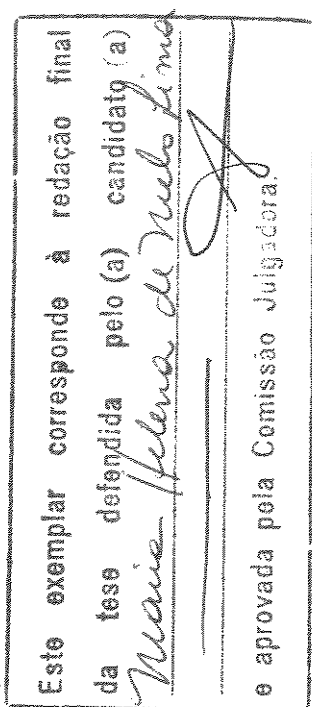


Maria Helena de Melo Lima



**REGULAÇÃO DA INTERAÇÃO IRS-1/SHP2 EM MODELOS
DE RESISTÊNCIA À INSULINA**



*Tese de doutorado apresentada ao curso de
Pós-graduação do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutor em Biologia
Funcional e Molecular, área de Fisiologia*

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

Campinas

2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



UNIDADE	30
N.º CHAMADA:	71 UNICAMP
	L 628r
V.	Ex.
TOMBO BC	43267
PROC.	16-278/00
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	19/12/00
N.º CPD	

CM-00154314-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

L628r **Lima, Maria Helena de Melo**
Regulação da interação IRS-1/SHP2 em modelos de
resistência à insulina/Maria Helena de Melo Lima. - -
Campinas, SP:[s.n.], 2000.
129f.:ilus.

Orientador: Mario José Abdalla Saad
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Insulina-resistência. 2. Tirosina fosfatase. 3. Receptor. I.
Saad, Mario José Abdalla . II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

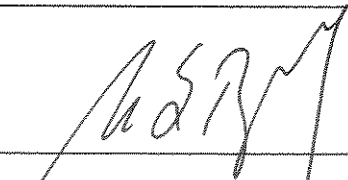
Data da Defesa 04/10/2000.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad



Prof. Dr. Sigisfredo Luís Brenelli



Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho



Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero



Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro



Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado

DEDICATÓRIA

*A meus Pais, Derval e Nair,
e ao João Flávio e Felipe.*

	PÁG.
RESUMO.....	i
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Animais.....	12
3.1.1. Grupos experimentais.....	12
3.2. Material.....	14
3.2.1. Soluções utilizadas.....	14
3.3. Métodos.....	16
3.3.1. Procedimentos com animais para a extração das proteínas teciduais, após estímulo insulínico <i>in vivo</i>	16
3.3.2. “Imunoblotting”.....	17
3.3.3. Imunoprecipitação.....	18
3.3.4. Dosagem da glicemia e da insulina sérica.....	18
3.3.5. Análise estatística.....	19
4. RESULTADOS.....	20
4.1. Características gerais dos animais.....	21
4.1.1. Determinação do tempo de fosforilação e associação IRS-1/SHPTP2 em fígado.....	23
4.1.2. Determinação do tempo de fosforilação do IRS-1 e associação IRS-1/SHP2 em músculo.....	25

4.1.3. Efeito do tratamento com estreptozotocina na expressão da proteína SHP2, no grau de fosforilação do IRS-1 e associação deste com a SHP2 em tecidos muscular e hepático de ratos.....	27
4.1.4. Efeito do uso de adrenalina na expressão da proteína SHP2, no grau de fosforilação do IRS-1 e associação deste com a SHP2 em tecidos hepático e muscular.....	32
4.1.5. Efeito do envelhecimento na expressão da proteína SHP2, no grau de fosforilação do IRS-1 e associação deste com a SHP2 em tecidos muscular e hepático de ratos.....	37
4.1.6. Efeito do jejum prolongado na expressão da proteína SHP2, no grau de fosforilação do IRS-1 e associação deste com a SHP2 em tecidos muscular e hepático de ratos.....	42
4.1.7. Efeito do tratamento crônico com dexametasona na expressão da proteína SHP2, no grau de fosforilação do IRS-1 e associação deste com a SHP2 em tecidos muscular e hepático de ratos.....	47
5. DISCUSSÃO.....	52
6. CONCLUSÕES.....	63
7. SUMMARY.....	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
9. ANEXOS.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

μCi	microCuri
AMPc	adenosina monofosfato cíclica
^{125}I	isótopo de iodo 125
ATP	adenosina trifosfato
AKT/PKB	proteína quinase B intermediário distal à ativação da PI 3-quinase
DAG	diacilglicerol
DNA	ácido desoxiribonucleico
DTT	ditiotretol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGF	epidermal growth factor
GLUT	transportador de glicose
GRB2	proteína ligadora do receptor para o fator de crescimento
GTP	guanosina trifosfato
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IR	receptor de insulina
IRS-1	substrato 1 do receptor de insulina
kDa	quilo Daltons
MAPK	proteína quinase ativadora da mitogênese

Nck	proteína adaptadora ligada às vias de crescimento
PDGF	plated-derived growth factor
PEPCK	fosfoenol piruvato carboxiquinase
PKA	proteína quinase A
PI 3-K	fosfatidilinositol 3-quinase
PMSF	fluoreto de fenilmetil sulfonila
pp185	proteína fosforilada de 185 kDa
Ras	proteína originalmente identificada como um oncogene, tem participação na regulação do metabolismo e crescimento celular
RNA	ácido ribonucléico
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SH2	segunda homologia do src
SH3	terceira homologia do src
SHP2	fosfotirosina fosfatase ativada pelo IRS-1 fosforilado em tirosina
Src	oncogene originalmente definido como produto do sarcoma vírus Rous
STZ	estreptozotocina
Syp	fosfatase tirosina-específica
Tris	tri(hidroximetil)-aminometano

Figura 1: Avaliação do grau de fosforilação em tirosia do IRS-1 e associação do SHP2 em diferentes tempos. a: Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em tecido hepático, antes (zero) e após a infusão de insulina, em diferentes tempos (0,30", 90", 3', 5' e 15'). Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anti-IRS-1, em submetidas a "immunoblotting" com anticorpo antifosfotirosina. b: Avaliação da associação do IRS-1/SHP2 em tecido hepático, antes (zero) e após a infusão de insulina, em diferentes tempos (0, 30", 90", 3', 5' e 15'). Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS1, e submetidas a "mmunoblotting" com anticorpo anti-SHP2.....	24
--	----

Figura 2. Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 e associação com SHP2 em diferentes tempos. a: Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em tecido muscular, antes (zero) e após a infusão de insulina, em diferentes tempos (0, 30", 90", 3', 5' e 15'). Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a "immunoblotting" com anticorpo anti-fosfotirosina. b: Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido muscular, antes (zero) e após a infusão de insulina, em diferentes tempos (0, 30", 90", 3', 5' e 15'). Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a "immunoblotting" com anticorpo anti-SHP2.....	26
--	----

Figura 3. Efeito do tratamento com STZ sobre a concentração protéica do SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. **a:** Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (STZ). Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (STZ), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$ 28

Figura 4. Efeito do tratamento com STZ sobre a associação IRS-1/SHP2 e o grau de fosforilação do AKT/PKB. **a:** Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (STZ), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em serina do AKT em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-AKT. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$ 29

Figura 5. Efeito do tratamento com STZ sobre a concentração protéica do SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. **a:** Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (STZ). Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (STZ), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$

30

Figura 6. Efeito do tratamento com STZ sobre a associação IRS-1/SHP2 e o grau de fosforilação do AKT/PKB. **a:** Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (STZ), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em serina do AKT em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-AKT. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$

31

Figura 7. Efeito do tratamento agudo com adrenalina sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. **a:** Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (Adr.). Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$ 33

Figura 8. Efeito do tratamento agudo com adrenalina sobre a associação do IRS-1/SHP2 e o grau de fosforilação do AKT/PKB. **a:** Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em serina do AKT em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-AKT. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$ 34

Figura 9. Efeito do tratamento agudo com adrenalina sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. a: Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (Adr.). Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. b: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$

35

Figura 10. Efeito do tratamento agudo com adrenalina sobre a associação do IRS-1/SHP2 e o grau de fosforilação do AKT/PKB. a: Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. b: Avaliação do grau de fosforilação em serina do AKT em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-AKT. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$

36

Figura 11. Efeito do envelhecimento sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. **a:** Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido hepático de ratos com 2 e 20 meses de idade. Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido hepático de ratos com 2 e 20 meses de idade, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$ 38

Figura 12. Efeito do envelhecimento sobre a associação do IRS-1/SHP2 e o grau de fosforilação do AKT/PKB. **a:** Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido hepático de ratos com 2 e 20 meses de idade, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em serina do AKT em tecido hepático de ratos com 2 e 20 meses de idade, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-AKT. A desitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$ 39

Figura 13. Efeito do envelhecimento sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. **a:** Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido muscular de ratos com 2 e 20 meses de idade. Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido muscular de ratos com 2 e 20 meses de idade, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$ 40

Figura 14. Efeito do envelhecimento sobre a associação do IRS-1/SHP2 e o grau de fosforilação do AKT/PKB. **a:** Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido muscular de ratos com 2 e 20 meses de idade, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em serina do AKT em tecido muscular de ratos com 2 e 20 meses de idade, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-AKT. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$ 41

Figura 15. Efeito do jejum sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. a: Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido hepático de ratos alimentados (controle) e mantidos de jejum prolongado. Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido hepático de ratos alimentados e mantidos de jejum prolongado, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$ 43

Figura 16. Efeito do jejum sobre a associação do IRS-1/SHP2. a: Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido hepático de ratos alimentados e mantidos de jejum prolongado, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$ 44

Figura 17. Efeito do jejum sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. **a:** Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido muscular de ratos alimentados (controle) e mantidos de jejum prolongado. Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido muscular de ratos alimentados e mantidos de jejum prolongado, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$

45

Figura 18. Efeito do jejum sobre a associação do IRS-1/SHP2. **a:** Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido muscular de ratos alimentados e mantidos de jejum prolongado, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$

46

Figura 19. Efeito do tratamento crônico com dexametasona sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. **a:** Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (Dexa). Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido hepático de ratos- controle (C) e tratados (Dexa), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$ 48

Figura 20. Efeito do tratamento crônico com dexametasona sobre a associação do IRS-1/SHP2. **a:** Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (Dexa), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$ 49

Figura 21. Efeito do tratamento crônico com dexametasona sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. **a:** Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido muscular de ratos- controle (C) e tratados (Dexa). Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido muscular de ratos controles (C) e tratados (Dexa), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$

50

Figura 22. Efeito do tratamento crônico com dexametasona sobre a associação do IRS-1/SHP2. **a:** Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (Dexa), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$

51

RESUMO

A insulina, ao se ligar à subunidade α de seu receptor heterotetramérico, dá início a uma série de ações imediatas e tardias, metabólicas e promotoras de crescimento. Tais eventos ocorrem através da estimulação da subunidade β transmembrana do receptor, que se autofosforila e ativa a fosforilação de substratos endógenos intracelulares, dos quais o mais estudado é o IRS-1. Esta proteína de peso molecular ~ 160 kDa pode ser bem caracterizada como um substrato direto do receptor de insulina e quando se fosforila associa-se a proteínas com porção SH2, PI-3 quinase e SHP2 ativando-as. Uma etapa distal a estas associações/ativações é a fosforilação em serina da AKT/PKB. Utilizando-se técnicas de “immunoblotting” com anticorpos anti-IRS-1, antifosfotirosina, anti-SHP2 e anti-AKT/PKB é possível analisar o grau de fosforilação do IRS-1 e AKT/PKB, a concentração protéica da SHP2 e a associação do IRS-1 com SHP2, ou seja, as ações iniciais da insulina.

Neste estudo investigamos a quantidade protéica da SHP2, o grau de fosforilação do IRS-1 e associação com SHP2 e a fosforilação do AKT/PKB no tecido muscular e hepático de ratos normais e em cinco modelos de resistência à insulina: o jejum prolongado, o envelhecimento, o uso agudo de adrenalina, o uso crônico de dexametasona e ratos com diabetes induzido por STZ.

Em experimentos com ratos normais para avaliação do efeito tempo após infusão de insulina no grau de fosforilação do IRS-1 e associação com SHP2, verificou-se que o pico de fosforilação do IRS-1 e associação IRS-1/SHP2 foi aos 30” para o tecido hepático e aos 90” para o tecido muscular, após a infusão de insulina, na veia porta.

Nos animais que receberam estreptozotocina, em tecido hepático não houve alteração no nível protéico da SHP2. Observamos um aumento significativo no grau de fosforilação do IRS-1 para $141 \pm 12\%$, $p < 0,05$, quando comparados aos animais controle. Não houve alteração na associação IRS-1/SHP2 quando comparados com o controle. Houve uma redução para $65 \pm 6\%$, $p < 0,035$, no grau de fosforilação do AKT/PKB. Em tecido muscular destes animais tratados com estreptozotocina, não houve alteração no nível protéico da SHP2, ocorrendo um aumento para $191 \pm 14\%$, $p < 0,036$ no grau de fosforilação do IRS-1 quando comparados com o controle, sem alteração na associação IRS-1/SHP2

quando comparados com o controle. O grau de fosforilação do AKT/PKB foi reduzido para $70 \pm 7\%$, $p < 0,04$, nos animais tratados com STZ quando comparados com o controle.

Animais submetidos ao tratamento agudo de adrenalina não apresentaram alteração no nível protéico da SHP2 tanto para o tecido hepático como para o muscular. Houve uma redução significativa no grau de fosforilação do IRS-1 para $37 \pm 3\%$, ($p < 0,019$), e para $37 \pm 7\%$, ($p < 0,003$) em tecido hepático e muscular respectivamente, acompanhado de uma diminuição da associação IRS/SHP2 para $52 \pm 3\%$, ($p < 0,002$), e para $20 \pm 7\%$, ($p < 0,041$), em tecido hepático e muscular, respectivamente. A fosforilação do AKT/PKB foi reduzida para $60 \pm 5\%$, ($p < 0,045$), e para $70 \pm 6\%$, ($p < 0,030$), em tecido hepático e muscular, respectivamente.

O envelhecimento não alterou o nível protéico da SHP2 em tecido hepático. A fosforilação do IRS-1 foi reduzida para $64 \pm 7\%$, ($p < 0,029$), ocorrendo um aumento na associação IRS-1/SHP2 para $155 \pm 9\%$, ($p < 0,012$) em tecido hepático dos animais senis. O grau de fosforilação do AKT/PKB dos animais senis não apresentou alteração. Em tecido muscular dos animais com 20 meses de idade observamos que não houve alteração do nível protéico da SHP2. O grau de fosforilação do IRS-1 foi reduzido para $50 \pm 7\%$, ($p < 0,007$), acompanhado de uma redução na associação do IRS-1/SHP2 para $48 \pm 12\%$, ($p < 0,034$), como também uma redução no grau de fosforilação do AKT/PKB para $70 \pm 6\%$, ($p < 0,05$), em tecido muscular do animais senis quando comparados com o controle.

Os animais mantidos em jejum prolongado não apresentaram alteração no nível protéico da SHP2 tanto para tecido hepático como muscular. Houve um aumento no grau de fosforilação do IRS-1 para $152 \pm 13\%$, ($p < 0,007$), e para $155 \pm 2\%$, ($p < 0,004$), em tecido hepático e muscular, respectivamente, em relação aos animais alimentados. Observamos um aumento na associação do IRS-1/SHP2 para $136 \pm 7\%$, ($p < 0,035$), e para $162 \pm 7\%$, ($p < 0,019$), em tecido hepático e muscular, respectivamente, quando comparados com os animais alimentados.

Os animais submetidos ao tratamento crônico com dexametasona tanto para o tecido hepático como para o muscular não apresentaram alteração no nível protéico da SHP2. Houve uma redução significativa no grau de fosforilação do IRS-1 para $48 \pm 5\%$, ($p < 0,040$), e para $36 \pm 5\%$, ($p < 0,035$), em tecido hepático e muscular, respectivamente, quando comparados com os controles. Não houve alteração na associação IRS-1/SHP2 em tecido hepático e muscular do animais que receberam tratamento crônico com dexametasona quando comparados com o controle.

A análise integrada dos 5 modelos animais sugere que a regulação do grau de fosforilação do IRS-1, bem como da interação deste com a PI 3-quinase depende dos níveis insulinêmicos do animal: animais hiperinsulinêmicos apresentam menor fosforilação e menor interação IRS-1/PI 3-quinase, e animais hipoinsulinêmicos mostram o oposto. Por outro lado, a regulação da interação IRS-1/SHP2 não parece manter nenhuma relação com níveis insulinêmicos.

Parece que a interação IRS-1/SHP2 contribui para a modulação da transmissão do sinal insulínico, influenciando a fosforilação/ativação da AKT/PKB.

Em situações com aumento da fosforilação do IRS-1 sem aumento na associação IRS-1/SHP2, o efeito final do AKT/PKB é atenuado, como demonstrado em fígado e músculo de animais tratados com STZ. Por outro lado, a diminuição da fosforilação do IRS-1, sem uma diminuição da associação IRS-1/SHP2, protege a fosforilação do AKT/PKB, como demonstrado em fígado dos animais senis.

1. INTRODUÇÃO

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

O principal hormônio no controle da glicemia em mamíferos é a insulina, que age estimulando a captação de glicose em tecidos muscular e adiposo, e inibindo a neoglicogênese no tecido hepático como também modificando a expressão ou atividades de uma série de enzimas e sistemas de transporte.

A insulina exerce seu efeito através da ligação a um receptor específico na membrana plasmática (FREYCHET, ROTH, NEVILLE, 1971; CUATRECASAS, 1972). O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituído por duas subunidades α , cada uma com peso molecular de 135.000, e duas subunidades β , cada uma com peso molecular de 95.000, ligadas por pontes de dissulfeto para dar a estrutura final β - α - α - β (MASSAGUE, PILCH, CZECH, 1981). A subunidade α é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade β é uma proteína transmembrana e responsável pela transmissão do sinal.

Em 1982 KASUGA *et al.* descreveram que a subunidade β do receptor de insulina é uma proteína quinase, estimulada pela insulina, sendo capaz de autofosforilar-se e fosforilar outros substratos em aminoácidos tirosina. A insulina liga-se à subunidade α e estimula a fosforilação em tirosina da subunidade β de seu receptor. O ATP atua como doador de fosfato e a fosforilação ocorre exclusivamente em tirosina (WHITE *et al.*, 1984).

A autofosforilação do receptor de insulina ocorre através de uma cascata intramolecular de reações de fosforilação (WHITE *et al.*, 1988). Como resultado, pelo menos cinco tirosinas na porção intracelular da cadeia β são fosforiladas, estando três delas nas posições 1158, 1162 e 1163. Quando estão fosforiladas, a atividade quinase é então implementada em direção a outros substratos (YU & CZECH, 1984).

Evidências diretas de que a atividade tirosina quinase do receptor de insulina é importante para ação insulínica vêm de diversas fontes. A mais convincente deriva de experimentos com indução de mutações *in vitro*, em que a lisina na porção 1030 da subunidade β foi trocada por outro aminoácido como a alanina (EBINA *et al.*, 1987). Em analogia com outras quinases, esta lisina é o sítio crítico de ligação do ATP. Quando a lisina é mudada e o receptor mutante é expresso em células, a ligação da insulina ocorre

normalmente, mas o ATP não se liga à subunidade β , ficando o receptor totalmente inativo como quinase e totalmente inefetivo para mediar a ação estimulatória do hormônio no metabolismo celular (EBINA *et al.*, 1987). Mutações de uma ou mais das tirosinas no sítio de autofosforilação, nas posições 1158, 1162, e 1163, produzem efeito similar, mas menos dramático (ELLIS *et al.*, 1986; WILDEN *et al.*, 1992). Mutações de todas essas tirosinas, entretanto, produz um receptor completamente inativo, semelhante ao mutante da posição 1030 ou sítio de ligação do ATP (WILDEN *et al.*, 1992). Alterações na atividade quinase em estados de resistência à insulina são também consistentes com a importância da fosforilação normal do receptor para uma efetiva ação insulínica (KAHN & WHITE, 1988).

Embora muitas proteínas e peptídeos sintéticos possam ser fosforilados *in vitro*, por receptores de insulina parcialmente purificados, essas reações não ocorrem *in vivo*, tornando seu significado fisiológico incerto (ROTHENBERG, WHITE, KHAN, 1990). Alguns substratos endógenos foram descritos (WHITE, MARON, KAHN, 1985; BERNIER, LAIRD, LANE, 1987; KARASIK *et al.*, 1988; SUN, ROTHENBERG, KAHN, 1991), proteínas que são rápida e diretamente fosforiladas em tirosina pela ativação da quinase do receptor de insulina. O primeiro substrato melhor caracterizado é uma proteína que migra no gel de poliacrilamida como uma banda larga entre 160 e 180 kDa denominada pp185. (WHITE *et al.*, 1985).

Em células transfectadas com o cDNA do receptor de insulina humano, há um aumento marcante na fosforilação da pp185 coincidente com um incremento na ação insulínica. A fosforilação da pp185 está reduzida em células expressando receptores com mutações no sítio de ligação do ATP ou nos sítios de autofosforilação, em proporção à redução na atividade quinase do receptor (WILDEN *et al.*, 1992; SUN *et al.*, 1992).

Entretanto, a evidência mais importante do papel da fosforilação da pp185 na ação insulínica veio de um resultado inesperado, em células expressando um receptor de insulina com mutação induzida na tirosina 960, na região justamembrana do mesmo. O receptor mutante se liga à insulina e é autofosforilado normalmente, apresentando também uma atividade quinase normal, dirigida a substratos exógenos *in vitro*. Entretanto, ele é incapaz de fosforilar a pp185, que provoca uma ausência de efeito insulínico no metabolismo de glicogênio e na síntese de DNA (WHITE *et al.*, 1988).

Em 1991, a pp185 foi clonada e denominada substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) (SUN *et al.*, 1991). O DNA complementar do IRS-1 de fígado de rato codifica uma proteína com 1235 aminoácidos e diversas características surpreendentes. Primeiro, não há porção transmembrana, e é uma proteína de localização citoplasmática. Há uma sequência consistente com uma de consenso para a ligação de nucleotídeos (ATP ou GTP), embora não haja nenhuma homologia com proteínas quinases conhecidas. Ainda em análise de sequências de consenso, há múltiplos sítios de fosforilação em serina, treonina e tirosina. Seis dos sítios de fosforilação nesta última têm a sequência repetitiva YMXM, em que Y é a tirosina, M a metionina e X significa qualquer aminoácido. Dois outros sítios de fosforilação em tirosina têm a porção similar YXXM. A porção YXXM não existe no receptor de insulina, mas é observada em diversas tirosina-quinases. Nestas, a porção YMXM parece estar envolvida na interação não covalente dessas proteínas com moléculas de sinalização, caracterizadas pela presença de uma porção que se liga ao YMXM, denominado SH2 (homologia com o src 2, que é um oncogene).

Em estudos *in vivo* em cultura de células e em sistemas reconstituídos *in vitro*, o IRS-1 fosforilado associa-se à enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) ativando-a (BACKER *et al.*, 1992; FOLLI *et al.*, 1992). Demonstrou-se posteriormente que esta associação e ativação também ocorrem em dois importantes tecidos insulino-sensíveis de ratos, fígado e músculo, em concentração fisiológicas de insulina (FOLLI *et al.*, 1992; SAAD *et al.*, 1993). A enzima PI 3-quinase apresenta uma subunidade de 110 kDa e uma regulatória de 85 kDa que contém duas porções SH2 e uma SH3 (CARPENTER & CANTLEY, 1990). A ligação e ativação descritas envolvem as tirosinas fosforiladas do IRS-1 próximas a metioninas YMXM, e a porção da subunidade regulatória da enzima PI 3-quinase. A insulina aumenta a concentração intracelular de fosfatidilinositol 3-fosfato, sugerindo que a PI 3-quinase é realmente ativada durante a estimulação com este hormônio. Embora a subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase seja fosforilada após estímulo com outros fatores de crescimento, isto não parece ocorrer após o estímulo com insulina. Ao invés disso, a ativação parece advir simplesmente como consequência da ligação do IRS-1 à PI 3-quinase.

Estudos recentes demonstraram que a ativação da PI 3-quinase é essencial para muitos efeitos metabólicos da insulina, incluindo no transporte de glicose, ativação da síntese de glicogênio e a inibição da fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK), a enzima chave para a gliconeogênese (CHEATHAM & KANH, 1995). Recentemente, demonstrou-se que a AKT/PKB, uma serina-treonina quinase, com peso molecular de 57 kDa, participa da transmissão do sinal da PI 3-quinase após o estímulo com insulina. A AKT/PKB é uma proteína com um N-terminal, que contém um sítio SH2, recentemente redefinido como sítio homólogo da “peckistrina” (PH), um sítio central catalítico e um sítio C-terminal.

Apesar da AKT/PKB apresentar potencial oncogênico, sua função e regulação normal não era conhecida, até ser clonada e relacionada como um intermediário distal à ativação da PI 3-quinase. Esta ativação foi baseada em duas observações: a ativação do fator de crescimento induzido pela AKT/PKB pode ser completamente bloqueada pela adição de “wortmonnim” (inibidor da PI 3-quinase); mutações dos receptores dos fatores de crescimento que inibem a ativação da PI 3-quinase, também inibem a PKB/AKT (COFFER, JING, WOODGETT, 1998). Estes dados sugerem que a PI 3-quinase ou seus produtos mediam a ativação da AKT/PKB. O principal fator regulador da ativação da AKT/PKB é a ativação da PI 3-quinase, mas podem existir vários mecanismos alternativos que são utilizados por estímulos específicos, tais como choque térmico, hiperosmolaridade, hipoxia, fator de crescimento neural e interleucinas (COFFER *et al.*, 1998).

Além da PI 3-quinase, outras proteínas com porção SH2 também interagem com o IRS-1 fosforilado, como as proteínas GRB2, Nck e Syp (SHP2). A GRB2 é uma pequena proteína citoplasmática que contém duas porções SH3 e uma SH2 que se liga à tirosina 895 do IRS-1. A GRB-2 age como uma molécula adaptadora, que compõe um complexo ativador da proteína ras, ativadora das MAP quinases (proteínas de ativação da mitogênese). A Nck, é uma proteína adaptadora com três porções SH3 e uma SH2, e que une o IRS-1 às vias de crescimento celular (CHEATHAM & KAHN, 1995). A proteína SHP2 é uma fosfotirosina fosfatase que contém duas porções SH2, que pode ter importância no crescimento celular e exercer uma auto-regulação no sinal gerado pela insulina.

Em geral a função de fosfatases-fosfotirosinas é tida como inibitória ou como inativação de vias de ativação das quinases. Entretanto, a fosfatase (SHP2) desempenha função efetora positiva, mas seu papel nas vias de transmissão do sinal insulínico não está completamente esclarecido, embora um grande avanço tenha sido observado nos últimos anos.

Especula-se que a finalização da ação da insulina ocorra por consequência da desfosforilação de ambos, receptor e substrato 1 do receptor de insulina. A tirosina fosfatase responsável por esta desfosforilação não foi identificada. KUHNE *et al.* (1993), usando proteínas recombinantes, demonstrou que o IRS-1 é rapidamente desfosforilado pela SHP2 *in vitro*, sugerindo que a fosfatase (SHP2) pode ser a enzima que desfosforila o IRS-1, bem como a chave principal na finalização da sinalização insulínica. Esses resultados não foram confirmados *in vivo* (YAMAUCHI *et al.*, 1995 ; NOGUCHI *et al.*, 1994), e hoje não se aceita que a SHP2 contribua para desfosforilar o IRS-1.

