G.; WHITE, M.F.; SHELESSINGER, J. & SKOLNIK, E.Y. Nck associates with the SH2 domain docking proteins IRS-1 in insulin stimulated cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90: 11713-11717, 1993.
- LEWIS, R.E.; WU, G.P.; MAC DONALD, R.G. & CZECH, M.P. Insulin-sensitivity phosphorylation of serine 1293/1294 on the human insulin receptor by a tightly associated serine kinase. **J. Biol. Chem.**, 265: 947-954, 1990.
- 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.
- MacDONALD, I. & BRAITHWAITE, D.M. Influence of dietary carbohydrates on the lipid pattern in serum and in adipose tissue. **Clin. Sci.**, 27: 23-30, 1964.
- 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.
- 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. Eletrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unit stoichiometries. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 77: 7137-7141, 1980.
- 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.
- McCLAIN, D.A.; MAEGAWA, H.; LEE, J.; DULL, T. J.; ULLRICH, A. & OLEFSKY, J.M.A mutant insulin receptor with defective tyrosine kinase displays no biological activity and does not undergo endocytosis. **J. Biol. Chem.**, 262: 14663-14671, 1987.
- MOLLER, D.E.; BJØRBAEK, C. & VIDAL-PUIG, A. Candidate genes for insulin resistance. **Diabetes Care**, 19: 396-400, 1996.
- MUSCELLI, E.O.A., SAAD, M.J.A. & GONTIJO, J.A.R. Insulinemia and blood pressure responses to oral glucose load in primary hypertensive patients. **Cardiology**, 79: 14-19, 1991.
- NAVA, P.; COLLADOS, M.T.; MASSÓ, F. & GUARNER, V. Endothelin mediation of insulin and glucose-induced changes in vascular contractility. **Hypertension**, 30: 825-829, 1997.
- NAVARRO-CID, J.; MAESO, R.; PEREZ-VIZCAINO, F.; CACHOFEIRO, V.; RUILOPE, L.M.; TAMARGO, J. & LAHERA, V. Effects of losartan on blood pressure, metabolic alterations, and vascular reactivity in the fructose-induced hypertensive rat. **Hypertension**, 26: 1074-1078, 1995.
- 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.
- O'DOHERTY, R.; STEIN, D. & FOLEY, J. Insulin resistance. **Diabetologia**, 40: B10-B15, 1997.
- OKADA, T.; KAWANO, T.; SAKAKIBARA, T.; HAZEKI, O. & UI, M. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and anti-lipolysis in rat adipocytes - studies with a selective inhibitor wortmannin. **J. Biol. Chem.**, 269: 3568-3573, 1994.

