



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Érica Patrícia Garcia de Souza

**Estudo da sinalização da insulina nos tecidos muscular e adiposo
de ratos submetidos à desnutrição materna no início da lactação**

Rio de Janeiro

2005

Érica Patrícia Garcia de Souza

**Estudo da sinalização da insulina nos tecidos muscular e adiposo de ratos
submetidos à desnutrição materna no início da lactação**

Tese apresentada, como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor, ao
Programa de Pós-graduação em Biologia,
da Universidade do Estado do Rio de
Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

Rio de Janeiro

2005

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S729 Souza, Érica Patrícia Garcia de.

Estudo da sinalização da insulina nos tecidos muscular e adiposo de ratos submetidos à desnutrição materna no início da lactação / Érica Patrícia Garcia de Souza. - 2005.
93 f. : il.

Orientadora: Thereza Christina Barja-Fidalgo.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Desnutrição - Teses. 2. Insulina - Sinalização - Teses. 3. Músculos - Teses. 4. Tecido adiposo - Teses. 5. Lactação - Teses.
I. Barja-Fidalgo, Thereza Christina. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 613.24

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Érica Patrícia Garcia de Souza

**Estudo da sinalização da insulina nos tecidos muscular e adiposo de
ratos submetidos à desnutrição materna no início da lactação**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 02 de setembro de 2005.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Prof.^a Dra. Carmen Cabanelas Pazos de Moura
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof.^a Dra. Marília de Brito Gomes
Centro Biomédico - UERJ

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2005

DEDICATÓRIA

À minha mãe e irmãos, pelo apoio, dedicação e carinho dados durante toda minha vida.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À Prof.^a Dr^a Thereza Christina Barja-Fidalgo, pela excelente orientação dada durante a realização deste trabalho. Por ter sido paciente nos momentos difíceis e, acima de tudo, por ter acreditado no meu trabalho. Admiro seu profissionalismo, competência, e agradeço pelo apoio, incentivo e amizade.

À Prof.^a Dr^a Iolanda Fierro, por ter me iniciado no mundo da ciência e pelo exemplo de profissionalismo. Agradeço pela atenção, apoio e amizade.

À Prof.^a Dr^a Marta Sampaio de Freitas, pelo incentivo e ajuda na realização desta tese.

À Prof.^a Dr^a Patrícia Lisboa, pela atenção e pela criteriosa revisão desta tese.

À Simone, a melhor parceira que pode existir. Por ser uma “Desnutrida” e dividir comigo as alegrias (os resultados) e tristezas (o biotério...) deste projeto. Pelo seu senso de humor inigualável e, pelo carinho e amizade em todos os momentos. Você é uma super amiga!!!

À Maria Augusta, a “Guta”, essa amiga de todas as horas. Pelo seu apoio, pelas conversas, pelos papos “fashion”, pela sua alegria contagiante, e acima de tudo, pelo profissionalismo. Você nasceu pra fazer ciência, e eu tenho orgulho em ser sua amiga.

À Aline Brando, pela amizade e fidelidade de tantos anos, que jamais serão esquecidos. Pelos nossos memoráveis passeios e momentos de puro entretenimento! Valeu, “cabeça”!

À Andréa, pela amizade verdadeira, pelas caronas para Niterói e pelo seu jeitinho “meio” desligado, que tantas vezes me fez rir. Te adoro!

À Roberta, ou Betoca, pelo seu carinho e apoio na realização desta tese. Pelo seu senso de organização no laboratório e pela sua amizade. Você é dez!

À Ananda, minha “borboleta” preferida. Pelo companheirismo, parceria e dedicação no trabalho com os adipócitos. Pelas dicas de nutrição e pela amizade construída.

À Dr^a Christina Villela, ou “Chrica”, pelo seu jeito contagiante, pelos ensinamentos, conversas, pela amizade, pelos “almoços de salto”, pelos seus dias de Sílvia, Bia, etc... Enfim, por você existir!!!

À Gisele Félix e Andréa Kaiser, minhas alunas de Iniciação Científica. Vocês foram muito importantes para a realização deste trabalho.

À Aline e Dayane, a nova geração de “Desnutridas”.

Aos eternos amigos e companheiros de pesquisa Vany, Aninha, Isabela, Rafael, Edward, Paula, Cristiane, Daniel, João, Pedro, Charles, Ana Paula, Diana e Amanda agradeço pelo carinho, amizade e incentivo nos momentos difíceis. Adoro vocês.

Ao Marcos e Juarez pelo apoio técnico indispensável para a realização deste trabalho.

À minha mãe, Tereza e meus irmãos Paulo e Luciano, que nos momentos difíceis sempre me incentivaram. Vocês são uma família maravilhosa.

Ao Carlos, pelo amor, carinho, respeito e cumplicidade. Te amo!!!

À todos que, direta ou indiretamente, colaboraram neste trabalho.

