

**EFEITO DA SOMATOTROPINA NA QUANTIDADE E  
FOSFORILAÇÃO DO SUBSTRATO 1 E 3 DO RECEPTOR DA  
INSULINA (IRS-1) E (IRS-3) E SUA ASSOCIAÇÃO COM A PI 3-  
QUINASE**

**FERNANDA CAMPOS DE PAIVA CASTRO**  
Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. **DANTE PAZZANESE DUARTE LANNA**

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade  
de São Paulo, para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia, Área de Concentração:  
Ciência Animal e Pastagens

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Março - 2001

“Nós, seres humanos, homens e mulheres, somos essencialmente seres de *protest-ação*. Protestamos continuamente. Recusamo-nos a aceitar a realidade na qual estamos inseridos porque somos mais, e nos sentimos maiores do que tudo que nos cerca. Com nosso pensamento habitamos as estrelas, rompemos os espaços. Por isso nós, seres humanos, temos uma existência condenada - condenada a abrir caminhos, sempre novos e surpreendentes. Ele sempre está fora do centro - O ser humano, esse desequilibrado.”

Leonardo Boff

À minha mãe, que fez de seu amor incondicional o principal legado de nossa criação.

Ao meu pai, pela generosidade e sutileza dos gestos.

Ao meu irmão, pelo seu caráter e persistência em colocar seu pensamento com muita delicadeza e inteligência.

À minha avó, mulher de grande força e alegria. Estar ao seu lado é apreender a dar importância ao substancial na vida.

Aos meus tios João, Myrian e Dirce Maria e aos primos Fabiano, Rafael e Leticia, pelo carinho de todos esses anos.

Ao meu avô (*in memoriam*), pela maneira simples de viver.

**DEDICO**

Ao professor Dante Pazzanese Duarte Lanna, pela oportunidade de ter desenvolvido este trabalho.

Às amigas Biotita, Sativa, Vara e Prê por toda força e companheirismo

À amiga Maria Luisa, pela alegria.

Aos amigos de laboratório, Sérgio, Eduardo, Elaine, Tuka, Juliano, Biológico, Dimas, Andréa e Marco por toda ajuda, mas principalmente, por permitirem ser o laboratório um lugar prazeroso de se estar.

À Rosângela Bezerra, por todos os ensinamentos da técnica.

À Fapesp, órgão financiador deste projeto.

**AGRADEÇO**

# SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	vi
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Hormônio de crescimento.....	4
2.2.1. Hormônio de crescimento em animais em crescimento.....	4
2.2. Ação Molecular do GH.....	7
2.3. O processo de sinalização insulínica.....	9
2.3.1. Receptor da Insulina.....	11
2.3.2. Os IRSs e sua ativação/ interação com a PI 3-quinase.....	12
2.4. Influência do GH no tecido adiposo.....	16
2.4.1. Efeito do GH sobre o metabolismo do tecido adiposo.....	17
2.4.1. Efeito do GH sobre a resposta à Insulina.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Animais.....	23
3.2. Materiais.....	24
3.3. Tecidos.....	24
3.4. Procedimento.....	25
3.4.1. Culturas de Tecido.....	25

3.4.2. Avaliação na concentração e nas taxas de fosforilação.....	26
3.5. Análise de dados.....	29
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
4.1. Resultados.....	30
4.1.1. Efeito crônico do hormônio de crescimento (48 h) na concentração de IRS-1, IRS-3 e PI 3-quinase em tecido adiposo de rato in vitro.....	30
4.1.2. Efeito crônico do hormônio de crescimento (24 h) na concentração de IRS-1, IRS-3 e PI 3-quinase em tecido adiposo de rato in vitro.....	34
4.1.3. Efeito crônico do hormônio de crescimento (24 h) na fosforilação do IRS-3, associação IRS-3/ PI 3-quinase e IRS-1/ PI 3-quinase após estímulo insulínico em tecido adiposo de rato in vitro....	38
4.2. Discussão.....	42
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>50</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

	Página
1. Concentração de IRS-1 em extratos de explantes de tecido adiposo após cultura de 48 horas com GH.....	31
2. Concentração de IRS-3 em extratos de explantes de tecido adiposo após cultura de 48 horas com GH.....	32
3. Concentração de PI 3-K em extratos de explantes de tecido adiposo após cultura de 48 horas com GH.....	33
4. Concentração de IRS-1 em extratos de explantes de tecido adiposo após cultura de 24 horas com GH.....	35
5. Concentração de IRS-3 em extratos de explantes de tecido adiposo após cultura de 24 horas com GH.....	36
6. Concentração de PI 3K em extratos de explantes de tecido adiposo após cultura de 48 horas com GH.....	37
7. Fosforilação do IRS-3 em explantes de tecido adiposo após cultura de 24 horas com GH seguida de 20 minutos com estímulo insulínico.....	39
8. Associação IRS-1/ PI 3K em explantes de tecido adiposo após cultura de 24 horas com GH seguida de 20 minutos com estímulo	

insulínico..... 40

9. Associação IRS-3/ PI 3K em explantes de tecido adiposo após cultura de 24 horas com GH seguida de 20 minutos com estímulo insulínico..... 41

# **EFEITO DA SOMATOTROPINA NA QUANTIDADE E FOSFORILAÇÃO DO SUBSTRATO 1 E 3 DO RECEPTOR DA INSULINA (IRS-1) E (IRS-3) E SUA ASSOCIAÇÃO COM A PI 3-QUINASE**

**Autora : FERNANDA CAMPOS DE PAIVA CASTRO**

**Orientador: Prof. Dr. DANTE PAZZANESE DUARTE LANNA**

## **RESUMO**

O tratamento crônico com hormônio de crescimento (GH) reduz a sensibilidade do tecido adiposo à ação da insulina. No entanto, inúmeras questões ainda existem para explicar o mecanismo exato pelo qual o GH reduz a sensibilidade à insulina. Este projeto teve como objetivo ampliar o conhecimento do efeito do hormônio de crescimento na cascata de sinalização da insulina, incluindo avaliar a concentração do substrato-1 do receptor da insulina (IRS-1), substrato-3 do receptor da insulina (IRS-3) e da PI 3-quinase, fosforilação do (IRS-1) e do (IRS-3), bem como, a interferência deste hormônio na associação entre IRS-1/PI 3-quinase e IRS-3/PI-quinase. Estes estudos foram conduzidos em um modelo de cultura crônica de tecido adiposo com GH, que preserva o efeito homeorrético de redução da sensibilidade à insulina. Para avaliar os efeitos de exposição do tecido adiposo ao GH, os explantes foram submetidos a dois ensaios em meio de cultura 199 com: Ensaio I (48 horas): a) I + D (100 ng/ml insulina + 10 mM dexametasona); b) I + D + GH (100 ng/ml insulina + 10 mM dexametasona + 100 ng/ml GH). Ensaio II (24 horas): a) controle (sem adição de hormônio); b) GH (100 ng/ml). Metade dos explantes do ensaio II, após 24 horas de cultura, foram estimulados com insulina (1 µg/ml) por 20 min. Os resultados, consistentes com a literatura, demonstraram uma redução de mesma magnitude (~30%) na concentração de IRS-1 em ambos os ensaios onde adipócitos de ratos foram cronicamente tratados com GH por 24 e 48



horas. Os níveis proteicos de IRS-3 variaram entre ensaios, onde pode ser encontrada uma redução de 15% no ensaio de 24 horas e de 27%, no de 48 horas. A concentração da PI 3-quinase apresentou uma redução média de 27% em ambos os tratamentos com GH por 24 e 48 horas. O IRS-1 e o IRS-3 apresentaram redução de 44 e 28%, respectivamente, em suas associações com a PI 3-quinase após estímulo insulínico nos explantes tratados com GH por 24 horas e uma redução de 28% foi observada na fosforilação do IRS-3 nesses explantes. Estes dados sugerem que o tratamento crônico com hormônio de crescimento altera os passos iniciais da sinalização insulínica, possivelmente cooperando para uma alteração da sensibilidade do tecido a este hormônio.

**EFFECT OF GROWTH HORMONE TREATMENT IN THE QUANTITY AND PHOSPHORYLATION OF THE INSULIN RECEPTOR SUBSTRATE -1 AND -3 (IRS-1) AND (IRS-3) AND THEIR ASSOCIATIONS WITH PI 3-KINASE**

Author : FERNANDA CAMPOS DE PAIVA CASTRO

Adviser: Prof. Dr. DANTE PAZZANESE DUARTE LANNA

**SUMMARY**

The growth hormone treatment (GH) decreases the adipose tissue sensitivity to the insulin action. However, the exact molecular mechanism remains unclear. In the present study, we have employed an organ maintenance system for adipose tissue in order to better characterize the cellular basis of the insulin resistance effect of GH. The objective of this project was to amplify the knowledge of the growth hormone effects on the insulin signal cascade through determination of the insulin receptor substrate -1 (IRS-1), -3 (IRS-3) and PI 3-kinase (PI-3K) concentrations, IRS-1 and IRS-3 phosphorylations and the associations of these substrates with PI 3-kinase. In order to analyse the effects of the adipose tissue exposition to GH, explants were subjected to two essays in 199 medium containing: Essay I (48 horas): a) I + D (100 ng/ml insulin + 10 mM dexamethasone); b) I + D + GH (100 ng/ml insulin + 10 mM dexamethasone + 100 ng/ml GH). Essay II (24 horas): a) control (no hormone addition); b) GH (100 ng/ml). After 24 hours culture, half of the essay II explants were stimulated with insulin (1µg/ml) for 20 min. The results, consistent with the literature, showed a reduction of the same magnitude (~30%) in the concentration of IRS-1 in both essays where adipocytes were chronically treated with growth hormone for 24 and 48 hours. The IRS-3 protein levels varied between essays, being a reduction of 15% encountered in the 24 hours essay, and a reduction of 27% in the 48 hours. The PI 3-kinase concentration

reduced 27% in both GH treatments for 24 and 48 hours. The IRS-1 and IRS-3 showed a reduction of 44 e 28%, respectively, in their associations with PI 3-kinase after 20 min insulin stimulation in the 24 hours GH treated explants and, in the same explants, after insulin stimulus, the IRS-3 phosphorylation was reduced 28%. These data suggest that chronically GH treatment alters the early steps of insulin signal transduction pathway, possibly cooperating with an alteration in the adipose tissue sensitivity to insulin.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso do hormônio de crescimento tem enorme impacto na produção animal, tanto de leite como de corte. Seus efeitos sem precedentes de aumento no ganho de peso, eficiência de crescimento e melhora da qualidade da carcaça de suínos estão sendo empregados na prática com enorme sucesso, principalmente na Austrália. O efeito do hormônio de crescimento sobre o tecido adiposo é fundamental para estes resultados e envolvem, basicamente, a redução nas taxas de síntese de gordura. Esta redução na lipogênese parece ser mediada pela redução da expressão de genes das enzimas reguladoras, assunto estudado por vários grupos de pesquisa, inclusive o do Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal da ESALQ/USP.

Paralelamente, o tratamento crônico com hormônio de crescimento reduz a sensibilidade do tecido adiposo ao efeito lipogênico da insulina. Vários estudos foram conduzidos para avaliar este efeito e o objetivo deste trabalho foi o de melhor compreender os mecanismos envolvidos na interação dos efeitos do hormônio de crescimento e insulina.

A insulina é um hormônio de efeitos pleiotrópicos que age como hormônio regulador do metabolismo e como promotor de crescimento. A insulina age nas células estimulando o metabolismo de glucose, proteínas e lipídios e também atua na síntese de RNA e DNA modificando a atividade de várias enzimas e processos de transporte. No fígado a insulina estimula a incorporação de glucose em glicogênio e inibe a glicogenólise e gluconeogênese. No músculo e no tecido adiposo, a insulina estimula o consumo, estoque e metabolismo de glucose.

Desde a descoberta da insulina, há 70 anos, pesquisas vêm sendo feitas na tentativa de entender o mecanismo molecular de sua ação. A importância do entendimento da ação insulínica está nos seus efeitos fisiológicos como também no fato de que alterações podem

acarretar em resistência à insulina, o que representa um importante papel na patogenicidade de muitos distúrbios, incluindo obesidade, diabetes mellitus, hipertensão e intolerância à glucose associada à muitas doenças endócrinas (ver revisão de Kahn et al., 1985).

A aplicação de hormônio de crescimento exógeno representa um tratamento que leva à resistência à insulina. Mais especificamente há uma redução da sensibilidade de alguns tecidos à ação da insulina (Wray-Cahen, 1992; Dunshea et al., 1992). Este efeito sobre a resposta à insulina, principalmente sobre o tecido adiposo, é considerada fundamental para a redução em até 80% da lipogênese em espécies de interesse agrônomico (i.e. suínos). No entanto, inúmeras questões ainda existem para explicar o mecanismo exato pelo qual o GH reduz a sensibilidade à insulina.

Devido à caracterização do receptor da insulina como uma proteína quinase e indentificação de alguns componentes do sistema de resposta do sinal insulínico, tornou-se possível um maior entendimento do mecanismo da ação insulínica em nível molecular (White et al., 1985; Sun et al., 1991). A insulina inicia seus efeitos, enquanto promotor de crescimento e no metabolismo, ligando-se à subunidade- $\alpha$  de seu receptor tetramérico, o que possibilita a ativação da quinase na subunidade- $\beta$  resultando na autofosforilação de resíduos específicos de tirosina (Cheatham e Kahn, 1995). Esta interação acarreta na ativação da atividade da tirosina quinase do receptor. Na maioria das células, este evento primário leva à fosforilação subsequente de tirosinas presentes em proteínas citoplasmáticas de peso molecular entre 165-185 kDa (Yenush e White, 1997). Um componente desta banda foi bem caracterizado como sendo o substrato-1 do receptor da insulina (IRS-1) (Sun et al., 1991). Consideráveis evidências demonstraram que a atividade da tirosina quinase do receptor da insulina e sua associação com a fosforilação do IRS-1 são essenciais para muitos, se não todos, os efeitos biológicos da insulina (ver revisão de Thirone et al., 1997; Cheatham e Kahn, 1995).

Este projeto teve como objetivo ampliar o conhecimento do efeito da hormônio de crescimento na cascata de sinalização da insulina, incluindo avaliar a concentração do substrato-1 do receptor da insulina (IRS-1), substrato-3 do receptor da insulina (IRS-3) e da

PI 3-quinase, fosforilação do (IRS-1) e do (IRS-3), bem como, a interferência deste hormônio na associação entre IRS-1/PI 3-quinase e IRS-3/PI-quinase. Estes estudos foram conduzidos em um modelo de cultura crônica de tecido adiposo com GH, que preserva o efeito homeorrético de redução da sensibilidade à insulina.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Hormônio de Crescimento**

#### **2.1.1. Hormônio de crescimento em animais em crescimento**

Há mais de 60 anos os cientistas demonstraram a presença de uma substância proveniente da pituitária anterior que era responsável por um aumento no crescimento de ratos. Mais tarde foi concluído que o tratamento com esta substância alterava a composição de ganho, aumentando a deposição de músculo e reduzindo a de gordura (Bauman e Vernon, 1993). Esta substância foi denominada “somatotropina”, do grego, “crescimento de tecido”. Somatotropina (ST) também pode ser referida como hormônio de crescimento (GH).

O hormônio de crescimento orchestra diversos processos fisiológicos promovendo maior acréscimo de tecido magro (durante crescimento) e aumento da síntese de leite (durante lactação). O GH exerce um controle homeorrético que afeta vários tecidos alvo (músculo, tecido adiposo, glândula mamária, etc.) de uma maneira coordenada reestabelendo uma nova ordem de utilização dos nutrientes por esses tecidos. Os efeitos biológicos do GH podem ser classificados em somatogênicos ou metabólicos. Os efeitos somatogênicos são aqueles pelos os quais o GH estimula proliferação celular. Esses efeitos são mediados pelo

IGF-I (insulin-like growth factor) (Rechler & Nissley, 1990). Muitos dos efeitos metabólicos do GH são de ação direta e envolvem uma variedade de tecidos e metabolismo de todas as classes nutricionais: carboidrato, lipídios e proteína. Essas alterações coordenadas no metabolismo dos tecidos alteram a partição de nutrientes e por isso exercem papel fundamental no aumento de peso e de produção de leite.

Grandes avanços no entendimento da biologia deste hormônio ocorreram durante a Segunda Guerra Mundial. Cientistas ingleses estudaram o uso do GH para aumento da produção de carne e leite e corroboraram efeitos positivos tanto na taxa de crescimento quanto na produção de leite de animais tratados. No entanto, pesquisas indicaram que a quantidade de hormônio de crescimento bovino (bGH) que poderia ser extraída da pituitária de bovinos abatidos seria insuficiente para atender a demanda de leite do país. Mais recentemente, com o avanço da biologia molecular, tornou-se possível a produção de proteínas através da técnica do DNA recombinante em quantidade ilimitada. Devido ao aumento da produtividade e eficiência animal, em decorrência do uso do bGH, várias companhias vêm produzindo hormônio de crescimento recombinante, cooperando para um aumento exponencial nas pesquisas referentes ao papel do GH na biologia da lactação, deposição de gordura e síntese de proteína.