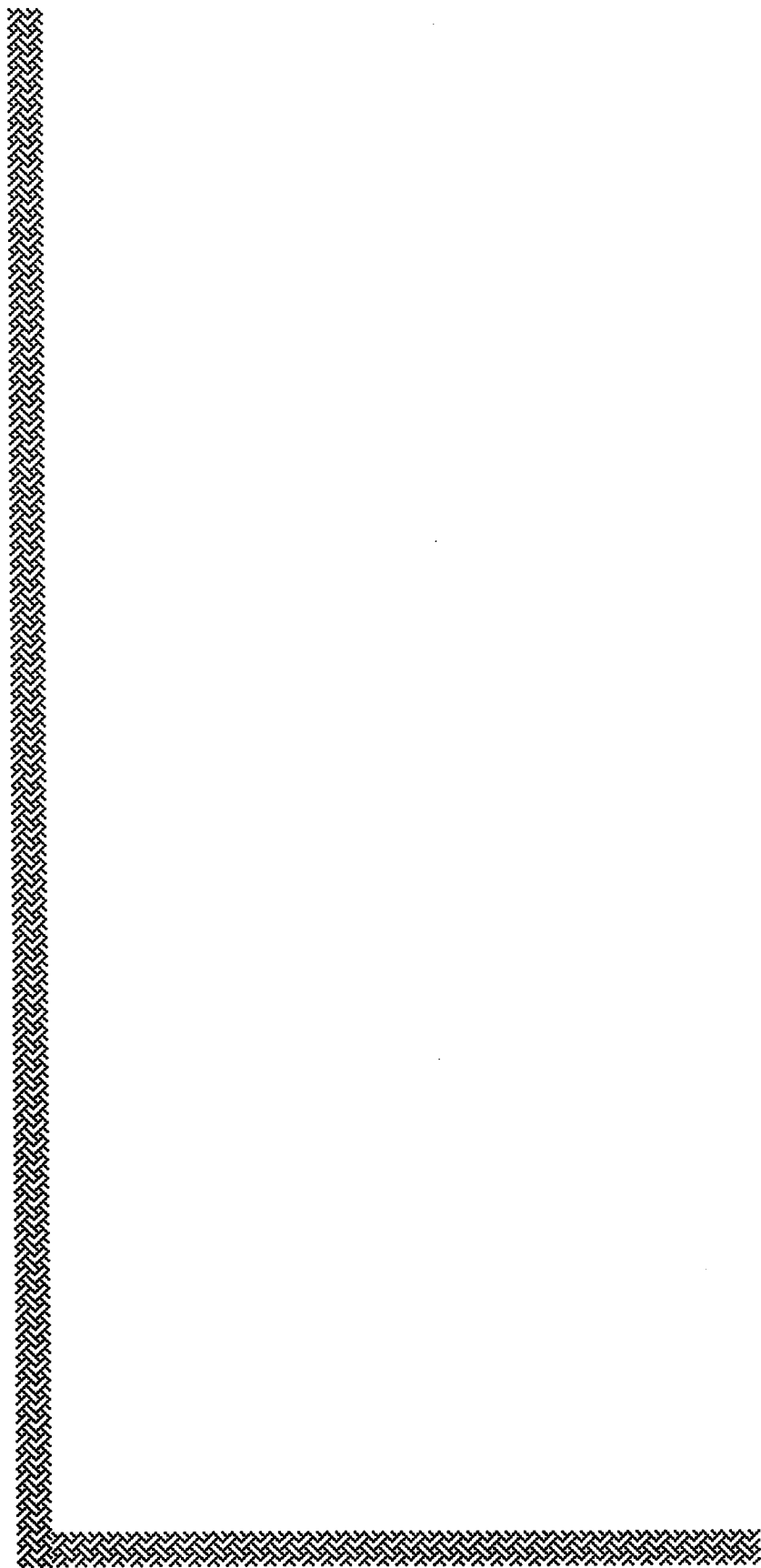
- PAZ, K.; VOLIOVITCH, H.; HADARI, Y.R.; ROBERTS, C.T.; LeROITH, D. & ZICK, Y. Interaction between the insulin receptor and its downstream effectors. **J. Biol. Chem.**, 271: 6998-7003, 1996.
- PERLMAN, R.; BOTTARO, D.; WHITE, M.F. & KAHN, C.R. Conformational changes in the α and β subunits of the insulin receptor identified by anti-peptide antibodies. **J. Biol. Chem.**, 264: 8964-8950, 1989.
- REAVEN, G.M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, 37: 1595-1607, 1988.
- REAVEN, G.M.; HO, H. & HOFFMAN, B.B. Attenuation of fructose-induced hypertension in rats by exercise training. **Hypertension**, 12: 129-132, 1988a.
- REAVEN, G.M.; HO, H. & HOFFMAN, B.B. Somatostatin inhibition of fructose-induced hypertension. **Hypertension**, 14: 117-120, 1989.
- REED, M.J.; HO, H.; DONNELLY, R. & REAVEN, G.M. Salt-sensitive and carbohydrate-sensitive rodent hypertension: evidence of strain differences. **Blood Press.**, 3: 197-201, 1994.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H. & FAHEY, 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.
- ROTHENBERG, P.L.; LANE, W.S.; KARSIK, 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.
- RUDERMAN, N.; KAPPELLER, R.; WHITE, M.F. & CANTLEY, L.C. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87: 1411-1415, 1990.
- SAAD, M.J.A. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, 27: 941-957, 1994.
- SAAD, M.J.A.; ARAKI, E.; MIRALPEIX, M.; ROTHENBERG, P.L.; WHITE, M.F. & KAHN, C.R. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, 90: 1839-1849, 1992.

- SAAD, M.J.A.; 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. Modulation of early steps in insulin action in the liver and muscle of epinephrine treated rats. **Endocrine**, 3: 755-759, 1995.
- 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, 1995a.
- SAAD, M. J. A.; MAEDA, L.; BRENELLI, S. L.; PAIVA, L. A. & VELLOSO, L. A. Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. **Diabetologia**, 40: 179-186, 1997.
- SHEPHERD, P.R.; WITHERS, D.J. & SIDDLE, K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. **Biochem. J.**, 333: 471-490, 1998.
- SKOLNIK, E.Y., BATZER, A.; LI, N.; LEE, C.H.; LOWENSTEIN, E.; MOHAMMDI, M.; MARGOLIS, B. & SCHLESSINGER, J. The function of GRB2 in linking the insulin receptor to rats signalling pathways. **Science**, 260: 1953-1955, 1993.
- SKOLNIK, E. Y.; LEE, C.H.; BATZER, A.; VINCENTINI, L.M.; ZHOU. M.; DALY, R.J.; MYERS, Jr M.G.; BACKER, J.M.; ULLRICH, A.; WHITE, M.F. & SCHLESSINGER, J. The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS-1 and Shc: implications for insulin control of rats signalling. **EMBO. J.**, 12: 1929-1936, 1993a.