MILARSKI & SALTIEL, (1994) utilizando células transfectadas com SHP2 cataliticamente inativas, demonstraram que, após estímulo insulínico, a ativação da MAP quinase ficava muito reduzida, sugerindo um papel importante para esta fosfatase na ações mitogênicas da insulina. Estudos posteriores confirmaram estes dados demonstrando também que a redução de atividade da MAP quinase é provavelmente consequência de uma menor ativação da proteína ras (YAMAUCHI *et al.*, 1995 ; NOGUCHI *et al.*, 1994).

HAUSDORFF *et al.*, (1995) também enfatizaram o papel da SHP2 na transmissão do sinal insulínico, demonstrando que ela é necessária para a expressão da proteína GLUT 1 induzida pela insulina, mas não é necessária para a ativação de vias metabólicas que levam a translocação do GLUT 4.

MAEGAWA *et al.*, (1999) utilizando camundongos transgênicos, Δ PTP (dominante negativo que diminui drasticamente a expressão da SHP2), observou uma resistência à insulina, com menor utilização de glicose estimulada por esse hormônio, acompanhada de uma diminuição na fosforilação do IRS-1. Observou-se também nesses animais redução na ativação da PI 3-quinase e AKT-quinase em músculo e fígado. Estes dados sugerem que a transmissão do sinal insulínico, em direção a fosforilação do IRS-1 e

ativação da PI 3-quinase e AKT/PKB, depende da expressão da SHP2 e sua associação ao IRS-1.

Assim, embora importante para a modulação da transmissão do sinal insulínico, a regulação da interação IRS-1/SHP2 não foi ainda investigada em tecidos animais, em situações de resistência à insulina.

Nos últimos anos demonstrou-se em diversos modelos animais da resistência à insulina uma redução na fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1, em fígado e músculo, após a estimulação *in vivo* com insulina, indicando defeitos na transmissão do sinal insulínico em etapas distais à ligação do hormônio em seu receptor (SAAD *et al.*, 1992). É importante ressaltar que em todos estes modelos havia uma modulação da fosforilação do substrato do receptor de insulina, e é possível que a ligação do IRS-1 à SHP2 ou à PI 3-quinase possa também estar alterada nestes modelos.

O jejum prolongado e o diabetes induzido por estreptozotocina em ratos, são dois modelos atípicos de resistência à insulina, porque apresentam hipoinsulinemia. Nestas duas situações descreve-se redução da ação insulínica tanto em tecidos periféricos quanto em tecido hepático, associado a um aumento no número de receptores de insulina (ALMIRA & REDDY, 1979; KADOWAKI *et al.*, 1984; OKAMOTO *et al.*, 1986). Estudos mais recentes, que utilizaram técnicas de “immunoblotting” e foram realizadas *in vivo*, demonstraram um aumento na autofosforilação do receptor de insulina nos tecidos hepático e muscular desses animais (SAAD *et al.*, 1992; FOLLI *et al.*, 1993). Com relação ao IRS-1 demonstrou-se um aumento de aproximadamente 100% no grau de fosforilação em tirosina e da associação IRS-1/PI 3-quinase, em tecido muscular e hepático de animais com privação de alimentos por três dias ou com diabetes induzido por estreptozotocina (SAAD *et al.*, 1992).

O envelhecimento é acompanhado de uma deterioração progressiva na tolerância à glicose, e a resistência à insulina parece desempenhar um papel primordial nessa intolerância a carboidratos (DAVIDSON, 1979; DE FRONZO, 1979). CARVALHO *et al.*, (1996) demonstraram que em tecidos muscular e hepático de ratos idosos (20 meses) os níveis de receptor de insulina não se alteram, mas ocorre uma redução de

aproximadamente 30% no grau de autofosforilação do mesmo. Com relação à fosforilação do IRS-1, foi demonstrado uma redução de aproximadamente 70%, em ambos os tecidos dos animais velhos. A associação IRS-1/PI 3-quinase acompanhou esta redução.

O tratamento de ratos com dexametasona induz resistência à insulina, caracterizada por alterações no metabolismo de glicose em tecidos hepático e periférico, redução na captação de aminoácidos estimulada pela insulina em músculo, e uma diminuição da lipogênese em adipócitos (DE PIRRO *et al.*, 1981; AMATRUDA, LIVINGSTONE, LOCKWOOD, 1985). O mecanismo pelo qual os glicocorticóides exercem estes efeitos não está inteiramente esclarecido. Resultados anteriores mostram que em tecidos muscular e hepático de ratos tratados com dexametasona por cinco dias ocorre uma redução no grau de fosforilação do IRS-1 e da associação desta com a PI 3-quinase (SAAD *et al.*, 1993; SAAD, FOLLI, KHAN, 1995a).

Finalmente, é fato bem estabelecido que a infusão de adrenalina induz resistência à insulina, sendo que neste caso os níveis séricos de insulina permanecem dentro da normalidade, e este modelo pode ser usado como exemplo de resistência à insulina que cursa com normoinsulinemia. Observou-se também que neste modelo de resistência à insulina ocorre uma redução no grau de fosforilação do IRS-1 com redução da associação IRS-1/PI-3quinase (SAAD, *et al.*, 1995b).

Entretanto, nos modelos animais discutidos acima não se investigou a regulação da associação IRS-1/SHP2 e ativações distais a esta interação como a da PKB/AKT. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os níveis protéicos, o grau de fosforilação do IRS-1 e a interação deste com a SHP2 e a fosforilação do PKB/AKT, em tecido muscular e hepático de ratos normais e nos seguintes modelos animais: ratos submetidos a jejum por 72 horas, ratos tratados com estreptozotocina, ratos com 20 meses de idade, ratos tratados agudamente com adrenalina e ratos tratados com dexametasona por cinco dias.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

Estudar o nível tecidual e o grau de fosforilação após o estímulo insulínico do receptor de insulina, do IRS-1, bem como a associação deste substrato com a SHP2, e o grau de fosforilação do AKT/PKB em fígado e músculo, de ratos normais e em modelos animais de resistência à ação da insulina que apresentam hipoinsulinemia, hiperinsulinemia ou normoinsulinemia.

Utilizamos seis grupos de experimentos:

- a) Ratos normais (jejum 12-14h)
- b) Ratos submetidos a jejum por três dias (hipoinsulinemia).
- c) Ratos tratados com estreptozotocina (hipoinsulinemia).
- d) Ratos tratados com dexametasona por 5 dias (hiperinsulinemia).
- e) Ratos tratados agudamente com adrenalina (normoinsulinemia).
- f) Ratos senis (hiperinsulinemia).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Em todos os experimentos foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar, fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp, a idade dos animais usados será mencionada ao descrever os modelos experimentais estudados.

Uma semana antes de qualquer experimento, os animais foram acomodados em gaiolas plásticas, contendo cinco ratos/gaiola mantidos em ciclos de 12h de luz (06:00-18:00h) e 12h de escuro (18:00-06:00h), recebendo água e dieta à vontade.

Com exceção do grupo de animais submetidos a jejum prolongado por 72h e seus controles, alimentados à vontade, a alimentação foi suspensa por 12 a 14h antes da coleta do material a ser analisado.

Após determinarmos a curva tempo-resposta da fosforilação do IRS-1 e a sua associação com a fosfatase SHP2, em tecidos muscular e hepático estes animais foram divididos em grupos experimentais.

3.1.1. Grupos experimentais

- *Animais submetidos a jejum*

Ratos da linhagem Wistar, com média de idade de 8 semanas, do sexo masculino, com peso em torno de 200g, em número de 8 a 12 por experimento, sendo 4 a 8 no grupo-controle e o mesmo número no grupo jejum. Os animais foram mantidos em jejum por 72h, ingerindo apenas água à vontade, enquanto o grupo-controle permaneceu com oferta de alimentos até o momento do experimento.

- *Animais idosos*

Ratos da linhagem Wistar de 20 meses de idade, do sexo masculino, com pesos variando em torno 450g, comparados a animais do mesmo sexo, de 8 semanas de idade com peso em torno de 200g. Os animais deste grupo e seus controles permaneceram em jejum nas 14h que antecederam o experimento, recebendo água à vontade.

- *Animais tratados com adrenalina*

Ratos machos da linhagem Wistar, com 8 semanas de idade, peso em torno de 200g, submetidos a tratamento agudo com adrenalina e o número idêntico de animais no grupo- controle, que receberam injeções de salina intraperitoneal. A administração da adrenalina foi feita sob a forma de injeção intraperitoneal de 25µg por 100g de peso corporal, aproximadamente 5 a 10 minutos antes da extração do material. Os animais de ambos os grupos permaneceram em jejum por 12 a 14h antes dos experimentos, com ingestão hídrica à vontade.

- *Animais tratados com dexametasona*

Ratos da linhagem Wistar com aproximadamente 8 semanas de idade, do sexo masculino, com peso em torno de 200g, submetidos ao tratamento crônico com corticosteróides, através de injeções intraperitoneais diárias de 1mg/kg de peso corporal de dexametasona (OGAWA *et al.*, 1992) ou volume igual de solução salina (grupo controle), no período da manhã, durante os 5 dias que antecederam o estudo e no momento do experimento. A alimentação foi suspensa por 12 a 14h antes da coleta do material, com oferta de água à vontade.

- *Animais tratados com estreptozotocina*

Ratos da linhagem Wistar com aproximadamente 8 semanas de idade, do sexo masculino, com peso em torno de 200g, submetidos a injeções endovenosa (caudal) de estreptozotocina, em dose única de 60mg/kg de peso corporal, ou volume igual de solução de citrato (grupo controle), os animais foram mantidos de jejum alimentar prévio, não hídrico de aproximadamente 14h antes da administração da estreptozotocina e por mais 2h após a administração. Os experimentos foram realizados após 4 dias da administração. A alimentação foi suspensa por 12 a 14h antes da coleta do material, com oferta de água à vontade.

3.2 MATERIAL

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

Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina, ditioneitol (DTT), triton X-100, tween 20, e glicerol foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). A proteína A com iodo radioativo (^{125}I) procedida da Amersham (Amersham, UK), e a proteína A sepharose 6 MB da Pharmacia (Uppsala, Suécia). A membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, 0.45 μm) foi obtida da Amersham (Aylesbury, UK). O agente anestésico tiopental sódico foi adquirido da Cristália (Itapira/SP, Brasil) e a insulina regular humana (Humulin R) da Biobrás (BH, Brasil). Os anticorpos anti IRS-1 e anticorpo antifosfotirosina, e o anti-SHP2, foram todos da Santa Cruz Biotechnology (Santa cruz, CA, USA) e o anticorpo AKT/PKB da Biolabs (Biolabs, UK).

3.2.1. Soluções utilizadas

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

Tampão de Laemmli (5X): utilizada para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese de sódio dodecil-sulfato (SDS-PAGE) a 6%. Contém: azul de bromofenol a 0,1%, fosfato de sódio a 1M pH 7,0, glicerol a 50%, SDS a 10%.

Solução tampão de extração B, para imunoprecipitação: para a extração de proteínas, para imunoprecipitação dos tecidos estudados. Contém: trisma base a 100 mM, EDTA a 10 mM, pirofosfato de sódio a 10 mM, fluoreto de sódio a 100 mM, ortovanadato de sódio a 10 mM, PMSF a 2 mM (diluído em álcool etílico), triton X 100 a 1% e 0,1 mg/ml de aprotinina. Esta solução foi mantida 4° C. O ortovanadato, PMSF e a aprotinina foram acrescentados no momento do uso.

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

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

Solução tampão para transferência: utilizada para transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Contém: trisma base a 25 mM, glicina a 192mM, metanol a 20% e SDS a 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular.

Solução tampão para SDS-PAGE, gel de resolução (resolving): utilizada para a manufatura do SDS-PAGE, gel de resolução, em tampão composto de EDTA a 4mM, SDS a 2%, trisma base a 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

Solução tampão para SDS-PAGE, gel de empilhamento (stacking): utilizada na confecção do SDS-PAGE, gel de empilhamento das proteínas. Contém: EDTA a 4mM, SDS a 2%, trisma base a 50mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

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

Solução bloqueadora: utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose logo após a transferência. Contém 5% de leite em pó desnatado (Molico®) e azida sódica a 0,02%, dissolvidos em solução basal.

Solução para anticorpos: solução na qual se diluem os anticorpos específicos. Contém 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica a 0,02%, diluídos em solução basal.

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

3.3. MÉTODOS

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

Os animais foram anestesiados com tiopental na dose de 15mg/Kg de peso corporal, e utilizados após a abolição do reflexo corneano e retirada da pata à dor. Foi realizada laparotomia mediana, com exposição da veia cava inferior, e a incisão ampliada para expor a musculatura da pata traseira. Os animais controle negativo (sem insulina), receberam 0,5 ml da solução salina, e ratos de controle positivo (+) receberam 60 μg de insulina regular administrados através da veia porta.

Em experimentos preliminares para avaliação do grau máximo de fosforilação do IRS-1 e a associação deste com a fosfatase SHP2, nos tecidos hepático e muscular (músculo gastrocnêmio) demonstramos que o melhor tempo para retirada do material é entre 30 e 90 segundos respectivamente, após a infusão insulínica.

O material extraído foi imediatamente colocado no tampão de extração A, homogeneizado, com Politron PTA 20S generator, Brinkmann Instruments model PT 10/35, ajustado na velocidade máxima. Após fervura, foi mantido em gelo para o transporte, e centrifugado a 12.000 rpm por 40 minutos a 4°C (Beckman 70.1 Ti rotor) para a remoção do material insolúvel, e as alíquotas do sobrenadante foram estocadas em tampão de Laemmli, contendo 200 mM de DTT em proporção de 5:1, até a fase seguinte. Outra pequena porção do sobrenadante foi utilizada para a quantificação da concentração protéica de cada amostra, através do método de biureto.

3.3.2. “Imunoblotting”

Duzentos microgramas de extrato tecidual, por amostra, foram aplicados no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 2mm de espessura, balizado por marcador de alto peso molecular da Bio Rad que contém: miosina (205 kDa), β galactosidade (116 kDa), BSA (85 kDa) e ovalbumina (47 kDa). Realizou-se a eletroforese em cuba de minigel da Bio Rad, com solução tampão previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 25 volts por 2 horas e depois a 120 volts por mais 2 horas. A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência do minigel da Bio Rad, que foi mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas, como descrito por TOWBIN, STAEBLIN, GORDON, 1979.

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

Após a revelação das auto-radiografias e visualização das bandas, estas foram submetidas à densitometria óptica, utilizando o equipamento Eagle Eye scanner (Stratagene). Com estes dados, realizou-se a análise estatística dos diferentes grupos, através da comparação das bandas obtidas. Os resultados finais foram a variação percentual entre os ratos considerados controles e os demais grupos de ratos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

3.3.3. Imunoprecipitação

Em alguns experimentos mencionados adiante, os tecidos estudados foram extraídos e homogeneizados no tampão de extração B, em banho de gelo, e mantidos nesta temperatura durante todo processo. Após a centrifugação por 25 min, a 12000 rpm a 4° C, foi usado o sobrenadante para imunoprecipitação com anticorpos anti-IRS-1. Os volumes das amostras foram normalizados por concentração proteica e o volume do anticorpo aplicado foi fixo (10µl/amostra).

As amostras foram incubadas por 12-14h, a 4° C, acrescentando-se, a seguir, proteína-A Sepharose (50 µl) por 2 horas, a 4° C, por 15 minutos. Os precipitados foram lavados por três vezes com tampão para lavagem do imunoprecipitado.

As proteínas foram tratadas com tampão de Laemmli, contendo 100mM de DTT, aquecidas em água fervente por 5 minutos e então submetidas a eletroforese em SDS-PAGE a 6%. O procedimento de transferência e “immunoblotting” segue as etapas já descritas anteriormente. Nestes experimentos de imunoprecipitação, os anticorpos utilizados para incubar as membranas foram antifosforotirosina e o anti-SHP2.

3.3.4. Dosagem da glicemia e da insulina sérica

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

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

3.3.5 Análise estatística

Experimentos foram sempre realizados, possibilitando o estudo de todos os grupos de animais em paralelo. Para análise estatística dos resultados, utilizou-se o teste 't' de Student, não pareado, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), sendo os resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($\bar{X} \pm E.P.M.$).

4.RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS

As características gerais dos animais utilizados nos diferentes experimentos são apresentados na tabela I. Os níveis plasmáticos de glicose e de insulina descritos a seguir foram dosados em amostras coletadas de animais que permaneceram em jejum por 12 a 14h, exceto no grupo alimentado e em jejum por 72h.

Os animais que ficaram em jejum por três dias apresentaram uma perda de peso média de 32g em relação aos animais alimentados (Jejum: 179 ± 51 g X Alimentados: 211 ± 62 g $p < 0,001$). Os níveis plasmáticos de glicose foram significativamente menores no grupo com restrição alimentar (Jejum: 74 ± 2 mg/dl X Alimentados: 165 ± 8 mg/dl $p < 0,001$) e a insulina sérica também se revelou diminuída nos animais em jejum (Jejum: 13 ± 4 μ U/ml X Alimentados: 38 ± 4 μ U/ml $p < 0,001$).

O grupo de animais com 20 meses de idade apresentou peso significativamente maior que o grupo com 2 meses (Idosos: 401 ± 16 g X Jovens 157 ± 13 g $p < 0,001$), mas o nível de glicose plasmática foi semelhante nos dois grupos (Idosos: 116 ± 11 mg/dl X Jovens: 115 ± 6 mg/dl), enquanto o de insulina sérica foi maior nos ratos senis que nos jovens (Idosos 52 ± 5 μ U /ml X Jovens: 17 ± 5 μ U /ml $p < 0,001$).

Os animais tratados agudamente com adrenalina apresentaram peso semelhante ao do grupo-controle (Controles 223 ± 53 X Adrenalina: 214 ± 52). A comparação entre o nível de glicose plasmática dos animais do grupo-controle e os do grupo tratado com adrenalina não mostrou diferenças significativas (Controle: 93 ± 3 mg/dl X Adrenalina: 108 ± 5 mg/dl $p < 0,383$). Da mesma maneira, os níveis de insulina sérica também não apresentaram diferenças significativas (Controle: 18 ± 4 μ U /ml X Adrenalina: 26 ± 7 μ U /ml $p < 0,284$).

Os animais tratados com dexametasona, após 5 dias de infusão intraperitoneal da droga, apresentaram peso corporal menor que o grupo-controle (Controles: 238 ± 47 g X Dexametasona: 202 ± 39 g $p < 0,001$). Como esperado, houve uma elevação nos níveis de glicose plasmática destes animais em relação aos controles (Controles 122 ± 6 mg/dl X

Dexametasona: 224 ± 17 mg/dl p 0,001), acompanhado de uma elevação significativa nos níveis de insulina séricos (Controles: 29 ± 4 μ U /ml X Dexametasona: 46 ± 4 μ U /ml p < 0,001).

Finalmente os animais tratados com estreptozotocina, após 6 a 7 dias da injeção da droga, apresentaram peso corporal significativamente menor que o daqueles do grupo-controle (Estreptozotocina: 98 ± 4 g X Controle 141 ± 4 g p< 0,001). Como esperado, houve uma elevação marcante nos níveis glicêmicos dos animais diabéticos em relação ao controle (Estreptozotocina 363 ± 6 mg/dl X Controle 122 ± 6 mg/dl, p<0,001), acompanhada de uma redução significativa nos níveis de insulina sérica (Estreptozotocina: 6 ± 2 μ U /ml X Controle 29 ± 4 μ U /ml, p< 0,0001).

TABELA 1

GRUPOS	PESO (g)	GLICEMIA Mg/dl	INSULINA μ U /ml
Jejum	179 ± 51	74 ± 2	13 ± 4
Alimentado	211 ± 62 p<0,001	165 ± 8 p<0,001	38 ± 4 p<0,001
2 meses	157 ± 13	123 ± 5	29 ± 4
20 meses	401 ± 16 p<0,001	124 ± 11	44 ± 5 p<0,001
Adrenalina	223 ± 54	108 ± 5	26 ± 7
Controle	214 ± 52	93 ± 3	18 ± 4
Dexametasona	202 ± 39	224 ± 17	46 ± 4
Controle	238 ± 47 p<0,001	122 ± 6 p<0,001	29 ± 4 p<0,001
Estreptozotocina	151 ± 4	362 ± 16	6 ± 2
Controle	98 ± 4 p<0,001	122 ± 6 p<0,001	29 ± 4 p<0,001

4.1.1. Determinação do tempo de fosforilação e associação IRS-1/SHPTP2 em fígado

As figuras 1 a e b resumem os resultados obtidos em amostras de fígado previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e submetidas a “imunoblotting” com anticorpo antifosforotirosina e anti-SHPTP2. A figura 1a mostra que no fígado ocorre um aumento da fosforilação aos 30 segundos de aproximadamente 8 vezes em relação ao basal após o estímulo insulínico, e decresce paulatinamente, retornando a níveis próximos ao basal aos 10 minutos.

Estudos anteriores demonstraram (KUHNE *et al* 1993; CHEATHAM & KAHN 1995) que há uma associação relativamente estável, de alta afinidade entre o IRS-1 e a fosfatase SHP2 e que ambas as proteínas podem ser co-precipitadas por anticorpos contra a outra. Neste sentido, as mesmas membranas que continham proteínas precipitadas com anticorpo anti-IRS-1 foram submetidas a “blotting” com anticorpo anti-SHP2. Os resultados demonstraram que durante este período de 30 segundos em que o IRS-1 está fosforilado, ocorre o maior pico de associação da proteína SHP2 com IRS-1, um aumento de aproximadamente 6 vezes em relação ao basal, que depois decresce paulatinamente, como mostra a figura 1b. Estes experimentos foram realizados 6 vezes.

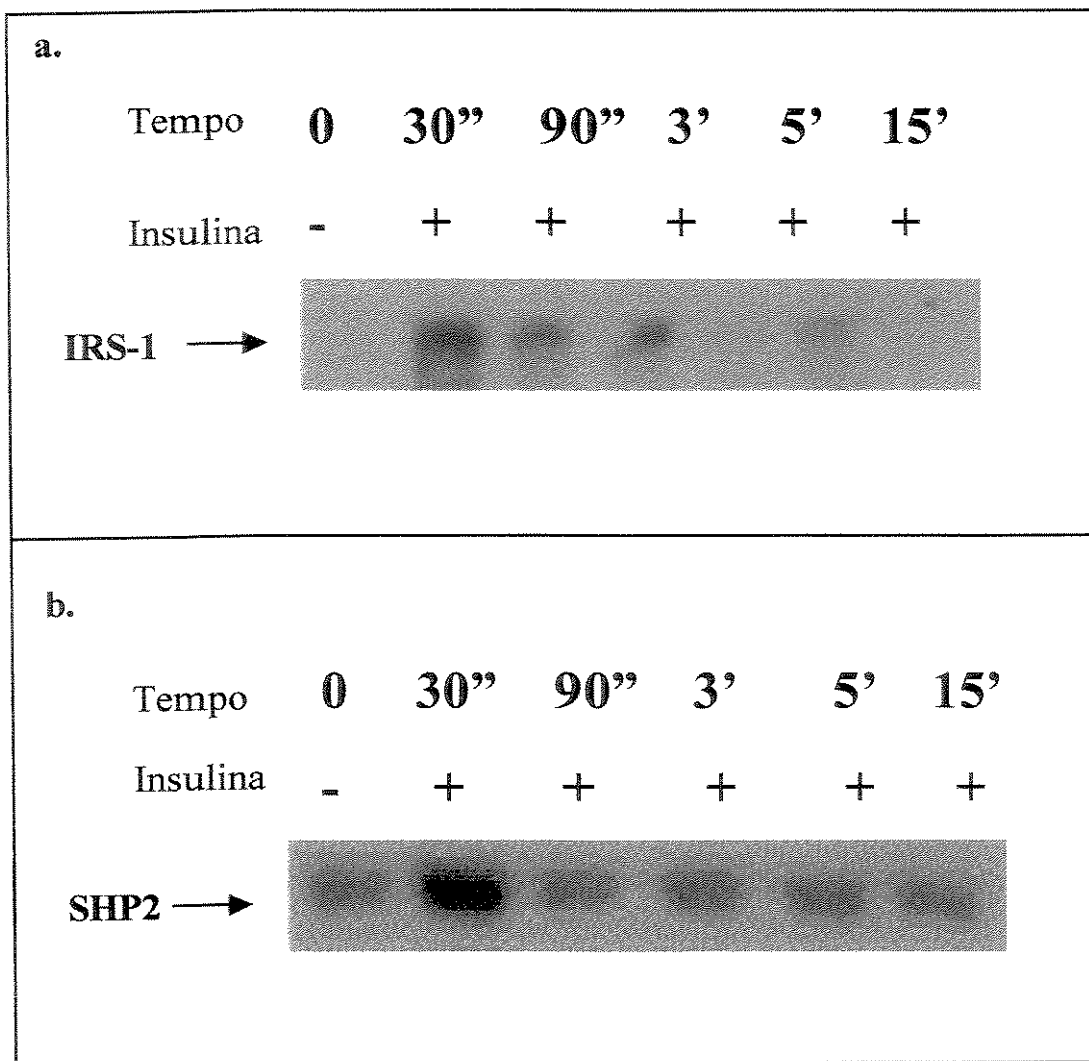


Figura 1. Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 e associação com SHP2 em diferentes tempos. a: Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em tecido hepático, antes (zero) e após a infusão de insulina, em diferentes tempos (0, 30", 90", 3', 5' e 15'). Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a "immunoblotting" com anticorpo antifosfotirosina. **b:** Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido hepático, antes (zero) e após a infusão de insulina, em diferentes tempos (0, 30", 90", 3', 5' e 15'). Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a "mmunoblotting" com anticorpo anti-SHP2.

4.1.2. Determinação do tempo de fosforilação do IRS-1 e associação IRS-1/SHP2 em músculo.

As figuras 2 a e b resumem os resultados obtidos em amostras de músculo previamente imunoprecipitadas com anticorpo IRS-1 e submetidas a “imunoblotting” com anticorpo antifosforotirosina e anti-SHP2. A figura 2a, demonstra que o aumento da fosforilação no tecido muscular inicia-se aos 30 segundos, porém o pico máximo de fosforilação ocorre aos 90 segundos, após o estímulo insulínico com uma queda gradativa em seguida.

De maneira semelhante ao realizado para extratos de tecido hepático, amostras de tecido muscular previamente imunoprecipitados com anticorpos anti-IRS1 foram (após separação em SDS-PAGE e transferência para membrana de nitrocelulose) incubadas com anticorpos anti-SHP2. Os resultados demonstraram que também em tecido muscular, após estímulo com insulina, ocorre a associação do IRS-1 fosforilado com a proteína SHP2. A associação inicia-se aos 30 segundos e permanece até os 90 segundos, quando o pico de associação é máximo, diminuindo gradativamente, como mostra a figura 2b. Estes experimentos foram realizados 6 vezes.