O hormônio de crescimento é um hormônio protéico formado por 191 aminoácidos, citado na literatura como sendo “espécie específico”, no entanto seria mais preciso referir-se a ele como “espécie limitado”. Isto significa que o hormônio de crescimento de uma espécie não é capaz de exercer seus efeitos biológicos em outra (Bauman, 1992). O bGH (hormônio de crescimento bovino) e o pGH (hormônio de crescimento suíno) dividem alto grau de afinidade em suas sequências de aminoácido (~90%, Bauman & Vernon, 1993; Etherton et al., 1993). Por um outro lado, 35% dos aminoácidos do hGH (hormônio de crescimento humano) são diferentes do bGH e pGH. Este dado é importante, pois a suplementação de animais não deve ter efeito sobre a saúde humana. Pelo contrário, o GH, além de reduzir o custo de produção, produz carne com menor teor de gordura, algo interessante para o consumidor. A redução no teor de gordura pode cooperar para a solução de alguns problemas como obesidade e diabetes.



O hormônio de crescimento é um hormônio protéico sintetizado e secretado pela glândula da pituitária anterior. A secreção do GH é regulada por dois peptídeos hipotalâmicos que estimulam (fator de liberação do hormônio de crescimento, GRF) ou inibem (somatostatina) a liberação do GH da glândula pituitária (Tuggle & Trenkle, 1996). Em adição a esses dois peptídeos, existe um terceiro hormônio, ainda não identificado, que se liga ao receptor do GH estimulando sua liberação através de uma via de sinalização distinta daquela do GRF (Etherton & Bauman, 1998).

O GH apresenta efeitos impressionantes na partição de nutrientes entre músculo e tecido adiposo, levando a uma alteração dramática no crescimento desses tecidos. Administração diária da dose máxima efetiva de pGH ( $\geq 100 \mu\text{g}/\text{kg}$  peso vivo/ dia) em suínos em crescimento por 30-70 dias, pode aumentar 10-20 % a taxa de ganho, aumentar 13-33% a eficiência de consumo (taxa de matéria consumida por ganho de peso), decrescer 70% a taxa de deposição de gordura e estimular a deposição de proteína (crescimento muscular) em até 62% (Etherton et al., 1993).

Os primeiros estudos avaliando os efeitos de pGH no crescimento e composição de carcaça (Chung et al., 1985; Etherton et al., 1987; Evock et al., 1988) sugeriram que a resposta ao hormônio é dependente da idade animal. Foi verificado em estudos subsequentes, em suínos tratados com pGH, que o aumento na taxa de crescimento e efeitos na deposição de gordura e proteína são significativamente maiores na fase final de crescimento. No entanto, as razões desse efeito permanecem não esclarecidas (Etherton & Bauman, 1998).

Alterações na dose de GH podem afetar vários parâmetros do crescimento, eficiência produtiva e composição de carcaça (Evock et al., 1988), podendo a exigência da dose variar consideravelmente entre os diferentes parâmetros. Por exemplo, aumento no ganho de peso e acréscimo protéico são estimulados ao máximo com uma dose diária de pGH de  $\sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$  peso vivo. Ao contrário, as taxas de acréscimo de lipídeo e de consumo, com relação ao peso corporal, decrescem de modo linear quando o pGH é

administrado em doses superiores a 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso vivo/ dia. Esses dados corroboram com a hipótese de que o GH afeta o metabolismo de nutrientes e crescimento do tecido adiposo e muscular por diferentes mecanismos. Os efeitos estimulatórios do pGH no acréscimo protéico e no nível circulante de IGF-I são dependentes dos níveis protéicos da dieta, apresentando níveis próximos de zero quando da restrição do consumo protéico. Por um outro lado, a habilidade do pGH em reduzir acréscimo lipídico transcende os níveis da proteína dietética, ocorrendo mesmo quando do consumo de dietas com inadequados níveis nutricionais. (Etherton & Bauman, 1998). O efeito do GH sobre o metabolismo de lipídios está diretamente ligado ao balanço energético do animal. Quando animais com balanço energético perto de zero, ou negativo, são tratados com hormônio de crescimento, observa-se uma elevação na mobilização da gordura corporal. Em contraste, animais de balanço energético positivo (i.e. em crescimento) quando tratados com GH têm na redução da lipogênese o principal efeito deste hormônio (Lanna et al., 1994).

O mecanismo pelo qual o GH altera de maneira orquestrada a eficiência de uso dos nutrientes nos diferentes tecidos e órgãos, permitindo que mais nutrientes sejam usados para aumento do tecido magro (durante crescimento) e aumento na síntese de leite (durante lactação), envolve alterações nas vias chaves do metabolismo, como também alterações dos tecidos às repostas dos sinais homeostáticos, e.g. reduzida resposta à insulina no tecido adiposo. Esse último aspecto dos efeitos do hormônio de crescimento sobre o metabolismo é de interesse para nosso estudo e será discutido em maiores detalhes adiante.

## **2.2. Ação molecular do GH**

O hormônio de crescimento exerce papel central na regulação do crescimento e no metabolismo intermediário de nutrientes em mamíferos e outras espécies de vertebrados

(Kelly et al., 1993). Os efeitos biológicos desse hormônio são mediados pela ativação do GHR (receptor do hormônio de crescimento), uma glicoproteína de 134 kDa pertencente à superfamília de receptores citoquinas/hematopoetina. Em resposta ao GH, o GHR é fosforilado rapidamente. Baseado em análises *in vitro*, incluindo cristalografia de raio-X (De Vos et al., 1992; Wells, 1996), foi sugerido que o GH induz dimerização de seu receptor (GHR), que é passo fundamental para sua ativação (Wells et al., 1993). A dimerização do domínio extracelular induz alterações conformacionais nas regiões intracitoplasmáticas, levando a uma rápida ligação de proteínas intracelulares com atividade de tirosina quinase e sua consequente ativação. Essas proteínas são conhecidas por JAK2 -“Janus activating kinase 2” (Argetsinger et al., 1993). As JAKs foram primeiro estabelecidas como intermediárias chave nas vias de transdução de sinal ativadas por receptores de interferons  $\alpha$  e  $\gamma$  (Darnell et al., 1994). Atualmente existem quatro membros dessa família descritos em mamíferos: JAK1, JAK2, JAK3 e Tyk2 (Shaonin et al., 1999).

Estudos que causaram o impediram a interação entre GHR e JAK2, por mutação do segmento Box1 de ligação do GHR, inibiram os efeitos biológicos regulados por GH (Goujon et al., 1994; Sotiropoulos et al., 1994), indicando que a JAK2 é essencial para ação desse hormônio. O passo subsequente na sinalização é dependente, principalmente, do início da cascata de fosforilação proteica que leva à ativação de uma variedade de transdutores de sinal, nenhum dos quais único ao GHR. Os Stats (para “Signal Transducer and Activator of Transcription”) são importantes transdutores fosforilados pelo JAK2, que, quando fosforilados em tirosinas, sofrem dimerização e translocação para o núcleo, onde se ligarão à sequências de reconhecimento específicas do DNA do gene alvo, que terá sua expressão ativada (Darnell et al., 1994). Estudos conduzidos por Rotwein, et al., 1997 e Bergard et al., 1995 mostraram que o GH rapidamente estimula a atividade da Stat 5 *in vivo*, e observações similares foram publicadas para Stat 1 e 3 (Gronowski and Rotwein, 1994).

Alguns trabalhos observaram efeito do GH similar ao da insulina, no entanto este efeito do hormônio de crescimento foi somente observado a curto prazo (geralmente

minutos) e em adipócitos de ratos mantidos *in vitro*, previamente incubados por 2 horas na ausência de GH. Efeitos semelhantes aos da insulina também foram observados em adipócitos de ratos hipofisectomizados ou seja, sem a presença de GH. Nessas situações, foi demonstrado por Souza et al. (1994), Argetsinger et al. (1995) que o GH ativa o substrato 1 do receptor da insulina (IRS-1) em células de gordura e que esta ativação pode ser mediada pela JAK2. O IRS-1 fosforilado desencadeia atividade de várias outras proteínas envolvidas no processo metabólico e mitogênico da ação insulínica (e.g. Shc, Grb2, MAP-quinase). No entanto, o significado fisiológico do hormônio de crescimento na ativação desta via permanece desconhecido, principalmente porque dificilmente os tecidos não estão expostos a alguma concentração de GH circulante como nos casos citados acima.

O hormônio de crescimento pode ainda estimular a via que regula a entrada de cálcio na célula, levando à alterações intracelulares múltiplas, como ativação da fosfolipase C e fosfolipase A<sub>2</sub> (Tollet et al., 1995). A fosfolipase C participa da quebra da fosfoinositol-bifosfato em duas moléculas sinalizadoras, diacilglicerol e inositol 1, 4, 5-trifosfato (Berridge, 1988). Já a fosfolipase A<sub>2</sub> é responsável por gerar outra molécula sinalizadora, o ácido araquidônico (Tollet et al., 1995).

Portanto, várias vias de sinalização são estimuladas pelo hormônio de crescimento ligado a seu receptor. Muitas dessas vias podem interagir entre si (e.g. MAP kinase pode fosforilar algumas das STATS em seus sítios de serina, potencialmente alterando sua atividade (David et al., 1995). Várias outras vias também convergem para o núcleo, onde podem colaborar para modificar a expressão gênica (Shaonin et al., 1999). Sendo assim, é razoável considerar a ação do GH intermediada por uma rede de vias de transdução do sinal e que somadas definem os efeitos deste hormônio. (Shaonin et al., 1999).

### 2.3. O processo de sinalização insulínica

Desde a descoberta da insulina há setenta anos, consideráveis esforços têm sido dedicados à tentativa de se entender os mecanismos moleculares da ação deste hormônio. A importância dedicada ao estudo da ação insulínica justifica-se pela prevalência da resistência à insulina e, pelo fato, desta ter relevante papel na patogênese de muitas doenças, incluindo obesidade, *diabetes mellitus*, hipertensão, hiperandrogenismo ovariano e intolerância à glucose associada à muitas doenças endócrinas.

É usual dividir-se os efeitos da insulina em duas grandes categorias: metabólicos e de promoção de crescimento. Os efeitos metabólicos, em geral, são observados a baixas concentrações de insulina (Kahn, 1985), sendo seu efeito dominante na regulação da homeostase da glucose, predominantemente em tecidos hepático e periférico (músculo e gordura), apresentando também ação integrada no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios (Norman & Litwack, 1997). No fígado, a insulina inibe a gluconeogênese e a glicogenólise, levando à inibição da produção de glucose e estímulo ao armazenamento de glicogênio. No músculo e tecido adiposo, a insulina estimula a captação, armazenamento e utilização da glucose. Somam-se a esses efeitos principais na homeostase da glucose, outros metabólicos que incluem estímulo à lipogênese, inibição da lipólise, síntese de glicogênio e estímulo a captação de aminoácidos e ao fluxo iônico (Norman & Litwack, 1997).

Considerando-se a segunda categoria de eventos, onde a insulina promove o crescimento e diferenciação celular, seus efeitos dão-se a altas concentrações (Kahn, 1985) e através da modificação da atividade de uma variedade de enzimas e sistemas de transporte protéico, levando à estimulação na síntese de RNA e DNA, estímulo à síntese e inibição da degradação de proteínas (Kahn, 1985; Cheatham & Kahn, 1995). Em altíssimas concentrações os efeitos da insulina podem ser mediados através de receptores de outros hormônios. Experimentos com concentrações fisiológicas de insulina chegaram a conclusões errôneas em função de estímulos a receptores mitogênicos, como por exemplo do IGF-I.

Como outros hormônios peptídeos e alguns neurotransmissores, a insulina liga-se a seu receptor protéico específico, situado na membrana plasmática da célula, e assim inicia uma cadeia de reações que leva a seus efeitos biológicos característicos (Kahn, 1985). O receptor serve para dois propósitos: o primeiro é para reconhecer o hormônio entre todas as outras substâncias do sangue, ligando-o com alta afinidade e especificidade. O segundo é para transmitir um sinal transmembrânico que resulta em uma ativação nas vias metabólicas intracelulares.

### **2.3.1. Receptor da insulina**

Os receptores da insulina são os mediadores do processo metabólico da insulina, incluindo transporte de glucose, síntese de gordura e glicogênio, síntese de proteína e expressão gênica (Tanasijevic et al., 1993). Este receptor está presente, praticamente, em todos os tecidos de mamíferos, embora em concentrações por célula tais que variam de 40, em eritrócitos circulantes, a mais de 200000 em adipócitos e hepatócitos (Kahn, 1985). Os níveis plasmáticos normais de insulina variam de  $10^{-10}$  a  $10^{-7}$ M, e são menores que a média de afinidade de ligação da mesma pelo seu receptor. Assim, o maior número de receptores de insulina, localizados no tecido alvo, proporciona o componente necessário para a mais rápida cinética de ligação (Cheatham & Kahn, 1995).

O receptor da insulina é uma proteína transmembrânica heterotetramérica de 350-440 kDa. É composto de duas subunidades  $\alpha$  (135 kDa) e de duas subunidades  $\beta$  (95kDa) ligadas por uma ponte de dissulfídeo. A subunidade  $\alpha$ , que está localizada totalmente fora da célula, contém o campo de ligação da insulina, já a  $\beta$ , tem domínios extracelular, transmembrânico e intracelular. Neste último domínio apresenta atividade tirosina quinase que é estimulada após a ligação da insulina com receptor, levando a sua autofosforilação e a fosforilação citoplasmática de substratos protéicos (Cheatham e Kahn, 1995).

A transmissão do sinal insulínico é iniciada pela ligação do hormônio à subunidade  $\alpha$  de seu receptor levando à ativação da tirosina quinase da subunidade  $\beta$  (Rosen, 1987). A subunidade  $\beta$  do receptor da insulina é essencial para a transmissão de sinais enquanto mediadora da seleção de substratos, supostamente engajando seu domínio de ligação fosfotirosínico (PTB) às proteínas IRS e Shc, possibilitando suas respectivas ativações (White, 1997).

### **2.3.2. Os IRSs e sua ativação / interação com a PI 3-quinase**

Vários substratos endógenos do receptor da insulina vêm sendo descritos. O primeiro, e talvez o mais estudado, é a proteína citoplasmática, cujo peso molecular está entre 165 e 185 kDa, conhecida por pp185 ou substrato-1 do receptor da insulina (IRS-1) (White et al., 1985). O receptor da insulina autofosforilado, após sensibilizado pela insulina, estimula a fosforilação de resíduos de tirosina do IRS-1 (Chou et al., 1987 em Sun et al., 1992). Antes do estímulo da insulina, o IRS-1 é fosforilado em seus resíduos de serina e treonina (Sun et al., 1992). O IRS-1 é fortemente fosforilado em células que expressam altos níveis de receptores da insulina, mas pouco em células expressando receptores com mutações em seus sítios de tirosina que os fazem deficientes na sinalização (White et al., 1988).

No IRS-1 existe uma sequência consistente com a sequência consensual para a ligação de nucleotídeos fosfatados (ATP ou GTP), mas não há homologia com proteínas quinases conhecidas. Sob o ponto de vista de análise de uma sequência consensual, existem no IRS-1 vários sítios potenciais de fosforilação em serina, treonina e tirosina. Seis dos sítios de fosforilação tirosínica possuem uma sequência repetida de YMXM, onde Y é a tirosina, M metionina e X é qualquer aminoácido. Dois sítios de fosforilação adicionais estão relacionados com a sequência YXXM. O motivo YMXM não ocorre no receptor da

insulina, mas pode ser observado em várias outras tirosinas quinases de outros substratos protéicos. Nesses outros substratos de tirosinas quinases, o motivo YMXM parece estar envolvido com interações não covalentes dessas proteínas com moléculas sinalizadoras. Essas moléculas sinalizadoras são caracterizadas pela presença de domínios conhecidos como SH2 (segunda homologia ao Src; para Src, oncogene originalmente definido como produto da sarcoma vírus) que se ligam aos motivos YMXM. Saad et al (1993) demonstraram uma associação da enzima fosfatodilinositol 3'-quinase (PI 3-quinase) com o IRS-1 após estímulo com insulina, e isto suporta a hipótese de que o IRS-1 se liga à moléculas sinalizadoras durante fosforilação da tirosina estimulada pela insulina (Folli et al., 1992). Além da PI 3-quinase, pelo menos três outras proteínas com porção SH2 associam-se ao IRS-1: Syp, Nck e Grb2 (proteína ligadora do receptor para fator de crescimento) (Cheatham & Kahn, 1995). A proteína Syp (SHPTP2) é uma fosfotirosina fosfatase que contém duas porções SH2 e liga-se à tirosina 1172 do IRS-1 (Skolnik et al., 1993). Esta união ativa a fosfatase que, potencialmente, pode ter importância no crescimento celular e exercer uma auto-regulação no sinal gerado pela insulina. A Nck de 47 kDa é uma proteína adaptadora com três porções SH3 e uma SH2, sendo fosforilada em aminoácidos tirosina e serina, em resposta a diversos fatores de crescimento. Ela, provavelmente, conecta o IRS-1 à vias de sinalização envolvidas no crescimento celular. A Grb2 é uma proteína citoplasmática que contém duas porções SH3 e uma SH2, sendo esta última o sítio de ligação à tirosina 895 do IRS-1. A Grb2 age como uma molécula adaptadora que une o fator permutador de guanina para p21ras, chamada mSOS (son-of-sevenless), a fosfoproteínas como o receptor do EGF e o IRS-1. O complexo Grb/mSOS ativa a p21ras, estimulando a ligação de GTP. Por analogia, a interação do complexo Grb/mSOS ao IRS-1 pode mediar a estimulação da p21ras pela insulina (Kahn 1994; White, 1997).