- SLEDER, J.; CHEN, Y.-D. I.; CULLY, M.D.; REAVEN, G.M.. Hyperinsulinemia in fructose-induce hypertriglyceridemia in the rat. **Metabolism**, 29(4): 303-305, 1980.
- SOWERS, J.R. Insulin and insulin-like growth factor in normal and pathological cardiovascular physiology. **Hypertension**, 29: 691-699, 1997.
- STADTMAUER, L. & ROSEN, O. M. Increasing the cAMP content of IM-9 cells alters the phosphorylation state and protein kinase activity of the insulin receptor. **J. Biol. Chem.**, 261: 3402-3407, 1986.
- STUMPO, D.J. & BLACKSHEAR, P.J. Cellular expression of mutant insulin receptors interferes with the rapid transcriptional response to both insulin and insulin-like growth factor I. **J. Biol. Chem.**, 266: 455-460, 1991.
- SUN, X.J.; ROTHENBERG, P.A.; KAHN, C.R.; BACKER, J.M.; ARAKI, E.; WILDEN, P.A.; CAHILL, D.A.; GOLDSTEIN, B.J. & WHITE, M.F. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, 352: 73-77, 1991.
- SUN, X.J.; CRIMMINS, D.L.; MYERS, M.G.; MIRALPEIX, M. & WHITE, M.F. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. **Mol. Cell. Biol.**, 13: 7418-7428, 1993.
- SUN, X.J.; WANG, L.M.; ZHANG, Y.; PATTI, M.A.; BRUNING, J.C.; HAAG, B.; JOHNSON, R.S. & KAHN, C.R. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. **Nature**, 337: 173-177, 1995.
- 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: 3440-3447, 1988.
- 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.**, 1997.
- 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.; TAMEMOTO, H.; YAMAUCHI, T.; AIZAWA, S.; YAZAKI, Y. & KADOWAKI, T. Identification of a 190 kDa protein as a novel substrate for

- the insulin receptor kinase functionally similar to insulin receptor substrate-1. **J. Biol. Chem.**, 270: 56698-56701, 1995.
- TOBEY, T.A.; MONDON, C.E.; ZAVARONI, I. & REAVEN, G.M. Mechanism of insulin resistance in fructose-fed rats. **Metabolism**, 31(6): 608-612, 1982.
- TOWBIN, H.; STAEBLIN, J. & GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 76: 4350-4354, 1979.
- TUOVINEN, C.G.R. & BENDER, A.E. Some metabolic effects of prolonged of starch, sucrose, fructose and carbohydrate-free diet in the rat. **Nutr. Metabol.**, 19: 161-172, 1975.
- UGI, S.; MAEGAWA, H.; KASHIWAGI, A.; ADACHI, M.; OLESFKY, J.M. & KIKKAWA, R. Expression of dominant negative mutant SHPTP2 attenuates phosphatidylinositol 3-kinase activity via modulation of phosphorylation of insulin receptor substrate-1. **J. Biol. Chem.**, 271: 12595-12602, 1996.
- ULLRICH, A.; BELL, J.R.; CHEN, E.Y.; HERRERA, R.; PETRUZZELLI, L.M.; DULL, T.J.; GRAY, A.; COUSSENS, L.; LIAO, Y.-C.; TSUBOKAWA, M.; MASON, A.; SEEBURG, P.H.; GRUNFELD, C.; ROSEN, O.M. & RAMACHANDRAN, J. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. **Nature**, 313: 756-761, 1985.
- UUSITUPA, M.I.J. Fructose in the diabetic diet. **Am. J. Clin. Nutr.**, 59(suppl): 753S- 757S, 1994.
- VERMA, S.; BHANOT, S.; HICKE, A. & McNEILL, J.H. Chronic T-type Ca²⁺ channel blockade with in hyperinsulinemic, insulin-resistance and hypertensive rats. **Cardiovasc. Res.**, 34: 121-128, 1997.
- WANG, L.-M.; KEEGAN, A.D.; LI, W.; LIENHARD, G.E.; PACINI, S.; GUTKIND, J. S.; MYERS, M.G.; SUN, X.J. & WHITE, M.F. Common elements in IL4 and insulin signaling pathways in factor dependent hematopoietic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90: 4032-4036, 1993.
- WHITE, M.F. The insulin signalling system and the IRS proteins. **Diabetologia**, 40: S2-S17, 1997.
- WHITE, M. F. & KAHN, C. R. The insulin signaling system. **J. Biol. Chem.**, 261: 1-4, 1994.