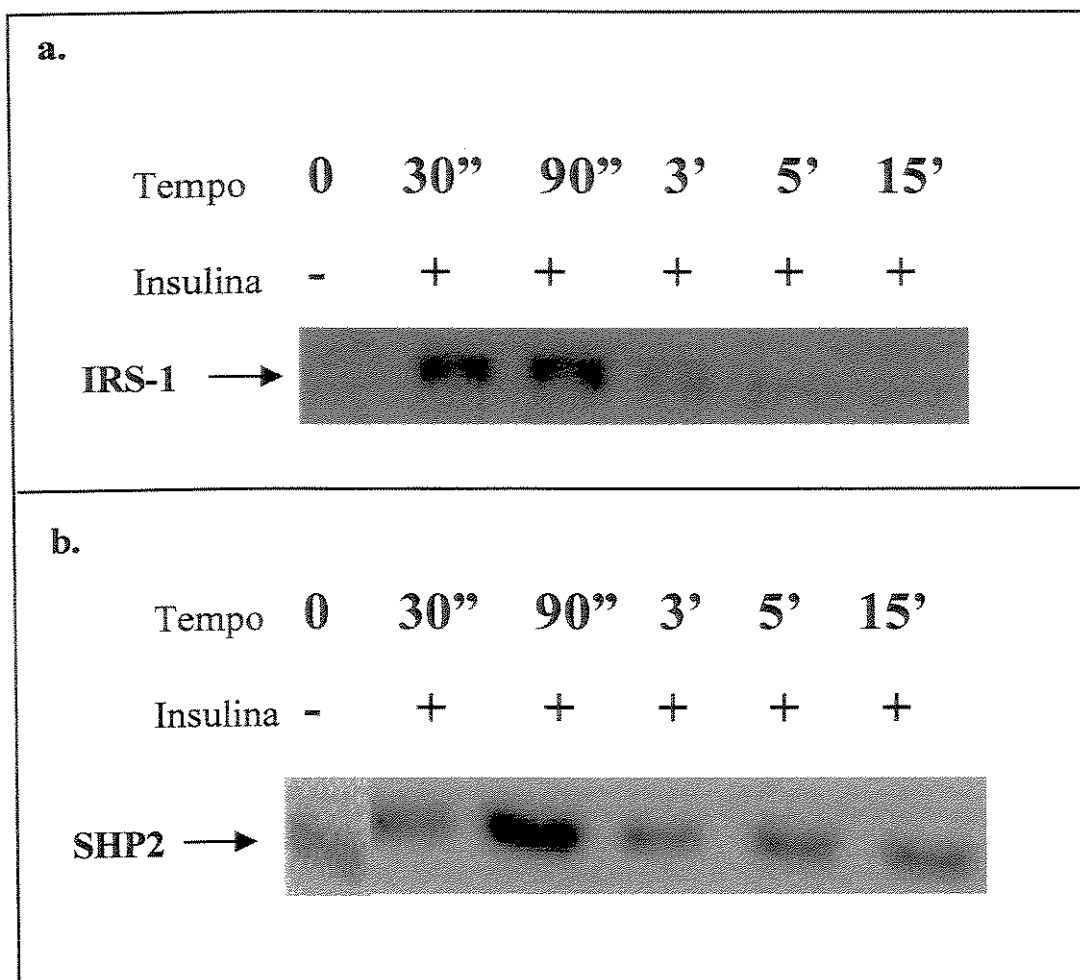


Figura 2. Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 e associação com SHP2 em diferentes tempos. a: Avaliação do grau de fosforilação do IRS-1 em tecido muscular, antes (zero) e após a infusão de insulina, em diferentes tempos (0, 30", 90", 3', 5' e 15'). Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a "immunoblotting" com anticorpo anti-fosfotirosina. **b:** Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido muscular, antes (zero) e após a infusão de insulina, em diferentes tempos (0, 30", 90", 3', 5' e 15'). Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a "immunoblotting" com anticorpo anti-SHP2.

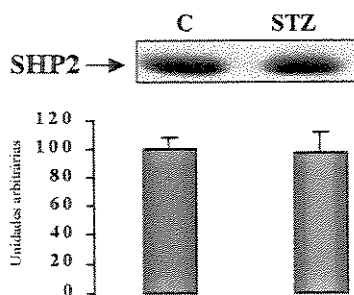
4.1.3. Efeito do tratamento com estreptozotocina na expressão da proteína SHP2, no grau de fosforilação do IRS-1 e associação deste com a SHP2 em tecidos muscular e hepático de ratos.

Usando anticorpo específico anti-SHP2, o nível desta proteína não mostrou alteração em tecido hepático de ratos tratados com STZ, (figura 3a). Amostras de fígado de ratos diabéticos previamente imunoprecipitadas com anticorpo para IRS-1 e submetidas ao “imunoblotting” com anticorpo antifosforotirosina e anti-SHP2, apresentaram um aumento significativo no grau de fosforilação do IRS-1 induzido por insulina, em relação ao grupo-controle (Controle $100 \pm 7\%$; STZ $141 \pm 12\%$; $p < 0.05$), (figura 3b). Por outro lado, a associação induzida pela insulina IRS-1/SHP2 nos animais diabéticos não apresentou mudança significativa quando comparados com o controle (figura 4a). O grau de fosforilação do AKT/PKB induzido por insulina foi reduzido para $65 \pm 6\%$; $p < 0,035$, em tecido hepático dos ratos tratados com STZ quando comparados com o controle (figura 4b).

Semelhante ao tecido hepático não encontramos alteração do nível protéico do SHP2 em músculo de animais diabéticos, (figura 5a). Em amostras de músculo de ratos tratados com STZ houve um aumento no grau de fosforilação após o estímulo com a insulina em relação ao grupo controle (Controle $100 \pm 13\%$; STZ $191 \pm 14\%$; $p < 0.036$), (figura 5b). A figura 6a mostra que não houve alteração na associação entre IRS-1/SHP2, após estímulo com insulina, em tecido muscular de ratos tratados com STZ, quando comparados com o controle. A figura 6b mostra que houve uma redução do grau de fosforilação do AKT/PKB induzido por insulina ($70 \pm 7\%$; $p < 0,04$) nos animais tratados com STZ, quando comparados com o controle.

a. Nível protéico da SHP2

Blot.: α SHP2



b. Fosforilação do IRS-1

IP: α IRS-1

IB: α PY

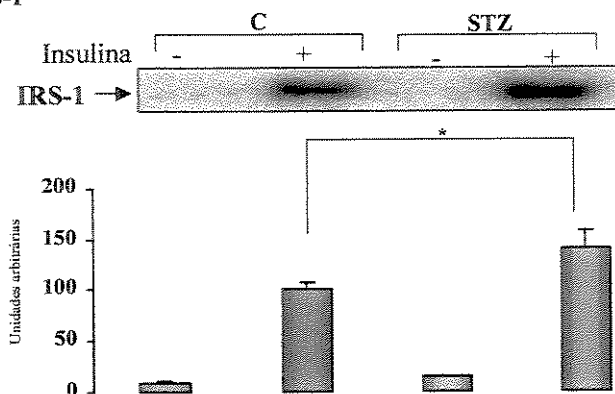
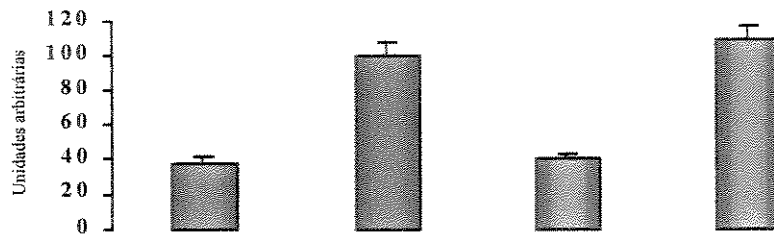
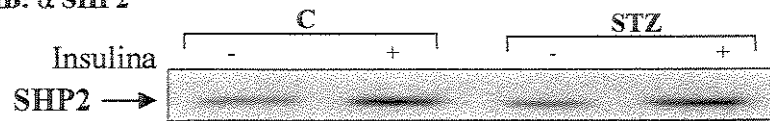


Figura 3. Efeito do tratamento com STZ sobre a concentração protéica do SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. a: Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (STZ). Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. b: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (STZ), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$.

a. Associação da SHP2

IP: α IRS-1

IB: α SHP2



b. Fosforilação do AKT

Blot: α AKT

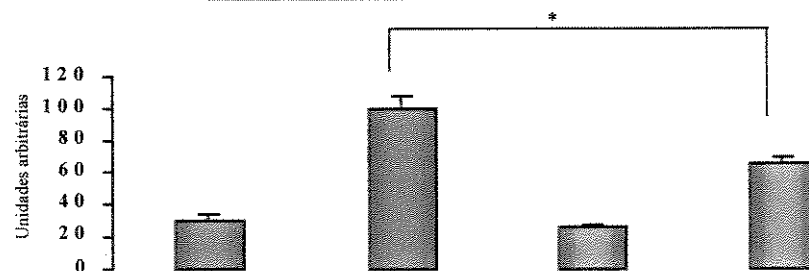
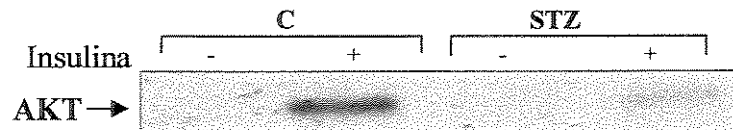
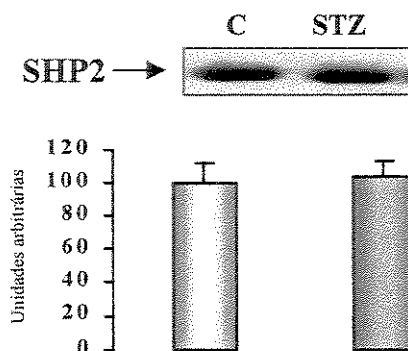


Figura 4. Efeito do tratamento com STZ sobre a associação IRS-1/SHP2 e o grau de fosforilação do AKT/PKB. a: Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (STZ), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em serina do AKT em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (STZ), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-AKT. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

a. Nível protéico da SHP2

Blot.: α SHP2



b. Fosforilação do IRS-1

IP: α IRS-1

IB: α PY

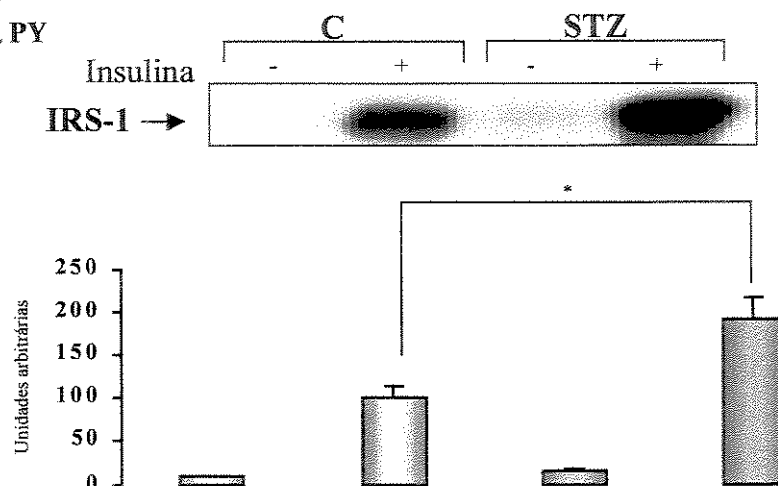
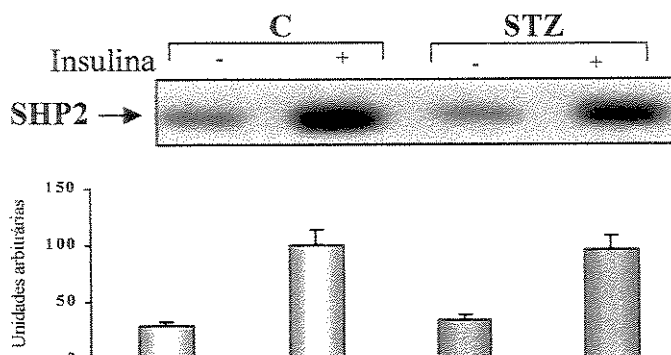


Figura 5. Efeito do tratamento com STZ sobre a concentração protéica do SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. a: Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (STZ). Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. b: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (STZ), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

a. Associação da SHP2

IP: α IRS-1

IB: α SHP2



b. Fosforilação do AKT

Blot: α AKT

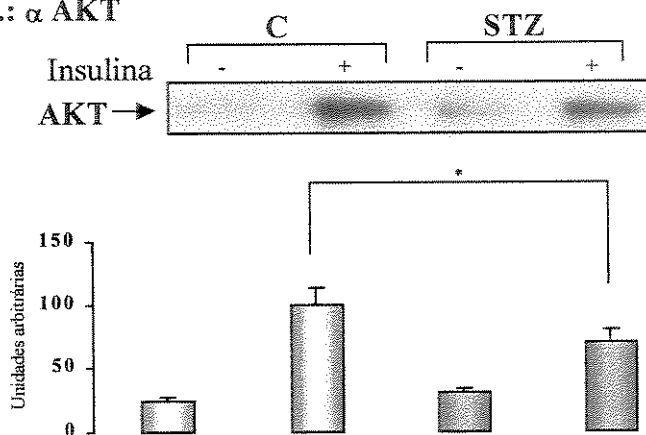


Figura 6. Efeito do tratamento com STZ sobre a associação IRS-1/SHP2 e o grau de fosforilação do AKT/PKB. a: Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (STZ), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. b: Avaliação do grau de fosforilação em serina do AKT em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-AKT. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$.

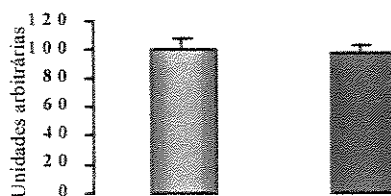
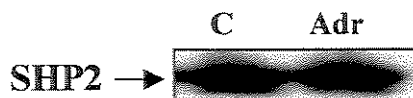
4.1.4. Efeito do uso agudo de adrenalina na expressão da proteína SHP2, no grau de fosforilação do IRS-1 e associação deste com a SHP2 em tecidos hepático e muscular.

O tratamento com adrenalina não produziu alteração no nível da proteína SHP2, (figura 7a). Entretanto, o grau de fosforilação do IRS-1 induzido por insulina, depois do tratamento agudo com adrenalina apresentou uma diminuição significativa como mostra a figura 7b (Controle $100 \pm 9\%$; Adr $37 \pm 3\%$; $p < 0.019$) em tecido hepático, acompanhado de uma diminuição da associação IRS-1/SHP2 neste tecido (Controle $100 \pm 2\%$; Adr $52 \pm 3\%$; $p < 0.002$), (figura 8a). A fosforilação do AKT/PKB após o estímulo com insulina foi significativamente reduzido para $60 \pm 5\%$; $p < 0,045$ em tecido hepático dos animais tratados com adrenalina (figura 8b).

O efeito da adrenalina no nível protéico da SHP2 do tecido muscular foi semelhante ao tecido hepático, (figura 9a). O grau de fosforilação do IRS-1 e a associação IRS-1/SHP2 em tecido muscular de ratos tratados com adrenalina foi similar ao fígado. Houve uma diminuição no grau de fosforilação do IRS-1, induzida por insulina (Controle $100 \pm 9\%$; Adr $37 \pm 3\%$; $p < 0.003$), como demonstrado em experimento com amostras de músculo que foram imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e submetidas ao “immunoblotting” com anticorpo antifosforotirosina (figura 9b), ocorrendo fato idêntico na associação IRS-1/SHP2 destas mesmas amostras quando foram submetidas ao “immunoblotting” com anticorpo SHP2, (Controle $100 \pm 20\%$; Adr $20 \pm 7\%$; $p < 0.041$), (figura 10a). A fosforilação do AKT/PKB foi reduzida para $70 \pm 6\%$, $p < 0,030$, em músculo de ratos tratados agudamente com adrenalina (figura 10b).

a. Nível protéico da SHP2

Blot.: α SHP2



b. Fosforilação do IRS-1

IP: α IRS-1

IB: α PY

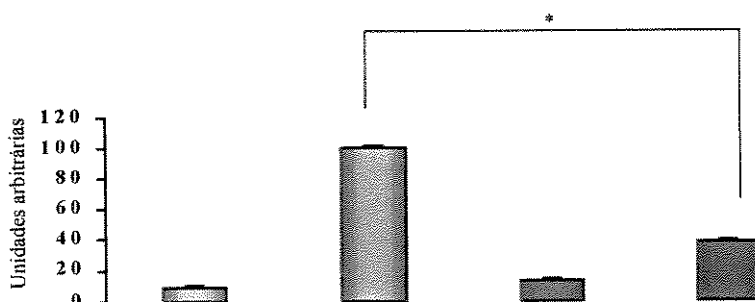
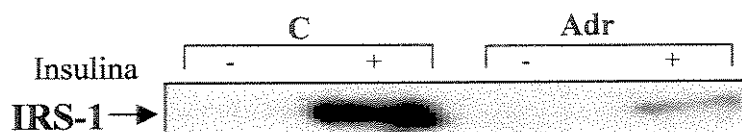
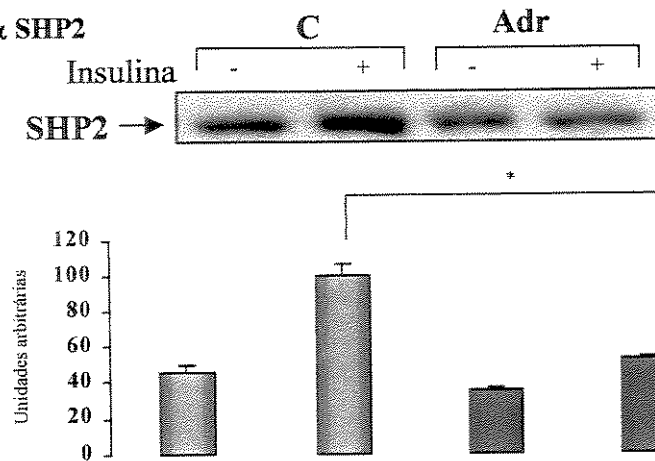


Figura 7. Efeito do tratamento agudo com adrenalina sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. **a:** Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (Adr.). Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$.

a. Associação da SHP2

IP: α IRS-1

IB: α SHP2



b. Fosforilação do AKT

Blot.: α AKT

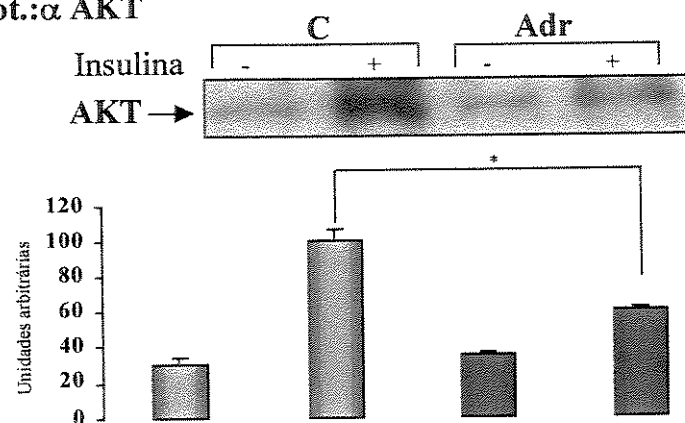
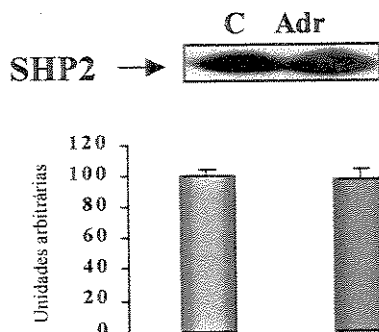


Figura 8. Efeito do tratamento agudo com adrenalina sobre a associação do IRS-1/SHP2 e o grau de fosforilação do AKT/PKB. **a:** Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em serina do AKT em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-AKT. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p < 0,05$.

a. Nível Protéico da SHP2

Blot: α SHP2



b. Fosforilação do IRS-1

IP: α IRS-1

IB: α SHP2

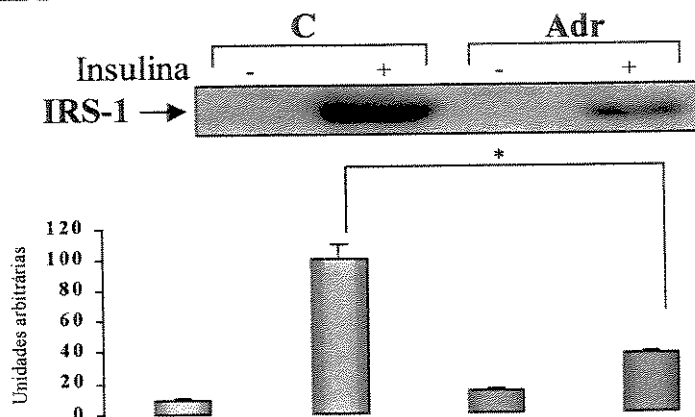
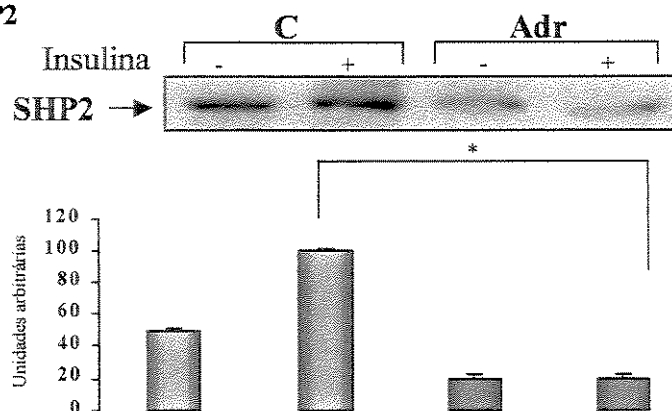


Figura 9. Efeito do tratamento agudo com adrenalina sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. **a:** Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (Adr.). Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$.

a. Associação da SHP2

IP: α IRS-1

IB: α SHP2



b. Fosforilação do AKT

Blot: α AKT

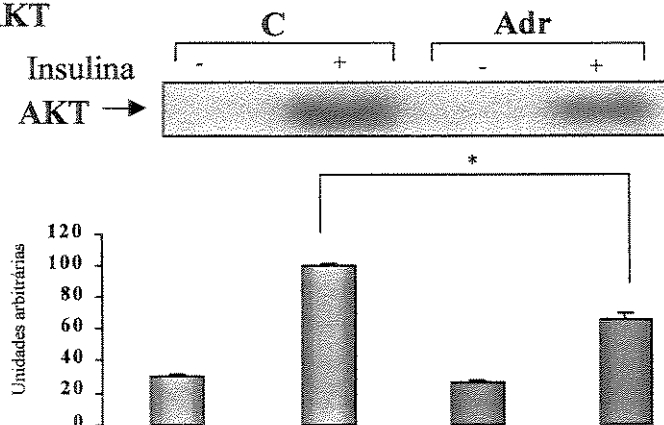


Figura 10. Efeito do tratamento agudo com adrenalina sobre a associação do IRS-1/SHP2 e o grau de fosforilação do AKT/PKB. a: Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em serina do AKT em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (Adr.), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-AKT. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p < 0,05$.

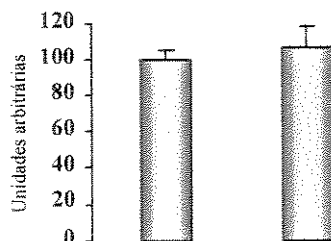
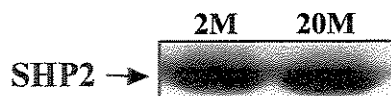
4.1.5. Efeito do envelhecimento na expressão da proteína SHP2, no grau de fosforilação do IRS-1 e associação deste com a SHP2 em tecidos muscular e hepático de ratos.

Os ratos com 20 meses não apresentaram alteração no nível protéico de SHP2 em tecido hepático quando comparados com ratos jovens, (figura 11a). Como mostra a figura 11b, amostras de tecido hepático foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti IRS-1 e depois incubadas com antifosforotirosina ou SHP2. A fosforilação do IRS-1 induzida por insulina foi reduzida significativamente nos animais senis (Jovens $100 \pm 12\%$; Senis $64 \pm 7\%$; $p < 0.029$). Quando estas amostras foram submetidas ao “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2, observamos um aumento na associação IRS-1/SHP2, após infusão de insulina, em ratos senis (Jovens 100 ± 11 ; Senis $155 \pm 9\%$; $p < 0.012$)-(figura 12a). Não houve alteração no grau de fosforilação do AKT/PKB, após o estímulo de insulina, em tecido hepático dos ratos senis quando comparados ao controle (figura 12b).