A PI 3-quinase existe como uma subunidade catalítica de 110kDa e uma subunidade de 85kDa que contém 2 domínios SH2 e um SH3 (Carpenter e Cantley, 1990 em Saad, 1994). A associação entre PI 3-quinase e IRS-1 ocorre através do motivo YMXM fosforilado no IRS-1 e os domínios SH2/SH3 da subunidade de 85kDa da PI 3-quinase. A



insulina aumenta a expressão gênica da PI 3-quinase, sugerindo que esta proteína seja ativada durante estímulo com insulina (Folli et al., 1992).

Embora a fosforilação da tirosina na subunidade de 85kDa da PI 3-quinase ocorra após estímulo com fatores de crescimento, não há evidência de que a fosforilação da banda de 85kDa ocorra durante estímulo com insulina (Saad, 1994). Ao contrário disso, a ativação pode ocorrer simplesmente porque a PI 3-quinase se liga ao IRS-1. Sendo assim, a insulina estimula a fosforilação do IRS-1 que ativado se liga a outras moléculas sinalizadoras, propagando a ação insulínica, sugerindo que o IRS-1 possa servir como uma proteína porto para outras proteínas contendo o domínio SH2. O fato de o IRS-1 ser submetido à fosforilação da tirosina em vários sítios, baseado no mapeamento trípico do peptídeo, sugere que ele possa se ligar a muitas cópias da PI 3-quinase causando amplificação do sinal, ou possa interagir com várias outras enzimas contendo o domínio SH2 o que pode estar envolvido na regulação de outros processos metabólicos (Sun et al., 1992). A ativação da PI 3-quinase vem se apresentando como um dos fatores mais importantes da mediação das ações metabólicas da insulina, não por estar somente envolvida diretamente no transporte de glucose, mas também por permitir o desencadeamento de umas das vias da ação de proliferação celular da insulina (Chetham et al., 1994; Okada et al., 1994; Zhou et al., 1999) Os produtos lipídicos da reação da PI 3-quinase desencadeiam a ativação da proteína quinase B. A ativação da PI 3-quinase e provavelmente da proteína quinase B são necessárias ao transporte de glucose estimulado pela insulina (Zhou et al., 1999).

Recentemente foi purificada e clonada por Lavan et al (1997a) uma proteína de 60kDa que apresenta características muito parecidas a de outras proteínas IRS e por isso denominada IRS-3 (Smith et al., 1997). Esta proteína apresenta domínios de ligação fosfotirosínicos com motivos YXXM que se ligam aos domínios SH2 da PI 3-quinase, quando estimulada pela insulina (Ross et al., 1998). O IRS-3 também apresenta um motivo de fosforilação NPXY, sugerindo que contenha domínios PTB com especificidade similar a do IRS-1. Além disso, a observação de que o IRS-3 é expresso em dois importantes tecidos alvo da ação insulínica (i.e. fígado e tecido adiposo) é consistente com a hipótese de que o

IRS-3 possa exercer importante papel na participação dos efeitos metabólicos da insulina (Sciachitano & Taylor, 1997). Foi observado por esses autores que o IRS-3 é expresso em níveis relativamente altos nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, sugerindo que essa proteína possa exercer papel importante não só nas ações metabólicas da insulina, mas também nas ações mitogênicas.

Ross et al. (1998) mostraram que o IRS-3 sofre fosforilação em seus resíduos de tirosina quando adipócitos de ratos foram estimulados com insulina. No estado fosforilado o IRS-3 se liga ao domínio SH2 da SHP2 e da PI 3-quinase e também, uma pequena parte, ao Grb2. Estudos conduzidos com outro tipo de células, que não adiposa, mostraram que a forma ativada da fosfatase SHP2 é necessária para um completo estímulo da cascata de proteínas quinase responsável por ativar a mitogênese em resposta à insulina, no entanto o mecanismo celular deste efeito permanece não elucidado (Shi, et al. 1998).

Vários estudos (Lowenstein et al., 1992; Beitner-Johnson et al., 1996; Sun et al., 1996) identificaram proteínas de domínio SH2 que se ligam à forma fosforilada das IRSs. Em vários tipos de células, o IRS-1 apareceu ligado à PI 3-quinase, Grb2 e SHP2, como também ao adaptador Nck e à tirosina quinase Fyn; o IRS-2 (Sun et al., 1997) e IRS-4 (Fantin et al., 1998) se associam à PI 3-quinase e ao Grb2, mas não ao domínio SH2 da SHP2. Sendo assim, associação com PI 3-quinase e Grb2 parece ser um aspecto comum das quatro IRSs, mas associação com SHP2 talvez não seja (Ross et al., 1998).

As funções exatas dos IRSs ainda precisam ser esclarecidas. Adipócitos de rato, deficientes em IRS-1, quando estimulados pela insulina, apresentaram redução de 50% da atividade da PI 3-quinase no transporte de glucose (Kaburagi et al., 1997). Os 50% restantes da atividade parece ter sido em função da associação IRS-3 com a PI 3-quinase, e não do IRS-2 (Kaburagi et al., 1997). Diferente de músculos e fígado, onde o IRS-2 se apresenta como o principal substrato alternativo na ausência de IRS-1 (Yamauchi et al., 1996), a quantidade de fosforilação tirosínica do IRS-2 em adipócitos é muito baixa (Sun et al., 1997). Sendo assim, o IRS-3 é o principal substrato que se associa a PI 3-quinase em

adipócitos de ratos que não apresentam IRS-1.

A literatura apresenta dados conflitantes quanto à atividade intrínseca das proteínas IRSs em ativar a PI 3-quinase. Foi sugerido por Smith et al (1997) que o IRS-3 seria mais eficiente que o IRS-1 na ativação da PI 3-quinase em células adiposas de rato, principalmente por apresentar o IRS-3 um tempo de associação com a PI 3-quinase mais rápido, e que essa associação seria mais duradoura. Em contraste, Kaburagi et al (1997) teceu uma conclusão oposta, mostrando que o IRS-1 seria um ativador mais potente em células adiposas de camundongo. Quando comparadas por Zhou et al (1999) as atividades do IRS-1 e IRS-3 recombinantes, o IRS-3 se apresentou mais eficiente em promover a translocação do Glut4 para membrana plasmática. Existem muitas explicações plausíveis que possam contribuir para as diferentes potencialidades das proteínas IRSs em mediar os efeitos metabólicos da ação insulínica, e.g. diferente localização subcelular, ativação de diferentes moléculas efetoras da cascata sinalizadora, diferente sensibilidade à inativação por fosfatases fosfotirosínicas, etc.

Anai et al (1998a) demonstraram que o IRS-1 e o IRS-2 estão localizados principalmente nos microsossomos de baixa densidade, já o IRS-3 se encontra principalmente na membrana plasmática e contribui para a ativação da PI 3-quinase na fração da membrana. A diferença na localização dos substratos pode influir no mecanismo de resistência à insulina (Anai et al., 1998b) considerando que a ativação da PI 3-quinase, na fração dos microsossomos de baixa densidade, seja essencial para o transporte da GLUT4 nos adipócitos e de outros efeitos metabólicos da insulina.

Apesar de muito ainda faltar para um completo entendimento do processo de sinalização da insulina, já se pode ter a certeza de que os substratos do receptor são essenciais para a ação deste hormônio.

#### **2.4. Influência do GH no tecido adiposo**

#### 2.4.1. Efeito do GH sobre o metabolismo do tecido adiposo

Os adipócitos são um dos principais alvo de ação do GH e este efeito é direto, uma vez que aquelas células contém os receptores para esse hormônio. A deposição, ou acúmulo de lipídios, é função do balanço entre a taxa de síntese e a taxa de mobilização de lipídios. Este hormônio age cronicamente facilitando a lipólise ou reduzindo a taxa de síntese de lipídios (Bauman e Vernon, 1993; Wang et al., 1999), dependendo do balanço energético do animal (Dunshea et al., 1992; Lanna et al., 1995). O efeito do hormônio de crescimento no metabolismo de lipídios é um dos principais componentes das alterações na partição de nutrientes e no aumento na eficiência produtiva.

Quando vacas com balanço energético perto de zero, ou negativo, são tratadas com bGH, uma elevação na lipólise estimulada por beta-adrenérgicos pode ser observada, indicando um aumento na mobilização da gordura corporal. Nesta situação a taxa de síntese de lipídios já estaria baixa. Em contraste, animais de balanço energético positivo (e.g. em crescimento) quando tratados com GH têm na redução da lipogênese o principal efeito deste hormônio (Lanna et al., 1994), incluindo reduções dramáticas nas atividades das enzimas acetil CoA carboxilase e sintetase de ácidos graxos (Lanna et al., 1995)

Em suínos em crescimento 80% da síntese de gorduras é feita pela via *de novo* (Bauman e Davis, 1975) utilizando glucose como substrato, pois apenas 8% das calorias de uma dieta típica estão na forma de gordura. Na situação do suíno cerca de 40% da utilização de glucose pelo corpo é destinada à deposição de lipídios, que ocorre no citoplasma do tecido adiposo. Este fato faz do modelo experimental do suíno algo distinto do rato, em que os lipídios são sintetizados *de novo* no fígado e transportados para o tecido adiposo onde são reesterificados. Quando suínos são tratados com pGH, apresentam redução na deposição de gordura em até 80% (Boyd et al., 1991).

Como citado anteriormente, a redução na síntese de lipídios, como consequência da administração do GH, é decorrência de quedas acentuadas nas atividades (Lanna et al., 1995) e na abundância de mRNA (Mildner e Clarke, 1991) das enzimas acetil CoA carboxilase e sintetase de ácido graxos. No entanto, as atividades totais de acetil CoA carboxilase e sintetase de ácido graxo são reduzidas em menor proporção após a incubação de tecido adiposo em culturas de longa duração (48 horas) com GH (Lanna et al., 1994). Estes resultados são consistentes com dados da literatura indicando que alterações nas atividades da ACC e FAS não deveriam ser esperadas em razão da meia vida destas enzimas ser relativamente longa, de aproximadamente de 48 horas (Majerus e Kilburn, 1969; Nakanishi e Numa, 1970). Isto indica que embora ocorra uma redução na atividade das enzimas limitantes ACC e FAS no tecido adiposo após tratamento de longa duração com GH *in vivo*, e que esta alteração seja parte das adaptações nos fluxos metabólicos, outros mecanismos também devem atuar na inibição da lipogênese no curto prazo (6-12 horas), como redução da resposta à insulina no tecido adiposo.

Ratos que receberam 2 mg GH /dia durante 15 dias apresentaram atenuação na habilidade da insulina em aumentar consumo e a deposição de lipídio da carcaça, no entanto esses animais não apresentaram redução na atividade da sintase de ácido graxo (FAS) no tecido adiposo (Roberts et al. 1994). Ikeda et al. (1998) trataram ratos por uma semana com hormônio de crescimento e encontraram redução no peso corporal e do tecido adiposo desses animais, sem alteração na taxa de consumo. Provavelmente, o tratamento com hormônio de crescimento inibiu a síntese de gordura, como também aumentou a utilização da gordura acumulada (Ikeda et al., 1998). É interessante lembrar que o crescimento do tecido adiposo é altamente dependente da taxa de lipogênese a qual tem, em monogástricos, a glucose como principal fonte de carbono (Etherton, 2000). Sendo assim, os estudos de Roberts et al (1994) e de Ikeda et al (1998) corroboram a hipótese de que algum outro sistema, além daquele diretamente relacionado à expressão e atividade das enzimas ACC e FAS, deva estar sendo alterado em função do tratamento com hormônio de crescimento.

Além da atividade das enzimas limitantes, outro sistema que pode ser alterado é o de transporte de glucose na membrana celular controlado por hormônios homeorréticos e homeostáticos (Bauman e Vernon, 1993). Maloff et al. (1980) observaram redução no transporte de glucose e na utilização total desse substrato no estado basal e após estímulo com insulina em adipócitos de rato tratados cronicamente com GH *in vitro*. Magri et al. (1990) identificou uma redução na atividade do transportador de glucose, bem como, na quantidade do transportador Glut4. Posteriormente determinou-se que a abundância do mRNA do Glut4 é reduzida após tratamento crônico com hormônio do crescimento (Liu et al., 1991). Entretanto, outros resultados demonstraram que o efeito do GH, em inibir a lipogênese, é menor quando a concentração de glucose é mais baixa do que quando a concentração é saturante, respectivamente 1mmol/L e 5mmol/L (Donkin et al., 1996). Surpreendentemente estes resultados sugerem que não é o transporte o fator limitante à lipogênese.

O tratamento com GH altera a resposta e a atividade da proteína Gi no tecido adiposo (Lanna et al., 1995; Doris et al., 1996; Houseknecht e Bauman, 1997) e este mecanismo parece estar associado às alterações da sensibilidade à insulina.

As observações de menor sensibilidade do tecido adiposo à ação da insulina (Walton et al., 1986; Lanna et al., 1994) e de menor expressão das proteínas limitantes na síntese de lipídios e transporte de glucose nos levam a questão da importância relativa dos mecanismos envolvidos: i.e. expressão gênica da enzima limitante ou modulação do sistema de mensageiros secundários que ativam no curto prazo a via lipogênica; ou ainda uma combinação de ambos.

#### **2.4.2. Efeitos do GH sobre a resposta à insulina**

Quando animais bem nutridos são tratados com hormônio de crescimento, como já

citado anteriormente, ocorre uma acentuada queda na deposição de gordura, que pode ser também em função de uma menor sensibilidade do tecido adiposo ao estímulo da lipogênese pela insulina (Walton e Etherton, 1986; Lanna et al., 1994; Costa et al., 1998; Etherton & Bauman, 1998). Essa redução pode ser avaliada graças à uma menor incorporação da glucose neste tecido (Walton et al., 1987) e também através da medição *in vivo* do consumo total da glucose no organismo (Wray-Cahen, 1992).

A redução na sensibilidade à insulina acarreta inibição de eventos regulados por esse hormônio, e.g. transporte de glucose, atividade e expressão de enzimas lipogênicas, síntese de glicogênio, lipogênese (Etherton & Bauman, 1998). Essa redução na sensibilidade à insulina pode também ser referida como resistência à insulina, uma desordem metabólica progressiva caracterizada por um reduzido consumo de glucose corporal em resposta à concentrações normais de insulina, sendo mais frequente como resultado de defeitos poligênicos e fatores ambientais, eg. tratamento crônico com hormônio de crescimento (Gopinath & Etherton, 1989). Doenças como *Diabetes mellitus* não-dependente-da-insulina (NIDDM) e obesidade são caracterizadas por resistência à insulina (Olefsky & Nolan, 1995). No entanto existe falta de dados no que concerne à progressão nas falhas da sinalização insulínica uma vez estabelecido o quadro de resistência. Isso é especialmente verdade para o evento de sinalização nos adipócitos (Li et al., 2000).

Uma variedade de animais tratados com GH apresentou uma redução na remoção da taxa de glucose induzida pela insulina (Rosenfeld, 1982). Este mesmo autor concluiu que a redução ao estímulo da insulina ocorre em elementos “abaixo” do receptor, baseando-se no fato de que o número de receptores da insulina e sua afinidade não foram afetados em animais tratados com GH. Estudos conduzidos com suínos corroboram a hipótese de Rosenfeld, pois o GH não alterou o número de receptores de insulina nem na fosforilação do receptor em tecido adiposo de suínos (Magri et al., 1990). Resultados obtidos na Unicamp por Thirone et al. (1997) e por Balbis et al. (1996) não observaram alterações na abundância nem no nível de autofosforilação dos receptores no fígado de ratos, um tecido que responde de forma similar à do tecido adiposo de suínos. Pouco se conhece sobre os

efeitos do hormônio de crescimento na via de sinalização insulínica, mas em adipócitos parece claro que a influência deva ser pós-receptor, pois a ligação insulínica não foi afetada (Etherton, 2000).