“Mesmo as noites sem estrelas podem anunciar
a autora de uma grande realização”

Martin Luther King

RESUMO

GARCIA-SOUZA. *Estudo da sinalização da insulina nos tecidos muscular e adiposo de ratos submetidos à desnutrição materna no início da lactação*. 2005. 120fl. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

Vários estudos sugerem que a desnutrição materna no período pós-natal poderia causar alterações na homeostase glicêmica da prole na vida adulta. Neste trabalho objetivamos investigar a interferência da programação metabólica induzida pela desnutrição protéica materna durante o início da lactação sobre a homeostase glicêmica e a sinalização da insulina nos tecidos muscular e adiposo. Animais desnutridos (D-dieta da mãe contendo 0% de proteína nos primeiros 10 dias de lactação) ou controle (C-dieta da mãe contendo 22% de proteína) foram estudados do nascimento até a vida adulta. Em resumo, observamos uma diminuição na insulina plasmática acompanhada de normoglicemia nos animais adultos desnutridos. A ativação do receptor de insulina (IR), após a estimulação com o hormônio apresentou-se diminuída durante o período de restrição protéica em músculo isolado destes animais experimentais. Durante o período da lactação, observamos uma diminuição na captação de glicose, na fosforilação do substrato para o receptor de insulina (IRS – 1) e na translocação do GLUT – 4 no tecido muscular. Na idade adulta, entretanto, houve aumento significativo na captação de glicose e translocação do GLUT – 4 no músculo, associado com o aumento na expressão da PI3 – quinase associada ao IRS – 1. No tecido adiposo de ratos desnutridos adultos observamos menor fosforilação em tirosina tanto do IR quanto do IRS – 1, que foi compensada pela maior ativação do IRS – 2 e da PI3 – quinase. Os níveis basais de pAkt e de GLUT – 4 na membrana estavam aumentados, culminando em um aumento na captação de glicose. Observamos também uma redistribuição do citoesqueleto de actina e maior resistência aos efeitos da Ltrunculina B nos adipócitos dos ratos desnutridos. Em conclusão, este estudo demonstrou que a desnutrição materna no início da lactação é capaz de causar alterações na prole na vida adulta, o que parece estar relacionado com a expressão e ativação de proteínas chave na cascata da sinalização da insulina nos tecidos periféricos, importantes na regulação do metabolismo da glicose.

Palavras-chave: Insulina. Resistência a insulina. Desnutrição. Sinalização de insulina.

ABSTRACT

Early postnatal undernutrition has been associated with the long-term effects on glucose homeostasis in adulthood. To elucidate the molecular mechanism by which undernutrition during early life leads to changes in insulin sensitivity, we investigated the insulin signaling in skeletal muscle and in adipose tissue of rats. Offspring of dams fed with either protein-free or normal diets during the first 10 days of lactation were studied from lactation period until adulthood. Early maternal undernutrition impaired secretion of insulin but maintained normal blood glucose levels until adulthood. Insulin receptor (IR) activation after insulin stimulation was decreased during the period of protein restriction. In addition, glucose uptake, insulin receptor substrate 1 (IRS – 1) phosphorylation and glucose transporter 4 (GLUT – 4) translocation in muscle were reduced in response to insulin during suckling. In contrast, non- or insulin-stimulated glucose uptake and GLUT – 4 translocation were found significantly increased in muscle of adult offspring. The basal association of phosphatidylinositol 3 – Kinase (PI3 – Kinase) with IRS – 1 was increased and was highly stimulated by insulin in muscle from adult rats. Finally, adipocytes isolated of undernourished adult rats presented reduced tyrosine phosphorylation of IR and IRS – 1 after insulin stimulation, but this inhibition was compensated by upregulation of IRS- 2 and PI3 – Kinase. The pAkt levels and GLUT – 4 translocation was increased in the basal state. Finally, we observed alterations in the actin cytoskeleton and an increased glucose uptake in this cells. Our findings suggest that early postnatal undernutrition impairs insulin sensitivity in adulthood, which appears to be directly related to changes in critical steps of insulin signaling in periferic tissues, required for glucose metabolism.