Não houve mudança no nível da proteína SHP2, em tecido muscular de ratos com 20 meses em relação ao controle, (figura 13a). A figura 13b mostra que nas amostras de tecido muscular que foram imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e submetidas ao “immunoblotting” com anticorpo antifosforotirosina, ocorreu uma redução do grau de fosforilação desta proteína, em ratos com 20 meses (Jovens $100 \pm 4\%$; Senis $50 \pm 7\%$; $p < 0.007$). Quando estas membranas foram incubados com anticorpo anti-SHP2, observamos uma redução da associação induzida por insulina do IRS-1/SHP2 em ratos com 20 meses (Jovens $100 \pm 8\%$; Senis $48 \pm 12\%$; $p < 0.034$) em amostras de tecido muscular (figura 14a), e a fosforilação do AKT/PKB, após tratamento com insulina foi reduzida para $70 \pm 6\%$ em relação ao grupo-controle, $p < 0,05$ (figura 14b).

a. Nível Protéico da SHP2

Blot.: α SHP2



b. Fosforilação do IRS-1

IP: α IRS-1

IB: α PY

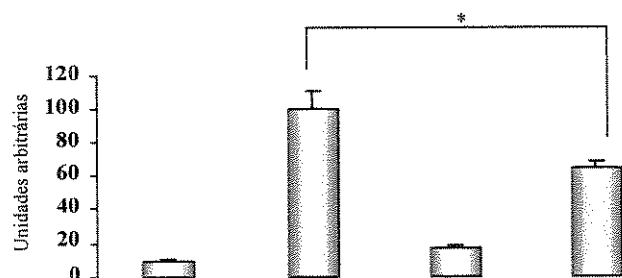
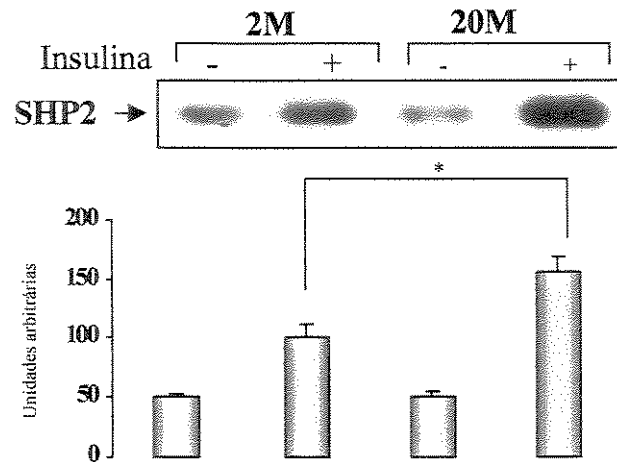


Figura 11. Efeito do envelhecimento sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. a: Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido hepático de ratos com 2 e 20 meses de idade. Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. b: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido hepático de ratos com 2 e 20 meses de idade, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$.

a. Associação da SHP2

IP: α IRS-1

IB: α SHP2



b. Fosforilação do AKT

Blot: α AKT

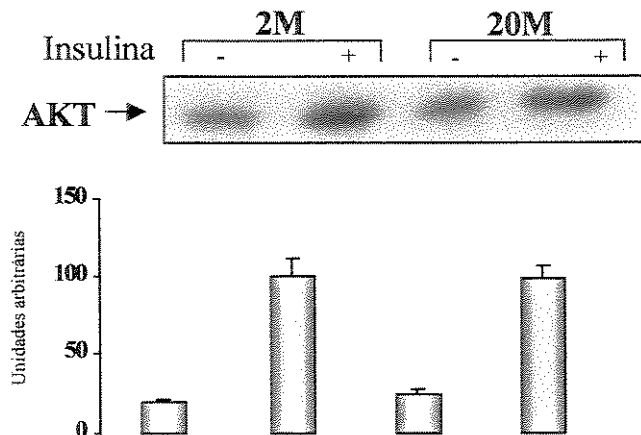
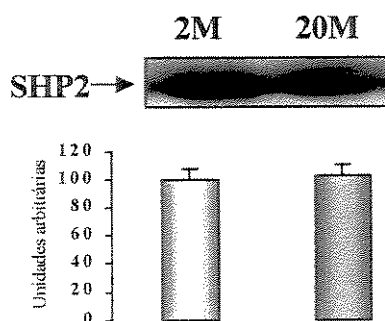


Figura 12. Efeito do envelhecimento sobre a associação do IRS-1/SHP2 e o grau de fosforilação do AKT/PKB. a: Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido hepático de ratos com 2 e 20 meses de idade, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em serina do AKT em tecido hepático de ratos com 2 e 20 meses de idade, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-AKT. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p < 0,05$.

a. Nível Protéico da SHP2

Blot: α SHP2



b. Fosforilação do IRS-1

IP: α IRS-1

IB: α PY

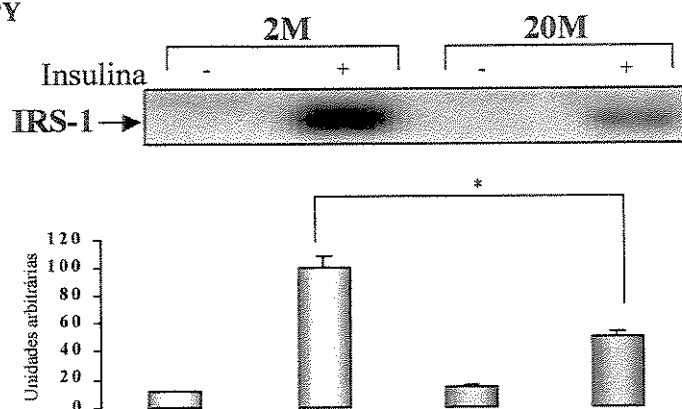
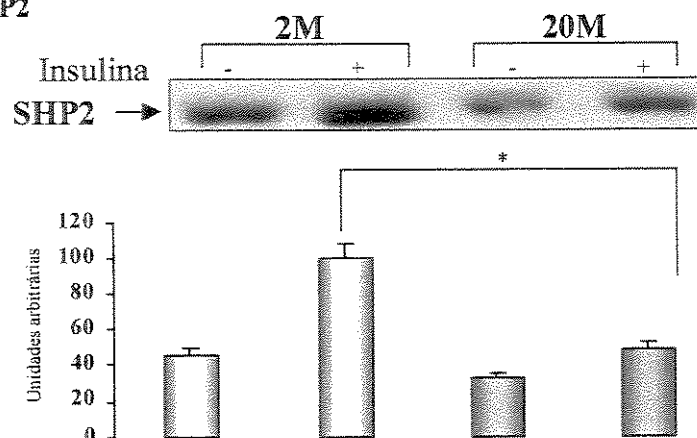


Figura 13. Efeito do envelhecimento sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. a: Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido muscular de ratos com 2 e 20 meses de idade. Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. b: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido muscular de ratos com 2 e 20 meses de idade, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$.

a. Associação da SHP2

IP: α IRS-1

IB: α SHP2



b. Fosforilação do AKT

Blot.: α AKT

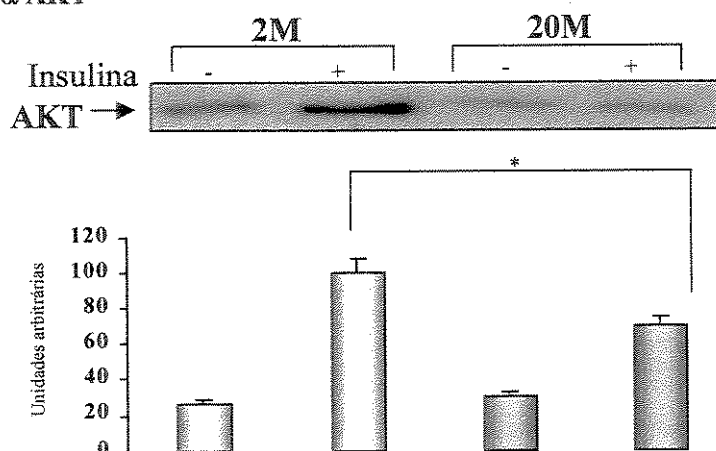


Figura 14. Efeito do envelhecimento sobre a associação do IRS-1/SHP2 e o grau de fosforilação do AKT/PKB. a: Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido muscular de ratos com 2 e 20 meses de idade, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. b: Avaliação do grau de fosforilação em serina do AKT em tecido muscular de ratos com 2 e 20 meses de idade, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-AKT. A densitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

4.1.6. Efeito do jejum prolongado na expressão da proteína SHP2, no grau de fosforilação do IRS-1 e associação deste com a SHP2 em tecidos muscular e hepático de ratos.

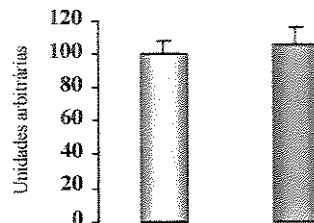
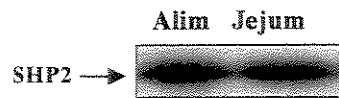
As figuras 15a, b e 16a resumem os resultados da quantidade protéica, do grau de fosforilação do IRS-1 e a associação IRS-1/SHP2 em amostras de fígado e músculo de ratos alimentados ou em jejum de 72 horas, previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e submetidas ao “imunoblotting” com anticorpo antifosforotirosina e anti-SHP2.

O jejum prolongado em ratos não alterou a quantidade protéica da SHP2 em tecido hepático em relação aos animais alimentados (figura 15a). Após a infusão de insulina houve um aumento significativo no grau de fosforilação do IRS-1 após jejum de 72 horas em comparação aos alimentados. (Alim $100 \pm 6\%$; Jejum $152 \pm 13\%$; $p=0,007$). O aumento no grau de fosforilação é facilmente evidenciado na figura 15b. No tecido hepático também houve um aumento da associação induzida por insulina, das proteínas IRS-1/SHP2, (Alim $100 \pm 6\%$; Jejum $136 \pm 7\%$; $p=0,035$), (figura 16a).

No tecido muscular de ratos com jejum de 72 horas, a quantidade protéica não se alterou quando comparados com os animais alimentados (figura 17a). Houve um aumento no grau de fosforilação do IRS-1 induzido pela insulina (Alim $100 \pm 11\%$; Jejum $155 \pm 2\%$; $p<0,004$), acompanhado do aumento da associação IRS-1/SHP2 (Alim $100 \pm 7\%$; Jejum $162 \pm 7\%$; $p<0,019$), como mostra a figura 17b e 18a.

a. Nível protéico da SHP2

Blot.: α SHP2



b: Fosforilação do IRS-1

IP: α IRS-1

IB: α PY

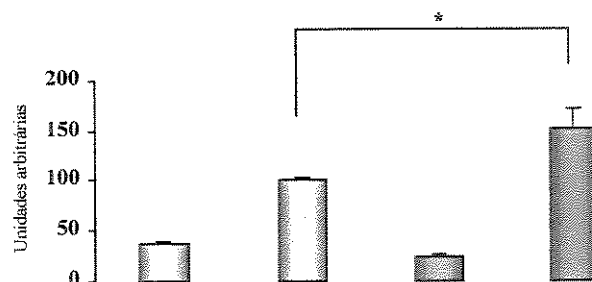
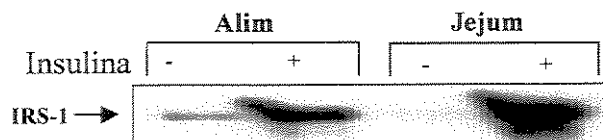


Figura 15. Efeito do jejum sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. a: Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido hepático de ratos alimentados (controle) e mantidos de jejum prolongado. Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. b: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido hepático de ratos alimentados e mantidos de jejum prolongado, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$.

a. Associação da SHP2

IP: α IRS-1

IB: α SHP2

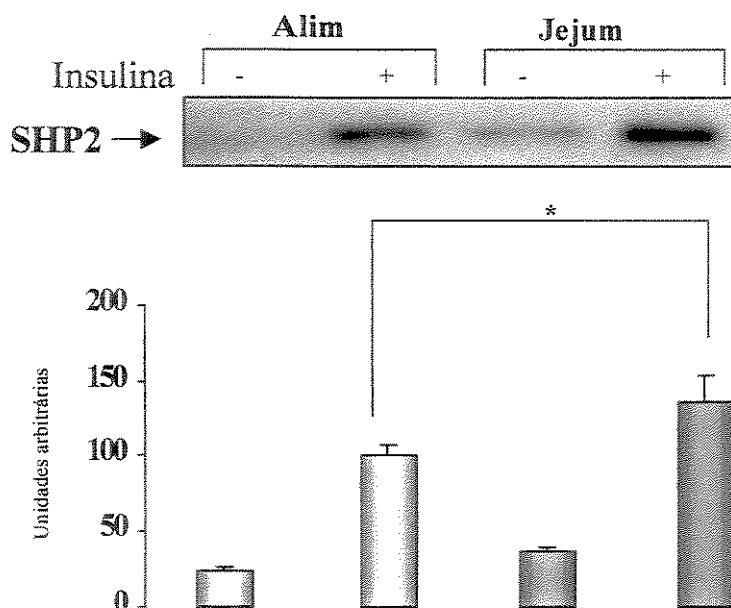
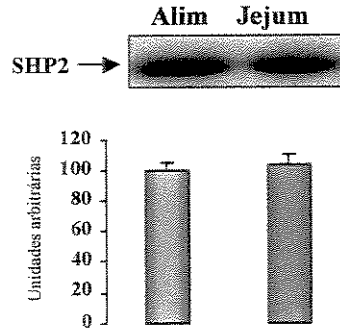


Figura 16. Efeito do jejum sobre a associação do IRS-1/SHP2. a: Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido hepático de ratos alimentados e mantidos de jejum prolongado, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

a. Nível protéico da SHP2

Blot.: α SHP2



b: Fosforilação do IRS-1

IP: α IRS-1

IB: α PY

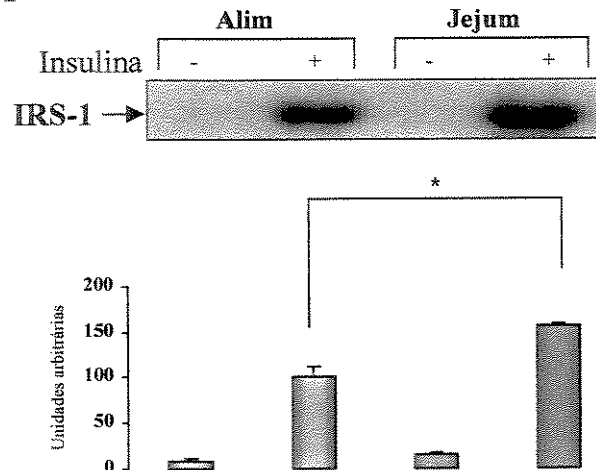


Figura 17. Efeito do jejum sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. **a:** Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido muscular de ratos alimentados (controle) e mantidos de jejum prolongado. Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido muscular de ratos alimentados e mantidos de jejum prolongado, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p < 0,05$.

a. Associação da SHP2

IP: α IRS-1

IB: α SHP2

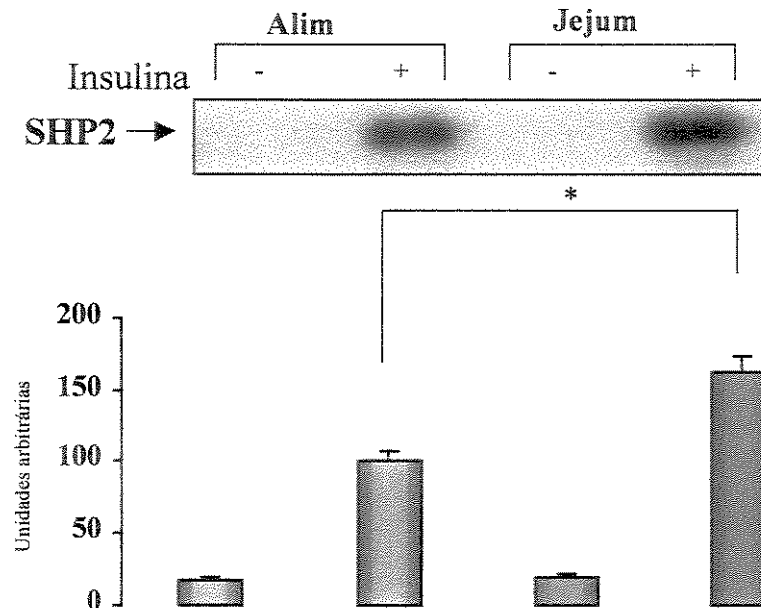


Figura 18. Efeito do jejum sobre a associação do IRS-1/SHP2. a: Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido muscular de ratos alimentados e mantidos de jejum prolongado, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$.

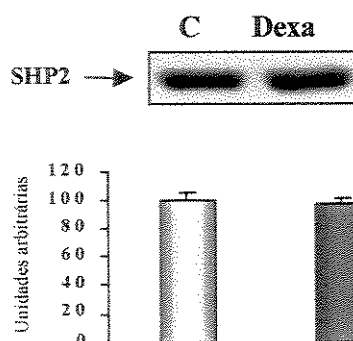
4.1.7. Efeito do tratamento crônico com dexametasona na expressão da proteína SHP2, no grau de fosforilação do IRS-1 e associação deste com a SHP2 em tecidos muscular e hepático de ratos.

Como mostra a figura 19a não ocorreu alteração no nível protéico da SHP2 em tecido hepático de ratos tratados com dexametasona. Nossos resultados demonstraram que o grau de fosforilação do IRS-1, após infusão de insulina em tecido hepático dos ratos tratados com corticosteroide, foi reduzido significativamente em comparação ao controle. (Controle $100 \pm 10\%$; Dexa $48 \pm 5\%$; $p < 0,040$)-(figura 19b). Entretanto, a associação IRS-1/SHP2, após o estímulo com insulina, foi similar nos dois grupos estudados (Controle $100 \pm 2\%$, Dexa $110 \pm 11\%$)-(figura 20a).

Em amostras de tecido muscular também não encontramos alterações dos níveis protéicos da SHP2, (figura 21a). Houve uma redução no grau de fosforilação do IRS-1 após o estímulo com insulina nos animais tratados em comparação aos controles. (Controle $100 \pm 10\%$; Dexa $36 \pm 5\%$; $p < 0,035$)-(figura 21b). De maneira similar ao tecido hepático, no músculo não houve alteração da associação IRS-1/SHP2 induzida por insulina entre os grupos estudados (Controle $100\% \pm 7\%$; Dexa $114\% \pm 10\%$), (figura 22a).

a. Nível protéico da SHP2

Blot.: α SHP2



b. Fosforilação do IRS-1

IP: α IRS-1

IB: α PY

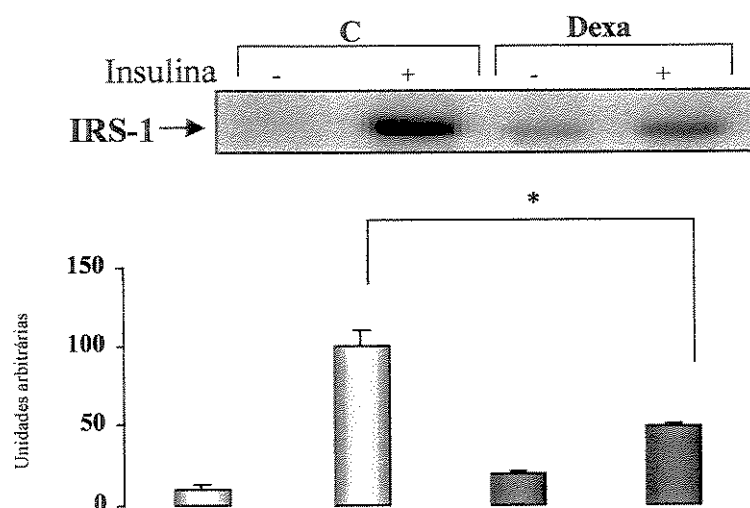


Figura 19. Efeito do tratamento crônico com dexametasona sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. a: Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (Dexa). Amostras de tecido hepático de ratos foram submetidas “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido hepático de ratos- controle (C) e tratados (Dexa), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como * $p < 0,05$.

a. Associação da SHP2

IP: α IRS-1

IB: α SHP2

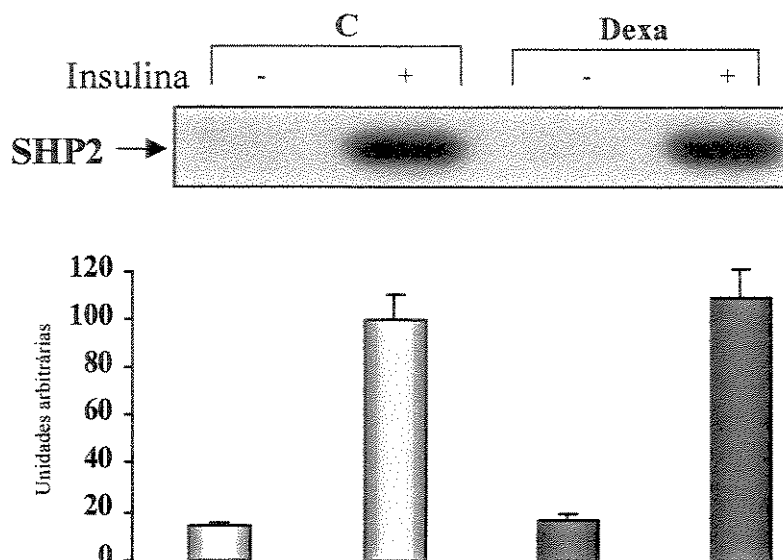
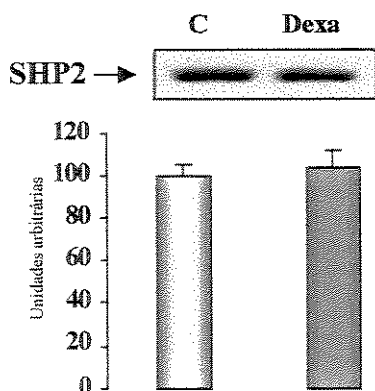


Figura 20. Efeito do tratamento crônico com dexametasona sobre a associação do IRS-1/SHP2. a: Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido hepático de ratos-controle (C) e tratados (Dexa), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido hepático de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. A desitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p < 0,05$.

a. Nível protéico da SHP2

Blot.: α SHP2



b: Fosforilação do IRS-1

IP: α IRS-1

IB: α PY

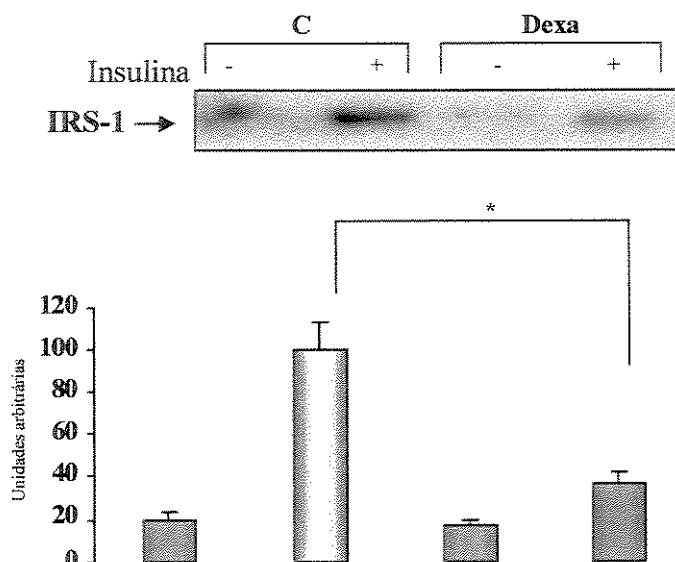


Figura 21. Efeito do tratamento crônico com dexametasona sobre a concentração protéica da SHP2 e o grau de fosforilação do IRS-1. **a:** Avaliação do nível protéico da SHP2 em tecido muscular de ratos- controle (C) e tratados (Dexa). Amostras de tecido muscular de ratos foram submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. **b:** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do IRS-1 em tecido muscular de ratos controles (C) e tratados (Dexa), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com antifosfotirosina. A desitometria óptica foi realizada nas auto-radiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p < 0,05$.

a: Associação da SHP2

IP: α IRS-1

IB: α SHP2

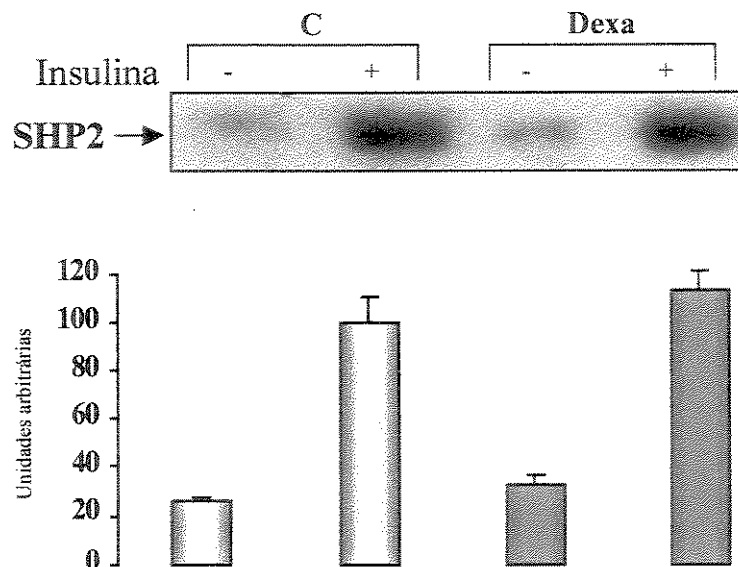


Figura 22. Efeito do tratamento crônico com dexametasona sobre a associação do IRS-1/SHP2. a: Avaliação da associação IRS-1/SHP2 em tecido muscular de ratos-controle (C) e tratados (Dexa), antes (-) e após (+) infusão de insulina. Amostras de tecido muscular de ratos foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1, e submetidas a “immunoblotting” com anticorpo anti-SHP2. A desitometria óptica foi realizada nas autoradiografias de 10 experimentos. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, e a significância expressa como $*p<0,05$.

5. DISCUSSÃO

A insulina inicia suas ações metabólicas e promotoras de crescimento quando se liga à subunidade α de seu receptor tetramérico, estimulando assim a capacidade tirosina quinase na subunidade β . Isto catalisa a autofosforilação intramolecular de tirosinas específicas nesta subunidade, aumentando a atividade tirosina quinase dirigida a substratos endógenos intracelulares. Este evento inicial leva à fosforilação de proteínas citoplasmáticas coletivamente denominadas pp 185, cujo componente melhor estudado até o momento é chamado substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) (SUN *et al.*; 1991; SUN *et al.*, 1992).

Evidências provenientes de trabalhos que se utilizam de metodologias variadas provam que a atividade tirosina quinase do receptor e a fosforilação do IRS-1 são essenciais para a maioria dos efeitos biológicos da insulina.

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

Inicialmente, os estudos experimentais sobre o processo de sinalização insulínica utilizavam receptores parcialmente purificados, e a atividade tirosina quinase era determinada *in vitro*, em direção a substratos exógenos tais como histonas (ROTHENBERG, WHITE, KHAN, 1990). Embora tais procedimentos fossem úteis na compreensão da fisiologia do receptor, eles estavam sujeitos a artefatos bioquímicos resultantes da homogeneização do tecido e da purificação do receptor, como proteólise e desfosforilação, em razão de fosfatases contaminantes presentes no meio (KATHURIA *et al.*, 1986). A remoção do receptor da membrana plasmática também interfere nas interações com outros componentes celulares, podendo influenciar em sua atividade tirosina quinase (FEHLMAN *et al.*, 1985). Além disso, a atividade quinase quando estudada *in vitro*, apresenta diferenças dependendo do substrato utilizado (ROTHENBERG *et al.*, 1990).

O protocolo experimental utilizado neste trabalho-estimulação *in vivo* com insulina, extração e homogeneização dos tecidos hepáticos e muscular em tampões desnaturantes ou em condições apropriadas para imunoprecipitação, e posterior “immunoblotting” com anticorpos específicos, permitiu uma avaliação das etapas iniciais da

ação insulínica nestes dois importantes tecidos para a homeostase da glicose (SAAD *et al.*, 1989). A metodologia aplicada neste estudo permitiu uma avaliação direta da fosforilação em tirosinas do IRS-1, bem como sua associação com outras proteínas (SAAD *et al.*, 1992).

Em estudos *in vivo* em cultura de células e em sistemas reconstituídos *in vitro*, o IRS-1 fosforilado associa-se à enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) ativando-a (BACKER *et al.*, 1992; FOLLI *et al.*, 1992). Em estudos anteriores, demonstrou-se que esta associação e ativação também ocorrem em dois importantes tecidos insulino-sensíveis de ratos, fígado e músculo, em concentração fisiológicas de insulina (FOLLI *et al.*, 1992; SAAD *et al.*, 1993). A enzima PI 3-quinase apresenta uma subunidade de 110 kDa e uma regulatória de 85 kDa que contém duas porções SH2 e uma SH3 (CARPENTER & CANTLEY, 1990). Estudo de CHEATHAM *et al.*, (1994) demonstrou que a ativação da PI 3-quinase é essencial para o transporte de glicose, pois o tratamento de células com um inibidor específico desta enzima, o “wortmonnim”, bloqueia também a captação dessa hexose.

Assim, a insulina estimula a fosforilação do IRS-1 e o IRS-1 fosforilado se liga a outras moléculas de sinalização intracelular, propagando o sinal insulínico. Além da PI 3-quinase, pelo menos três outras proteínas com porção SH2 associam-se ao IRS-1: Syp, Nck, e GRB-2 (KUHNE *et al.*, 1993, CHEATHAM & KAHN, 1995).

A proteína Syp é uma fosfatase, também denominada de SHP2 ou PTP1D, fazendo parte da família de fosfatases tirosina-específicas, citosólica, de 68 kDa, que apresenta duas porções SH2 na parte N terminal e uma SH2 na carboxil terminal. Estas porções SH2 controlam a ligação da SHP2 com receptores do fator de crescimento epidérmico (EGF), receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e do IRS-1 (SUN *et al.*, 1992), levando à ativação desta fosfatase. Também a porção SH2 regula a atividade catalítica da SHP2. Demonstrou-se que SH2 não ocupados mantêm a atividade da fosfatase sob inibição, enquanto a ligação de proteínas fosforiladas em tirosina ou peptídeos aumenta esta atividade.