Estudos conduzidos por Thirone et al. (1997) mostraram reduções na fosforilação em tirosinas do IRS-1 e redução na associação desse substrato com a PI 3-quinase, observadas em fígado e músculo de ratos tratados com GH. Em outro trabalho Thirone et al. (1998) observaram redução na associação IRS-1/PI 3-quinase, em músculo de ratos tratados cronicamente com GH. Corroborando esses dados, músculos de ratos transgênicos, super-expressando GH, apresentaram reduzida fosforilação do IRS-1 como também uma menor associação desse substrato com a PI 3-quinase (Dominici, et al., 1999).

Estudos conduzidos com ratos deficientes em IRS-1, que apresentaram redução na associação IRS-1/ PI 3-quinase estimulada pela insulina, concluíram que essa associação é essencial para o consumo de glucose no tecido muscular (Yamauchi, et al., 1996). No entanto, em tecido adiposo, não parece muito claro o papel da associação IRS-1 /PI 3-quinase em determinar o consumo de glucose (Araki et al., 1994). Por um outro lado, redução na expressão de Glut4 tem sido uniformemente observada em adipócitos de modelos animais resistentes à insulina (Li et al., 2000). Entretanto, não está claro se o limitante para o consumo de glucose no tecido adiposo é a concentração de Glut4 reduzida ou se é uma falha na via de sinalização insulínica que poderia levar, inclusive, à redução na quantidade de Glut4. Recentemente Li et al (2000) conduziram um experimento com ratos deficientes em Glut4 que apresentaram consumo normal de glucose porque tinham sua via de sinalização insulínica normal, mostrando que a cascata de sinalização apresenta suficiente plasticidade para acomodar alterações significativas sem reduzir consumo de glucose. No entanto, não exclui a possibilidade de o conteúdo celular de Glut4 ser fator limitante em mediar o máximo consumo de glucose em adipócitos estimulados com insulina.

Apesar desses dados sugerirem alterações nos passos iniciais da transmissão de sinal



insulínico, o mecanismo molecular, pelo qual a administração exógena ou aumento de secreção endógena de GH induz resistência à insulina, não está totalmente esclarecido. Neste sentido, a caracterização das etapas iniciais da ação insulínica, em modelo de estudo com excesso de GH, poderia contribuir para elucidação do mecanismo de redução na sensibilidade à insulina, associada à presença de GH. Este é o primeiro trabalho a estudar o efeito crônico do GH no comportamento do substrato 3 do receptor da insulina (IRS-3) em tecido adiposo de rato.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **Medições efetuadas:**

- a) concentração do IRS-1, IRS-3 e da PI 3-quinase após culturas crônica com GH;
- b) e taxa de fosforilação do IRS-1 e IRS-3; associação IRS-1/PI 3-quinase e IRS-3/PI 3-quinase após cultura crônica com GH e posterior estímulo insulínico.

Essa medições foram feitas através da imunoprecipitação, transferência e bloqueamento das proteínas, marcação e detecção da membrana.

#### **Material Biológico:**

##### **3.1. Animais**

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, variedade albina), da linhagem Wistar-Hannover, machos, jovens, com 180-200g, obtidos no Biotério Central da UNICAMP, Campinas-SP. Após o desmame, os animais recebiam como alimentação apenas ração para ratos Labina (90% de matéria seca, 25% proteína bruta e 4% de gordura), marca Purina.

### 3.2. Materias

Os reagentes e aparelho para eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE) foram da Bio-Rad (Richmond, California). Metano hidroximetila (Tris), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina, silicone, ditioneitol (DTT), Meio 199 e insulina bovina recombinante foram da Sigma (St. Louis, MO). Hormônio de crescimento biossintético humano GH (Norditropin) foi adquirido da Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark). Protein A Sepharose 6 MB da Pharmacia (Uppsala, Sweden). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0.2 µm) foi de Schleider and Schuell. Anticorpo anti-fosfotirosine monoclonal (100 µg/ml), anticorpo anti-IRS-1 policlonal (100 µg/ml), anticorpo anti-IRS-3 policlonal (100 µg/ml) foram da Santa Cruz. Anticorpo anti-PI 3-kinase (p85) policlonal foi da Upstate Biotechnology Incorporated (UBI, Lake Placid, NY). Anticorpo secundário anti-rabbit e anti-goat foram da Sigma (St. Louis, MO). Anticorpo secundário anti-mouse e sistema de detecção para fosfatase alcalina foram da Bio-Rad (Richmond, California).

### 3.3. Tecidos

Os tecidos foram obtidos após morte dos animais. O tecido adiposo de rato foi imediatamente retirado e transferido para a solução salina (0,15M NaCl), pH 7,4 contendo 25mM HEPES (Sigma Chemical Co.) e antibióticos (60 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 10 µg/ml de neomicina, 5 µg/ml de anfotericina) à temperatura de 37 °C. Estas amostras foram transferidas para o fluxo laminar para preparação dos explantes utilizados para culturas de tecido de longa duração.

### **3.4. Procedimento**

#### **3.4.1 Culturas de Tecido**

##### **Culturas de longa duração**

Após duas lavagens com o meio de transporte, os explantes foram transferidos para “multiwell” plates contendo 3ml de meio de cultura 199 (sais de Earle, L-glutamina, 25mM de bicarbonato de sódio e 25 mM de HEPES), contendo antibióticos (60 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 10 µg/ml de neomicina, 5 µg/ml de anfotericina). As amostras foram mantidas a 37°C e pH 7,4 sob uma atmosfera de 95% de ar, 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C por 24 ou 48horas.

Para avaliar os efeitos de exposição do tecido adiposo ao GH, os explantes foram submetidos a dois ensaios em meio de cultura 199 com:

Ensaio I (48 horas):

a)I+D (100 ng/ml insulina + 10 mM dexametasona);

b)I + D + GH (100 ng/ml insulina + 10 mM dexametasona + 100 ng/ml GH).

Ensaio II (24 horas):

a)controle (sem adição de hormônio);

b)GH (100 ng/ml).

Metade dos explantes do ensaio II, após 24 de cultura, foram estimulados com insulina (1 µg/ml) por 20 min.

A insulina foi solubilizada em 0,001N de HCl a pH 3.0. O GH recombinante humano utilizada nos experimentos foi solubilizada em água estéril para concentração final de 10 mg/ml e 75 mM de bicarbonato de sódio e, posteriormente, diluído em solução estéril de bicarbonato de sódio (pH 9.0) antes de ser adicionado ao meio de cultura. A estreptomicina foi solubilizada em etanol, enquanto todos os outros antibióticos foram solubilizados em água estéril. A dexametasona foi dissolvida em etanol. A concentração final de etanol no meio de cultura foi inferior a 0,025% (vol./vol.). Os hormônios foram adicionados ao meio de cultura imediatamente antes dos explantes serem transferidos para “multiwell” plates. O meio de cultura foi trocado a cada 24 horas para evitar o problema da redução da concentração dos hormônios e/ou substratos em função da sua incorporação ou degradação por células ou enzimas presentes no meio. Trabalhos anteriores garantem que a concentração dos hormônios era suficiente para obtenção de respostas máximas (plateau).

### **3.4.2. Avaliação na concentração e nas taxas de fosforilação**

## **Técnica de Western blot**

### **Preparação da amostra**

Após 24-48 horas de tratamento em cultura, 1g do tecido adiposo foi removido e, imediatamente, homogeneizado em solução tampão ( X-100 Triton 1%, 100mM Tris, pH 7,4, contendo 100mM pirofosfato de sódio, 100mM de fluoridido de sódio, 10mM EDTA, 10mM de vanádio de sódio, 2mM PMSF e 0,1 mg de aprotina/ml) a 4°C na centrífuga Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments model PT 10/3S) operada na sua máxima velocidade por 30 segundos.

O extrato foi centrifugado a 15000 rpm a 4°C numa Beckman 70.1 rotor Ti (Palo Alto, CA) por 45 minutos, para precipitar as células não homogenizadas, organelas celulares e o corpo de gordura. O infranadante foi usado para imunoprecipitação com anticorpos anti-IRS-1, anti-IRS-3 ou anti-PI 3-quinase.

### **Imunoprecipitação**

Antes de serem colocados os anticorpos, os volumes das amostras foram normalizados por concentração protéica e então colocados os anticorpos anti-IRS-1, anti-IRS-3 ou anti-PI 3-quinase num volume fixo de 15 µl/amostra e de 5µl/amostra no caso de anti-PI 3-quinase. As amostras foram incubadas por 12-14 horas a 4°C, acrescentando-se, a seguir, 50µl de proteína A-sepharose 6 MB e, após mais duas horas, os precipitados foram coletados em centrifugação de 12000rpm, a 4°C, por 15 minutos. Os precipitados foram lavados três vezes com tampão de lavagem. As proteínas precipitadas foram tratadas com

solução tampão Laemmli (Laemmli, 1970) contendo 100mM DTT e aquecidas em água ebulindo por 4 minutos, e então submetidas a eletroforese em SDS-PAGE ( bis-acrilamida 6%) em aparato de gel miniatura da Bio-Rad (Mini Protean). Os pesos moleculares padrões foram: miosina (194 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), albumina de soro de bovino (85 kDa) e albumina do óvulo (49,5 kDa).

### **Transferência e Bloqueamento das proteínas**

A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose se deu num período de 2 horas a 120V (constante), em um aparato de transferência em miniatura, da Bio-Rad (Mini-Protean), e adição de 0,02% SDS no tampão de transferência com intuito de aumentar a evasão das proteínas de grande peso molecular. O bloqueamento de proteínas não-específicas, ligadas à membrana de nitrocelulose, foi efetuada através da pré-incubação da membrana a 4<sup>o</sup>C, durante a noite, em tampão bloqueador (5% de leite magro, 10mM Tris, 150mM NaCl e 0,02% Tween 20).

### **Marcação e Detecção da membrana**

A marcação da membrana de nitrocelulose foi efetuada de forma sequencial. Primeiro foi feita a incubação da membrana com os anticorpos anti-fosfotirosina (1:200), anti-IRS-1 (1:300), anti-IRS-3 (1:300) ou anti-PI 3-quinase (1:2000). Esta incubação foi acompanhada de agitação por 1 hora a 37<sup>o</sup>C, depois a membrana foi lavada três vezes, 10 minutos cada, com TTBS. Após esse processo, a membrana foi incubada ao segundo anticorpo conjugado à fosfatase alcalina (anti-mouse (1:2000), para anti-fosfotirosina; anti-rabbit (1:4000), para anti-IRS-1 e anti-PI 3-quinase; anti-goat (1:4000), para anti-IRS-3.

Esta incubação também foi acompanhada de agitação por 1 hora a 37<sup>o</sup>C e a membrana foi lavada três vezes, 10 minutos cada, com TTBS. A visualização foi através do sistema de detecção fosfatase alcalina (Bio-Rad) e as bandas medidas pela intensidade de “pixel”, dada pelo programa Kodak DS1D Digital Science DC 120 (Eastman Kodak Company).

### **3.5 Análise dos Dados**

O delineamento experimental do trabalho foi totalmente casualizado, cujo esquema seguiu o estudo de comparações de médias usando o teste t de Student para dados pareados, conforme apropriado. Para efeito de comparação, os resultados foram expressos como variação percentual. Os resultados foram avaliados em unidades arbitrárias.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Resultados

#### 4.1.1. *Efeito crônico do hormônio de crescimento (48 h) na concentração de IRS-1, IRS-3 e PI 3-quinase em tecido adiposo de rato in vitro*

Usando anticorpos específicos contra IRS-1 (Fig. 1A and 1B) a estimativa da abundância dessa proteína apresentou redução de  $33 \pm 6\%$  ( $P < 0.01$ ,  $n=6$ ) em adipócitos de rato cronicamente tratados com GH. Amostras de tecido adiposo previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-3 e imunodetectadas com o mesmo anticorpo, encontrou-se uma redução de  $27 \pm 8\%$  ( $P < 0.05$ ,  $n=7$ ) no nível dessa proteína quando adipócitos controle foram comparados aos tratados com GH (Fig. 2A and 2B). Quando analisada a concentração de PI 3-quinase em adipócitos de rato tratados com GH, foi encontrada uma redução de  $26 \pm 8\%$  ( $P < 0.05$ ,  $n=7$ ) na quantidade aparente dessa proteína (Fig. 3A and 3B).

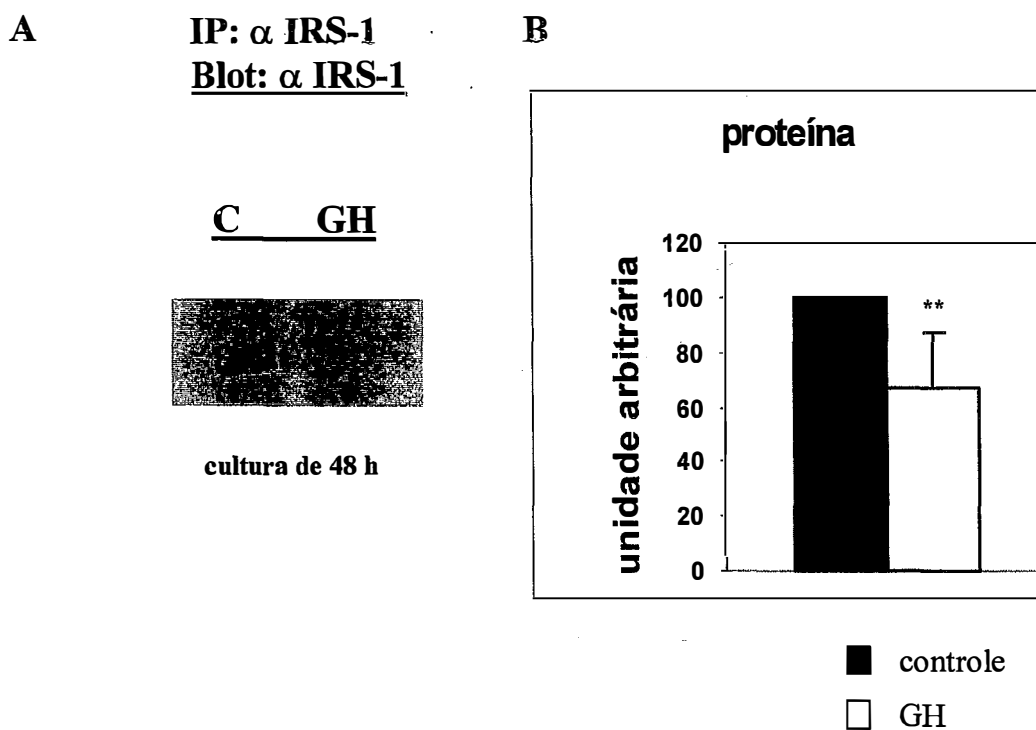


Fig.1. Extratos de explantes de tecido adiposo após cultura, contendo a mesma quantidade de proteína, foram submetidas à imunoprecipitação e imunodeteção com anticorpo anti-IRS-1 (A). A canaleta C refere-se ao controle, e como GH, aos adipócitos tratados com hormônio de crescimento. O nível protéico de IRS-1 está representado como média  $\pm$  desvio padrão, proveniente da densitometria de 6 experimentos (B). \*\*Diferenças significativas a um nível de  $P < 0.01$ .