Keywords: Insulin. Insulin resistance. Undernutrition. Insulin signaling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Cross-talk entre os tecidos no metabolismo da glicose.....	22
Figura 2 –	As vias de sinalização da insulina.....	27
Figura 3 –	Via de sinalização da insulina envolvida no transporte de glicose: via PI3-quinase/PKB.....	28
Figura 4 –	A fosforilação do IRS-1 em resíduos de serina regula suas funções.....	30
Figura 5 –	Compartimentalização intracelular das vesículas de GLUT4 e mobilização pela insulina.....	35
Figura 6 –	Vias de sinalização envolvidas no processo de translocação do GLUT4 e o envolvimento do citoesqueleto de actina e microtúbulos neste processo.....	37
Figura 7 –	Esquema de acasalamento e sseparação do grupo de animais controle se desnutridos.....	44
Gráfico 1 –	Curva dose resposta de insulina sobre a fosforilação em tirosina em adipócitos isolados de ratos.....	68
Gráfico 2 –	Expressão do receptor de insulina em adipócitos de ratos controle e desnutridos.....	70
Gráfico 3 –	Fosforilação em tirosina do receptor de insulina em adipócitos de ratos controle e desnutridos.....	71
Gráfico 4 –	Expressão do substrato do receptor de insulina em adipócitos de ratos controle e desnutridos.....	72
Gráfico 5 –	Fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina em adipócitos de ratos controle e desnutridos.....	73
Gráfico 6 –	Expressão do substrato do receptor de insulina tipo 2 (IRS-2) em adipócitos de ratos controle e desnutridos.....	75
Gráfico 7 –	Efeito do LY294002 sobre a captação de glicose estimulada pela insulina em adipócitos isolados de ratos controle e desnutridos.....	77
Gráfico 8 –	Efeito do tratamento com a insulina sobre a ativação da Akt em adipócitos isolados de ratos controle e desnutridos.....	80
Gráfico 9 –	Imunolocalização do GLUT-4 e do citoesqueleto de actina em adipócitos isolados de ratos controle e desnutridos.....	81
Gráfico 10	Efeito do tratamento com Latrunculina B sobre a localização subcelular do GLUT-4 e citoesqueleto de actina nos adipócitos isolados de ratos controle e desnutridos.....	85
Gráfico 11	Efeito do tratamento com Latrunculina B sobre a ativação da Akt em adipocitos isolados de ratos controle e desnutridos.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Principais transportadores de glicose (GLUTS).....	34
Tabela 2 –	Composição básica da ração industrializada específica para ratos Labina (Purina), utilizada para as ratas lactantes sem restrição proteica.....	45
Tabela 3 –	Composição de micronutrientes da ração industrializada específica para ratos Labina (Purina), utilizada para as ratas lactantes sem restrição protéica.....	46
Tabela 4 –	Composição básica da ração artesanal utilizada para as ratas lactantes sem restrição proteica.....	46
Tabela 5 –	Composição de micronutrientes da ração artesanal utilizada para as ratas lactantes com restrição protéica.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT –	Proteína quinase B
BSA –	Albumina de soro bovino
DAB –	3,3 diaminobenzidina
DNA –	Ácido dextrorribonucleico
EDTA–	Ácido etileno diamino tetracético
ERK-	proteína quinase regulada por fator extracelular
FITC-	Fluoresceína isotiocianato
GLUT-	Transportador de glicose
GSK-3	Glicogênio sintase quinase 3
GTP	Guanosina trifosfato
IGF-1	Fator de crescimento insulina like
IKK	Quinase do I κ B
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato para o receptor de insulina
JNK	Quinase C-JUN NH ₂ terminal
kDa	Kilodaltons
KRB	Tampão Krebs Ringer Bicarbonato
NP-40	Nonidet P-40
PBS	Tampão salina fosfato
PDK1	Proteína quinase dependente de fosfoinosítídeo
PI3-quinase	Fosfatidil inositol 3-quinase
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PtdIns	Fosfatidilinositol
PTP1B	Tirosina fosfatase 1B
Ptyr	fosfotirosina
PVDF	polivinilideno difluorido
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes

TBS	Tampão tri-fosfato
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRITC	Tettrarodamina isotiocianato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Nutrição e impressão metabólica.....	17
1.2	A regulação do metabolismo da insulina.....	20
1.3	As vias de sinalização da insulina.....	24
1.4	Regulação negativa da cascata de sinalização da insulina.....	29
1.5	A regulação do transporte de glicose.....	31
1.6	O papel do citoesqueleto.....	36
1.7	Modelo experimental de desnutrição.....	38
2	OBJETIVOS.....	40
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3.1	Modelo experimental de desnutrição.....	59
3.2	Dietas.....	60
3.3	Transporte de glicose e sinalização de insulina em tecido muscular de ratos.....	47
3.4	Isolamento de adipócitos.....	48
3.5	Captação de glicose.....	49
3.6	Imunoprecipitação.....	49
3.7	Western Blotting.....	50
3.8	Imunocitoquímica- dupla marcação.....	51
3.9	Análise estatística.....	51
4	RESULTADOS.....	52
4.1	Artigo 1: Efeito da desnutrição materna durante a lactação sobre a secreção de insulina e a captação de glicose no tecido muscular de ratos durante o desenvolvimento: Relação com a expressão e ativação de proteínas chave na cascata da sinalização da insulina.....	53
4.2	A sinalização da insulina em tecido adiposo de ratos adultos submetidos a desnutrição durante o início da lactação.....	65
4.2.1	Avaliação do Peso corporal.....	66
4.2.2	Curva dose resposta da insulina sobre a fosforilação em tirosina em adipócitos.....	66
4.2.3	Expressão e fosforilação em tirosina do receptor de insulina em adipócitos...	69
4.2.4	Expressão e fosforilação em tirosina do IRS-1 em adipócitos.....	70
4.2.5	Expressão e ativação do IRS-2 em adipócitos.....	74
4.2.6	Ação da insulina e do LY294002 sobre a captação de glicose.....	76
4.2.7	Efeito do tratamento com a insulina sobre ativação da Akt.....	78
4.2.8	Imunolocalização do Glut-4 em adipócitos.....	79
4.2.9	Marcação para o citoesqueleto de actina em adipócitos.....	82