- WHITE, M.F.; LIVINGSTON, J.N.; BACKER, J.M.; LAURIS, V.; DULL, T.J.; ULLRICH, A. & KAHN, C.R. Mutation of insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. **Cell**, 54: 641-649, 1988.
- 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.
- WILDEN, P. A.; BACKER, J. M.; KAHN, C. R.; CAHILL, D. A.; SCHROEDER, G. J.; WHITE, M. F. Characterization of the insulin receptor with an in vivo mutation at tyrosine 1146: evidence for separate insulin receptor signals regulating cellular metabolism and growth. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 87: 3358-3362, 1990.
- WILDEN, P.A.; KAHN, C.R.; SIDDLE, K. & WHITE, M.F. Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. **J. Biol. Chem.**, 267: 16660-16668, 1992.
- WILDEN, P.A.; SIDDLE, K.; HARING, E.; BACKER, J.M.; WHITE, M.F. & KAHN, C. R. The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. **J. Biol. Chem.**, 267: 13719-13727, 1992a.
- YENUSH, L. & WHITE, M.F. The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. **BioEssays**, 19: 491-500, 1997.
- 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**, 10: 970-973, 1980.



ANEXO

MATERIAL E MÉTODOS

Protocolo Experimental

Ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade albina) da linhagem *Wistar-hannover*, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, Campinas-SP., com aproximadamente 5 semanas de idade e peso em média 120g, foram mantidos em gaiolas individuais com ração e água *ad libitum*, e em condições de fotoperíodo (12 horas de luz/escuro).

Os animais foram divididos em dois grupos: 1) grupo controle, recebendo ração para ratos Nuvilab CR-1 (Nuvital, Curitiba, PR) composta em porcentagem de calorias: 64% de amido vegetal, 9,5% de óleos insaturados, 26,5% de proteína animal, e 3g/Kg de dieta de sódio e 10g/Kg de dieta de potássio; 2) grupo frutose, recebendo uma dieta purificada contendo (em porcentagem de calorias) 66% de frutose, 22% de proteína (caseína), 12% de óleo insaturado (óleo de soja), e quantidades adequadas de mistura mineral (1,0g de sódio e 3,6g de potássio por Kg de dieta) e vitamínica segundo a AIN93 (REEVES *et al.*, 1993); 3) grupo controle enriquecido em sódio, recebendo ração para ratos Nuvilab CR-1 (Nuvital, Curitiba, PR) composta em porcentagem de calorias: 64% de amido vegetal, 9,5% de óleos insaturados, 26,5% de proteína animal, e 10g/Kg de dieta de sódio e 10g/Kg de dieta de potássio; 4) grupo frutose enriquecido em sódio, recebendo uma dieta purificada contendo (em porcentagem de calorias) 66% de frutose, 22% de proteína (caseína), 12% de óleo insaturado (óleo de soja), e quantidades adequadas de mistura mineral (modificadas nos teores de sódio e potássio - 4,9g de sódio e 4,9g de potássio por Kg de dieta) e vitamínica segundo a AIN93 (REEVES *et al.*, 1993). Os animais permaneceram nestas dietas por um período experimental de 28 dias, sendo pesados semanalmente, para o registro de ganho de peso. Os animais dos quatro grupos foram submetidos aos testes bioquímicos e medida da pressão arterial indireta. Os animais dos grupos controle e frutose foram utilizados para o estudo das vias iniciais da sinalização da insulina.