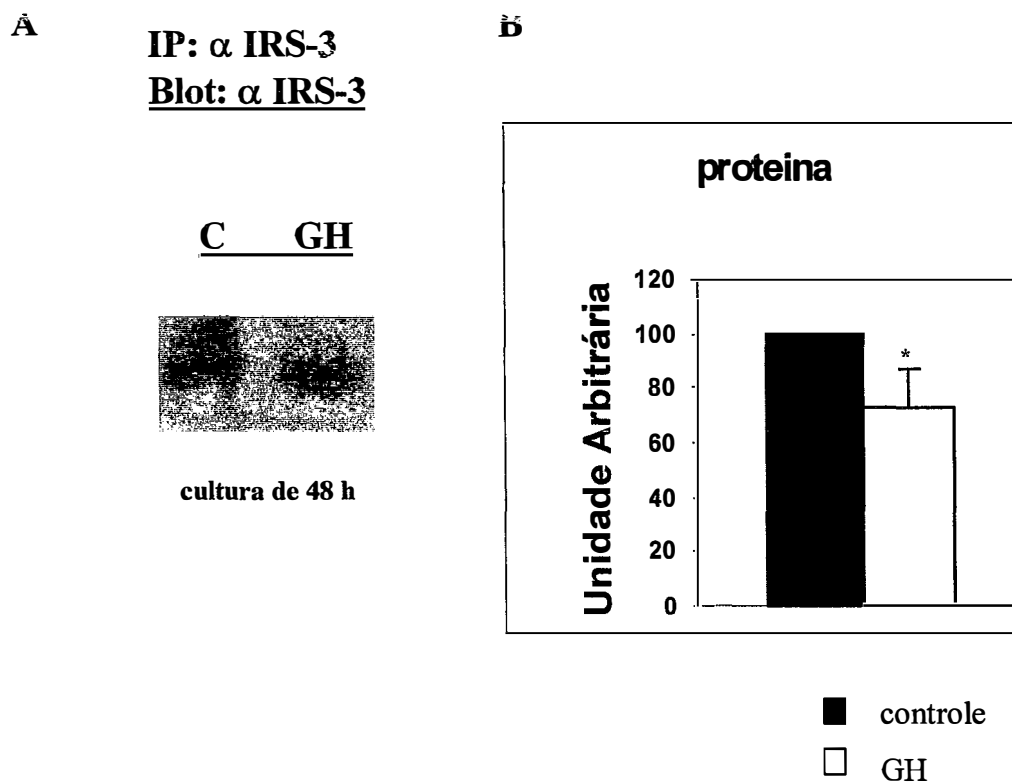


Fig.2 Amostras de extratos de tecido adiposo em cultura, contendo a mesma quantidade de proteína, foram submetidas à imunoprecipitação e imunodeteção com anticorpo anti-IRS-3 (A). A canaleta tida como (C) refere-se ao controle, e como (GH), aos adipócitos tratados com hormônio de crescimento. O nível protéico de IRS-3 está representado como média  $\pm$  desvio padrão, proveniente da densitometria de 7 experimentos (B). Diferenças significativas a um nível de  $P < 0.05$ .

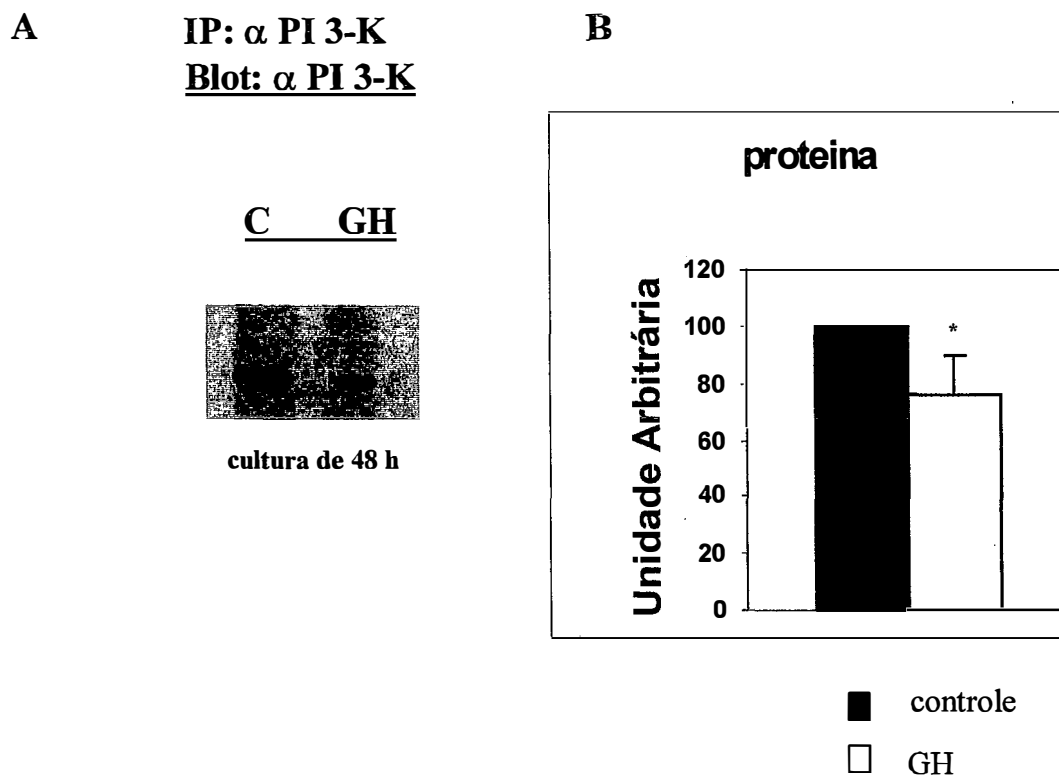


Fig.3 Amostras de extratos de tecido adiposo em cultura, contendo a mesma quantidade de proteína, foram submetidas à imunoprecipitação e imunodeteção com anticorpo anti-PI 3-quinase (A). A canaleta tida como (C) refere-se ao controle, e como (GH), aos adipócitos tratados com hormônio de crescimento. O nível protéico de PI 3-quinase está representado como média  $\pm$  desvio padrão, proveniente da densitometria de 7 experimentos (B). Diferenças significativas a um nível de  $P < 0.05$ .

#### ***4.1.2. Efeito crônico do hormônio de crescimento (24 h) na concentração de IRS-1, IRS-3 e PI 3-quinase em tecido adiposo de rato in vitro***

Em tecido adiposo, amostras tratadas com GH por 24 horas e previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-1 e imunodetectadas para o mesmo anticorpo (Fig. 4A, 4B) tiveram redução de  $29 \pm 4\%$  ( $P < 0.01$ ,  $n=5$ ). Usando o anticorpo específico para anti-IRS-3 houve uma redução de  $15 \pm 3\%$  ( $P < 0.01$ ,  $n=8$ ) na concentração desta proteína em adipócitos de rato tratados com GH por 24 horas (Fig. 5A, 5B).

Para determinar se a redução na quantidade de associação entre IRS-1/ PI 3-quinase ou entre IRS-3/ PI 3-quinase era também resultado de alterações na quantidade total da proteína PI 3-quinase em adipócitos tratados com GH, nós investigamos os níveis de PI 3-quinase por imunoprecipitação e imunodeteção dos extratos do tecido com o anticorpo da subunidade de 85 kDa desta proteína. A concentração desta proteína reduziu  $29 \pm 5\%$  ( $P < 0.01$ ,  $n=6$ ) em tecidos tratados com GH (Fig. 6A, 6B) e pode exercer influência na redução da associação da PI 3-quinase com IRS-1 e IRS-3, como mostrado abaixo.

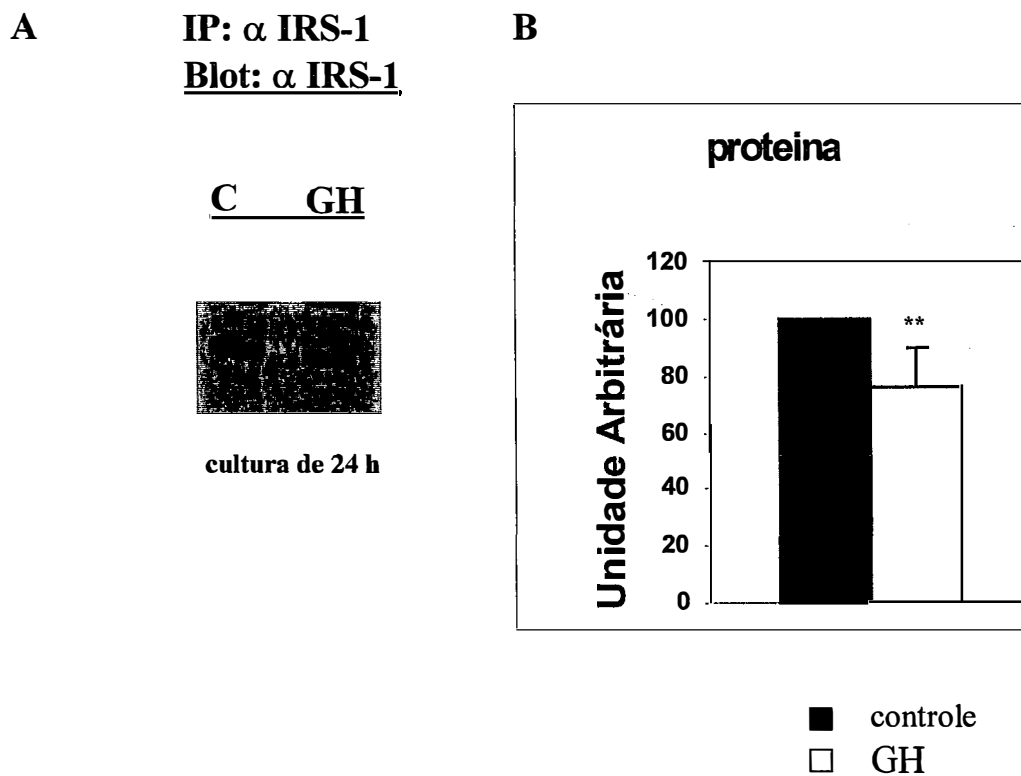


Fig.4. Amostras de extratos de cultura de tecido, controle (C) e adipócitos tratados com hormônio de crescimento (GH), contendo a mesma quantidade de proteína, foram submetidos a imunoprecipitação e imunodeteção com anticorpo anti-IRS-1 (A). A concentração de IRS-1 está mostrada em média  $\pm$  desvio padrão baseando-se na densitometria de cinco experimentos (B). Diferenças significativas a um nível de  $P < 0.01$ .

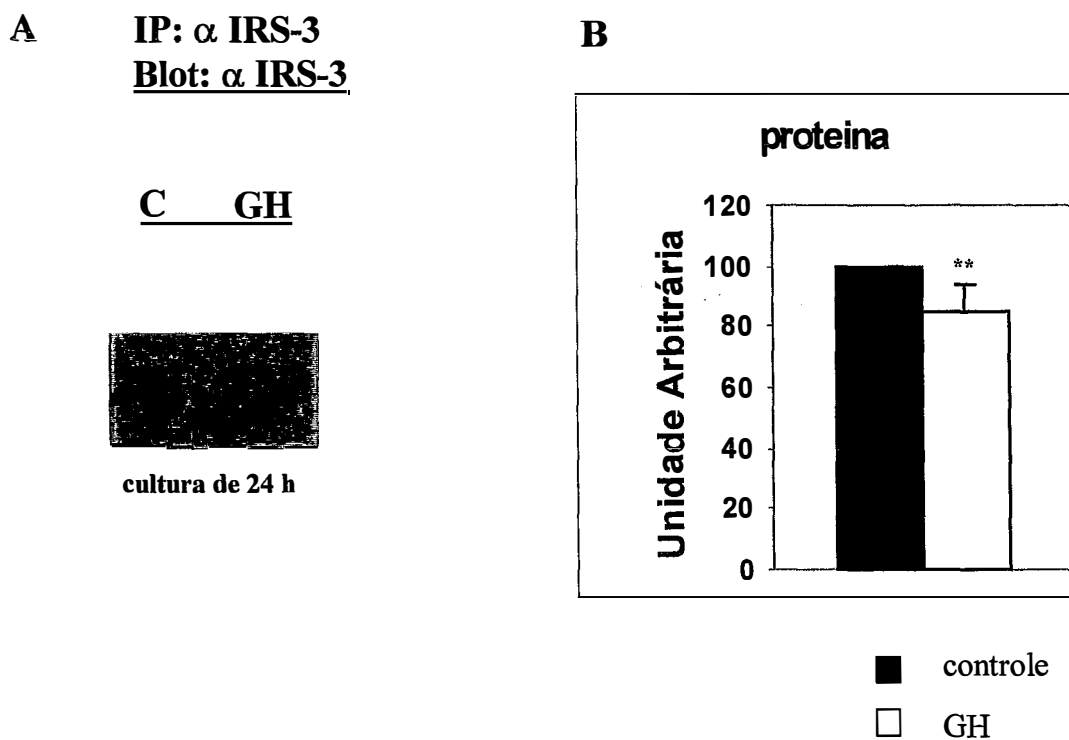


Fig.5 Amostras de extratos de cultura de tecido, controle (C) e adipócitos tratados com hormônio de crescimento (GH), contendo a mesma quantidade de proteína, foram submetidos a imunoprecipitação e imunodeteção com anticorpo anti-IRS-3 (A). A concentração de IRS-3 está mostrada em média  $\pm$  desvio padrão baseando-se na densitometria de cinco experimentos (B). Diferenças significativas a um nível de  $P < 0.01$ .

**A** IP:  $\alpha$  PI 3-K  
 Blot:  $\alpha$  PI 3-K

**C** GH



cultura de 24 h

**B**

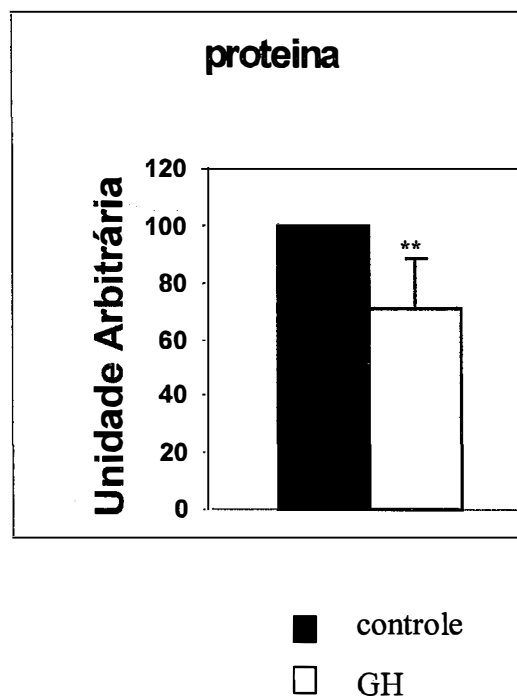


Fig.6 Amostras de extratos de cultura de tecido, controle (C) e adipócitos tratados com hormônio de crescimento (GH), contendo a mesma quantidade de proteína, foram submetidos a imunoprecipitação e imunodeteção com anticorpo anti-PI 3-quinase (A). A concentração de PI 3-quinase está mostrada em média  $\pm$  desvio padrão baseando-se na densitometria de seis experimentos (B). Diferenças significativas a um nível de  $P < 0.01$ .



#### ***4.1.3. Efeito crônico do hormônio de crescimento (24 h) na fosforilação do IRS-3, associação IRS-3/ PI 3-quinase e IRS-1/ PI 3-quinase após estímulo insulínico em tecido adiposo de rato in vitro***

Após estímulo com insulina, a fosforilação do substrato 3 do receptor da insulina (IRS-3) foi reduzida  $28 \pm 6\%$  ( $P < 0.05$ ,  $n=7$ ) em adipócitos tratados com GH (Fig 7A and 7B). A fosforilação do IRS-1 não foi possível de ser detectada provavelmente devido à baixa concentração dessa proteína nos extratos do tecido adiposo deste sistema. No estado basal, quando comparado adipócitos tratados com GH e controle, a fosforilação do IRS-3 e sua consequente associação com a PI 3-quinase como também a associação entre IRS-1 e PI 3-quinase não foram possíveis de serem analisadas em função da grande variabilidade observada. Esses resultados não corroboram aqueles encontrados por Thirone et al. (1997) em que a fosforilação do IRS-1 e sua associação com a PI 3-quinase aumentaram 150 e 180%, respectivamente, no estado basal de fígado de ratos tratados com GH.

Estudos anteriores sugeriram uma estabilidade relativamente alta e grande afinidade na interação entre IRS-1 (Folli et al., 1992; Backer et al., 1992) ou entre IRS-3 (Ross et al., 1998; Lavan & Lienhard, 1993) com a subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase. Esta interação permite que ambas as proteínas possam ser co-imunoprecipitadas com anticorpos específicos para qualquer uma das duas. Quando amostras foram previamente imunoprecipitadas com anticorpo contra IRS-1 e posteriormente incubadas com anticorpo para subunidade de 85 kDa da PI 3-quinase houve uma redução de  $44 \pm 20\%$  ( $P < 0.10$ ,  $n=6$ ) na quantidade de PI 3-quinase associada ao IRS-1 nos adipócitos tratados com GH, sugerindo uma menor associação entre IRS-1/ PI 3-quinase (Fig 8A and 8B). Entretanto, essa redução na quantidade de PI 3-quinase associada pode ter sido simplesmente consequência das menores concentrações proteicas de IRS-1 e/ou de PI 3-quinase encontradas nos adipócitos tratados com GH. Poderia ainda ter ocorrido uma combinação das duas possibilidades. Podendo o IRS-3, de uma maneira similar ao IRS-1, se associar à PI 3-quinase, as amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-3 foram

posteriormente incubadas com anticorpo anti-PI 3-quinase. Após estímulo com insulina, a quantidade de PI 3-quinase associada com IRS-3 reduziu  $28 \pm 4\%$  ( $P < 0.01$ ,  $n=6$ ) nos adipócitos tratados com GH quando comparados com controle (Fig 9A and 9B). Mais uma vez as reduções nos níveis protéicos de IRS-3 e PI 3-quinase em adipócitos tratados com GH podem ter contribuído para o decréscimo na quantidade associada daquela proteína.