4.2.10	Efeito do tratamento com Latrunculina B sobre a localização subcelular do GLUT-4 e do citoesqueleto de actina.....	83
4.2.11	Efeito do tratamento com a Latrunculina B sobre a ativação da Akt estimulada pela insulina.....	86 87
5	DISCUSSÃO	101
5.1	Sumário dos resultados.....	102
6	CONCLUSÃO	103
7	REFERÊNCIAS	

Introdução

1-Introdução

1.1- Nutrição e Impressão metabólica

Nas últimas décadas vários estudos foram realizados tendo como principal foco a nutrição, procurando um consenso e uma correlação entre as condições nutricionais e seus efeitos sobre a saúde, principalmente nos casos de doenças degenerativas, câncer e funções cognitivas (Barker,1993; Lucas, 1994). Recentemente, o tema nutrição e saúde obteve uma nova dimensão, através da noção de que eventos ocorridos durante o período fetal e de crescimento pós-natal podem ser considerados críticos para determinar alterações metabólicas permanentes durante a vida adulta, predispondo ao desenvolvimento de patologias crônicas como a hipertensão, cardiopatias, obesidade e diabetes tipo 2 (Lucas, 1998). Estudos epidemiológicos em humanos e experimentais em animais de laboratório sugerem que a desnutrição na fase inicial da vida pode aumentar a susceptibilidade a doenças crônicas na vida adulta. Estes estudos comprovam evidências de que mecanismos biológicos podem existir para “memorizar” os efeitos metabólicos de alterações nutricionais ocorridas no início do desenvolvimento (Waterland & Garza, 1999).

Durante períodos críticos no início da vida o organismo possui a habilidade de responder a adversidade do ambiente através de adaptações a nível bioquímico, celular e molecular. Estas adaptações a um estímulo nutricional podem alterar permanentemente a fisiologia e o metabolismo do organismo e

continuar sendo expressas mesmo na ausência do estímulo ou estresse que causou este processo. Os conceitos de que eventos de natureza não genética atuam no início da vida para organizar de modo permanente os sistemas fisiológicos são conhecidos como “programação” (Lucas,1998) ou “impressão metabólica” (Waterland & Garza, 1999). Estes conceitos descrevem um processo adaptativo que ocorre em resposta a um insulto/estímulo nutricional durante um período vulnerável no início da vida, propondo que o padrão nutricional neste dado período pode “marcar” o indivíduo, conduzindo a uma programação metabólica que estabelece condições para o surgimento de doenças crônicas na vida adulta.

Baseados em observações clínicas, Hales e Baker formularam a hipótese do “fenótipo de poupança”, que propõe uma associação entre a má nutrição no período fetal e/ou pós-natal e aumento do risco de desenvolvimento de obesidade e diabetes na vida adulta. Esta hipótese postula que a má-nutrição pode alterar vias metabólicas que resultam em adaptações nos tecidos periféricos, induzindo a uma economia no uso dos nutrientes na vida pós-natal, favorecendo a obesidade e diabetes sob condições de nutrição adequada ou abundante (Lazar, 2005).

Os mecanismos envolvidos na programação metabólica não foram totalmente esclarecidos, porém o período e o tempo de exposição a estímulos ou insultos metabólicos parecem ser particularmente importantes, visto que em mamíferos a maior parte do desenvolvimento relativo ao processo de divisão celular ocorre na vida intra-uterina, sendo que em alguns órgãos este desenvolvimento continua após o nascimento (Nyirenda *et al*, 2001). Dentre os

vários estímulos ou insultos metabólicos ocorridos em períodos críticos podemos destacar a desnutrição.

É sabido que a qualidade da dieta no início da vida influencia no desenvolvimento do sistema imune (Hanson *et al*; 1996). A nutrição materna pobre durante a gestação pode causar o retardamento no crescimento fetal intrauterino (IUGR- intrauterine fetal growth retardation) e está associada com uma série de problemas para a prole, tais como distúrbios comportamentais e anormalidades fisiológicas e metabólicas (Pennington *et al*; 2001). Kwong e colaboradores (2000) sugerem que a desnutrição pode atuar como um mecanismo de programação, iniciando condições de “stress metabólico”, restringindo a proliferação embrionária inicial e a proliferação de células tronco apropriadas. Amplos estudos em animais, especificamente em ratos, demonstram que a desnutrição ocorrida em um período vulnerável para o desenvolvimento do cérebro pode ter efeitos permanentes neste órgão, tais como redução no tamanho, reduzido número de células e dificuldades nos processos de aprendizagem e memória (Smart, 1986).

Coletivamente, estudos em humanos e em animais incluindo primatas fornecem evidências de que o estado nutricional em um período crítico ou sensível da vida pode influenciar amplamente uma variedade de processos metabólicos, entretanto cresce o número de questões que precisam ser esclarecidas para um melhor entendimento deste fenômeno. Uma questão que se estabelece é onde a memória destes eventos iniciais é estocada num período intermediário e o que induz o desenvolvimento de doenças na maturidade, apesar da contínua

replicação e substituição celular. Os mecanismos propostos incluem efeitos adaptativos sobre a expressão gênica transmitidos as células, ou uma seleção clonal adaptativa, levando a eliminação ou aumento de células individuais específicas, de modo que a quantidade ou proporção de populações de células em um determinado tecido possa ser permanentemente alterada (Lucas, 1991;1998). Modificações epigenéticas são disparadas por mudanças no meio e podem ocorrer tanto em linhagens celulares somáticas quanto germinativas (Monk, 1995; Thorvaldsen& Bartolomei, 2000). Além disto, alterações nutricionais no início da vida também podem modificar os padrões celulares específicos de metilação do DNA causando alterações na expressão gênica em tecidos específicos (Jacob, 2000; Miller & Kersten, 2003).