Acredita-se que a função de fosfatases-fosfotirosinas seja inibitória ou de inativação de vias de ativação das quinases. Entretanto, a fosfatase (SHP2) desempenha função efetora positiva, mas seu papel nas vias de transmissão do sinal insulínico não está completamente esclarecido, embora um grande avanço tenha sido observado nos últimos anos.

A finalização da ação da insulina pode ocorrer em consequência da desfosforilação de ambos, receptor e substrato 1 do receptor de insulina. A fosfotirosina fosfatase responsável por esta desfosforilação não foi identificada. KUHNE *et al.*, (1993), usando proteínas recombinantes, demonstraram que IRS-1 é rapidamente desforilado pela SHP2 *in vitro*, sugerindo que a fosfatase (SHP2) pode ser a enzima que desfosforila o IRS-1, bem como a chave principal na finalização da sinalização insulínica. Esses resultados não foram confirmados *in vivo* (YAMAUCHI *et al.*, 1995; NOGUCHI *et al.*, 1994), e atualmente não se aceita que a SHP2 contribua para desfosforilar o IRS-1 em condições fisiológicas.

MILARSKI & SALTIEL, (1994) utilizando células transfectadas com SHP2 cataliticamente inativas, demonstraram que após estímulo insulínico a ativação da MAP quinase ficava muito reduzida, sugerindo um papel importante para esta fosfatase na ações mitogênicas da insulina. Estudos posteriores confirmaram estes dados demonstrando também que a redução de atividade da MAP quinase é provavelmente consequência de uma menor ativação da proteína ras (YAMAUCHI *et al.*, 1995 ; NOGUCHI *et al.*, 1994).

HAUSDORFF *et al.*, (1995) também enfatizaram o papel da SHP2 na transmissão do sinal insulínico, demonstrando que ela é necessária para a expressão da proteína GLUT 1 induzida pela insulina, mas não é necessária para a ativação de vias metabólicas que levam a translocação do GLUT 4.

Recentemente demonstramos (LIMA, *et al.*, 1998) que tecido muscular e hepático de ratos normais, existe uma aumento na associação do IRS-1 com SHP2, após o estímulo com insulina. Esta associação ocorre quando o IRS-1 está no pico da fosforilação em tirosina e a diminuição da associação IRS-1/SHP2 é mais rápida do que a diminuição dos níveis de fosforilação do IRS-1. Estes dados sugerem que a SHP2 não participa da desfosforilação do IRS-1.

MAEGAWA *et al.*, (1999) utilizando camundongos transgênicos, Δ PTP (dominante negativo, que diminui drasticamente a expressão da SHP2), observaram uma resistência à insulina, com menor utilização de glicose estimulada por esse hormônio, acompanhada de uma diminuição na fosforilação do IRS-1. Também observaram redução na ativação da PI 3-quinase e AKT-quinase em músculo e fígado destes animais. Estes dados sugerem que a transmissão do sinal insulínico em direção à fosforilação do IRS-1, ativação da PI 3-quinase e AKT/PKB, depende da expressão da SHP2 e de sua associação ao IRS-1. Entretanto, a regulação da SHP2 em fígado e músculo de modelos animais de resistência à insulina não foi ainda investigada.

Dentre as situações que freqüentemente apresentam resistência à insulina, além do próprio diabetes mellitus tipo 2, podemos citar o envelhecimento, diabetes induzido por estreptozotocina, os aumentos agudos nos níveis circulantes de catecolaminas, jejum prolongado e o uso crônico de corticosteróides. Os eventos precoces da ação insulínica nestas condições tem sido estudados em tecidos-alvo clássicos da atividade insulínica, mas ainda não se havia investigado o grau de fosforilação do IRS-1 e a associação deste com a SHP2 nestes modelos.

O diabetes induzido por STZ é caracterizado por uma deficiência de insulina, e é um modelo atípico de resistência à insulina. O mecanismo molecular pelo qual ocorre a resistência à insulina ainda não está bem elucidado. Estudos anteriores demonstraram que ocorre um aumento no grau de fosforilação do IRS-1, após o estímulo com insulina em tecido hepático e muscular desses animais. Paralelamente, existe também um aumento na associação IRS-1/PI 3-quinase. Nossos resultados demonstraram que não houve aumento na associação IRS-1/SHP2 dos tecidos hepático e muscular de ratos tratados com STZ, discordante do aumento significativo do grau de fosforilação do IRS-1 induzido pela insulina. Estes resultados são de difícil explicação, mas algumas possibilidades devem ser consideradas. Existem tirosinas específicas do IRS-1 na qual se ligam a PI-3 quinase, e outras tirosinas nas quais se ligam a SHP2. Podemos sugerir que o aumento do grau de fosforilação do IRS-1 não se deve, provavelmente, às tirosinas que se ligam à SHP2. Outra possibilidade que poderia ser considerada, principalmente no músculo, é o nível protéico do

IRS-1, que é reduzido e pode estar contribuindo para explicar a ausência de aumento na associação IRS-1/SHP2.

Para se investigar as consequências de um aumento na associação IRS-1/PI 3-quinase, com interação normal IRS-1/SHP2, avaliou-se uma etapa distal da ação insulínica que é a fosforilação/ativação da AKT/PKB.

A ativação da PI 3-quinase é essencial para muitos efeitos da insulina, incluindo o transporte de glicose, ativação da síntese de glicogênio e a inibição da PEPCK. A função e regulação normal AKT/PKB não está totalmente esclarecida, mas é um intermediário distal à ativação da PI 3-quinase. O principal fator regulador da ativação AKT/PKB é a ativação da PI 3-quinase.

Nossos dados demonstraram uma redução na fosforilação do AKT/PKB em fígado e músculo desses animais tratados com STZ, ao contrário do aumento da associação IRS-1/PI 3-quinase. Assim, o aumento na associação do IRS-1/PI 3-quinase, sem um aumento na associação IRS-1/SHP2 pode atenuar a propagação do sinal insulínico.

Podemos sugerir, neste modelo animal, que a propagação do sinal insulínico, através da fosforilação do IRS-1, da associação IRS-1/PI 3-quinase e da fosforilação AKT/PKB, depende da associação IRS-1/SHP2.

Além do papel da associação IRS-1/SHP2 na modulação da transmissão distal do sinal insulínico, não se pode excluir também um efeito da hiperglicemia reduzindo a atividade da AKT/PKB. A redução de fosforilação/ativação da AKT/PKB deve desempenhar um importante papel na resistência à insulina do animal com diabetes induzido pela STZ, possivelmente através do controle do metabolismo de glicogênio.

A liberação endógena de adrenalina após o estresse, assim como a infusão de catecolaminas exógenas resultam em diminuição na tolerância à glicose (CHLIASSON *et al.*, 1981; KIRSCH, KEMMLER, HARING, 1983; PESSIN *et al.*, 1983; BONEN *et al.*, 1992). Estudos em seres humanos e também em animais têm demonstrado que este efeito é decorrente de diminuições na secreção de insulina, aumentos na produção hepática de

glicose e também de menor captação e utilização da glicose pelos tecidos periféricos, principalmente o músculo esquelético (DEIBERT & DE FRONZO, 1980).

SAAD *et al.*, (1995b) demonstraram que no fígado e músculo de ratos tratados com adrenalina há diminuição no grau de fosforilação do receptor de insulina e IRS-1, como também na associação IRS-1/PI-3-quinase. Nossos resultados evidenciam que após a infusão aguda da adrenalina os níveis protéicos da proteína SHP2 não mostram alterações significativas. Os resultados do presente estudo confirmam a diminuição no grau de fosforilação do IRS-1 de ~ 50% em tecido hepático e muscular, bem como da associação do IRS-1 com a PI 3-quinase, e demonstram ainda uma menor associação IRS-1/SHP2. A etapa distal a estas associações, fosforilação do AKT/PKB, também apresentou diminuição nos tecidos hepático e muscular destes animais que receberam tratamento agudo com adrenalina. A atividade AKT/PKB tem sido relacionada como essencial para ativação da síntese do glicogênio estimulado pela insulina (KITAMURA *et al.*, 1998). Assim a diminuição da fosforilação do AKT/PKB pode contribuir para a resistência à insulina observada nos animais tratados agudamente com adrenalina.

O mecanismo pelo qual a adrenalina reduz os níveis de fosforilação do IRS-1 e as associações IRS-1/PI 3-quinase e IRS-1/SHP2 não estão bem esclarecidos, mas duas possibilidades devem ser consideradas: a) É conhecido o fato de que agentes que aumentam o nível de AMPc intracelular, elevam a fosforilação em serina e treonina, reduzem a fosforilação em tirosina e inibem a atividade tirosina quinase estimulada pela insulina de seu receptor. Sendo assim, o AMPc pode atenuar a ação da insulina por alterar o estado de fosforilação do receptor. É possível também que elevações nos níveis de AMPc intracelular aumentem a fosforilação em serina do IRS-1 diminuindo sua fosforilação em tirosina; b) Outra possibilidade baseia-se na descrição de que aumentos no AMPc intracelular podem elevar a atividade das fosfatases, através da ativação da proteína quinase A (PKA), levando a uma sequência de desfosforilações (WILSON & KACZMAREK, 1993). É possível que a diminuição de fosforilação do IRS-1 induzida pela adrenalina, independente do mecanismo, ocorra em diversas tirosinas desta proteína, explicando assim a redução de interação IRS-1/PI 3 quinase e IRS-1/SHP2.

Sabe-se que o envelhecimento está associado à intolerância a carboidratos (DAVIDSON, 1979; DE FRONZO, 1979) e vários mecanismos têm sido propostos na tentativa de se entender tal alteração. O envelhecimento é uma situação clássica de resistência à insulina. Esta forma de resistência hormonal foi bem estabelecida em humanos (FINK *et al.*, 1983; REED *et al.*, 1993) e em animais (YOSHIMASA *et al.*, 1988; CARRASCOSA *et al.*, 1989). Alterações nos efeitos biológicos da insulina no fígado e em tecidos periféricos são descritas em animais senescentes. Observa-se uma diminuição na inibição da produção hepática de glicose por concentrações fisiológicas de insulina. A captação periférica de glicose estimulada pela insulina está reduzida, paralelamente à depleção do “pool” de transportadores de glicose (GULVE *et al.*, 1993; HOUMARD *et al.*, 1995).

Os defeitos primários deste fenômeno ainda são pouco conhecidos, embora vários estudos concordem que a idade determina uma forma de resistência à insulina em virtude das prováveis alterações após a ligação da insulina ao receptor. (KONO *et al.*, 1990). CARVALHO *et al.*, (1996) demonstraram que em tecidos muscular e hepático de ratos senis, os níveis de receptor de insulina não se alteram, mas ocorre uma redução de aproximadamente 30% no grau de autofosforilação do mesmo, existindo também uma diminuição do nível de fosforilação do IRS-1 e redução da associação IRS-1/PI-3 quinase. Esta regulação acarreta alterações no transporte de glicose nos ratos senis. A insulina estimula a captação de glicose em tecido muscular e adiposo, em parte pelo estímulo à translocação do GLUT4 do compartimento intracelular para a membrana plasmática (STEPHENS & PILCH, 1995; RICE & GARNER, 1994; QUON *et al.*, 1995), e a via IRS-1/PI 3-quinase está relacionada à ativação do transporte de glicose, e a redução desta associação em ratos senis pode contribuir para a resistência observada.

É interessante notar que no envelhecimento há diferenças na regulação das interações do IRS-1: a associação IRS-1/PI 3-quinase apresenta-se reduzida tanto em fígado como em músculo, mas a interação IRS-1/SHP2 mostra regulação tecidual específica, com decréscimo em músculo e aumento no fígado. A consequência desta regulação tecidual específica da associação IRS-1/SHP2 no envelhecimento não está completamente elucidada, mas deve refletir na ativação AKT/PKB. Nesse sentido, os resultados

demonstraram uma diminuição na fosforilação do AKT/PKB em músculo mas não em fígado. Como há uma relação entre a atividade e a fosforilação do AKT/PKB, podemos sugerir que no fígado de ratos senis a atividade AKT/PKB induzida pela insulina é provavelmente normal, a qual pode contribuir para explicar a supressão normal da produção de glicose hepática durante a infusão de doses fisiológicas de insulina.

Por outro lado, em músculo a diminuição de fosforilação/ativação da AKT/PKB pode contribuir para a resistência à insulina nesse tecido, considerando o importante papel desta serina quinase na transmissão do sinal insulínico em direção à homeostase de glicose. O mecanismo responsável por estas regulações tecido-específicas de associações IRS-1/SHP2 e ativação AKT/PKB não está totalmente esclarecido, mas os níveis de IRS-1 podem desempenhar um papel importante, pois diminuem no músculo, mas não no fígado de ratos senis.

A exposição prolongada ao excesso de glicocorticóides está associada a estados de resistência à insulina e à hiperinsuliemia, que podem ser resultantes de alterações em uma ou mais das várias respostas celulares ao estímulo insulínico (GRUNFELD *et al.*, 1981; RIZZA *et al.*, 1982).

Em ratos, o tratamento crônico com dexametasona também induz à resistência à ação da insulina, evidenciada por alterações no metabolismo de glicose em tecido hepático e tecidos periféricos, bem como a redução na captação de aminoácidos em músculo e diminuição da lipogênese em tecido adiposo (DE PIRRO *et al.*, 1981; AMATRUDA *et al.*, 1985). A dexametasona também melhora a estimulação da síntese de DNA mediada por insulina (GERMINARIO & McQUILLAN, 1985).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com dexametasona não induziu alterações da quantidade protéica da SHP2 em fígado e músculo. Observamos diminuições significativas no grau de fosforilação do IRS-1 após 5 dias de tratamento com dexametasona, associadas à diminuição na interação desta com a PI 3-quinase, e sem alteração na associação do IRS-1/SHP2. A redução da interação IRS-1/PI 3-quinase descrita em músculo poderia explicar pelo menos em parte, a redução na captação de glicose e translocação do GLUT 4 descritos em outros estudos (SANCHEZ-MARGALET

et al., 1994; HARUTA *et al.*, 1995; WELSH *et al.*, 1994; CHEATHAM *et al.*, 1994). A ausência de alteração na associação IRS-1/SHP2 pode também contribuir para explicar a manutenção de efeitos mitogênicos da insulina nesta situação, a despeito de alterações nas ações metabólicas deste hormônio.

Assim, embora ocorra uma diminuição nos níveis de fosforilação do IRS-1, a não alteração da associação do IRS-1 com a SHP2, após injeção de insulina em fígado e músculo de ratos tratados com dexametasona, provavelmente contribui para a preservação da via de transmissão específica destinada a otimizar a resposta mitogênica à insulina após sua sensibilização por dexametasona.

Como os animais tratados com dexametasona também apresentam hiperinsulinemia, não podemos atribuir nossos resultados exclusivamente a uma ação direta do excesso de glicocorticóides, uma vez que já está estabelecido que os aumentos nos níveis de insulina sérica em animais ou em cultura de células podem causar alterações nas etapas iniciais da transmissão do sinal insulínico (SAAD *et al.*, 1992; 1994; 1995).

Entretanto, existem consideráveis evidências de que o excesso de glicocorticóides, isoladamente, pode induzir reduções nos níveis e graus de fosforilação do IRS-1 em culturas de células do tipo adipócitos 3T3 (SAAD *et al.*, 1994). É possível que a diminuição nos níveis de IRS-1 em cultura de células tratadas com dexametasona seja consequência de uma redução na síntese do mesmo (SAAD *et al.*, 1994).

O jejum prolongado é uma situação fisiopatológica caracterizada por deficiência e resistência à insulina (ALMIRA & REDDY, 1979, FRIEDENBERG *et al.*, 1985). Após um jejum de 72 horas observa-se redução da ação insulínica tanto em tecidos periféricos quanto em tecido hepático, associado a um aumento no número de receptores de insulina (ALMIRA & REDDY, 1979).

Nossos resultados demonstram que no jejum prolongado há um aumento no grau de fosforilação do IRS-1 em fígado e músculo de ratos. Após um jejum de 72 horas há uma maior associação/ativação IRS-1/PI 3-quinase, sugerindo que o defeito molecular responsável pela resistência à insulina no jejum não esteja na via IRS-1/PI 3-quinase (SAAD *et al.*; 1992; FOLLI *et al.*, 1993).

De maneira similar ao observado na associação IRS-1/PI 3-quinase no jejum prolongado, houve também um aumento da associação IRS-1/SHP2 tanto em fígado quanto em músculo.

É interessante destacar que no outro modelo animal de resistência à insulina e hipoinsulinemia - o diabetes induzido por STZ - o aumento de fosforilação do IRS-1 e associação IRS-1/PI 3-quinase não foi acompanhada de aumento da associação IRS-1/SHP2, diferente do jejum em que houve o aumento nesta associação. Os mecanismos responsáveis por esta discrepância não são conhecidos, mas como a hiperglicemia é a principal diferença entre esses modelos, é possível que ela tenha algum papel nesse processo. Entretanto, essa hipótese necessita futuras investigações.

A análise integrada dos 5 modelos animais sugere que a regulação do grau de fosforilação do IRS-1, bem como da interação deste com a PI 3-quinase depende dos níveis insulinêmicos do animal: animais hiperinsulinêmicos apresentam menor fosforilação e menor interação IRS-1/PI 3-quinase, e animais hipoinsulinêmicos mostram o oposto. Por outro lado, a regulação da interação IRS-1/SHP2 não parece manter nenhuma relação com níveis insulinêmicos.

Parece que a interação IRS-1/SHP2 contribui para a modulação da transmissão do sinal insulínico, influenciando a fosforilação/ativação da AKT/PKB.

Em situações com aumento da fosforilação do IRS-1 sem aumento na associação IRS-1/SHP2, o efeito final do AKT/PKB é atenuado, como demonstrado em fígado e músculo de animais tratados com STZ. Por outro lado, a diminuição da fosforilação do IRS-1, sem uma diminuição da associação IRS-1/SHP2, protege a fosforilação do AKT/PKB, como demonstrado em fígado dos animais senis.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

6. CONCLUSÕES

- a) Em animais com diabetes induzido por STZ houve um aumento no grau de fosforilação do IRS-1, sem alteração na interação IRS-1/SHP2, e uma redução no grau de fosforilação do AKT/PKB, tanto para tecido muscular como tecido hepático.
- b) A administração de adrenalina induziu uma redução no grau de fosforilação do IRS-1, acompanhada de uma diminuição da interação do IRS-1/SHP2 e do grau de fosforilação do AKT/PKB, em tecido muscular e hepático.
- c) No envelhecimento em tecido hepático ocorreu uma redução no grau de fosforilação do IRS-1, com um aumento na interação IRS-1/SHP2 e sem alteração do grau de fosforilação do AKT/PKB. Em tecido muscular, a redução do grau de fosforilação do IRS-1 foi acompanhada da redução da interação IRS-1/SHP2 como também do grau de fosforilação do AKT/PKB.
- d) No jejum prolongado em tecido hepático e muscular ocorreu uma elevação do grau de fosforilação do IRS-1, acompanhado de um aumento na interação IRS-1/SHP2.
- e) O uso da dexametasona por 5 dias induziu à redução do grau de fosforilação do IRS-1 e da interação IRS-1/SHP2 em tecido muscular e hepático.
- f) Em todas as situações de resistência à insulina acima descritas os níveis teciduais de SHP2 se mantiveram inalterados.
- g) Não se estabeleceu nenhuma relação entre níveis insulinêmicos e interação IRS-1/SHP2.
- h) Provavelmente a interação IRS-1/SHP2 contribuiu para a modulação da transmissão do sinal insulínico, influenciando a fosforilação do AKT/PKB.

7. SUMMARY

Insulin stimulates the tyrosine kinase activity of insulin receptor resulting in the phosphorylation of its cytosolic substrate, insulin receptor substrate 1 (IRS-1). After activation on by insulin, IRS-1 associates with several proteins, including phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase, phosphotyrosine phosphatase Syp, and adapter molecules like Nck, Grb2 and Fyn.

Using anti-peptide antibodies to SHP2, to IRS-1, to antiphosphotyrosine and to AKT/PKB it is possible to study insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation and the association between IRS-1 and SHP2; and the of phosphorylation AKT/PKB. It's also possible to quantify the level of SHP2.

In the present study we have examined early steps of insulin action in muscle and liver in five animal models of insulin resistance: 72 hours fasting and diabetes (STZ) (hypoinsulinemia), aging and effect of chronic treatment with dexametasone (hyperinsulinemia) and the effect of acute epinephrine treatment (normoinsulinemia). We used immunoprecipitation and immunoblotting techniques with specific antibodies.

In liver of diabetic rats (STZ) there was an increased IRS-1 phosphorylation of $141 \pm 12\%$ compared to the control value ($p < 0.05$). The IRS-1/SHP2 association did not change, but the phosphorylation level of AKT/PKB was decreased in the liver of rats treated with STZ. In muscle samples there was an increase in IRS-1 phosphorylation to $191 \pm 14\%$ ($p < 0.036$), without change in the association of IRS-1 with SHP2. There was also no change in SHP2 protein level, and the AKT/PKB phosphorylation was reduced to $70 \pm 7\%$ ($p < 0.04$) of in muscle of diabetic rats compared to controls.

In fasting there was an increase to $152 \pm 13\%$ ($p < 0.007$) in IRS-1 phosphorylation. There was also an increase of IRS-1/SHP2 association to $136 \pm 7\%$ ($p < 0.035$) in liver tissue of fasting rats, after insulin stimulation compared to controls. In muscle samples from fasting rats the results were similar to that in liver. There was an increase to $155 \pm 2\%$ ($p < 0.019$) IRS-1 in phosphorylation in tissue of diabetic rats compared to controls after insulin-stimulation. There was an increase of IRS-1/SHP2 association of $162 \pm 7\%$ ($p < 0.019$) in tissue of diabetic rats compared to controls.

In rats treated acutely with epinephrine there was a decrease in insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation to $37 \pm 3\%$ of control value ($p < 0.019$), accompanied by reduced to $52 \pm 3\%$ ($p < 0.002$) in IRS-1/SHP2 association in liver. The level of SHP2 protein was found be unchanged and the AKT/PKB phosphorylation induced by insulin was reduced to $60 \pm 5\%$ ($p < 0.045$) in the liver of rats treated acutely with epinephrine. In muscle of epinephrine treated rats, there was a marked reduction to $57 \pm 9\%$ ($p < 0.003$) in insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation compared to control. The association of IRS-1/SHP2 was reduced to $20 \pm 7\%$ ($p < 0.041$) in muscle of epinephrine treated rats. There was no change in the SHP2 protein level, and the phosphorylation of AKT/PKB was reduced to $70 \pm 6\%$ ($p < 0.030$) in muscle of rats treated with epinephrine.

There was a decrease in IRS-1 phosphorylation to $64 \pm 7\%$ in liver of 20-month-old rats compared to 2-month-old rats. When the same blots were subsequently incubated with anti-SHP2 antibody there was an increase to $155 \pm 9\%$ ($p < 0.012$) in insulin-induced IRS-1/SHP2 association in liver of 20-month-old rats compared to 2-months-old rats. Aging did not change the level of SHP2 protein and the phosphorylation level of AKT/PKB in liver. In muscle there was a decrease in insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation to $50 \pm 7\%$ ($p < 0.007$) in 20-months-old rats. There was a simultaneous decrease to $48 \pm 6\%$ ($p < 0.034$) in insulin-induced IRS-1/SHP2 association in muscle of 20-months-old rats. The AKT/PKB phosphorylation was reduced to $70 \pm 6\%$ ($p < 0.05$) in muscle of the 20-month-old rats when compared 2-month-old rats.

Finally, dexamethasone treatment for 5 days induced a decrease in insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation levels to $48 \pm 5\%$ ($p < 0.040$), without changes in insulin-induced IRS-1/SHP2 association in liver of rats. Immunoprecipitation and immunoblotting with anti-SHP2 antibody showed that the level of this protein did not change in liver of rats treated with dexamethasone. In muscle tissue the results were similar to that in liver. There was a reduced in insulin-induced IRS-1 phosphorylation to $36 \pm 5\%$ ($p < 0.035$), and there was no change in the association of IRS-1 with SHP2 in muscle of rats treated with dexametasone after stimulation with insulin. There was also no change in SHP2 protein level in muscle of treated rats compared to controls.

In summary, the results demonstrated that in hiperinsulinemia animals (i.e.; aging and dexamethasone treatment) there is a increased IRS-1 phosphorylation induced by insulin compared to controls and in hipoinsulinemia models (i.e.; fasting and STZ treatment) the IRS-1 phosphorylation induced by insulin is reduced. This phenomenon influence the downstream signal transduction through the IRS-1 pathway as indicated by reduced insulin-induced AKT/PKB phosphorylation in liver and muscle of diabetic rats; increased insulin-induced IRS-1/SHP2 association in liver and muscle of fasting rats and liver of aging animals.

Our results suggest that modulation in insulin signal transduction through IRS-1 may occur in response to insulin circulatory levels and for metabolic changes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMIRA, E.C. & REDDY, W.J. - Effect of fasting on insulin binding to hepatocytes and liver Plasma membranes from rats. **Endocrinology**, **104**:205-11, 1979.
- AMATRUDA, J.M.; LIVINGSTONE, J.N.; LOCKWOOD, D.H. - Celular mechanisms in selected states of insulin resistance: human obesity, glucocorticoid excess and chronic renal failure. **Diabetes Metab Ver**, **3**:293-327, 1985.
- BACKER, J.M.; MYERS JR., M.G.; SHOELSON, S.E.; CHIN, D.J.; SUN, X.J.; MIRALPEIX, P.; HU, B.; MARGOLIS, B.; SKOLNIK, E.Y. SCHLESSINGER, J.; WHITE, M.F. - The phosphatidylinositol 3-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **EMBO J.** **11**:3469- 3479, 1992.
- BERNIER, M.; LAIRD, D.M.; LANE, M.D. - Insulin-activated tyrosine phosphorylation a 15-kilodalton protein in intact 3T3-L1 adipocytes. **Proc Natl Acad Sci USA** **84**:1844-1848, 1987.
- BONEN, A.; MEGENEY, I. A.; MCCARTHY, S.C.; McDERMOTT, J.C.; TAN, M.H. - Epinephrine administration stimulates GLUT 4 translocation but reduces glucose transport in muscle. **Biochem Biophys Res Commun**, **187**(2): 685-91, 1992.
- CARPENTER, C.L. & CANTLEY, L.C. Phosphoinositide kinases. **Biochemistry** **29**:11147-56, 1990.
- CARRASCOSA, J.M.; RUIZ, P.; MARTINEZ, C.; PULIDO, J.Á.; SATRUSTEGUI, J.; ANDRES, A. - Insulin receptor kinase activity in rat adipocytes is decreased during Aging. **Biochem Biophys Res Comm**, **160**: 303-309, 1989.
- CARVALHO, C.R.O.; BRENELLI, S.L.; SILVA, A.C.; NUNES, A.L.B.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.A. - Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 30kinase in liver and muscle of rats. **Endocrinology**, **137**: 151-159, 1996.
- CHEATAM, B. & KAHN, C.R.- Insulin action and the insulin signaling network **Endocr Rev** **16**:117-42, 1995.