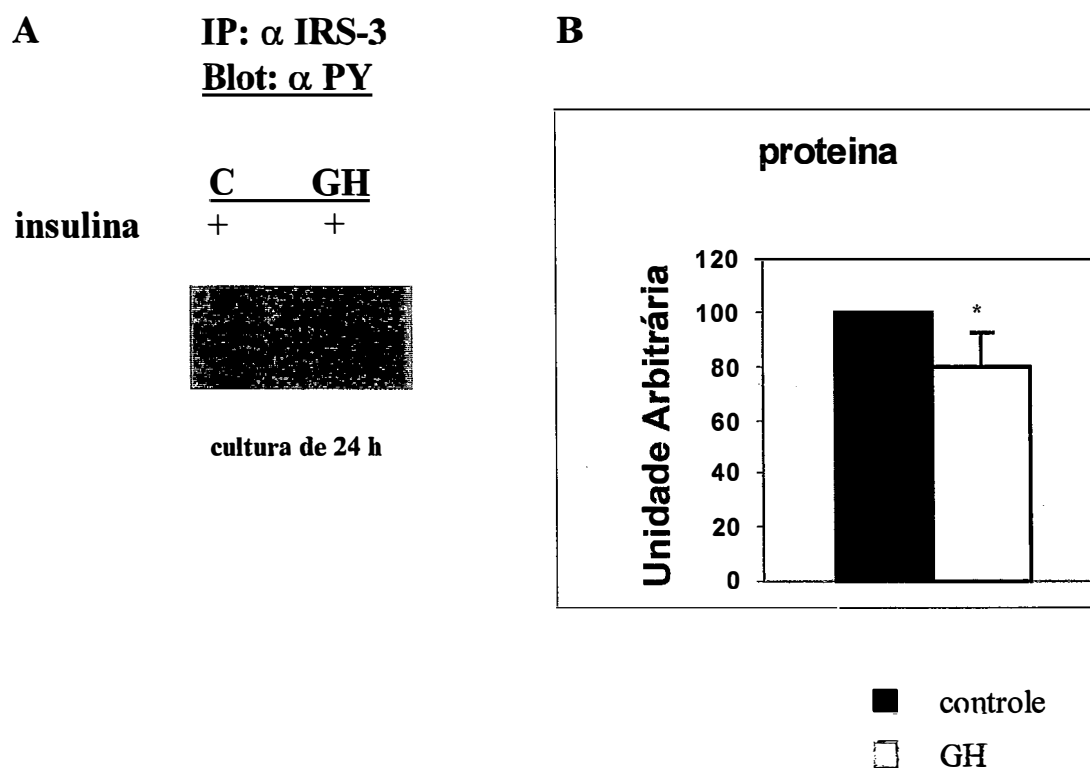


Fig.7 Amostras de extratos de cultura de tecido, controle (C) e adipócitos tratados com hormônio de crescimento (GH), contendo a mesma quantidade de proteína, foram submetidos a imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-3 e imunodeteção com anticorpo anti-PY (A). Insulina ( $1\mu\text{g/ml}$ ) foi administrada nos adipócitos por 20 min e a fosforilação do IRS-3 está mostrada em média  $\pm$  desvio padrão, baseando-se na densitometria de sete experimentos (B). Diferenças significativas a um nível de  $P < 0.05$ .

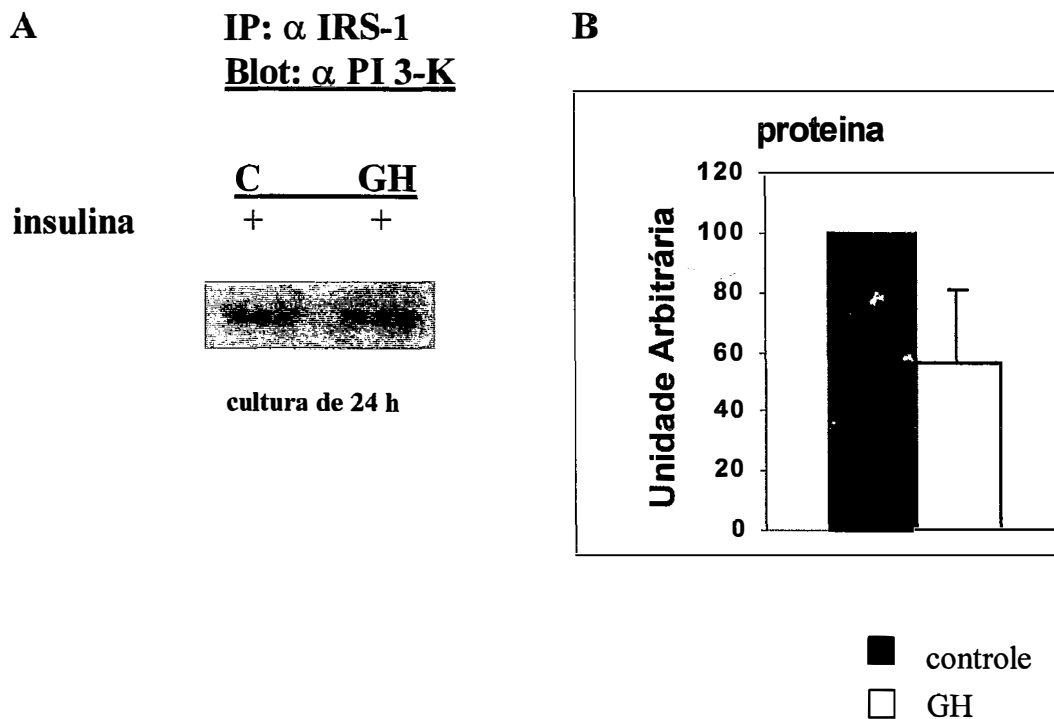


Fig.8 Amostras de extratos de cultura de tecido, controle (C) e adipócitos tratados com hormônio de crescimento (GH), contendo a mesma quantidade de proteína, foram submetidos a imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-1 e imunodeteção com anticorpo anti-PI 3-quinase (A). Insulina ( $1\mu\text{g/ml}$ ) foi administrada nos adipócitos por 20 min e a associação IRS-1/ PI 3-quinase está mostrada em média  $\pm$  desvio padrão, baseando-se na densitometria de seis experimentos (B). Diferenças significativas a um nível de  $P < 0.10$ .

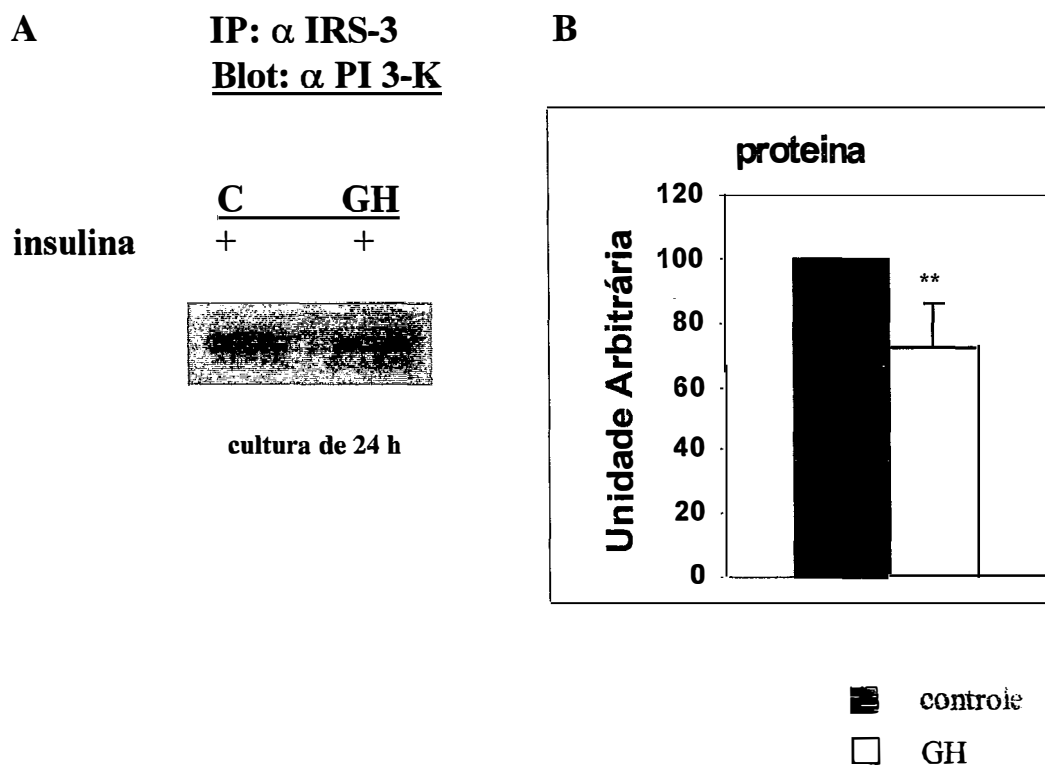


Fig.9 Amostras de extratos de cultura de tecido, controle (C) e adipócitos tratados com hormônio de crescimento (GH), contendo a mesma quantidade de proteína, foram submetidos a imunoprecipitação com anticorpo anti-IRS-3 e imunodeteção com anticorpo anti-PI 3-quinase (A). Insulina (1 $\mu$ g/ml) foi administrada nos adipócitos por 20 min e a associação IRS-3/ PI 3-quinase está mostrada em média  $\pm$  desvio padrão, baseando-se na densitometria de seis experimentos (B). \*\*Diferenças significativas a um nível de  $P < 0.01$ .

## 4.2. Discussão

No presente estudo, foram avaliados em adipócitos de ratos cronicamente tratados com GH *in vitro* a concentração do substrato 1 e 3 da insulina (IRS-1, IRS-3), concentração da fosfatidilinositol 3 - quinase (PI 3-quinase), fosforilação tirosínica do IRS-3 estimulada pela insulina, e também associação dos substratos IRS-1 e IRS-3 com a PI 3-quinase.

O receptor da insulina (IR) é uma glicoproteína heterotetramérica transmembrânica composta por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$  ligadas por pontes de dissulfideo. As subunidades  $\alpha$  contém o domínio de ligação insulínico, enquanto as  $\beta$  funcionam como quinases específicas de tirosina (quinases do receptor da insulina). A sinalização da insulina utiliza a atividade tirosina quinase do receptor para fosforilar proteínas porto em múltiplos resíduos de tirosina e propagar a ação insulínica (Cheatham & Kahn, 1995). Os principais substratos da ação insulínica são a Shc (Pronk et al., 1993) e as proteínas IRSs, IRS-1 (Sun et al., 1991), IRS-2 (Sun et al., 1995), IRS-3 (Lavan et al., 1997a) e IRS-4 (Lavan et al., 1997b).

A via de sinalização abordada pelas proteínas IRSs controla o consumo de glucose e lipogênese, síntese de proteína e sobrevivência da célula (Cheatham & Kahn, 1995). Vários fatores endógenos ou exógenos, como administração de epinifrina, podem alterar esse quadro de sinalização insulínica comprometendo a atuação desse hormônio. Estudos conduzidos com ratos mostraram que o tratamento com hormônio de crescimento induz resistência à insulina, como evidenciado por alterações no metabolismo de glucose nos tecidos periféricos e no fígado (Bishop et al., 1967). A redução na sensibilidade à insulina decresce eventos regulados por esse hormônio, como transporte de glucose, atividade (Lanna et al., 1995) e expressão (Etherton & Bauman, 1998) de enzimas lipogênicas. No tecido adiposo de suíno, o decréscimo na sensibilidade à insulina causada pelo GH não está associado a nenhuma alteração no número de receptores da insulina ou na atividade tirosina

quinase deste receptor (Magri et al., 1990). No entanto, pouco se sabe sobre os eventos pós-receptor que mediam o efeito do GH na via de sinalização insulínica.

O estudo da regulação destas etapas iniciais da ação insulínica pode ser realizado *in vitro*, utilizando-se receptor de insulina parcialmente purificado e moléculas de IRSs e PI 3-quinase recombinantes, também pode ser realizado em culturas de células ou em tecidos animais *in vivo*. Os procedimentos utilizados neste trabalho, estimulação *in vitro* com insulina, extração e homogeneização do tecido adiposo em condições apropriadas para imunoprecipitação e posterior *immunoblotting* com anticorpos específicos anti-IRS-1, anti-IRS-3, anti-PI 3-quinase, anti-fosfotirosina permitiram uma avaliação das etapas iniciais da ação insulínica, após a ligação com o receptor, em um tecido com importante papel na utilização da glucose. Este método apesar de semi-quantitativo, ou seja, avalia-se a concentração protéica através da densidade da banda, que é dada por valores arbitrários, parece representar bem as alterações encontradas.

O interesse em se trabalhar com um sistema *in vitro* está na possibilidade de maior controle dos tratamentos aplicados como também no menor custo deste sistema, principalmente na aplicação desta metodologia para o tecido adiposo de animais de grande porte como animais de interesse agrônômico e o homem. Este estudo, apesar de utilizar um modelo animal de laboratório, que representa relativo baixo custo na sua manipulação *in vivo*, estabelece uma oportunidade para que futuras pesquisas envolvendo animais de grande porte possam ser conduzidas na tentativa de se compreender os mecanismos da interferência do hormônio de crescimento na ação insulínica.

Os resultados mostraram uma redução de mesma magnitude (~30%) na concentração de IRS-1 em ambos os ensaios onde adipócitos de ratos foram cronicamente tratados com GH por 24 e 48 horas. Esses resultados confirmam aqueles de Thirone et al (1997) em que a abundância do IRS-1 do fígado se mostrou 40% menor em ratos tratados com GH *in vivo* por 5 dias. A exposição crônica de células em cultura à insulina reduz os níveis protéicos de IRS-1 sem alterar sua quantidade de RNAm (RNA mensageiro) (Saad et

al., 1994; Rice et al., 1993), principalmente como resultado de um aumento na degradação desta proteína (Rice et al., 1997). No entanto, no presente trabalho foi estabelecido um quadro hiperinsulinêmico apenas no tratamento de 48 horas, enquanto que no de 24 horas, os explantes ficaram em um meio sem insulina ou soro fetal. Exposição à altas doses de insulina foram utilizadas por apenas 20 minutos para estudos de fosforilação e associação das proteínas. Esses dados indicam que a ação inibidora seja efetivamente função da presença do hormônio de crescimento e não de um efeito da hiperinsulinemia encontrada no experimento de 48 horas.

Ratos mutantes com ausência de IRS-1 são 30-50% menores se comparados ao controle (Tamemoto et al., 1994; Araki et al., 1994; Whitters et al., 1998), e apresentam resistência à insulina em todo corpo, incluindo tecido adiposo incubado *in vitro* (Smith et al., 1997; Kaburagi et al., 1997). Esses ratos apresentam concentração de glicose sanguínea normal, mas com nível insulínico praticamente o dobro do animal controle. Este fenótipo mostra que o IRS-1 é essencial para o crescimento animal e para homeostase da glicose e pode ter funções únicas, as quais podem não ser completamente substituídas por outras IRSs ou outros mensageiros secundários (Liu et al., 1999).

No presente trabalho, o IRS-1 também apresentou redução de 44% na sua associação com a PI 3-quinase após estímulo de 20 minutos com insulina em explantes tratados com GH por 24 horas. Isto sugere que este evento possa influenciar a resistência à insulina causada pelo hormônio de crescimento. Esses dados são consistentes com os de Thirone et al (1997) e Thirone et al. (1998) onde foi encontrada redução na associação IRS-1/ PI 3-quinase de 55 e 60%, respectivamente, nos ratos tratados cronicamente com GH. Entretanto, essa redução na associação pode ser não somente consequência da redução na concentração de IRS-1, mas também relacionada a menor concentração de PI 3-quinase encontrada nos adipócitos tratado com GH por 24 horas, como discutido adiante.