Uma definição dos mecanismos que estão envolvidos na programação metabólica pode ser crucial no entendimento da patogênese de doenças crônicas do adulto e na programação de medidas preventivas.

1.2 - A regulação do metabolismo pela insulina

A insulina é o mais potente hormônio anabólico conhecido. Ela promove a síntese e estoque de carboidratos, lipídeos e proteínas, inibindo sua degradação e liberação na circulação. A insulina estimula a captação de glicose, aminoácidos e ácidos graxos nas células, aumenta a expressão ou atividade de enzimas que

catalisam a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas enquanto inibe a atividade ou expressão daquelas que catalisam a degradação (LeRoith & Zick, 2001).

O controle da homeostase glicêmica é feito através do balanço entre a absorção de glicose pelo intestino, produção pelo fígado e captação e metabolismo pelos tecidos periféricos. A insulina aumenta a captação de glicose no músculo e tecido adiposo, e inibe a produção de glicose hepática, servindo como o principal regulador da glicose sanguínea. A insulina também estimula a diferenciação e o crescimento celular, e promove o estoque de substratos em gordura no fígado e músculo pela estimulação da lipogênese, síntese de proteínas e glicogênio, inibindo a lipólise, glicogenólise e degradação de proteínas. A resistência à insulina ou sua deficiência resulta na desregulação profunda destes processos, resultando em doenças como diabetes, associada a hipertensão, obesidade, dislipidemia e arteriosclerose (Saltiel & Kahn. ,2001).

.

Na regulação do metabolismo da glicose, existe um mecanismo de “cross-talk” entre os tecidos (Figura 1). A insulina é secretada pelas células β do pâncreas em resposta a elevação da glicose plasmática. O hormônio diminui a produção de glicose no fígado e aumenta a captação, utilização e estoque de glicose no tecido adiposo e no músculo .