- CHEATHAM, B.; VLAHOS, C.J.; CHEATAM, L.; WANG, L.; BLENIS, J.; KHAN, C.R. - Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis and glucose transporter translocation. **Mol Cel Biol**, 14:4902-11, 1994.
- CHIASSEN, J.L.; SHIKAMA, H.; CHU, D.T. EXTON, J.H. - Inhibitory effect of epinephrine on insulin-stimulated glucose uptake by rat skeletal muscle. **J Clin Invest**, 68 (3): 706-13.1981.
- COFFER, P.J.; JING, J.; WOODGETT, J.R.- Protein kinase (c-AKT): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. **Biochem J**, 335:1-13, 1998.
- CUATRECASAS, P. - Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membrane. **Proc Natl Acad Sci USA**, 69:1277-81, 1972.
- DAVIDSON, M.B. - The effect of aging on carbohydrae metabolism: a review of the english literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes melitus in the elderly. **Metabolism**, 28(6): 688-705, 1979.
- DE FRONZO, R.A. - Glucose intolerance and aging. Evidence for tissue insensitivity to Insulin. **Diabetes**, 28:1095-101, 1979.
- DEIBERT, D.C. & DE FRONZO, R. A.- Epinephrine-induced insulin resistance in man. **J Clin Invest**, 65: 717-21, 1980.
- DE PIRRO, R.; GREEN, A.; KAO, Y.; OLEFSKY, J.N. - Effects of prednisone and dexamethasone *in vivo* and *in vitro*. Studies of insulin binding, deoxyglucose uptake and glucose oxidation of isolated adipocytes. **Diabetologia**, 21: 149-153, 1981.
- 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-biding region of the insulin receptor abolishes insulin and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. **Proc Natl Acad Sci USA**, 84:704-708, 1987.
- ELLIS, L.; CLAUSER, E.; MORGAN, D.O.; EDERY, M.; ROTH, R.A. RUTHER, W.J. - Replacement of insulin receptor tyrosine 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2- deoxyglucose. **Cell**, 45:721-732, 1986.

- FEHLMAN, M.; PERYRON J.; SAMSON, M., VAN OBBERGHEN, E.; BRANDENBURG, D.; BROSSETE, N. – Molecular association between major histocompatibility complex class I antigens and insulin receptors in mouse liver membranes. **Proc Natl Acad Sci USA**, **82**: 8634-37, 1985.
- FINK, R.I.; KOLTERMAN, O.G.; GRIFFIN, J.; BACKER, J.M.; OLEFSKY, J.M. - Mechanism of insulin resistance in aging. **J Clin Invest**, **71**: 1523-35, 1983.
- FOLLI, F.; SAAD, M.J.A.; BACKER, J.M.; KHAN, C.R. - Insulin stimulation of PI 3- kinase activity and association with IRS-1 in liver and muscle of the intact rat. **J Biol Chem**, **267**:22171-77, 1992.
- FOLLI, F.; SAAD, M.J.A.; BACKER, J.M.; KAHN, C.R. - Regulation of Phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. **J Clin Invest**, **92**: 1787- 94, 1993.
- FREYCHET, P.; ROTH, J.; NEVILLE, D.M. Jr. - Insulin receptor in the liver: Specific binding of 125I-insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. **Prod Natl Acad Sci USA** **68**:1833-37, 1971.
- FRIEDENBERG, G.; KLAEin, H.; CORDERA, R.; OLEFSKY, J. - Insulin receptor kinase activity in rat liver: regulation by fasting and high carbohydrate feedin. **J Biol Chem**, **260**: 12444-53, 1985.
- GERMINARIO, R. & McQUILLAN, A. - Glucocorticoid-induced modulation of insulin-stimulated DNA synthesis: differential responsiveness in cell cultures derived from donors of different ages. **Gerontology**, **31**: 65-75, 1985.
- GRUNFELD, C.; BAIRD, K.; VAN OBBERGHEN, E.; KAHN, C.R. – Glucocorticoid-Induced insulin resistance *in vivo*: evidence for both receptor and postreceptor Defects. **Endocrinology**, **109**: 1723-30, 1981.

GULVE, E.A.; HENRIKSEN, E.J.; RODNICK, K.J.; YOUN, J.H.; HOLLOSZY, J.O. - Glucose transporters and glucose transport in skeletal muscles of 1 – to 25 mold rats. **Am J Physiol**, 264: E319-27, 1993.

HARUTA, T.; MORRIS, A. J.; ROSE, D.W.; NELSON, J.G.; MUECKLER, M.; OLEFSKY, J.M. – Insulin stimulated GLUT 4 translocation is mediated by a divergent intracellular signaling pathway. **J Biol Chem**, 270:27991-94, 1995.

HAUSDORFF, S.F.; BENNETT, A.M.; NEEL, B.G.; BIRBAUM, M.J. - Different Signaling roles of SHPTP2 in Insulin-induced GLUT1 Expression and GLUT4 Translocation. **J Biol Chem**, 270:12965-68, 1995.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKILMAN, I. – **Clinical chemistry. Principles and Tecniques**, 2 ed., Ino N.Y., Herper and Row Publisher, 1974, 1288.

HOUMARD, J.Á.; WEIDNER, M.D.; DOLAN, P.L.; LEGGETT-FRAZIER, N.; GAVIGAN, K.E.; HICKEY, M.S.; TYNDALL, G.L.; ZHENG, D.; ALSHAMI, A.; DOHM, G.L. - Skeletal muscle GLUT4 protein concentration and aging in humans. **Diabetes**, 44: 555- 60, 1995.

KADOWAKI, T.; KASUGA, M.; AKANUMO, Y.; EZAKI, O.; TAKAKUI, F. - Decreased autophosphorylation of the insulin receptor kinase in strepto- Zotocin-diabetes rats. **J Biol Chem**, 259:14208-16, 1984.

KAHN, C.R. & WHITE, M.F. - The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. **J Clin Invest**, 82:1151-1156, 1988.

KARASIK, A. ; PEPINSKY, R.B.; SHOELSON, S.E.; KAHN, C.R. - Lipocortins 1 and 2 as substrates for the insulin receptor kinase in rat liver. **J Biol Chem**, 263:11862-67, 1988. KASUGA, M.; HEDO, J.A.; YAMADA, K.M.; KAHN, C.R. - Structure of insulin receptor and its subunits. **J Biol Chem**, 257:10392-99, 1982.

- KATHURIA, S.; HARTMAN, S.; GRUNFELD, C.; RAMACHANDRAN, J.; YAMAGUCHI, Y. - Differential sensitivity of two functions of the insulin receptor to the associated proteolysis: kinase action and hormone binding. **Proc Natl Acad Sci USA**, **83**:8570-74, 1986.
- KIRSCH, D.; KEMMLER, W.; HARING, H.U. - Cyclic AMP modulates insulin binding and induces post-receptor insulin resistance of glucose transport in isolated rat adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, **115**(1): 389-405, 1983.
- KITAMURA, T.; OGAWA, W.; SAKAUE, H.; HINO, Y.; KURODA, K.; TAKATA, M.; MATSUMOTO, M.; MAEDA, T.; KONISHI, H.; KIKKAWA, U.; KASUGA, M. - Requirement for activation of serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in Insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. **Mol Cell Biol**, **18**: 3708-17, 1998.
- KONO, S.; KUZUYA, H.; OKAMOTO, M.; NISHIMURA, H.; KOSAKI, A.; KAKEHI, T.; INOUE, G.; MAEDA, I.; IMURA, H. - Changes in receptor kinase with aging in rat skeletal muscle and liver. **Am J Physiol**, **259**: E27-35, 1990.
- KUHNE, M.R.; PAWSON, T.; LIENHARD, G.E.; FENG, G.H. - The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. **J Biol Chem**, **268**:11479-81, 1993.
- LIMA, M.H.M.; ZAMBELLI, J.E.; CARVALHO, C.R. O.; SAAD, M.J. A.- The insulin Receptor substrate 1 associates with phosphotyrosine phosphatase SHPTP2 in liver and muscle of rats. **Braz J Med Biol Res**, **31**: 1409-13, 1998.
- LOTT, J. A. & TURNER, K. - Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. **Clin Chem**, **21**: 1754-1770, 1975.
- MAEGAWA, H.; HASEGAWA, M.; SUGAI, S.; OBATA, T.; UGI, S.; MORINO, K.; EGAWA, K.; FUJITA, T.; SAKAMOTO, T.; NISHIO, Y.; KOJIMA, H.; HANEDA, M.; YASUDA, H.; KIKKAWA, R.; KASHIWAGI, A. - Expression of a Dominant negative SHP2 in transgenic mice induces insulin resistance. **J Biol Chem**, **274**: 30236-42, 1999.

- MASSAGUE, J.P.; PILCH, P.F.; CZECH, M.P. - Eletrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unit stoichiometries. **Proc Natl Acad Sci USA** 77:7137-41, 1981.
- MILARSKI, K.L. & SALTIEL, A.R. - Expression of Catalytically Inactive Syk Phosphatase in 3T3 Cells Blocks Stimulation of Mitogen-activated protein Kinase by Insulin. **J Biol Chem**, 269:21239-43, 1994.
- NOGUCHI, T.; MATOZAKI, T.; HORITA, K.; FUJIOKA, Y.; KASUGA, M. - Role of SH-PTP2, a Protein-Tyrosine Phosphatase with Src Homology 2 domains, in Insulin-Stimulated Ras Activation. **Mol Cell Biol**, 14: 6674-82, 1994.
- OGAWA, A. JOHNSON, J.H. OHNEDA, M.; McALLISTER, C.T.; INMAN, L.; ALAM, T.; UNGER, R. - Roles of insulin resistance and β cell dysfunction in Dexamethasone-induced diabetes. **J Clin Chem**, 90: 497-504, 1992.
- OKAMOTO, M.; WHITE, M.; MARON, R.; KAHN, C.R. - Autophosphorylation and kinase activity of insulin receptor in diabetic rats. **Am J Physiol**, 251:E542-50, 1986.
- PESSIN, J.E.; GITOMER, W.; OKA, Y.; OPPENHEIMER, C.L.; CZECH, M.P. - Beta-Adrenergic regulation of insulin and epidermal growth factor receptors in rat adipocytes. **J Biol Chem**, 258(12): 7386-94, 1983.
- QUON, M.J.; BUTTE, A.J.; ZARNOWSKI, M.J.; SESTI, G. ; CUSHMAN, S.W.; TAYLOR, S.I. - Insulin receptor substrate 1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT 4 translocation in transfected rat adipose cells. **J Biol Chem**, 269: 27920-24, 1995.
- REED, M.J.; REAVEN, G.M.; MONDON, C.E.; AZHAR, S. - Why does insulin resistance develop during maturation? **J Gerontol**, 48: B139-44 1993.
- RICE, K.M. & GARNER, G.R. - Correlation of the insulin receptor substrate-1 with insulin responsive deoxyglucose transport in 3T3-11 adipocytes. **Biochem Biophys Res Comm**, 198: 523-30, 1994.

- RIZZA, R. A.; MANDARINO, L.J.; GERICH, J.E. – Cortisol-induced insulin resistance in man: impaired suppression of glucose production and stimulation of glucose utilization due to a postreceptor defect of insulin action. **J Clin Endocrinol Metab**, **54**:131-38, 1982.
- ROTHENBERG, R.J.; WHITE, M.J.; KHAN, C.R. - The insulin receptor tyrosine kinase. In: CUATRECASAS, P. & JACOBS, S., ed. - **Handbook of perimental Pharmacology**, Berlin. Springer-Verlag, 1990. p 209-43. V.92.
- SAAD, M.J.A.; ARAKI, E.; MIRALPEIX, X.; ROTHEMBERG, P.L.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. - Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of Animals models of insulin resistance. **J Clin Invest**, **90**:1839-49, 1992.
- SAAD, M.J.A.; FOLLI, F.; ARAKI, E.; HASHIMOTO, N.; CSERMELY, P.; KHAN, C.R. - Regulation of insulin receptor IRS-1 and PI 3-kinase in 3T3-F442A adipocytes. Effects of differentiation, insulin and dexamethasone. **Mol Endocrinol**, **8**:545-57, 1994.
- SAAD, M.J.A.; FOLLI, F.; KHAN, J.A.; KHAN, C.R. - Modulation of insulin receptor, IRS-1 and PI3-kinase in liver and muscle of dexamethasone treated rats. **J Clin Invest**, **92**:2065-72, 1993.
- SAAD, M.J.A.; FOLLI, F.; KHAN, C.R. - Insulin and dexamethasone regulate insulin receptor substrate 1, and phosphatidylinositol 3-kinase in Fao hepatoma cells. **Endocrinology**, **136**:1579-1588, 1995a.
- 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**:755-59, 1995b.
- SAAD, M.J.A.; PIMENTA, W.P.; PACCOLA, G.M.G.F. Effect of glucose ingestion on peri-perhal glucose metabolism in normal man. **Diabete & Met**, **15**:5-10, 1989.

- SANCHEZ-MARGALET, V.; GOLDFINE, I.D.; VLAHOS, C.J.; SUNG, C.K. – Role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor L Y 294002. **Biochem Biophys Res Comm**, **204**: 446-52, 1994.
- STEPHENS, J.M. & PILCH, P.F. - The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT 4, the major insulin-responsive glucose transporter. **Endocr Ver**, **16**:529-46, 1995.
- SUN, X.J.; MIRALPEIX, M.; MYERS, M.G.Jr.; GLASHEEN, E.; BACKER J.M.; KHAN, C.R.; WHITE, M.F. - Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. **J Biol Chem**, **266**:22662-72, 1992
- SUN, X.J.; ROTHENBERG, P.A.; KHAN, C.R.- Struture of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein **Nature**, **352**:73-7, 1991.
- TOWBIN H.; STAEHLIN J.; GORDON J. - Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels tonitrocellulose sheets.Procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA**, **76**:4350-4, 1979.
- TRINDER, P.- Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system With a non-carcinogenic chromogen. **J Clin Path** **22**: 158-61, 1969.
- WELSH, G.I.; FOULSTONE, E.J.; YOUNG, S.W.; TAVARÈ, J.M.; PROUD, C.G. – Wortmannin inhibits the effects of insulin and serum on the activities of glycogen synthase kinase-3 and mitogen-activated protein kinase. **Biochem J**, **303**:15-20, 1994.
- WHITE, M.F.; HARING, H.U.; KASUGA, M.; KHAN, C.R. - Kinetic properties and sites of autophosphorilation of the partially purified receptor from hepatoma cells. **J Biol Chem**, **259**:255-64, 1984.
- WHITE, M.F.; MARON, R.; KAHN, C.R. - Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr=185,000 protein in intact cells. **Nature**, **318**:183-6, 1985.

- WHITE, M.F.; SHOELSON, S.E.; SEUTMANN, H.; KHAN, C.R. - A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the insulin receptor. **J Biol Chem**, **263**:2969-80, 1988.
- WILDEN, P.A.; SIDDLE, K.; HARING, E.; BACKER, J.M.; WHITE, M.F.; KHAN, C.R. - The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities: analyses with insulin and anti-receptor antibodies. **J Biol Chem**, **267**:13719-27, 1992.
- WILSON, G.F. & KACZMARECK, L.K. - Mode-switching of a voltage-gated cation channel is mediated by protein kinase A-regulated phosphatase. **Nature**, **366**: 433-8, 1993.
- YAMAUCHI, K.; MILARSKI, K.L.; SALTIEL, A.R.; PESSIN, J.E. - Protein tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a require positive effector for insulin downstream signaling. **Biochemistry**, **92**:664-8, 1995.
- YOSHIMASA, Y.; YAMADA, K.; IDA, T.; KAKEHI, T.; IMURA, H. - Change of insulin action with aging in conscious rats determined by euglycemic clamp. **Am J Physiol**, **254**: E92-8, 1988.
- YU, K.T. & CZECH, M.P. - Tyrosine phosphorylation of the insulin receptor beta-subunit activates the receptor-associated tyrosine kinase activity. **J Biol Chem**, **259**:5277-86, 1984.

9. ANEXOS

The insulin receptor substrate 1 associates with phosphotyrosine phosphatase SHPTP2 in liver and muscle of rats

M.H.M. Lima²,
J.E. Zambelli¹,
C.R.O. Carvalho¹
and M.J.A. Saad¹

Departamentos de ¹Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, and
²Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas,
Campinas, SP, Brasil

Abstract

Insulin stimulates the tyrosine kinase activity of its receptor resulting in the phosphorylation of its cytosolic substrate, insulin receptor substrate-1 (IRS-1) which, in turn, associates with proteins containing SH2 domains. It has been shown that IRS-1 associates with the tyrosine phosphatase SHPTP2 in cell cultures. While the effect of the IRS-1/SHPTP2 association on insulin signal transduction is not completely known, this association may dephosphorylate IRS-1 and may play a critical role in the mitogenic actions of insulin. However, there is no physiological demonstration of this pathway of insulin action in animal tissues. In the present study we investigated the ability of insulin to induce association between IRS-1 and SHPTP2 in liver and muscle of intact rats, by co-immunoprecipitation with anti-IRS-1 antibody and anti-SHPTP2 antibody. In both tissues there was an increase in IRS-1 association with SHPTP2 after insulin stimulation. This association occurred when IRS-1 had the highest level of tyrosine phosphorylation and the decrease in this association was more rapid than the decrease in IRS-1 phosphorylation levels. The data provide evidence against the participation of SHPTP2 in IRS-1 dephosphorylation in rat tissues, and suggest that the insulin signal transduction pathway in rat tissues is related mainly to the mitogenic effects of the hormone.

Key words

- Insulin action
- Insulin receptor substrate
- Phosphotyrosine phosphatase
- SHPTP2

Correspondence

M.J.A. Saad
Departamento de Clínica Médica
FCM, UNICAMP
13081-970 Campinas, SP
Brasil
Fax: +55-19-239-3114

Presented at the XIII Annual Meeting
of the Federação de Sociedades de
Biologia Experimental, Caxambu,
MG, Brasil, August 26-29, 1998.

Research supported by FAPESP and
CNPq (PRONEX).

Received April 14, 1998
Accepted August 13, 1998

The insulin receptor is the principal mediator of insulin action on cellular and metabolic processes. 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 (1). Moreover the discovery of the tyrosine kinase activity of the insulin receptor sug-

gested that the mechanism of insulin action involved the tyrosyl phosphorylation of intracellular substrates. An insulin-stimulated phosphoprotein called pp185 was identified in many cells and tissues using anti-phosphotyrosine antibodies. One component of the pp185 band was purified and cloned from several sources (2-4) and the cloned protein was called insulin receptor substrate

1 (IRS-1). Evidence from different sources has shown that the phosphotyrosine-containing form of IRS-1 binds to the enzyme phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) through the Src homology 2 (SH2) domains of the latter (4,5) and that this association activates the enzyme.

In addition to PI 3-kinase, other proteins containing SH2 domains such as SHPTP2, Nck, Grb2 have been shown to bind to IRS-1 (1). SHPTP2 is an SH2 domain-containing tyrosine phosphatase that associates with the COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites of IRS-1 in cell cultures (6), and this association increases the phosphatase activity of SHPTP2 *in vitro* (7). However, there is no physiological demonstration of this pathway of insulin action in animal tissues. In the present study we investigated the ability of insulin to induce association of IRS-1 and SHPTP2 in liver and muscle of intact rats, two of the main target tissues for insulin action.

The rats were anesthetized with sodium amobarbital (15 mg/kg body weight, intraperitoneally) and used in the experiments 10-15 min later, as soon as anesthesia was assured by the loss of foot and corneal reflexes. The abdominal cavity was opened, the vena cava exposed and 0.5 ml saline (0.9% NaCl), containing or not 6 µg of insulin, was injected. After the indicated time, the liver or muscle was removed, minced coarsely and immediately homogenized in extraction buffer (1% Triton X-100, 100 mM Tris, pH 7.4, containing 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF and 0.1 mg aprotinin/ml) at 4°C with a Polytron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments model PT 10/35; Westbury, NY) operated at maximum speed for 30 s. Both extracts were centrifuged at 15,000 rpm and 4°C in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA) for 45 min to remove insoluble material, and the supernatant of these tissues was used for immunoprecipita-

tion with anti-IRS-1 antibody and protein A Sepharose 6 MB. The samples were treated with Laemmli sample buffer (8) containing 100 mM DTT, heated in a boiling water bath for 4 min and submitted to SDS-PAGE (6.5% Tris/acrylamide). Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 2 h at 100 V (constant) in the Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-protean), as described by Towbin et al. (9) but with 0.02% SDS added to the transfer buffer to enhance the elution of high-molecular mass protein. Nonspecific protein binding to nitrocellulose was reduced by pre-incubating the filter overnight at 4°C in blocking buffer (3% BSA, 10 mM Tris, 150 mM NaCl and 0.02% Tween 20). The pre-stained molecular mass standards used were myosin (205 kDa), galactosidase (116 kDa), BSA (80 kDa) and ovalbumin (49.5 kDa). The nitrocellulose blot was incubated with anti-phosphotyrosine (1 µ/ml) or anti-SHPTP2 (1:100) antibodies for 4 h at 22°C. Monoclonal anti-phosphotyrosine antibody and anti-IRS-1 and anti-SHPTP2 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA. The blots were subsequently incubated with 2 µCi [¹²⁵I]-protein A (30 µCi/µg) in 10 ml of blocking buffer for 1 h at 22°C and washed again. [¹²⁵I]-protein A bound to the antibodies was detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film with Cronex Lightning Plus intensifying screens at -70°C for 12-48 h. Band intensities were quantified by optical densitometry (Molecular Dynamics) of the developed autoradiogram (10-12).

To estimate the rate of insulin-induced IRS-1 phosphorylation in the liver, we performed a time course experiment after the administration of insulin into the portal vein. Liver extracts were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and blotted with anti-phosphotyrosine antibody. As shown in Figure 1A, 30 s after exposure to insulin there was a substantial increase in the phosphorylation of IRS-1, the rate of which decreased

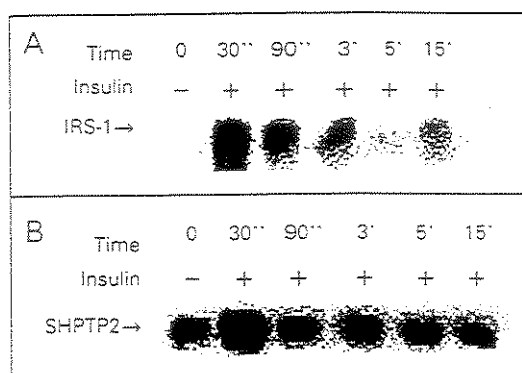


Figure 1 - Time course of insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation (panel A) and association with SHPTP2 in rat liver (panel B). Rats were anesthetized and the abdominal wall was incised to expose the viscera. Saline or insulin was infused at the indicated time. The tissues were excised and homogenized in extraction buffer at 4°C as described in the text. After centrifugation, aliquots containing equal amounts of protein were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and protein A Sepharose 6 MB and then resolved on 6.5% SDS-polyacrylamide gels. The protein bands were subsequently transferred to a nitrocellulose membrane and detected with anti-phosphotyrosine antibody (A) or anti SHPTP2 (B) and [¹²⁵I]-protein A, after which the membrane was subjected to autoradiography. The data are representative of five experiments.

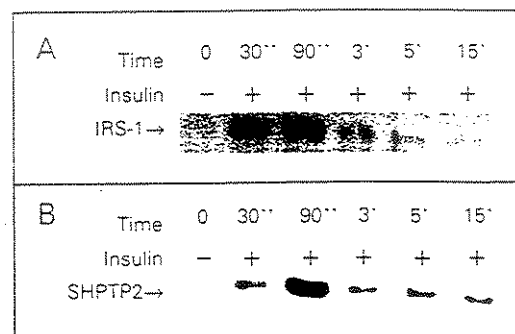


Figure 2 - Time course of insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation (panel A) and association with SHPTP2 in rat muscle (panel B). Rats were anesthetized and the abdominal wall was incised to expose the viscera. Saline or insulin was infused at the indicated time. The tissues were excised and homogenized in extraction buffer at 4°C as described in the text. After centrifugation, aliquots containing equal amounts of protein were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted as described in the legend to Figure 1. The data are representative of four experiments.

thereafter and had almost vanished by 15 min. In order to investigate the association of SHPTP2 with IRS-1 the same membrane was stripped and re-blotted with anti-SHPTP2 antibody. Figure 1B shows that there is a basal association between IRS-1 and SHPTP2 which increases 30 s after insulin infusion and returns to basal levels thereafter. It is interesting to note that at 90 s and 3 min after insulin infusion there still was IRS-1 tyrosine phosphorylation, but the association with SHPTP2 was just basal.

The results obtained for muscle were similar to those obtained for liver but high tyrosine phosphorylation levels of IRS-1 were observed at 30 and 90 s after insulin infusion (Figure 2A). When these samples previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody were blotted with anti-SHPTP2 antibody, an important association was observed 30 s

after insulin infusion, which was dissociated from IRS-1 tyrosine phosphorylation, whose levels continued to be high up to 90 s.

The results presented here show that SHPTP2 associates with phosphorylated IRS-1 in liver and muscle of rats. In cell culture, SHPTP2 is activated during association with IRS-1. While the effect of IRS-1/SHPTP2 association on signal transmission is not completely known, there is a possibility that this interaction autoregulates IRS-1 phosphorylation. The tyrosine phosphatase SHPTP2 may dephosphorylate signaling intermediates located either in the IRS-1 signaling complex or at distant sites, thus downregulating signaling. In this regard, there is a study showing that SHPTP2 is able to dephosphorylate IRS-1 *in vitro* (13), but this phenomenon was not observed *in vivo* (14-16). Our results showing that IRS-1/SHPTP2

association occurs when IRS-1 has the highest level of tyrosine phosphorylation are evidence against the effect of SHPTP2 dephosphorylating IRS-1, and suggest that this association depends on an important increase in IRS-1 tyrosine phosphorylation.

The role of SHPTP2 in insulin signaling has been examined by several approaches. Microinjection of the SH2 domains of SHPTP2 or antibodies against SHPTP2 blocks insulin-stimulated DNA synthesis (14,17). Similarly, overexpression of a catalytically inactive mutant SHPTP2 molecule inhibits mitogenesis and p21^{ras} and MAP kinase activation (14-17). It is not clear how SHPTP2 transmits signals to p21^{ras} and MAP kinase or mediates mitogenesis during insulin signaling, but there is no doubt that the activity of SHPTP2 plays a critical role in the mitogenic actions of insulin.

It is known that insulin activates hexose transport via at least two mechanisms: a p21^{ras}-dependent pathway leading to an increase in the amount of cell surface GLUT 1,

and a metabolic, p21^{ras}-independent pathway leading to translocation of the insulin-responsive transporter GLUT 4 to the cell surface (1,7). Hausdorff et al. (17), using microinjection of a glutathione S-transferase fusion protein encoding the N- and C-terminal SH2 domains of SHPTP2 or anti-SHPTP2 antibodies into 3T3-L1 adipocytes, demonstrated that SHPTP2 is important for the expression of GLUT 1, but is not required for activation of GLUT 4 translocation. These data suggest that SHPTP2 plays a role in the insulin-induced transcription of immediate early genes such as GLUT 1, but is not required for the metabolic increase in transport mediated by GLUT 4 translocation.

In summary, the present results demonstrate that after insulin stimulation of liver and muscle of intact rats there is an increase in the association of IRS-1 with SHPTP2, a pathway that has been shown to play an important role in insulin-induced DNA synthesis in cell culture.