Materials

Os reagentes e aparelhos para eletroforese de gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE) e eletrotransfêrencia foram da Bio-Rad (Richmond, Calif., USA). Tri(hidroximetil)-aminometano (Tris-base), fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PSMF), aprotinina, ditioneitol (DTT), Triton X-100, Tween 20 e glicerol foram da Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo., USA). Proteína A-Sepharose 6 MB foi da Pharmacia (Uppsala, Sweden), [¹²⁵I]proteína A foi da Amersham (Aylesbury, UK) e membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, 0.45 µm) foi da Schleicher & Schuell (Keene, N.H., USA). Insulina recombinante humana (Humulin R) foi da Biobrás (Belo Horizonte, MG, Brasil) e o tiopental sódico foi da Cristália (Itapira, SP, Brasil). Os anticorpos monoclonal antifosfotirosina, e policlonal anti-receptor de insulina, anti-IRS-1, e anti-SHP2 foram da Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA), e o anticorpo policlonal anti-PI 3-quinase foi da Upstate Biotechnology Incorporated (Lake Placid, N.Y., USA). A frutose foi gentilmente fornecida pela Vepê Industria de Alimentos S.A. (S. José dos Campos, SP, Brasil). A insulina sérica foi dosada por técnica de radioimunoensaio (kit Diagnostic Products Corp.- Los Angeles, CA., USA). A glicose, triacilglicerol e colesterol sérico foram dosados por métodos enzimáticos colorimétricos (kits Labtest - Campinas, SP, Brasil).

Soluções Utilizadas Nos Experimentos

Solução tampão de extração:

Para a extração de proteínas, para imunoprecipitação dos tecidos estudados. Contém: Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100mM, EDTA (ácido etileno-diamino tetracético) 10mM, pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoreto) 2Mm (diluído em álcool etílico), triton X 100 1%, 1,1 mg/ml de aprotinina. Esta solução deve ser mantida a 4°C. O ortovanadato, PMSF e a aprotinina devem ser acrescentados no momento do uso.

Tampão de Laemmli (5X):

Para aplicação no gel de poliacrilamida. Contém: Azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50%, SDS 10%.

Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado:

Contém: Trisma base 100mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 2 mM, triton X-100 0,5 %. Esta solução deve ser mantida a 4°C.

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

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

Solução tampão para SDS-PAGE, gel de empilhamento ("stacking"):

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

Solução tampão para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

Empregada para a realização da eletroforese no SDS-PAGE. Para uso, a solução deve ser diluída 1:4. Contém: Trisma base 200mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM, SDS 0,4%.

Solução tampão para transferência:

Usada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE, para a membrana de nitrocelulose. Contém: Trisma base 25 mM, glicina 192 mM,

metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Deve ser mantido à 4°C.

Solução Basal:

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

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 para anticorpos:

A solução contendo os anticorpos específicos que reagirão com as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém: 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal. Os anticorpos utilizados foram os seguintes: α -fosfotirosina, α -IR e α -IRS-1, α -PI 3-K e α -SHP2.

MÉTODOS

Procedimentos para extração das proteínas teciduais:

Os experimentos foram realizados no período da manhã com os animais em estado alimentado. Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com solução de tiopental sódico na concentração de 8mg/100g de peso. O procedimento foi iniciado após a perda dos reflexos corneano e de retirada da pata à dor. Após laparotomia mediana com exposição da veia porta, a incisão foi ampliada expondo o músculo gastrocnêmico da pata traseira. Nos animais controle e nos alimentados com frutose, um fragmento de fígado e músculo foram

retirados antes da injeção de insulina, servindo de amostras sem estímulo com insulina. Para as amostras positivas (estimulado com insulina), foi injetada pela veia porta 0,2 ml de uma solução de insulina regular (1,5U de insulina ou 60µg de insulina) veiculada em solução salina 0,9%

Após 30 e 90 segundos da injeção de insulina, foram retirados um fragmento de fígado e um fragmento do músculo gastrocnêmico, respectivamente. Esses tempos foram determinados, seguindo os resultados obtidos por SAAD *et al.* (1992), que demonstraram que a fosforilação máxima do IRS-1, corria entre 30 e 60 segundos em fígado e entre 1 e 4 minutos em músculo, após infusão de insulina na veia porta nas concentrações de 60 e 6 µg de insulina, respectivamente. Os tecidos extraídos foram imediatamente homogeneizados em tampão de extração, em banho de gelo, e mantidos nesta temperatura durante todo o processo. Após centrifugação por 25 min. a 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi utilizado para imunoprecipitação com os anticorpos anti-receptor de insulina ou anti-IRS-1. As amostras foram incubadas por 14-16 horas, a 4°C. A seguir, foram acrescentados 50µl de proteína A-Sefarose 6MB, para precipitação do complexo proteína-anticorpo, e mantido sob agitação contínua a 4°C, por duas horas. Ao final deste período as amostras foram centrifugadas por 15 min. a 12.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o complexo precipitado foi lavado por 3 vezes com tampão específico de lavagem.