Os níveis proteicos de IRS-3 também apresentaram redução de 15 e 27% em adipócitos tratados com GH por 24 e 48h, respectivamente. Essa diferença na concentração

entre os ensaios pode estar relacionada à exposição do tecido adiposo à insulina na cultura de 48h, permitindo ao sistema apresentar um estado hiperinsulinêmico, em que o hormônio de crescimento teria maior efeito em inibir a síntese de lipídios. E também sugere que o IRS-1 e IRS-3 possam ser regulados de maneira diferente, uma vez que a concentração do IRS-1 não diferiu entre ensaios. Em adição ao IRS-1, o IRS-3 tem se mostrado atuante na ativação da PI 3-quinase em adipócitos estimulados pela insulina (Zhou et al., 1999). Estudos com ratos com inativação do gene do IRS-1 sugerem que o IRS-3 é o principal substrato fosfotirosínico que se liga à PI 3-quinase em células adiposas tratadas com insulina (Smith et al., 1997; Kaburagi et al., 1997). Zhou et al. (1999) evidenciou que tanto o IRS-3 quanto o IRS-4 podem mediar a ação da insulina em promover translocação do Glut4 para transporte de glucose em células adiposas. Entretanto, para desenhar conclusões definitivas quanto à importância relativa das várias diferentes moléculas de IRSs, se faz necessário comparar seus efeitos nos adipócitos cujos genes do IRS-1, -2 e -3 foram manipulados.

Em contraste à aparente controvérsia a respeito da importância relativa das IRSs para os diferentes processos, o próximo passo na cascata metabólica da insulina (i.e. ativação da PI 3-quinase) é essencial para o transporte de glucose. Por exemplo, quando expressado um mutante da p85 capaz de abolir a atividade da PI 3-quinase, a habilidade da insulina em promover translocação do Glut4 em adipócitos de rato foi essencialmente interrompida (Quon et al., 1995). Similarmente, agentes que inibem a atividade catalítica da PI 3-quinase também levam a uma completa inibição da ação da insulina (Cheatham et al., 1994). No presente trabalho a concentração da PI 3-quinase apresentou uma redução média de 27% em ambos os tratamentos com GH por 24 e 48 horas. Em função do papel pivotal desta enzima, esse mecanismo pode estar colaborando com o desenvolvimento de um quadro de resistência observado em animais tratados com GH e em animais deficientes em PI 3-quinase.

A associação da PI 3-quinase com IRS-3 apresentou redução de 28% após estímulo insulínico nos explantes tratados com GH por 24 horas e redução de mesma magnitude



(~28%) foi observada na fosforilação do IRS-3 nesses explantes. Apesar da possibilidade de redundância, estas alterações do IRS-3 parecem consistentes com um papel do IRS-3 na regulação da via insulínica em tecido adiposo. A redução na atividade da PI 3-quinase implicaria em menor consumo de glucose e conseqüente quadro de resistência à insulina nos adipócitos tratados cronicamente com GH. No entanto, no presente trabalho não foram feitas determinações diretas da atividade da PI 3-quinase.

Embora nossos resultados sugiram importância do IRS-3 em ativar a PI 3-quinase e estimular consumo de glucose, o que é consistente com dados apresentados por Kaburagi et al (1997) e Zhou et al (1999), como já discutido anteriormente, Liu et al (1999) mostraram que ratos ausentes em IRS-3 apresentam crescimento e desenvolvimento normais. Esses ratos não são afetados pela ausência de IRS-3 no referente aos níveis de insulina e de glucose no estado absorptivo e de jejum, como também, após estímulo insulínico, os adipócitos desses animais apresentam transporte de glucose normal. É possível, que no animal selvagem, o IRS-3 exerça importantes funções, mas que no rato com ausência de IRS-3, outras IRSs funcionem em seu lugar.

Quando comparados aos resultados de Thirone et al. (1997) observa-se uma redução mais discreta nas variáveis estudadas, em média uma diferença de 30% menor para nosso estudo. Isso provavelmente se deve aos diferentes sistemas estudados nos dois trabalhos, *in vitro* no primeiro e *in vivo* no segundo. Ainda não está totalmente estabelecida a influência da dexametasona nos processos envolvidos na resposta à insulina em tecido adiposo de ratos. Em tecido adiposo de suínos (Walton et al., 1986) e de bovinos (Etherton et al., 1987) a dexametasona age sinergisticamente com a insulina em estimular a síntese de ácido graxo. No entanto, para tecido adiposo de ratos existem resultados conflitantes mostrando que a dexametasona age antagonicamente à insulina (Philips et al., 1965), em sinergismo (Amatruda et al., 1983) ou até mesmo não exercendo nenhuma influência (Hallowes et al., 1973). Tumbow et al. (1994) mostraram que tratamento crônico com dexametasona induz à degradação do IRS-1. Algumas diferenças podem se dever às diferentes concentrações de insulina utilizadas nos experimentos, no entanto a glucose é o principal precursor da síntese

de ácido graxo em adipócitos de rato e por isso qualquer efeito inibitório da dexametasona pode cooperar para uma redução da ação insulínica e conseqüente redução de síntese de ácido graxo, explicando talvez os resultados mais discretos encontrados em nosso trabalho.

A observação de que há uma redução na quantidade de IRS-3 fosforilado no tecido adiposo, bem como uma redução nas quantidades de PI 3-quinase associadas aos substratos 1 e 3 do receptor da insulina, após estímulo insulínico dos explantes de ratos tratados com GH, sugere que estes eventos tenham papel na resistência insulínica mediada pelo GH.

Além dos efeitos da fosforilação em tirosinas, um mecanismo regulatório importante das etapas iniciais da ação insulínica é a fosforilação das IRSs em aminoácidos serina e treonina (Myers & White, 1996). A fosforilação em serina/treonina do IRS-1 (Perderson et al., 2001; Ranichandran, et al., 2001; Rui et al., 2001) e IRS-2 (Paz et al., 1996; Paz et al., 1997) reduz, de maneira importante, a capacidade do receptor da insulina fosforilar estes substratos em tirosinas, dificultando a transmissão do sinal insulínico. Diversas enzimas com capacidade serina quinase como a própria PI 3-quinase, a MAP quinase, a proteína quinase-C, proteína quinase-A, podem fosforilar os IRSs em serina ou treonina, induzindo tais alterações. O tratamento com hormônio de crescimento pode determinar aumento na quantidade de diacilglicerol (DAG) (Catalioto et al., 1990; Sjöholm et al., 2000). O DAG ativa a proteína quinase-C e esta induz a fosforilação das IRSs em resíduos de serina e treonina, tornando-os menos receptivos à fosforilação em tirosina e induzindo reduções na associação destes substratos com a PI 3-quinase. Considerando a exposição dos tecidos de ratos tratados com hormônio de crescimento em níveis elevados de GH, podemos especular que a redução observada nestes passos iniciais da ação insulínica possa ser mediado pelo aumento da atividade da proteína quinase-C e, por conseguinte, fosforilação das IRSs em serina e treonina.

Na presente discussão foram basicamente mostrados os efeitos metabólicos do GH na cascata de insulina, no entanto o GH apresenta um espectro de ação bastante

amplo, o qual ainda envolve alteração na expressão gênica de enzimas chave para síntese de lipídios (e.g. Acetil CoA Carboxilase e Sintetase de Ácido Graxo), alteração no comportamento das vias de glicogênese e glicogenólise no fígado e músculo, alteração na via de gluconeogênese no fígado, etc.

Apesar da impossibilidade em se afirmar quais os efeitos específicos da ação do hormônio de crescimento na cascata da insulina, este trabalho demonstra que o tratamento crônico com GH *in vitro* altera os primeiros passos da transdução do sinal insulínico. Uma importante observação é a da redução das concentrações de IRS-1, IRS-3 e PI 3-quinase, associadas à menor quantidade associada da PI 3 quinase com os substratos do receptor. A alteração na quantidade de IRS-3 fosforilado está provavelmente associada à redução na quantidade ou na interação entre IRS-3 e a PI 3-quinase. Esses dados sugerem que o IRS-3 possa ser um importante substrato mediador das ações metabólicas da insulina em adipócitos de ratos e que as alterações nos primeiros passos do sinal de transdução insulínico possam exercer influência na resistência à insulina.

## 5. CONCLUSÃO

- A cultura crônica de explantes de tecido adiposo com hormônio de crescimento se mostrou eficiente para estudo da sinalização insulínica. Os resultados observados são consistentes com a literatura de trabalhos *in vivo*.
- O tratamento de tecido adiposo com hormônio de crescimento por 48 horas reduziu a concentração de IRS-1, IRS-3 e PI 3-quinase.
- Da mesma forma, o tratamento de tecido adiposo com hormônio de crescimento por 24 horas também reduziu a concentração de IRS-1, IRS-3 e PI 3-quinase.
- O tratamento de tecido adiposo com hormônio de crescimento por 24 horas, seguido de estímulo insulínico por 20 minutos, reduziu as quantidades de PI 3 quinase associadas ao IRS-1 e ou IRS-3 .
- A quantidade de IRS-3 fosforilada também foi reduzida pelo tratamento com GH por 24 horas, seguido de estímulo insulínico por 20 minutos.
- Estes dados sugerem que o tratamento crônico com hormônio de crescimento altera os passos iniciais da sinalização insulínica, possivelmente cooperando para uma alteração da sensibilidade do tecido a este hormônio.

## 6. BIBLIOGRAFIA

AMATRUDA, J.M.; DANAHY, S.A. and CHUNG, C.C. The effects of glucacorticoids on insulin-stimulated lipogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. **Biochem. J.** 212: 235, 1983.

ANAI, O., FUNAKI, M., OGIHARA, T.; et al. Differences in subcellular distribution and expression level regulation between IRS-1 and IRS-3 in fat cells. **Diabestes**, 47:13-23, 1998a.

ANAI, M., ONO, H., FUNAKI, M.; et al. Different subcellular distribution and regulation of expression of insulin receptor substrate (IRS-3) from those of IRS-1 and IRS-2. **Journal of Biological Chemistry**, 273:(45) 29686-29692, nov 6, 1998b.

ARAKI, E., LIPES, M.A., PATTI, M-E; et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, 372: 186-190, 1994.

ARGETSINGER, L.S., CAMPBELL, G.S., YANG, X.; et al. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor associated tyrosine kinase. **Cell**, 74: 237, 1993.

ARGETSINGER, L.S., HSU, G.W., MEYERS, M.E.; et al. Growth hormone, interferon-g, and leukemia inhibitory factor promoted tyrosilphosphorylation of insulin receptor substrate-1. **The Journal of Biological Chemistry**, 270: 14685, 1995.

- BACKER, J.M., MYERS, M.G., SHOELSEN, S.E.; et al. The phosphatidylinositol 3kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **EMBO J.** 11: 3469-3479, 1992.
- BALBIS, A.; BARTKE, A.; TURYN, D. Overexpression of bovine growth hormone in transgenic mice is associated with changes in hepatic insulin receptors and in their kinase activity. **Life Science**, 59: 1363-1371, 1996.
- BAUMAN, D.E. and C.L. DAVIS. Regulation of lipid metabolism. In: *Digestion and Metabolism in the ruminant*. Eds: I.W. McDonald and A.C.I Warner. Butterworths, London pp.67-83, 1975.
- BAUMAN, D.E. Bovine Somatotropin: Review of an Emerging Animal Technology. **Journal of Dairy Science**. 75: 3432-3451, 1992.
- BAUMAN, D.E. and R.G. VERNON. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. **Annu.Rev.Nutr.** 13:437-461, 1993.
- BEITNER-JOHNSON, D., BLAKESLEY, A.U., SHEN-ORR, Z.; et al. The proto-oncogene product c-Crk associates with insulin receptor substrate-1 and 4PS. Modulation by insulin growth factor-1 (IGF) and enhanced IGF-1 signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, 271: 9287-9290, 1996.
- BERGAD, P.L., SHIH, H.-M., TOWLE, H.C.; et al. Growth hormone induction of hepatic serine protease inhibitor 2.1 transcription is mediated by a Stat5-related factor binding synergistically to two g-activated sites. **The Journal of Biological Chemistry**, 270: 24903, 1995.

- BISHOP, J.S.R., STEELE, R., ALTSZULER, N., RATHGEB, I., BJERKNES, C., BODO, R.C. Diminished responsiveness to insulin in the growth hormone-treated ormal dog. **American Journal of Physiology** 212, 272-278, 1967.
- BOYD, R. D., D. E. BAUMAN, D. G. FOX, AND C. G. SCANES. Impact of metabolism modifiers on protein accretion and protein and energy requirements of livestock. **J. Anim. Sci.** 69 (Suppl. 2):56-75, 1991.
- BRATUSCH-MARRAIN, P.R., SMITH, D. and DeFRONZO, R.A. The effect of growth hormone on glucose metabolism and insulin secretion in man. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 55: 973-982, 1982.
- CATALIOTO, R.M.; AILHAUD, G; NEGREL, R. Diacylglycerol production induced by growth hormone in OB 1771 preadipocytes arise from phosphatidilcholine breakdown. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 173: 840-846, 1990.
- CHEATHAM, B., VLAHOS, C.J., CHEATHAM, L.; et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transport translocation. **Molecular Cell Biology**, 14: 4902-4911, 1994.
- CHEATHAM B. and KAHN R. Insulin action and the insulin signaling network. **Endocrine Reviews** 16 (2) 117-142, 1995.
- CHUNG, C.S.; ETHERTON, T.S. and WIGGINS, J.P. Stimulation of swine growth by porcine growth hormone. **Journal of Animal Science**, 60: 118-130, 1985.
- COSTA, C. SOLANES, G., VISA, J.; et al. Transgenic rabbits overexpressing growth hormone develop acromegaly and diabetes mellitus. **Faseb Journal**, 12: 1455-1460, 1998.

- COSTA, C. SOLANES, G., VISA, J.; et al. Transgenic rabbits overexpressing growth hormone develop acromegaly and diabetes mellitus. **Faseb Journal**, 12: 1455-1460, 1998.
- DARNELL, J.E., KERR, I.M. and STARK, G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signalling proteins. **Science (Wash DC)**, 264: 1415, 1994.
- DAVID, M.E., PETRICOIN, E., BENJAMIM, C., PINE, R.; et al. Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon a- and interferon b-stimulated gene expression through STAT proteins. **Science (Wash DC)**, 269: 1721, 1995.
- DAVIDSON, M.B. Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. **Endocr. Rev.** 8: 115-131, 1987.
- DE VOS, A.M., ULTSCH, M. and KOSSIAKOFF, A. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: Crystal structure of the complex. **Science (Wash DC)**, 255: 306, 1992.
- DOMINICI, P.F., CIFONE, D., BARTKE, A.; et al. Alterations in the early steps of the insulin-signaling system in skeletal muscle of GH-transgenic mice. **American Journal of Physiology**, 277: E447-E454, 1999.
- DONKIN, S.S., CHIU, P.Y., YIN, D.; et al. Porcine somatotropin differentially down-regulates expression of the Glut4 and fatty acid synthase genes in pig adipose tissue. **Journal of Nutrition**, 126:(10), 2568-2577, Oct 1996.
- DORIS, R.A.; THOMPSON, G.E.; FINLEY, E.; et al. Chronic effects of Somatotropin treatment on response of subcutaneous adipose tissue lipolysis to acutely acting factors



in vivo and in vitro. **Journal of Animal Science**, 74: 562-568, 1996.

DUNSHEA, F.R., HARRIS, D.M., BAUMAN, D.E.; et al. Effect of porcine somatotropin on in vivo glucose kinetics and lipogenesis in growing pigs. **Journal of Animal Science**, 70: 141-151, 1992.

ETHERTON, T.D.; EVOCK, C.M. & KESINGER, R.S. Native and recombinant bovine growth hormone antagonize insulin action in cultured bovine adipose tissue. **Endocrinology**, 121: 699-703, 1987.

ETHERTON, T.D.; WIGGINS, J.P.; EVOCK, C.M. et al. Stimulation of pig growth performance by porcine growth hormone determination of dose response relationship. **Journal of Animal Science**, 64: 433-443, 1987.

ETHERTON, T.D.; LOUVEAU, I.; SOMENSEN, M.T.; et al. Mechanism by which somatotropin decrease adipose tissue growth. **American Journal of Clinical Nutrition**, 58: 287S-295S, 1993.

ETHERTON, T.D., DONKIN, S.S. and BAUMAN, D.E. Mechanisms by which porcine somatotropin (pST) decreases adipose tissue growth in growing pigs. IN: **Biology of Fat in Meat Animals**, 1997.

ETHERTON, T.D. & BAUMAN, D.E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. **Physiological Review**, 128 (suppl 2): 360S-363S, 1998.

ETHERTON, T.D. The biology of somatotropin in adipose tissue growth and nutrient partitioning. **Journal of Nutrition**, 130: 2623-2625, 2000.

EVOCK, C.M.; ETHERTON, T.D.; CHUNG, C.S.; et al. Pituitary porcine growth hormone

(pGH) and a recombinant pGH analog stimulate pig growth performance in a similar manner. **Journal of Animal Science**, 66: 1928-1941, 1988.

FANTIN, V.R., SPARLING, J., SLOT, J.; et al. Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. **Journal of Biological Chemistry**, 273: 10726, 1998.