References

- White MF & Kahn CR (1994). The insulin signaling system. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 1-5.
- White MF, Maron R & Kahn CR (1985). Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of an Mr 185 000 protein in intact cells. *Nature*, 318: 183-186.
- Keller SR, Aebersold RH, Garner CW & Lienhard GE (1993). The insulin-elicited 160 kDa phosphotyrosine protein in mouse adipocytes is an insulin receptor substrate 1: identification by cloning. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1172: 323-326.
- Sun XJ, Rothenberg PL, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden P, Cahill DA, Goldstein BJ & White MF (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*, 352: 73-77.
- Carvalho CRO, Brenelli SL, Silva AC, Nunes ALB, Velloso LA & Saad MJA (1996). Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology*, 137: 151-159.
- Kuhné MR, Pawson T, Lienhard GE & Feng GS (1993). The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase syp. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 11479-11481.
- Myers MG & White FM (1996). Insulin signal transduction and the IRS-1 proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36: 615-658.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Towbin H, Staehlin J & Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 76: 4350-4354.
- Saad MJA, Carvalho CRO, Thirone ACP & Velloso LA (1996). Insulin induces tyrosine phosphorylation of Jak2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 22100-22104.
- Thirone ACP, Carvalho CRO, Brenelli SL, Velloso LA & Saad MJA (1997). Effect of chronic growth hormone treatment on signal transduction in rat tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 130: 33-42.
- Saad MJA, Maeda L, Brenelli SL, Carvalho CRO, Paiva RS & Velloso LA (1997). Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. *Diabetologia*, 40: 179-186.
- Sugimoto S, Wandless TJ, Shoelson SE, Nell BG & Walsh CT (1994). Activation of the SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SHPTP2, by phosphotyrosine-containing peptides derived from insulin receptor substrate-1. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 13614-13622.
- Milarski KL & Saltiel AR (1994). Expression of catalytically inactive syp phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 21239-21243.

15. Yamauchi K, Ribon V, Saltiel AR & Pessin JE (1995). Identification of the major SHPTP2-binding protein that is tyrosine-phosphorylated in response to insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 270: 17716-17722.
16. Yamauchi K, Milarski KL, Saltiel AR & Pessin JE (1995). Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 664-668.
17. Hausdorff FS, Bennett AM, Neel BG & Birnbaum MJ (1995). Different signaling roles of SHPTP2 in insulin-induced GLUT1 expression and GLUT4 translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 11479-11881.

Introduction

Insulin resistance is defined as a subnormal biologic response to a given concentration of insulin, and is characteristic of many disease states including type 2 diabetes, uncontrolled type 1 diabetes, aging and excess of epinephrine. Although various defects in insulin action have been reported in these conditions, the exact mechanisms involved in the insulin resistance have not been adequately elucidated.

The insulin receptor is the principal mediator of insulin action on cellular mitogenic and metabolic processes. 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 (White and Kahn 1994). This interaction further enhances the tyrosine kinase activity of the receptor towards other intermediate molecules, including insulin receptor substrate-1 (IRS-1), (Sun et al, 1991; White et al, 1985). After a stimulation by insulin, IRS-1 associates with several proteins, including phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase, phosphotyrosine phosphatase Syp, and adapter molecules like Nck, Grb2 and Fyn (Backer et al., 1992; Harari et al., 1992; Myers and White, 1996). The enzyme PI 3 -Kinase has been shown to play a critical role in many of the metabolic effects of the insulin, including stimulation of glucose transport, activation of glycogen synthase, and inhibition of phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK), the key enzyme of gluconeogenesis (Cheathan and Kahn,1995). Different approaches have demonstrated that AKT/PKB, a serine-threonine kinase with a pleckstrin homology domain, is functionally located downstream of PI 3-kinase (Cohen et al., 1997; Klippel et al., 1997; Tanti et al.,1997; Downward, 1998; Kitamura et al., 1998).

SHP2 is an SH2 domain-containing tyrosine phosphatase that associates with the COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites of IRS-1 in cell cultures, and this association increases the phosphatase activity of SHP2 in vitro (Kuhné et al., 1993). We have recently demonstrated that in rats tissues insulin induces IRS-1/SHP2 association in vivo, suggesting that this pathway is physiologically relevant (Lima et al., 1998). However the regulation of this association in situations of altered IRS-1 phosphorylation was not investigated. In the present study we investigated insulin-induced IRS-1/SHP2 association

and AKT/PKB phosphorylation in liver and muscle of three animal models of insulin resistance: STZ diabetes, epinephrine-treated rats and aging, which have in common alteration in IRS-1 tyrosine phosphorylation (Saad et al., 1995; Folli et al., 1993; Carvalho et al., 1996).

MATERIALS AND METHODS

Materials

The reagents and apparatus for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting were obtained from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Tris, [hidroxymethyl] amino-methane (Tris) phenylmethylsulfonyl fluoride (PSMF), aprotinin, silicone, and dithiothreitol (DTT), Triton X-100, Tween 20 and glycerol were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Sodium amobarbital was from Lilly. Human recombinant insulin (Humulin R) was from Biobrás. [¹²⁵I]-Protein A was from Amersham (Amersham, UK) and protein A Sepharose 6 MB from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Nitrocellulose (BA85, 0.2 µm) was from Schleicher & Schuell. Male Wistar rats were from the UNICAMP Central Breeding Center. Monoclonal antiphosphotyrosine antibody (αPY/ clone 4G10) was from Upstate Biotechnology Incorporated (UBI, Lake Placid, NY). Anti-IRS-1 (αIRS-1/C20), Anti-SHP2 (αSHP2/ C-18) antibodies were from Santa Cruz Technology Santa Cruz, CA) and Anti-AKT phosphorylated antibody from New England Biolabs (Hitchin, UK).

Animals

Male Wistar rats, 6 weeks old, were divided into two groups and the studies were performed in parallel using the control and treated rats. All groups received standard rodent chow and water ad libitum. Food was withdrawn 12-14 h before experiments. Diabetes was induced in the rats with streptozotocin in 0.01 M citrate buffer, pH 4.5, administered EV in a single dose of 58 mg/kg body wt to overnight-fasted rats. Diabetic rats were studied 7 d after streptozotocin injection. Male Wistar rats 6 weeks old, rats anesthetized were injected intraperitoneally with epinephrine 25 µg/100g body wt or an equal volume of saline (control group) and the animals used 5 min later or series of experiments. Male wistar rats were divided into two groups by age 2 months old (control) or 20 months old. The groups were fed standard rodent chow and water ad libitum. Food was withdraw 12-14 hours before the experiments.

Methods

The rats were anesthetized with sodium amobarbital (15 mg/kg body weight, intraperitoneally) and used in the experiments 10-15 min later, as soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes. The abdominal cavity was opened, the portal vein exposed and 0.5 ml of normal saline (0 time) or 6 µg of insulin was injected. At 30 seconds the liver was removed, and at 90 seconds the muscle was removed, minced coarsely and immediately homogenized in extraction buffer (1% Triton X-100, 100 mM Tris, pH 7.4, containing 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PSMF and 0.1 mg of aprotinin/ml) at 4° C with a Polytron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments model PT 10/35) operated at maximum speed for 30 seconds. Both extracts were centrifuged at 15 000 rpm and 4° C in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA) for 45 min to remove insoluble material, and the supernatant of these tissues was used for immunoprecipitation with anti-IRS-1 antibody and protein A Sepharose 6 MB. We also used whole tissue extract in the determination of AKT phosphorylation. The samples were treated with Laemmli sample buffer (Laemmli et al., 1970) containing 100 mM DTT and heated in a boiling-water bath for 4 min. SDS PAGE (6.5% Tris/acrylamide) was carried. Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 2 h at 100 V (constant) in the Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-protean), as described by Towbin et al., 1979, but with 0.02% SDS added to the transfer buffer to enhance the elution of high-molecular mass protein. Non-specific protein binding to nitrocellulose was reduced by pre-incubating the filter overnight at 4° C in blocking buffer (3% BSA, 10 mM Tris, 150 mM NaCl and 0.02% Tween 20). The pre-stained molecular mass standards used were myosin (205 kDa), (-galactosidase (116 kDa), BSA (80kDa) and ovalbumin (49.5 kDa). The nitrocellulose blot was incubated with anti-phosphotyrosine (1 µ/ml), anti-SHPTP2 (1:100) or anti AKT antibodies for 4 h at 22° C. Monoclonal anti-phosphotyrosine antibody, anti-IRS-1 and anti-SHPTP2 antibodies were from Santa Cruz (CA). The blots were subsequently incubated with 2 µCi [¹²⁵I] protein A (30 µCi/µg) in 10 ml of blocking buffer for 2 h at 22° C and washed again. [¹²⁵I] protein A bound to the antibodies was detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film with Cronex Lightning Plus intensifying screens at -70° C for 12-48h. Band intensities were

quantified by optical densitometry (Molecular Dynamics) of the developed autoradiogram (Saad et al., 1996; Thirone et al., 1997) .

Statistical analysis

The experiments were performed by studying all groups of animals in parallel. For comparisons, Student's unpaired t-test was used as appropriate. The level of significance employed was $P < 0.05$.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

RESULTS

Characteristics of insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation and association with SHP2 in liver and muscle of STZ-treated rats

Figure 1 illustrates the protocol for assessing insulin signalling in the STZ-treated rats. Control and STZ-treated rats were injected with saline or insulin and after 30 s and 90 s liver and muscle were removed and homogenized as described in Methods. The extracts were immunoprecipitated with specific antibodies and then submitted to SDS-PAGE under reducing conditions and were blotted on to nitrocellulose membranes. These blots were subsequently analysed using antiphosphotyrosine and anti-SHP2 antibodies.

In samples from liver previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody, there was a clear increase in insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation to $141 \pm 12\%$ of the control value ($p < 0.05$) in STZ-treated rats (Fig 1A). IRS-1 can bind and activate other proteins including the phosphotyrosine phosphatase SHP2. We stripped these nitrocellulose membranes and incubated them with anti-SHP2 antibody. The results demonstrated that there was no change in IRS-1/SHP2 association in liver (Fig 1B). Immunoprecipitation and immunoblotting with anti-SHP2 antibody showed that the level of this protein did not change in the liver of rats treated with STZ, (Fig 1C). We analyzed the insulin-induced AKT/PKB phosphorylation in whole tissue extract using an anti-AKT phosphorylation. After stimulation with insulin, a band could be observed indicating that AKT/PKB protein is phosphorylated phosphorylation in both control and STZ diabetes rats. Based on immunoreactivity, the insulin-induced phosphorylation level of AKT/PKB was decreased in liver of STZ treated rats to $65 \pm 6\%$ ($p < 0.035$), (Fig 1D).

In samples from muscle of STZ-treated rats the results were similar to that in liver. There was an increase in insulin-induced IRS-1 phosphorylation to $191 \pm 14\%$ ($p < 0.036$) in muscle of STZ-treated rats. (Fig 2A). Figure 2B shows that there was no change in the association of IRS-1 with SHP2 in muscle of rats treated with STZ after stimulation with insulin. There was also no change in SHP2 protein level in muscle of diabetic animals (Fig 2C). The AKT/PKB phosphorylation in muscle was reduced to $70 \pm 7\%$ of the control value ($p < 0.04$) in muscle of STZ treated rats (Fig 2D).

Characteristics of insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation and association with SHP2 in liver and muscle of epinephrine-treated rats

In samples from liver previously immunoprecipitated with anti- IRS-1 and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody, there was a clear decrease in insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation to $37 \pm 3\%$ of the control value ($p < 0.019$) in epinephrine treated rats (Fig 3A). After stimulation with insulin, IRS-1 is co-precipitated with SHP2 and this association was reduced to $52 \pm 3\%$ of the control value ($p < 0.002$) in liver of epinephrine treated rats (Fig 3B). Using a specific anti- peptide antibody against SHP2, the level of this protein was found to be unchanged in the liver of rats treated acute with epinephrine (Fig 3C). The AKT/PKB phosphorylation induced by insulin was significantly reduced to $60 \pm 5\%$ ($p < 0.045$) in liver of epinephrine treated rats (Fig 3 D).

Figure 4A shows that there was a marked reduction to $57 \pm 9\%$ ($p < 0.003$) in insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation in muscle of epinephrine treated rats, compared to controls. The association of IRS-1 with SHP2 after insulin stimulation, determined by immunoblotting the same membrane with SHP2 antibody, was reduced to $20 \pm 7\%$ of the control value ($p < 0.041$) in muscle of epinephrine treated rats (Fig 4B). There was no change in the SHP2 protein level of muscle from rats treated with epinephrine (Fig 4C). The phosphorylation of AKT/PKB was reduced to $70 \pm 6\%$ ($p < 0.030$) in muscle of rats treated acutely with epinephrine (Fig 4D).

Characteristics of insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation and association with SHP2 in the liver and muscle of 2 month-old or 20 month-old rats.

Figure 5A shows that after insulin stimulation, there was a decrease of IRS-1 phosphorylation to $64 \pm 7\%$ in liver of 20 months old rats. When the same blots were subsequently incubated with anti-SHP2 antibody there was an increase to $155 \pm 9\%$ ($p < 0.012$) in insulin-induced IRS-1/SHP2 association in liver of 20 months old rats compared to 2 months old rats (Fig 5B). Aging also did not significantly change the level of SHP2 protein in liver (Fig 5C). The insulin-induced phosphorylation level of AKT/PKB did not change significantly in liver of aging rats (Fig 5D).

In samples from muscle previously immunoprecipitated with IRS-1 antibody and immunoblotted with antiphosphotyrosine, there was a decrease in insulin-stimulated IRS-1 phosphorylation to $50 \pm 7\%$ ($p < 0.007$) in 20 months old rats (Fig 6A). To examine the association of IRS-1 with SHP2, blots of samples which had been previously immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibodies were incubated with anti-SHP2 antibody. As expected there was a decrease to $48 \pm 6\%$ ($p < 0.034$) in insulin-induced IRS-1/SHP2 association in muscle of 20 months old rats (Fig 6B). There was no change in the SHP2 protein level in muscle of 20 months old rats (Fig 6C). In muscle the AKT/PKB phosphorylation was reduced to $70 \pm 6\%$ ($p < 0.05$) of the 20 months-old rats when compared to 2 month-old rats (Fig 6D).

DISCUSSION

The molecular events linking the insulin receptor tyrosine kinase to its final cellular actions is a matter of continuing investigation. In the past 8 years, several of the early steps in the cascade of insulin action have been characterized at a molecular level. After insulin binding, the activated insulin receptor kinase catalyzes the tyrosine phosphorylation of a protein termed IRS-1. IRS-1 has been shown to be a direct substrate of the insulin receptor both *in vivo* and *in vitro* and has several potential serine, threonine, and tyrosine phosphorylation sites.

Following IRS-1 phosphorylation it can associate with proteins containing SRC homology 2 (SH2) domains through specific tyrosil phosphorylation sites (Yamauchi et al., 1995). In cells in culture phosphorylated IRS-1 associates with lipid metabolizing enzyme PI3-kinase, with NCK, Grb2 and with the phosphotyrosine phosphatase SHP2 (Yamauchi et al., 1995).

We have recently demonstrated that SHP2 associates with phosphorylated IRS-1 in liver and muscle of rats (Lima et al., 1998). In cell culture it has been shown that SHP2 is activated during association with IRS-1. While the effect of IRS-1/SHP2 association on signal transduction is not completely known, there is a possibility that this interaction autoregulates IRS-1 phosphorylation. The tyrosine phosphatase SHP2 may dephosphorylate signaling intermediates located either in the IRS-1 signaling complex or at distant sites, thus downregulating signaling (Milarski and Saltiel, 1994; Yamauchi et al., 1995). Data from different source suggest that SHP2 plays an important role in insulin-induced transcription of immediate early gene such as Glut 1, which is crucial for basal glucose transport in muscles and adipocytes (Hausdorff et al., 1995). In addition, Maegawa et al., 1999 recently demonstrated that inhibition of endogenous SHP2 function impaired insulin sensitivity on glucose metabolism in transgenic mice, suggesting that SHP2 many function to modulate insulin signaling in target tissues. However, the regulation of IRS-1/SHP2 association in liver and muscle of animal models of insulin resistance was not yet investigated.

In the present study, we investigated IRS-1/SHPTP2 association in three situations of insulin resistance that course with altered IRS-1 tyrosine phosphorylation.

STZ diabetes is characterized by insulin deficiency and insulin resistance. The molecular mechanisms responsible for this insulin resistance is not clear, but at least defects in early steps in insulin action have been demonstrated. We have previously described that in liver and muscle of these animals there is an increase in insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation levels. In parallel there is also an increase in IRS-1 association with PI 3-kinase (Folli et al., 1993). The results of the present study did not demonstrate changes in insulin -induced IRS-1/SHP2 association in liver and muscle of STZ rats. The mechanism responsible for the differential regulation of IRS-1 associations for these alterations is not known, but since there are specific tyrosines in IRS-1 which bind PI 3-kinase or SHP2 we can suggest that the increase in IRS-1 phosphorylation is probably not in tyrosines which bind SHP2. The increase in IRS-1/PI 3-Kinase association without an increase in IRS-1/SHP2 association may attenuate downstream signaling. It is interesting that AKT phosphorylation was reduced in liver and muscle of STZ-diabetic animals in spite of an increase in IRS-1/PI 3-Kinase association.

It has long been known that an excess of epinephrine causes insulin resistance (Folli et al., 1993; Saad et al., 1995). High intracellular cyclic AMP-levels seen to induce insulin resistance at both receptor and post-receptor levels. Using purified receptors and artificial substrates in vitro, decreased insulin receptor phosphorylation and kinase activity have been observed as a consequence of increased cAMP and cAMP kinase (Folli et al., 1995). We have recently demonstrated that in liver and muscle of rats treated with epinephrine there is a decrease in insulin-induced insulin receptor and IRS-1 tyrosine phosphorylation and also in IRS-1/PI 3-kinase association (Saad et al., 1995). In the present study we demonstrated that there is parallel a decrease in IRS-1/SHP2 association.

It is interesting that insulin induced AKT phosphorylation was attenuated in epinephrine treated rats. Recently, AKT activity has been reported to be essential for activation of glycogen synthase by insulin (Kitamura et al., 1998). Since AKT phosphorylation correlates with AKT activity we can suggest that a decrease in insulin-induced AKT phosphorylation may contribute to the insulin resistance observed in

epinephrine treated rats. The mechanism by which epinephrine reduces IRS-1 tyrosine phosphorylation levels and associations are not known but at least two possibilities should be considered. First, it is well known that agents which raise intracellular cAMP levels increased phosphorylation of the insulin receptor at serine and threonine residues, reduce insulin-mediated receptor phosphorylation on tyrosine, and inhibit the insulin-dependent tyrosine protein kinase activity of the receptor. Thus, cAMP may attenuate insulin action by altering the state of phosphorylation of the insulin receptor (Folli et al., 1993;). It is not known whether an increase in intracellular cAMP also induces a serine phosphorylation in IRS-1. However, since insulin receptor kinase activity is reduced, a reduction in IRS-1 phosphorylation and hence in the association between IRS-1/PI 3-kinase is also expected. Another possibility arises from data showing that an increase in cellular cAMP through activating protein kinase A (PKA) increases the activity of endogenous phosphotyrosine phosphatase (PTPase), thus leading to a sequence of dephosphorylation (Wilson and Kaczmarek, 1993)

The insulin resistance that develops during aging is associated with an increased glucose intolerance. The rate of glycogen synthesis in response to stimulation by insulin is markedly decreased in the soleus muscle of 85-week-old Wistar rats (Goodman et al., 1983), and impaired insulin-stimulated glucose uptake due to a depletion of the pool of glucose transporters has been observed (Mathaei et al, 1990) . At high insulin levels there is no alteration in insulin-induced inhibition of hepatic glucose output, suggesting that the insulin resistance observed in aging is mainly located in skeletal muscle (Davidson et al 1978; Yoshimasa et al., 1988). Carvalho et al., 1996 demonstrated that in liver and muscle of old rats there is a decrease in IRS-1 tyrosine phosphorylation level and also a decrease in IRS-1/PI 3-kinase association. Evidence from other sources and using different approaches demonstrated a correlation between PI 3-kinase activity and glucose transport (Wallberg and Holloszy, 1985; Goodyear et al ., 1988). Thus, it is reasonable to speculate that the reduction in IRS-1/PI 3-kinase association in old rats may have a role in the resistance observed in aging. It is interesting that in contrast to IRS-1/PI 3-kinase which was reduced in both liver and muscle, insulin-induced IRS-1/SHP2 association showed a tissue-specific regulation, decreasing in muscle and increasing in liver. The mechanisms responsible for

these alterations are not established but the levels of IRS-1 may have a role, because they decrease in muscle but not in liver of aging rats.

The existence of alternative substrates and pathways for insulin signaling suggests that compensatory changes in either IRS protein levels or IRS-association could minimize the impact of alterations in IRS-1-linked signaling. In aging rats there is a decrease in AKT phosphorylation in muscle but not in liver, which parallel the changes observed in IRS-1/SHP2 association.

Since AKT/PKB phosphorylation is related to AKT/PKB activity, we can suggest that in liver of aging rats AKT/PKB activity induced by insulin is probably normal, which can contribute to explain the normal suppression of hepatic glucose output during the infusion of high doses of insulin.

Taken together these three models of insulin resistance, we can suggest that insulin induced IRS-1/SHP2 association is important for insulin for insulin signaling downstream, as AKT phosphorylation. In situations with an increase in IRS-1 tyrosine phosphorylation without an increase in IRS-1/SHP2 association the final effect on AKT is attenuated, as demonstrated in liver and muscle of STZ diabetic animals. On the other side a decrease in IRS-1 tyrosine phosphorylation without a decrease in IRS-1/SHP2 association protects the insulin effect on AKT phosphorylation as in liver of aging rats. However a decrease in IRS-1/SHP2 association is accompanied by a reduction in insulin induced AKT phosphorylation as demonstrated in liver and muscle of epinephrine-treated rats and in muscle of aging rats.

In conclusion, the results of the present study demonstrated that insulin induced IRS-1/SHP2 association can be regulated in insulin-sensitive tissues of animal models of insulin resistance, and may have a role in the control of AKT phosphorylation, which may be implicated in the control of glycogen metabolism.

REFERENCES

1. Backer, J.M., Mayers Jr., Shoelson, S.E., Chin, D.J., Sun, X.J., Miralpeix, M., Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E.Y., Schlessinger, J., and White, M.F. (1992). Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during stimulation. *Embo J.* 11: 3469-3479.
2. Carvalho CRO, Brenelli SL, Silva AC, Nunes ALB, Velloso LA, Saad MJA, (1996). Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology*. 137: 151-159.
3. Cheatham, B., and Khan, C.R. (1995). Insulin signaling network. *Endocrinol. Ver.* 16:117-142.
4. Davidson MB, Karjala RG. 1978. Primary insulin antagonism of glucose transport in muscle from the older-obese rat. *Metabolism*. 27:194-200.
5. Downward, J. (1998). Lipid-regulated kinases: some common themes at last. *Science*. 279: 673-674.
6. Folli F, Saad MJA, Backer M, Kahn R. (1993). Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. *J.Clin.Invest.* 92:1787-1794.
7. Goodman NM, Druz SM, McElaney MA, Belur E, Ruderman NB, (1983). Glucose uptake and insulin sensitivity in rat muscle: change during 9-96 weeks of age. *J Physiol*. 244:E93-E100.
8. Goodyear LJ, Hirshman MF, Knutson SM, Horton ED, Horton ES. 1988. Effect of exercise training on glucose homeostasis in normal and insulin-deficient diabetic rats. *J Appl Physiol* 65:844-851.

9. Harari, Y.R., Tzahar, E., Nadiv, O., Rothenberg, Roberts Jr., C.,T., LeRoith. D., Yarden, Y., and Zick Y. (1992). Insulin and insulinomimetic agents induce activation of phosphatidylinositol 3'-kinase upon its association with pp185 (IRS-1) in intact rat livers. *J Biol.Chem.* 267: 17483-17486
10. Hausdorff FS, Bennett AM, Neel BG, Birnbaum MJ, 1995. Different signaling roles of SHPTP2 in insulin-induced GLUT1 expression and GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* 268, 11479-11881.
11. Kitamura, T., Ogawa, W., Sakaue, H., Hino, Y., Kuroda, K., Takata, M., Matsumoto, M., Maeda, T., Konishi, H., Kikkawa, U., and Kasuga, M.,(1998). Requirement for activation of serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Mol. Cell. Biol.* 18: 3708-3717.
12. Klippel, A., W., M., Kavanaugh, D. Pot, and L. T. Williams. (1997). A specific product of phosphatidylinositol 3'-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol. Cell. Biol.* 17; 338-344.
13. Koopmans SJ, De Boer SF, Sips HCM, Radder JK, Frolich M, Krans HMJ. 1991. Whole body and hepatic insulin action in normal, starved and diabetic rats. *Am J Physiol* 260:E825-E832.
14. Kuhné MR, Pawson T, Lienhard GE, Feng GS, (1993). The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase syp. *J. Biol Chem* 268: 11479-11481.
15. Laemmli UK, (1970).Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
16. Lima MHM, Zambelli JE, Carvalho, CR, Saad MJ, (1998). The insulin receptor substrate 1 associates with phosphotyrosine phosphatase SHPTP2 in liver and muscle of rats. *Braz J Med Biol Res* 31: 1409-1413.

17. Maegawa H, Hasegawa M, Sugai S, Obata T, Ugi S, Morino K, Egawa K, Fujita T, Sakamoto T, Nishio Y, Kojima H, Haneda M, Yasuda H, Kikkawa R, Kashiwagi A, (1999). Expression of a dominant negative SHP-2 in transgenic mice induce insulin resistance*. *J Biol Chem* 274: 30236-30243.
18. Mathaei S, Benecke H, Klein HH, Hamann A, Kreyman G, Greten G.(1990) . Potencial mechanism of insulin resistance in aging: impaired insulin-stimulated glucose transport due to a depletion of intracelular pool of glucose transporters in Ficher rat adipocytes. *J Endocrinol* 126:99-107.
19. Milarski KL, Saltiel AR, (1994). Expression of catalytically inactive syp phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin. *J. Biol. Chem.*269: 21239-21243.
20. Myers MG, White FM, (1996). Insulin signal transduction and the IRS-1 proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36: 615-658.
21. Nishimura H, Kuzuya H, Okamoto M, Yamada K, Kosaki A, Kakehi T, Inoue G, Kono S, Imura H. 1989. Postreceptor defect in insulin action in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol* 256: E624-E630.
22. Saad MJA, Hartmann LGC, Carvalho DS, Galoro AO, Brenelli SL, Carvalho CRO, (1995) Modulation of early steps in insulin in the liver and muscle of epinephrine treated rats. *Endocrine* 3:755-759.
23. Saad MJA, Carvalho CRO, Thirone ACP, Velloso LC, (1996). Insulin induces tyrosine phosphorylation of Jak2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J.Biol.Chem.*271: 22100-22104.
24. Sun XJ, Rothenberg PL, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden P, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF, (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-77.