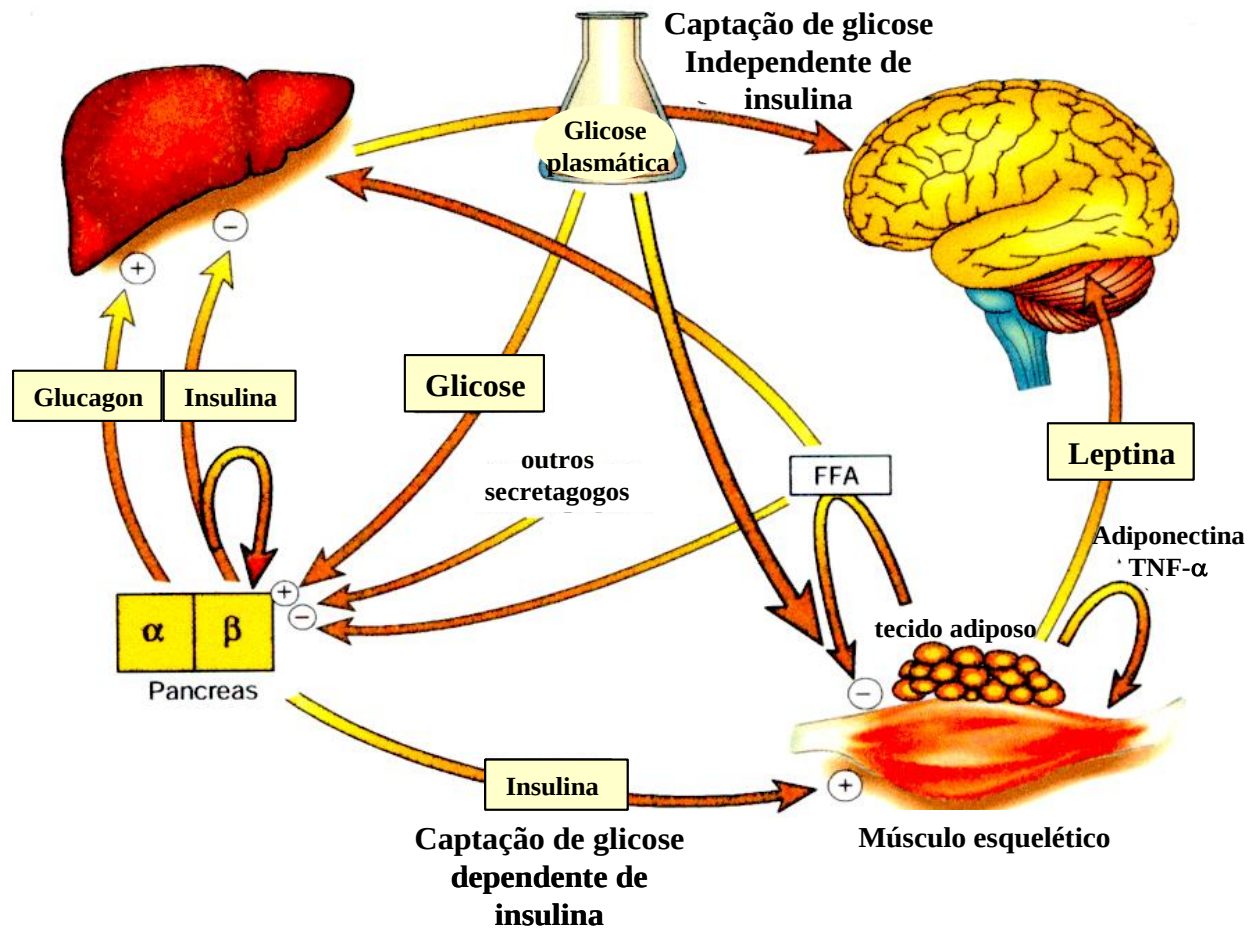


Figura 1- “Cross-talk” entre os tecidos no metabolismo da glicose

A insulina aumenta a captação de glicose nas células de tecidos periféricos como células musculares e adipócitos através da estimulação da translocação do transportador de glicose, GLUT-4, do meio intracelular para a superfície da célula. Cerca de 75% da glicose a disposição é captada pelo músculo, enquanto que o tecido adiposo responde por somente uma pequena fração (Klip & Paquet, 1990). Apesar disto, foi demonstrado que camundongos *knockout* para o receptor de insulina no tecido muscular apresentam tolerância normal à glicose. Isto parece ocorrer, em parte, devido a um aumento da captação de glicose no tecido adiposo, com um subsequente aumento da massa de tecido adiposo, ácidos graxos livres e triglicerídeos circulantes (Brunning *et al.*, 1998). Entretanto, animais *knockout* para o GLUT-4 no tecido adiposo apresentam um significativo desequilíbrio na tolerância a glicose, aparentemente devido à uma indução da resistência à insulina no fígado e músculo (Abel *et al.*, 2001). Tanto a obesidade quanto a lipoatrofia também causam resistência a insulina e predisposição a diabetes tipo 2, demonstrando que o tecido adiposo é crucial para a regulação do metabolismo, além de sua habilidade em captar glicose (Gavrilova *et al.*, 2000). Embora a insulina não estimule a captação de glicose no fígado, ela bloqueia a glicogenólise e gliconeogênese e estimula a síntese de glicogênio, regulando os níveis da glicemia plasmática durante o jejum. A ação da insulina em tecidos normalmente considerados não sensíveis, incluindo cérebro e células β pancreáticas, também pode ser importante na manutenção da homeostase glicêmica (Kulkarni *et al.*, 1999).

Os adipócitos são importantes na regulação metabólica, liberando ácidos graxos livres que reduzem a captação de glicose no músculo, secreção de insulina pelas células β e aumentam a produção de glicose no fígado. Os adipócitos também podem secretar “adipocinas” como a leptina, adiponectina e TNF- α , que regulam a ingesta alimentar, gasto energético e a sensibilidade a insulina (Niswender & Schwartz, 2003).

1.3- As vias de sinalização da insulina

A ligação da insulina ao seu receptor resulta na estimulação da sua atividade tirosina quinase intrínseca, levando a autofosforilação do receptor e subsequente fosforilação de substratos em múltiplos resíduos de tirosina, como os membros da família IRS, Shc e Cbl (Figura 2). Após a fosforilação em tirosina, estas proteínas interagem com moléculas sinalizantes através de seus domínios com homologia a Src 2 (SH2), o que resulta na ativação de uma diversidade de outras proteínas e vias de sinalização. Estas vias atuam de modo coordenado, regulando o tráfico de vesículas transportadoras de glicose (GLUT), síntese de proteínas, ativação e inativação de enzimas e expressão gênica, resultando na regulação do metabolismo da glicose, lipídeos e proteínas (Saltiel & Kahn, 2001).

O receptor da insulina (IR) pertence a uma subfamília dos receptores tirosina quinase que inclui o receptor do fator de crescimento insulina-like (IGF-1). Estes receptores são proteínas tetraméricas que possuem duas subunidades α e β que funcionam como enzimas alostéricas, nas quais a subunidade α inibe a atividade tirosina kinase da subunidade β . A ligação da insulina à subunidade α leva a liberação da atividade kinase da subunidade β , sua auto-fosforilação e mudança conformacional, aumentando sua atividade kinase, possibilitando a fosforilação de substratos intracelulares próximos que atuam como sítios ligantes para proteínas efetoras (Whitehead *et al*, 2000).