Immunoblotting ou Westernblotting:

As proteínas precipitadas foram ressuspensas em tampão de LAEMMLI (1970) contendo 100 mM de DTT, aquecidas em água fervente por 4 min., e então submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 8% para receptor de insulina e 6% para IRS-1. Foi utilizado marcadores de alto peso molecular da Bio Rad (miosina – 205 kDa, β galactosidase – 116 kDa, BSA – 85 kDa e ovalbumina – 47 kDa) para orientação da corrida eletroforética.

A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da Bio Rad, com solução tampão previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 25 volts, inicialmente, até a linha demarcada pela fase de empilhamento e posteriormente a 120 volts até o final do gel de resolução. A seguir, as proteínas, separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência do minigel da Bio Rad, mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas.

Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução bloqueadora, por duas horas, à temperatura ambiente, e então lavadas com solução basal por três sessões, de dez minutos. A seguir, foram incubadas com solução contendo anticorpo específico, a 4°C por 14-16 horas, sob agitação constante. Após este período, as membranas foram novamente lavadas com solução basal, por quatro sessões de 10 minutos, e a seguir, incubadas com a proteína A marcada com ^{125}I , por duas horas à temperatura ambiente. O excesso de proteína A radioativa foi lavado com solução basal. As membranas secas foram expostas ao filme de RX (astman Kodak, Rochester, NY) com intensificador (Cronex Lightning Plus intensifying screens – DuPont, Wilmington, DE). O cassete foi mantido à temperatura de -80 °C, e após 12-48 horas, o filme foi revelado de maneira convencional. As bandas identificadas na autoradiografia, foram quantificadas nas suas áreas, utilizando-se de densitometria óptica. Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística, para comparação das médias entre os grupos.

Outros:

Teste de tolerância à insulina de curta duração:

Alguns animais dos grupos controle e experimental foram submetidos ao teste endovenoso de tolerância à insulina. Os animais, após um jejum de 14 horas, foram anestesiados, e feito uma abertura na cavidade abdominal para exposição da veia porta. Através de corte na porção distal da calda, amostras de 200 µl de sangue foram colhidas, nos tempos 0 (sem infusão de insulina), 4, 8, 12

e 16 minutos após a infusão de insulina (60 µg). As amostras foram colhidas em ácido tricloro acético, para sua desproteinização. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi utilizado para determinação da glicose sérica por método enzimático (kit Labtest - Campinas, SP, Brasil). A taxa constante de desaparecimento da (Kitt) foi calculada utilizando-se a fórmula $\ln 2/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose sérica foi calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima, durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose (BONORA *et al.*, 1989).

Dosagem da glicemia sérica basal e triacilglicerol, colesterol e insulina sérico pós-absortiva:

Os resultados obtidos na dosagem da glicose sérica no tempo 0 do teste de tolerância à insulina foram expressos como glicemia basal.

Após 5 horas de jejum (8:00-13:00), animais dos quatro grupos experimentais foram anestesiados com tiopental sódico (8 mg/100 g de peso), e amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca. Após centrifugação, o soro foi dividido em alíquotas, e congelado para posterior determinação. Os níveis séricos de triacilglicerol e colesterol foram dosados por método enzimático colorimétrico (kit Labtest - Campinas, SP). Para a dosagem da insulina sérica, utilizou-se técnica de radioimunoensaio, empregando-se o método de duplo anticorpo para insulina (kit Diagnostic Products Corp.- Los Angeles, CA., USA).

Medida da Pressão Arterial:

Aos 28 dias de experimentação, animais dos quatro grupos experimentais foram submetidos a medida de pressão arterial indireta, utilizando-se do aparelho Eletrosphygmanometer PE-300 (Narco Bio-Systems). Os animais foram levados ao laboratório de Metabolismo Hidrosalino do Núcleo de Cirurgia Experimental da UNICAMP, permanecendo no local por um período anterior ao início das medições,

como procedimento de adaptação e redução do estresse. Posteriormente, os animais foram colocados em ambiente aquecida a 40°C, por 10 minutos. Em seguida, um manguito conectado a um esfigmomanômetro de mercúrio foi colocado na porção basal da calda, para oclusão da circulação. O manguito foi inflado até perda dos ruídos pulso. Através de um microfone Korotkoff, fixado próximo a porção basal, o pulso da calda foi detectado, durante a liberação progressiva da circulação. As medidas foram tomadas em triplicatas.