25. Tanti, J. L., S. Grillo, T. Gremeaux, P.J. Coffe, E. Van-obberghen, and Y. Le-Marchand-Brustel. (1997). Potential role of protein Kinase B in glucose Transporter translocation in adipocytes. *Endocrinology*. 138: 2005-2010.
26. Thirone ACP, Carvalho CRO, Brenelli SL, Velloso LA, Saad MJA, 1997. Effect of chronic growth hormone treatment on signal transduction in rat tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 130: 33-42.
27. Towbin H, Staehlin J, Gordon J, (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354.
28. Wallberg-Henriksson H, Holloszy JO. 1985. Activation of glucose transport in diabetic muscle: responses to contraction and insulin. *Am J Physiol* 249:C233-C237.
29. Wilson, G.F. and Kaczmarek, L.K. (1993). Mode-switching of a voltage-gated cation channel is mediated by a protein kinase A-regulated tyrosine phosphatase. *Nature*. 366: 433-438.
30. White MF, Maron R, and Kahn CR, 1985. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr 185 000 protein in intact cells. *Nature* 318:183-186.
31. White MF, Kahn CR, (1994). The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* 269: 1-5.32.
32. Yamauchi K, Ribon V, Saltiel AR, Pessin JE, (1995). Identification of the major SHPTP2-binding protein that is tyrosine-phosphorylated in response to insulin. *J. Biol. Chem.* 270: 17716-17722.
33. Yoshimasa Y, Yamada K, Ida T, Kakehi T, Imura H. 1988. Change of insulin action with aging in conscious rats determined by euglycemic clamp. *Am J Physiol* 254:E92-E98.

LEGENDS

Figure 1. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in intact liver from STZ-treated rats. Saline 0.9 % (lanes 1 and 3) or insulin 6 μ g (lanes 2 and 4) was administered into the portal vein as a bolus injection and 30 s later the liver was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-SHP2 and immunoblotted with the same antibody (C). Aliquots of amples were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody (A) and anti-SHPTP2 antibody (B). Aliquots of samples were immunoblotted with anti-AKT/PKB (D). Scanning densitometry of autoradiograms was performed in six experiments. The black bar represent the control group and the white bar represent the STZ-treated group. The data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$.

Figure 2. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in intact muscle from STZ-treated rats. Saline 0.9 % (lanes 1 and 3) or insulin 6 μ g, (lanes 2 and 4) was administered into the portal vein as a bolus injection and 90 s later the muscle was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-SHP2 and immunoblotted with the same antibody (C). Aliquots of same samples were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody (A) and anti-SHPTP2 antibody (B). Aliquots of samples were immunoblotted with anti-AKT/PKB (D). Scanning densitometry of autoradiograms was performed in six experiments. The black bar represent the control group and the white bar represent the STZ-treated group. The data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$.

Figure 3. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in intact liver from epinephrine-treated rats. Saline 0.9 % (lanes 1 and 3) or insulin 6 μ g, (lanes 2 and 4) was administered into the portal vein as a bolus injection and 30 s later the liver was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-SHP2 and immunoblotted with the same antibody (C). Aliquots of samples were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody (A) and anti-SHPTP2 antibody (B). Aliquots of samples were immunoblotted with anti-AKT/PKB (D). Scanning densitometry of autoradiograms was performed in six

experiments. The black bar represent the control group and the white bar represent the epinephrine-treated group. The data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$.

Figure 4. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in intact muscle from epinephrine-treated rats. Saline 0.9 % (lanes 1 and 3) or insulin 6 μ g (lanes 2 and 4) was administered into the portal vein as a bolus injection and 90 s later the muscle was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-SHP2 and immunoblotted with the same antibody (C). Aliquots of samples were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody (A) and anti-SHPTP2 antibody (B). Aliquots of samples were immunoblotted with anti-AKT/PKB (D). Scanning densitometry of autoradiograms was performed in six experiments. The black bar represent the control group and the white bar represent the epinephrine-treated group. The data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$.

Figure 5. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in intact liver from 2 month-old or 20 month-old rats. Saline 0.9 % (lanes 1 and 3) or insulin 6 μ g (lanes 2 and 4) was administered into the portal vein as a bolus injection and 30 s later the liver was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-IRS-1 and immunoblotted with the same antibody (C). Aliquots of samples were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody (A) and anti-SHPTP2 antibody (B). Aliquots of samples were immunoblotted with anti-AKT/PKB (D). Scanning densitometry of autoradiograms was performed in six experiments. The black bar represent the control group(2 month-old) and the white bar represent the 20 month-old group. The data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$.

Figure 6. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in intact muscle from 2 month-old or 20 month-old rats. Saline 0.9 % (lanes 1 and 3) or insulin 6 μ g (lanes 2 and 4) was administered into the portal vein as a bolus injection and 90 s later the muscle was excised and aliquots containing the same amount of protein were immunoprecipitated with anti-SHP2 and immunoblotted with the same antibody (C). Aliquots samples were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody (A) and anti-SHPTP2 antibody (B). Aliquots of samples were immunoblotted with

anti-AKT/PKB (D). Scanning densitometry of autoradiograms was performed in six experiments. The black bar represent the control group(2 month-old) and the white bar represent the 20 month-old group. The data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$.

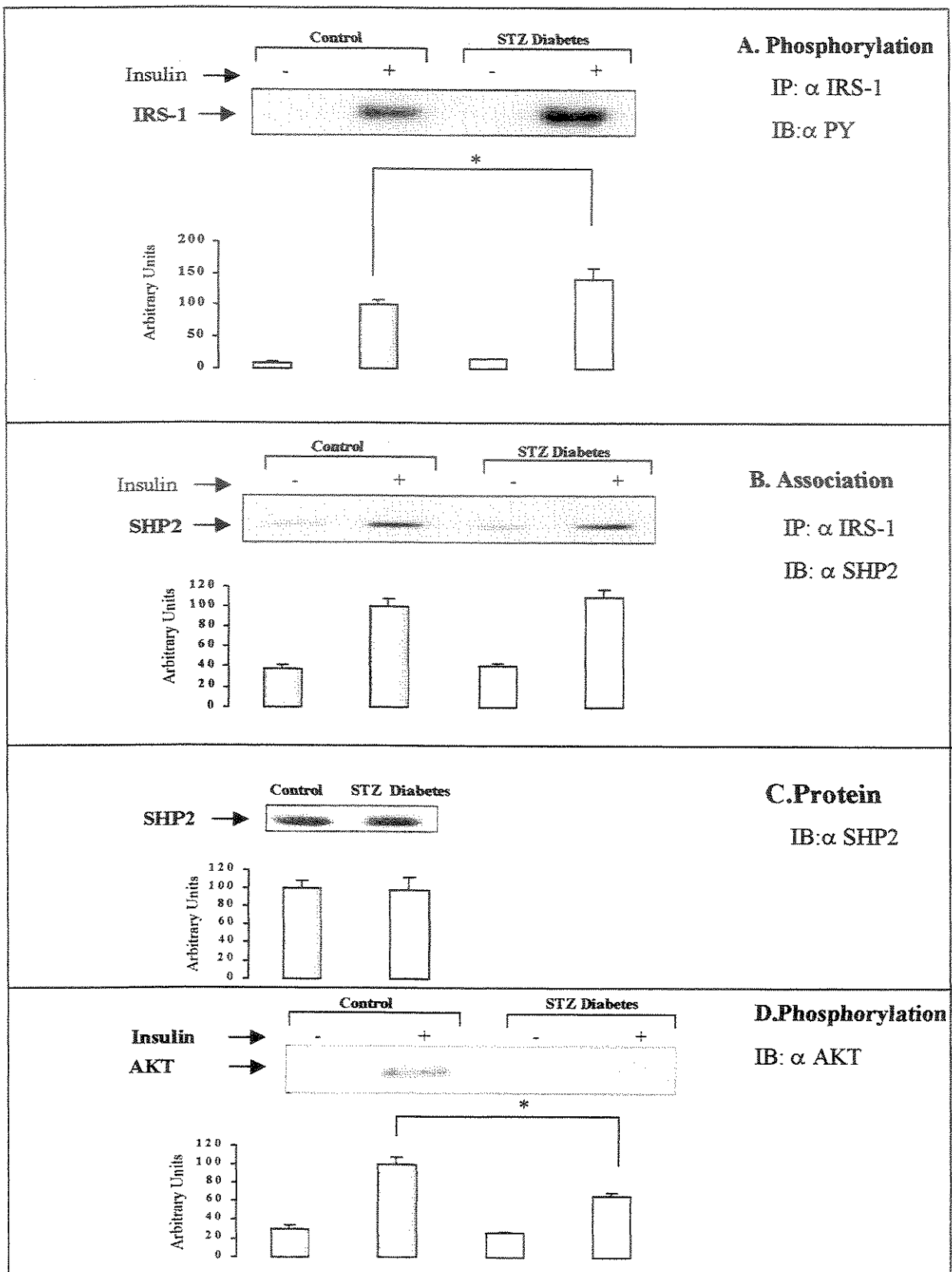


FIGURE 1

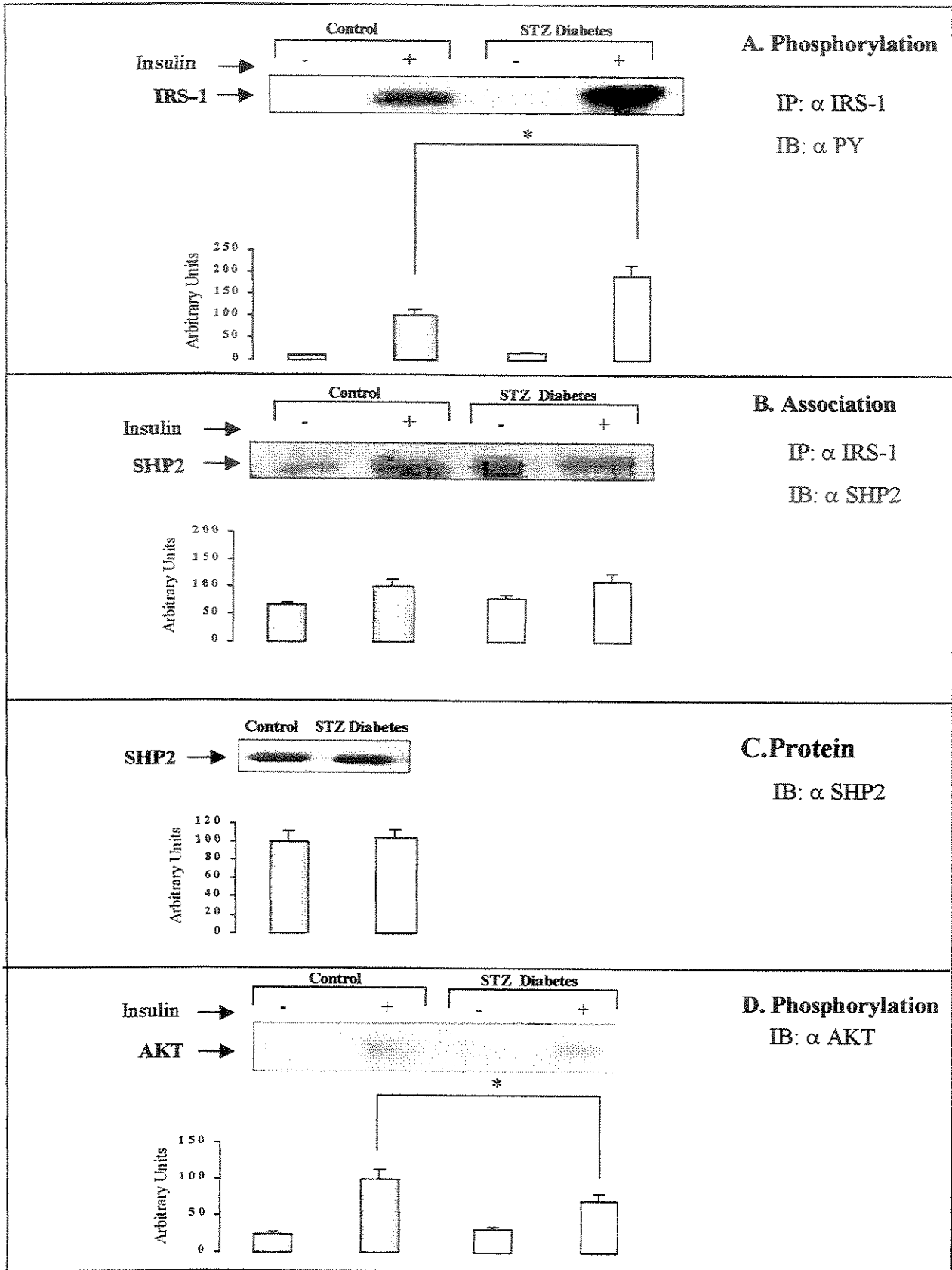


FIGURE2

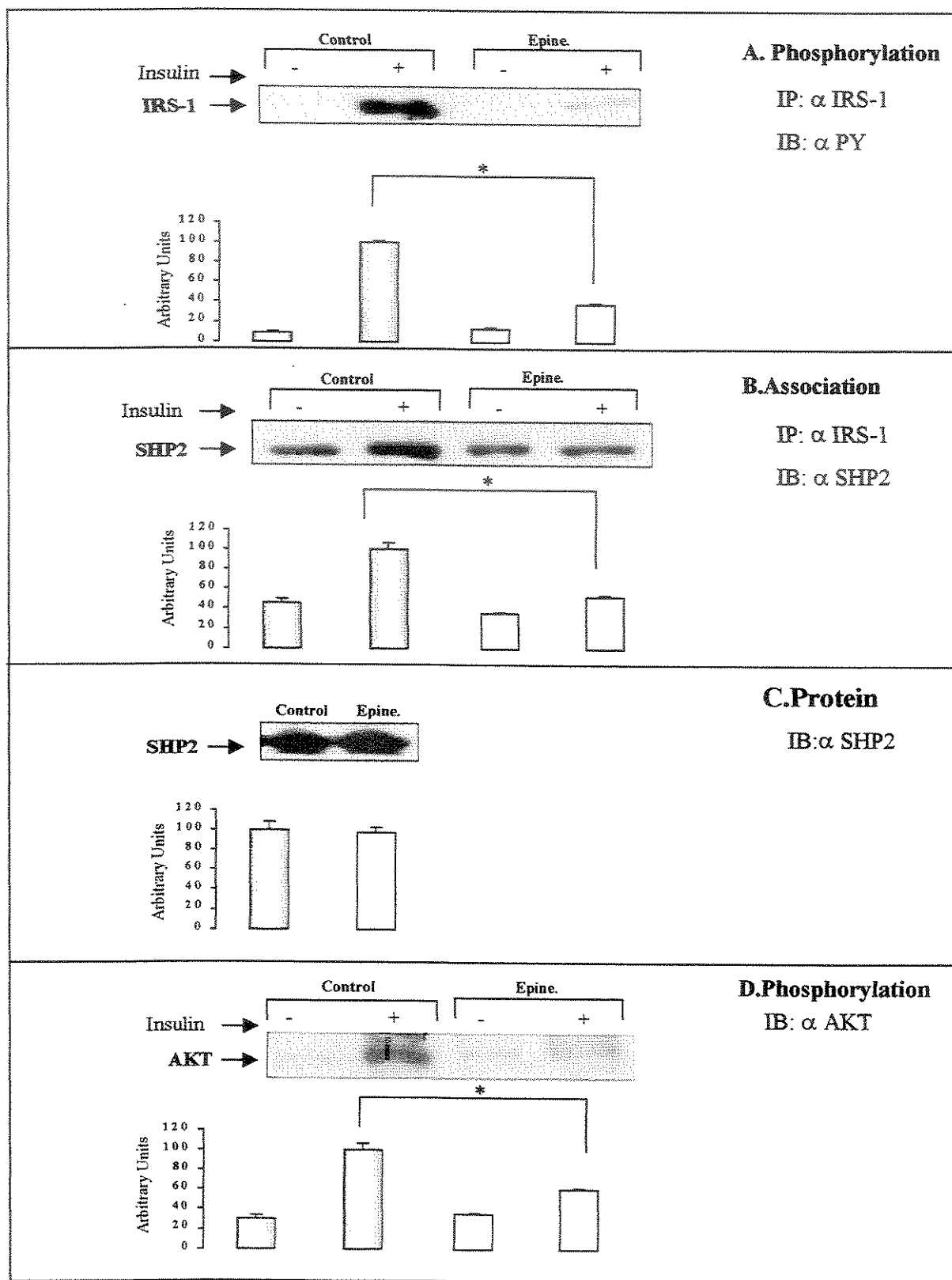


FIGURE 3

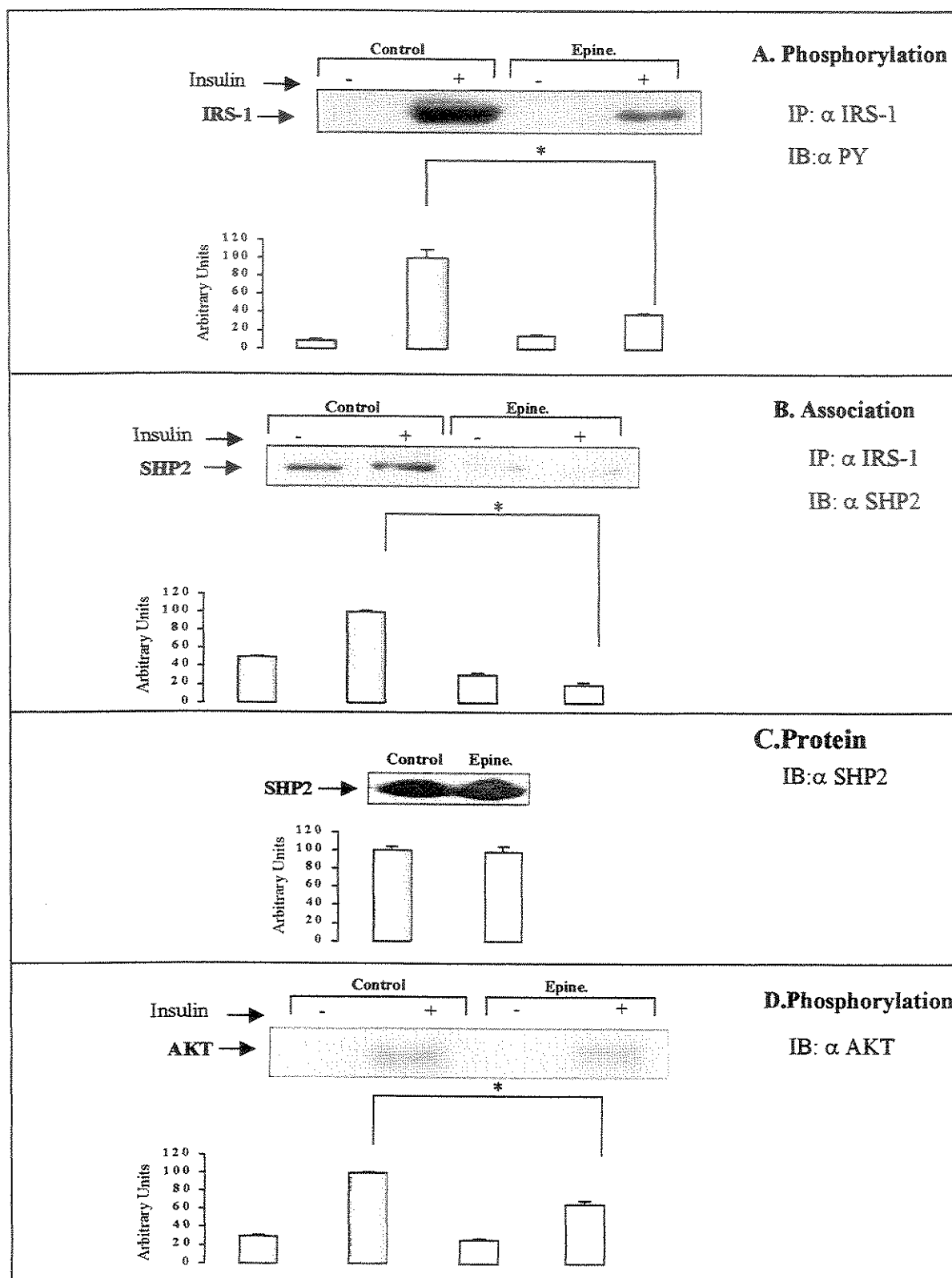


FIGURE 4

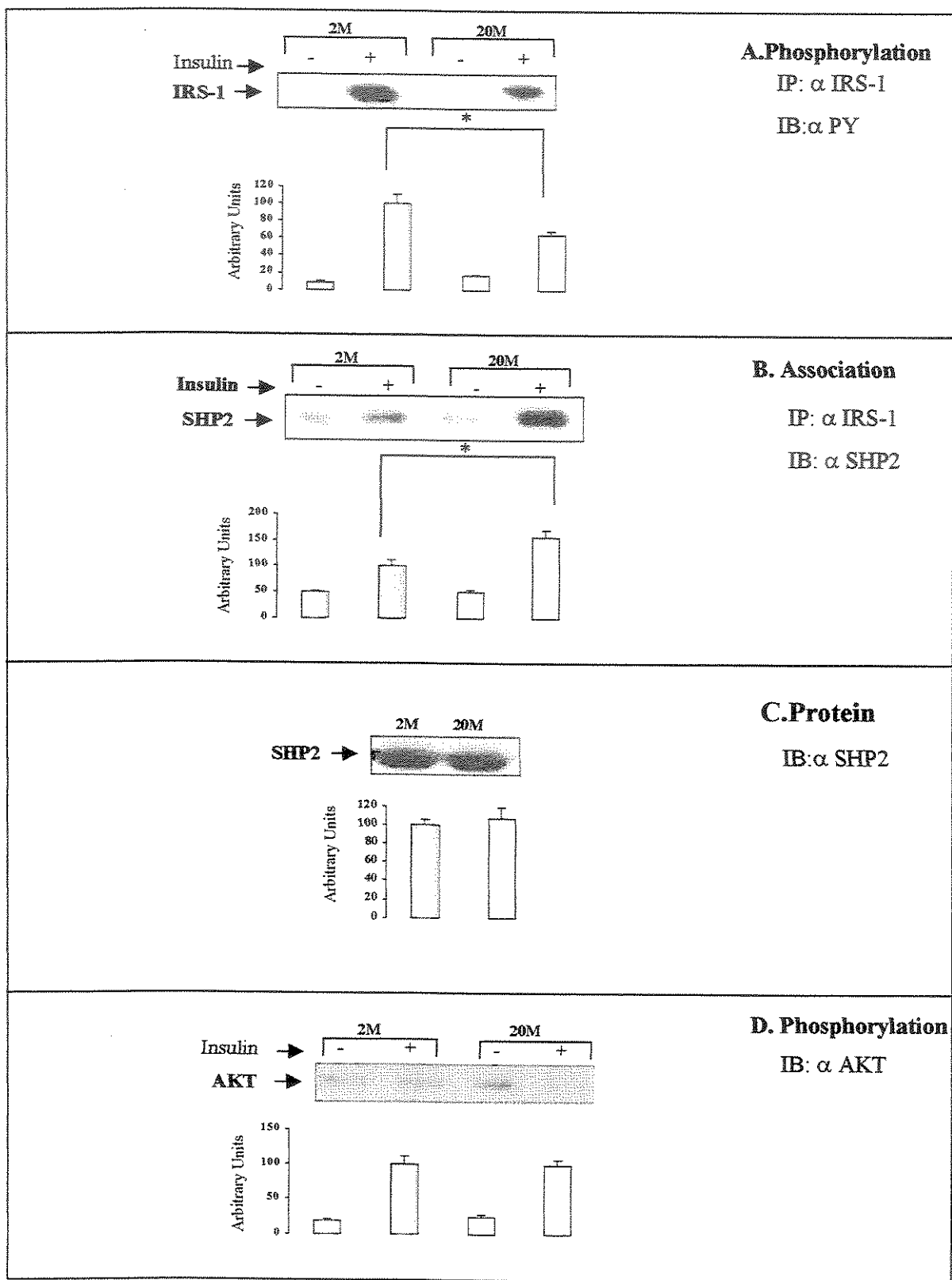


FIGURE 5

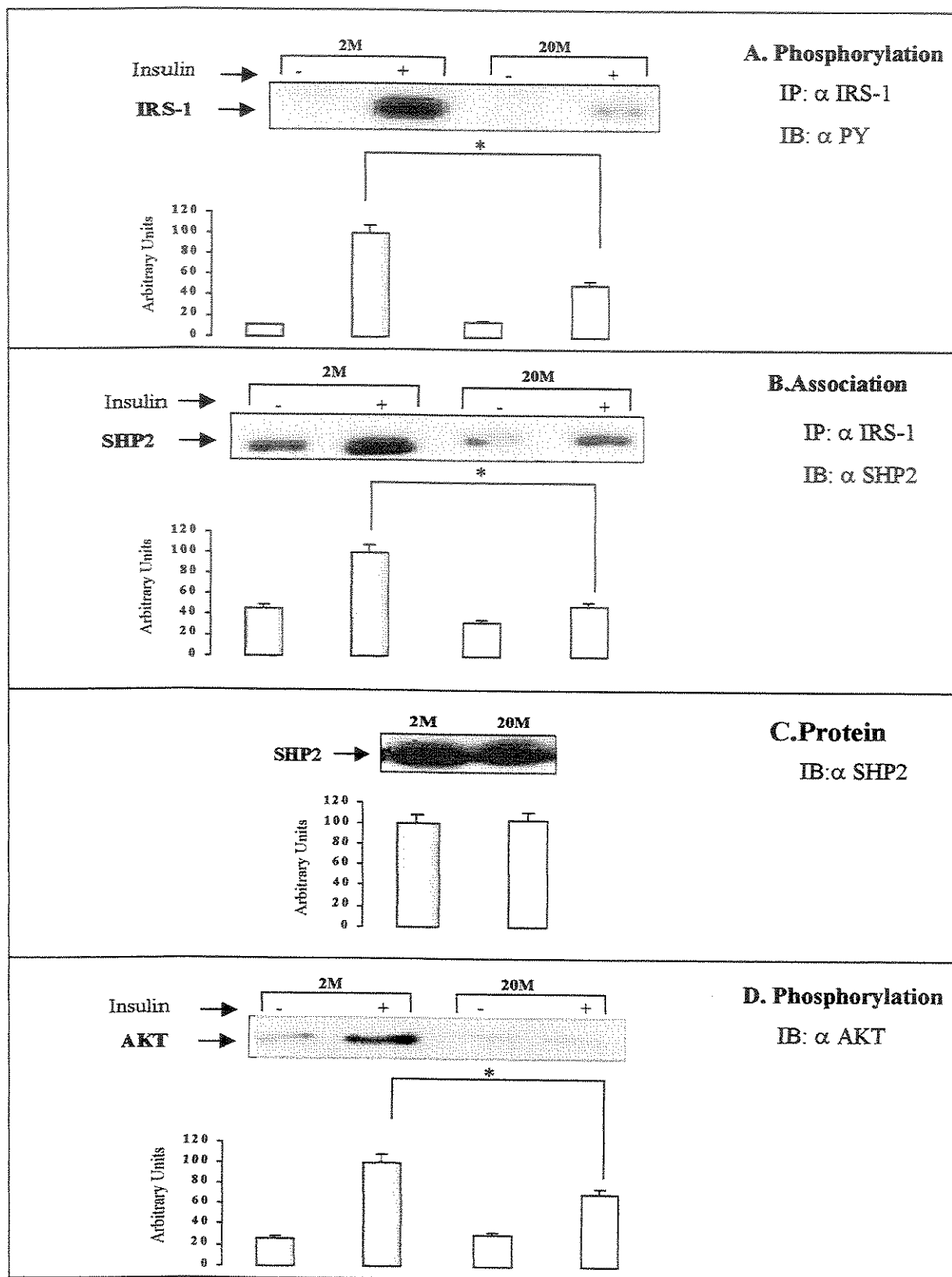


FIGURE 6



Correção ortográfica e

Edição

-2000-