Vários substratos intracelulares para o receptor de insulina / IGF-1 foram identificados. As proteínas IRS-1, IRS-2, IRS-3 e IRS-4, pertencentes a família do substrato do receptor de insulina (IRS), constituem os principais substratos para o IR (White, 1998). Outros substratos incluem Gab-1, p60^{dock}, Cbl, APS, SIRPS e isoformas de Shc. As tirosinas fosforiladas destes substratos atuam como sítios ligantes para proteínas que contêm domínios SH2, como a tirosina fosfatase SHP-2 e a subunidade regulatória p85 da fosfoinositídeo 3-kinase (PI 3-kinase). A estimulação da PI 3-kinase catalisa a fosforilação dos fosfoinositídeos na posição 3 para produzir fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns), gerando a formação de PtdIns (3,4) P₂ (PIP2) e PtdIns (3,4,5) P₃ (PIP3) (Cantley; 2002). PIP3 estimula a atividade da proteína kinase dependente de fosfoinositídeo (PDK1), a qual pode fosforilar e ativar a AKT (também chamada de PKB - proteína kinase B) e/ou membros da família de proteínas kinase C (PKC) atípicas, zeta e lambda.

Eventos de fosforilação catalisados por kinases dependentes de PtdIns (3,4,5) P₃ liberam as vesículas do meio intracelular, permitindo a translocação do GLUT4 para superfície da célula (Figura 3). Vários estudos observaram uma correlação entre a ativação da AKT/PKB e da PKC e a translocação do GLUT-4 mediada pela insulina (Tanti *et al.*, 1997; Standaert *et al.*, 1997, Kitamura *et al.*, 1998; Kotani *et al.*, 1998). Szychová e Komers (2005) recentemente enfatizaram a importância da sinalização via Akt kinase na fisiopatologia do diabetes. Sugere-se que o envolvimento da Akt no metabolismo da glicose, após a estimulação com a insulina, ocorre em dois níveis: através de sua associação com o GLUT-4 (Calera *et al.*, 1998) e a indução da translocação das vesículas contendo GLUT-4 dos estoques intracelulares para a membrana plasmática (Khon *et al.*, 1996; Hajdúch *et al.*, 1998). Cross e colaboradores (1995) demonstraram que a expressão constitutiva da Akt nos adipócitos leva a um aumento da captação de glicose.

Estudos recentes sugerem que uma segunda cascata de sinalização que funcionaria independentemente da via da PI 3-kinase também seria necessária para a translocação do GLUT-4 dependente de insulina. Esta segunda via envolve a TC10 (Figura 2), uma proteína da família Rho ligante de GTP, que funcionaria através de um meio especializado de microdomínios lipídicos na membrana plasmática, via ativação do sistema Cap-Cbl. Após a ativação específica pela insulina, o TC10 parece ser um sinal secundário que funcionaria em paralelo com a ativação da via da PI 3-kinase (Chiang *et al.*, 2001).