FOLLI, F., SAAD, M.J., BACKER, J.M.; et al. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. **Journal of Biological Chemistry**. 267: 22171-22177, 1992.

GOPINATH, R. & ETHERTON, T.D. Effects of porcine growth hormone on glucose metabolism in pigs: II. Glucose tolerance, peripheral tissue insulin sensitivity and glucose kinetics. **Journal of Animal Science**, 67: 689-697, 1989.

GRONOWSKI, A.M. & ROTWEIN, P. Rapid changes in gene expression after in vivo growth hormone treatment. **Endocrinology**, 136: 4741, 1995.

HALLOWES, R.C.; WANG, D.Y., LEWIS, D.J.; et al. The stimulation of prolactin and growth hormone of fatty acid synthesis in explants from rat mammary glands. **Journal of Endocrinology**, 57: 265-276, 1973.

HOUSEKNECHT, K.L. and BAUMAN, D.E. Regulation of lipolysis by somatotropin: functional alteration of adrenergic and adenosine signaling in bovine adipose tissue. **Journal of Endocrinology**, 152: 465-475, 1997.

IKEDA, A., CHANG, K-T., MATSUMOTO, Y.; et al. Obesity and Insulin Resistance in Human Growth Hormone Transgenic Rats. **Endocrinology**, 139: 3057-3063, 1998.

- KABURAGI, Y., SATOH, S., TAMEMOTO, H.; et al. Role of the receptor substrate-1 and pp60 in the regulation of insulin-induced glucose transport and GLUT4 translocation in primary adipocytes. **Journal Biological Chemistry**, 272:25839-25844, 1997.
- KAHN, CR. Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. **Annual Review of Medicine**. 36: 429 – 451, 1985.
- KAHN, C.R. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. **Diabetes**, 43: 1066-1084, 1994.
- KELLEY, D.E., MOKAN, M., SIMONEAU, J.-A.; et al. Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. **J. Clin. Invest.**, 92: 91-98, 1993.
- KELLY, P.A., ALI, S., ROZAKIS, M.; et al. The growth hormone/prolactin receptor family. **Recent Prog. Horm. Res.** 48:123, 1993.
- KIM, K.J., CHOI, S.C. and YOUN, J.H. Acute effect of growth hormone to induce peripheral insulin resistance is independent of FFA and insulin levels in rats. **Endocrinol. Metab.** 40: E742-E749, 1999.
- KIM, K.J., GAVRILOVA, O., CHEN, Y.; et al. Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. **Journal of Biological Chemistry**, 275: 8456-8460, 2000.
- KOOHMARIE, M. The biological basis for meat tenderness and potential genetic approaches for its control and prediction. **Proc. Recip. Meat Conf.**, 20-25, Aug, 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (London)** 277, 680-685, 1970.

- LANNA, D. P. D., D. A. DWYER AND D. E. BAUMAN. "Somatotropin and the Control of Lipogenesis by Insulin and Adenosine in Pig Adipose Tissue". **Journal of Animal Science** 72 (suppl. 1):161, 1994.
- LANNA, D. P. D., K. L. HOUSEKNECHT, D. M. HARRIS E D. E. BAUMAN. "Effects of Somatotropin Treatment on Lipogenesis, Lipolysis and Related Cellular Mechanisms in Adipose Tissue of Lactating Cows." **Journal of Dairy Science**, 78(8):1703-1712, 1995. .
- LAVAN, B.E. and LIENHARD, E.G. The insulin-elicited 60 kDa phosphotyrosine protein in rat adipocytes is associated with phosphatidylinositol 3-kinase. **The Journal of Biological Chemistry** 268: 5921-5928, 1993.
- LAVAN, B.E., LANE, W. and LIENHARD, G.E. The 60kDa phosphotyrosine protein in insulin treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. **Journal of Biological Chemistry**, 272: 11439-11443, 1997a.
- LAVAN, B.E.; FANTIN, V.R.; CHANG, E.T.; et al. A novel 160 kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. **Journal of Biological Chemistry**, 272: 21403-21407, 1997b.
- LI, J., HOUSEKNECHT, K.L., STENBIT, A.E.; et al. Reduced glucose uptake precedes insulin signaling defects in adipocytes from heterozygous GLUT4 knockout mice. **FASEB Journal**, 14: 1117-1125, 2000.
- LIU, C.Y., GRANT, A.L., KIM, K.-H.; et al. Effects of recombinant porcine somatotropin on acetyl-CoA carboxylase enzyme activity and gene expression in adipose tissue of pigs. **J. Anim. Sci.** 69 (suppl.1): 309 (abstr), 1991.
- LIU, S.C.H., WANG, Q., LIENHARD, G.E.; et al. Insulin receptor substrate 3 is not

essential for growth or glucose homeostasis. **The Journal of Biological Chemistry**, 274: 18093-18099, 1999.

LOWENSTEIN, E.J., DALY, R.J., BATZER, A.G.; et al. The SH2 and SH3 domain containing protein GRB2 links receptor tyrosine to ras signaling. **Cell**, 70: 431-442, 1992.

MAGRI, K. A., M. ADAMO, D. LEROITH, and T. D. ETHERTON. The inhibition of insulin action and glucose metabolism by porcine growth hormone in porcine adipocytes is not the result of any decrease in insulin binding or insulin receptor kinase activity. **Biochem. J.** 266:107-113, 1990.

MAJERUS, P.W. and KILBURN, T. Acetyl coenzyme A carboxylase: the roles of synthesis and degradation in regulation of enzyme levels in rat liver. **J. Biol. Chem.** 244 (22): 6254-6262, 1969.

MALOFF, B.L., LEVINE, J.H., and LOCKWOOD, D.H. Direct effects of growth hormone on insulin action in rat adipose tissue maintained in vitro. **Endocrinology**, 107: 538-544, 1980.

MILDNER, A.M. and CLARKE, S.D. Porcine fatty acid synthase: cloning of a complementary DNA, tissue distribution of its mRNA and suppression of expression by somatotropin and dietary protein. **J. Nutr.** 121(6):900-907, 1991.

MOLLER, N., BUTLER, P.C., ANTISIFEROV, M.A.; et al. Effects of growth hormone on insulin sensitivity and forearm metabolism in normal man. **Diabetologia**, 32: 105-110, 1989.

MYERS, M.G. & WHITE, M.F. Insulin signal transduction and the IRS proteins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 36: 615-658, 1996.

- NAKANISHI, S. and NUMA, S. Purification of rat liver acetyl coenzyme A carboxylase and immunochemical studies on its synthesis and degradation. **J. Biochem.** 16: 161-173, 1970.
- NORMAN, A.W. and LITWACK, G. **Hormones**. 2 ed. Academic Press, San Diego, 1997. 557p.
- OKADA, T., KAWANO, Y., SAKAKIBARA, T.; et al. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and anti-lipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. **Journal of Biological Chemistry**, 269: 3568-3573, 1994.
- OLEFSKY, J.M. & NOLAN, J.J. Insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanism. **American Journal of Clinical Nutrition**, 61: 980S-986S, 1995.
- PAZ, K., VOLIOVITCH., HADARI, Y.R.; et al. Interaction between the insulin receptor and its downstream effectors. **Journal of Biological Chemistry**, 271: 6998-7003, 1996.
- PAZ, K., HEMI, R., LEROITH, R.; et al. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/ threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, 272: 29911-29918, 1997.
- PEDERSON, T.M., KRAMER, D.L. and RONDINONE, C.M. Serine/ Threonine phosphorylation of IRS1 triggers its degradation- Possible regulation by tyrosine

phosphorylation. **Diabetes**, 50: (1) 24-31, 2001.

PHILIPS, G.R., HERRERA, M.G., & RENOLD, A.E. Estimulation of metabolic activity of adipose tissue from fasted rats by prolonged incubation *in vitro*. II Effects of physiologic levels of cortisol. **Biochim. Biophys. Acta**, 106: 234-240, 1965.

QUON, M.J., BUTTE, A.J., ZARNOWSKI, M.J.; et al. Roles of 1-phosphatidylinositol 3-kinase and ras in regulating translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. **Molecular Cell Biology**, 15:5403-5411, 1995.

RANICHANDRAN, L.V., ESPOSITO, D.L., CHEN, J. and QUON, J.M. Protein kinase C-zeta phosphorylates insulin receptor substrate 1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin. **Journal of Biological Chemistry**, 276: 3543-3549, 2001.

RECHLER, M.M. and NISSLEY, S.P. Insulin-like growth factors. **Handb. Exp. Pharmacol.**, 95: 263-267, 1990.

RICE, K.M., MARILYN, A., TURNBOW, M.A.; et al. Insulin stimulates the degradation of IRS-1 in 3T3-L1 adipocytes. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, 190: 961-967, 1993.

ROBERTS, T.J.; AZAIN, M.J.; HAUSMAN, G.J.; et al. Interaction of insulin and somatotropin on body weight gain, feed intake, and body composition in rats. **American Journal of Physiology**, 267: E293-E299, 1994.

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

ROSENFELD, R.G., HINTZ, R.L. and DOLLAR, L.A. Insulin-induced loss of insulin-like growth factor-I receptors on IM-9 lymphocytes. **Diabetes** 31: 375-381, 1982.

- ROSS, S.A., LIENHARD, G.E. and LAVAN, B.E. Association of insulin receptor substrate 3 with SH2 domain containing proteins in rat adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 247:(2) 487-492, Jun 18, 1998.
- ROTWEIN, P., THOMAS, M.J., HARRIS, D.M.; et al. Nuclear actions of growth hormone: an in vivo perspective. **Journal of Animal Science**, 75 (Suppl.2): 11-19. 1997.
- RUI, L.Y., AGUIRRE, V., KIM, J.K., et al. Insulin/ IGF-I and TNF- $\alpha$  stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser (307) via distinct pathways. **Journal of Clinical Investigation**, 107: (2) 181-189, 2001.
- SAAD, M.J.A., FOLLI, F., KAHN, J.A.; et al. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone treated rats. **Journal of Clinical Investigation** 92: .2065-2072, 1993.
- SAAD, M.J.A. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 27: .941-957, 1994.
- SCIACHITANO, S. & TAYLOR, S.I. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of the mouse IRS-3 gene. **Endocrinology**, 138: 4931-4940, 1997.
- SHAONIN, J., GUAN, R., FRANK, S.J.; et al. Insulin inhibits growth hormone signaling via the growth hormone receptor/ Jak2/STAT5B pathway. **Journal of Biological Chemistry**, 274: 13434-13442, 1999.
- SHI, Z.Q., LU, W. and FENG, G., S. The Shp2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-Jun NH2-terminal



- mitogen-activated protein kinases. **Journal of Biological Chemistry**, 273: 4904-4908. 1998.
- SJOHOLM, A., ZHANG, Q.M., WELSH, N.; et al. Rapid Ca<sup>2+</sup> influx and diacylglycerol synthesis in growth hormone-mediated islet beta-cell mitogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, 275: 21033-21040, 2000.
- SKOLNIK, E.Y., BATZER, A., LI, N.; et al. The function of Grb2 in linking the insulin receptor to ras signaling pathway. **Science**, 260: 1953-1955, 1993.
- SOUZA, S.C., FRICK, G.P., YIP, R.; et al. Growth hormone stimulates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. **Journal of Biological Chemistry**, 269: 30085-30088, 1994.
- SMITH, H.J., PONS, S., PATTI, M.E.; et al. The 60kDa insulin receptor substrate functions like a IRS protein pp60 (IRS3) in adipose cells. **Biochemistry**, 36:(27) 8304-8310, Jul, 1997.
- SUN, X.J., ROTHENBERG, P., KAHN, C.R.; et al. The structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature** 352: 73-77, 1991.
- SUN, X.J., MIRALPEIX, M., MYERS, M.G.; et al. Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. **Journal of Biological Chemistry** .267: 22662-22672. nov. 1992.
- SUN, X.J., PONS, S., ASANO, T.; et al. The Fyn tyrosine kinase binds IRS-1 and forms a distinct signaling complex during insulin stimulation. **Journal of Biological Chemistry**, 271: 10583-10587, 1996.

- SUN, X.J., PONS, S., WANG, L.M.; et al. The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action. **Molecular Endocrinology**, 11: 251-262, 1997.
- TAMEMOTO, H., KADOWAKI, T., TOBE, K.; et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. **Nature**, 372: 182-186, 1994.
- TANASIJEVIC, M.J., MYERS, M.G., RICHARD, S.T.; et al. Phosphorylation of the insulin receptor substrate IRS-1 by casein kinase II. **Journal of Biological Chemistry** 268: 18157, 1993.
- THIRONE, A.C.P., CARVALHO, C.R., BRENELLI, S.L.; et al. Effect of chronic growth hormone treatment on insulin signal transduction in rat tissues. **Molecular and Cellular Endocrinology** 130: 33-42, 1997.
- THIRONE, A.C.P., PAEZ-ESPINOSA, E.V., CARVALHO, C.R.O.; et al. Regulation of insulin stimulated tyrosine phosphorylation of Shc and IRS-1 in the muscle of rats: effect of growth hormone and epinephrine. **FEBS Lett** 421: 191-196, 1998.
- TOLLET, P., HAMBERG, M. GUSTAFSSON, J.-A.; et al. Growth hormone signaling leading to CYP2C12 gene expression in rat hepatocytes involves phospholipase A2. **Journal of Biological Chemistry**, 270: 12569, 1995.
- TUGGLE, C.K. and TRENKLE, A. Control of growth hormone synthesis. **Domest. Anim. Endocrinol.**, 13: 1-33, 1996.
- TURNBOW, M.A.; KELLER, S.R.; RICE, K.M.; et al Dexamethasone down-regulation of insulin receptor substrate 1 in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, 269: 2516-2520, 1994.

- VAAG, A., HANDBERG, A., SKOTT, P.; et al. Glucose-fatty acid cycle operates in humans at the levels of both whole body and skeletal muscle during low and high physiological plasma insulin concentrations. **Eur. J. Endocrinol.**, 130: 70-79, 1994.
- WALTON, P.E. and ETHERTON, T.D. Stimulation of lipogenesis by insulin in swine adipose tissue: antagonism by porcine growth hormone. **J. Anim. Sci.** 62: 1584-1595, 1986.
- WALTON, P.E.; ETHERTON, T.D & EVOCK, C.M. Antagonism of insulin action in cultured pig adipose tissue by pituitary and recombinant porcine growth hormone: potentiation by hydrocortisone. **Endocrinology**, 118: 2577-2581, 1986.
- WALTON, P.E., ETHERTON, T.D. and CHUNG, C.S. Exogenous pituitary and recombinant growth hormones induce insulin and insulin-like growth factor 1 resistance in pig adipose tissue. **Dom. Anim. Endocrinol.** 4:183-189, 1987.
- WANG, Y., FRIED, S., PETERSEN, R.N.; et al. Somatotropin regulates adipose tissue metabolism in neonatal swine. **Journal of Nutrition**, 129: 139-145, 1999.
- WELLS, J.A., CUNNINGHAM, B.C., FUH, G.; et al. The molecular basis for growth hormone-receptor interactions. **Recent Progr. Horm. Res.**, 48: 253, 1993.
- WELLS, J.A. Binding of the growth hormone receptor complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 171, 1996.
- WHITE, M.F. et al. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr 185,000 protein in intact cells. **Nature** 318: 183-186, 1985.

- WHITE, M.F., LIVINGSTON, J.N., BACKER, J.M.; et al. Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell* .54: 641-649, 1988.
- WHITE, M.F. The insulin signalling system and IRS proteins. *Diabetologia* 40: S2-S17, 1997.
- WHITERS, D.J., GUTERREZ, J.S., TOWER, H.; et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391: 900-904, 1998.
- WRAY-CAHEN, D. Metabolic effects of porcine somatotropin in the growing pig. PhD dissertation, Cornell University, Ithaca, New York, 1992.
- YAAUCHI, K., MILARSKI, K.L., SALTIEL, A.R.; et al. Protein-tyrosine-phosphatase SHPT2 is a required positive effector for insulin downstream signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 664-668, 1995.
- YAMAUCHI, T., KABURAGI, Y., UEKI, K.; et al. Insulin signaling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Molecular Cell Biology*, 16: 3074-3084, 1996
- YENUSH, L. and WHITE, M. The IRS signalling system during insulin and cytokine action. *BioEssays* 19(5), 491-500. 1997.
- ZHOU, L., CHEN, H., XU, P.; et al. Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT4 in rat adipose cells. *Molecular Endocrinology*, 13: 505-514, 1999.
- ZORZANO, A., BALON, T.W., BRADY, L.J.; et al. Effects of starvation and exercise on

concentrations of citrate, hexose phosphates and glycogen in skeletal muscle and heart.  
**Biochem. J.**, 232: 585-591, 1985.