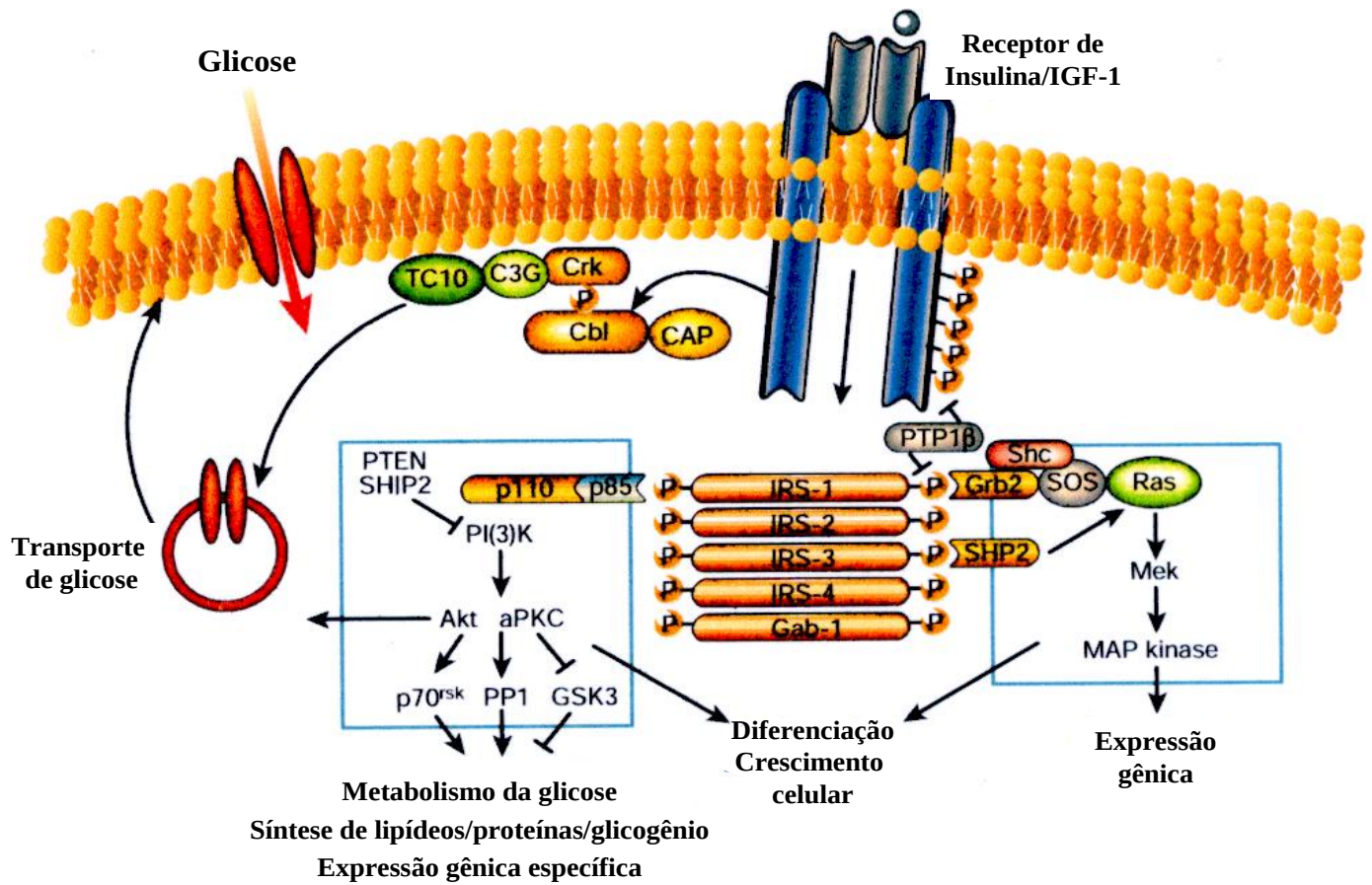


Figura 2- As vias de sinalização da insulina

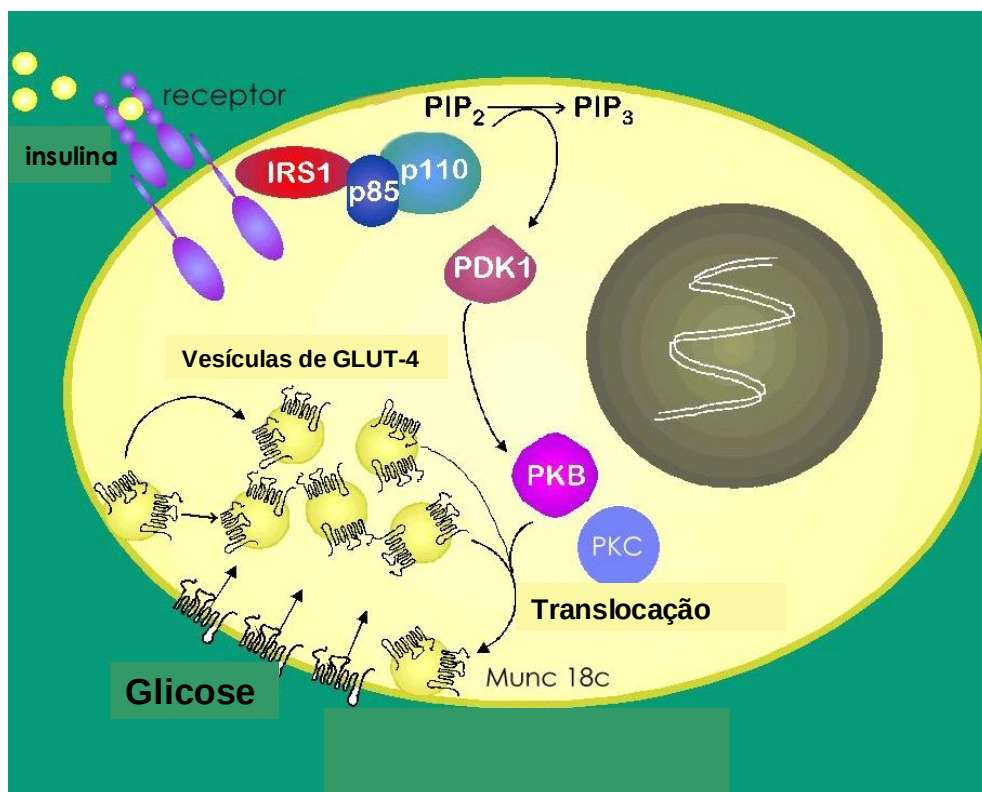


Figura 3- Via da sinalização da insulina envolvida no transporte de glicose:
via PI3-kinase/ PKB (Imagem extraída do site www.csiro.au)

1.4- Regulação negativa da cascata da sinalização da insulina

Após a dissociação da insulina, o receptor e seus substratos sofrem a ação de proteínas tirosina-fosfatases (PTPases), que catalisam sua rápida desfosforilação. Esse controle faz parte de um mecanismo de feedback negativo induzido pela insulina para controlar sua ação. Várias fosfatases que catalisam a desfosforilação do receptor *in vitro* foram descritas, sendo que algumas são “upreguladas” em estados de resistência a insulina (Drake *et al.*, 1998). PTP1B, uma fosfatase citoplasmática, foco dos estudos mais recentes, tem sido descrita como um alvo terapêutico em potencial nos casos de diabetes e obesidade. Camundongos *knockout* para a PTP1B apresentam um aumento da fosforilação em tirosina das proteínas IR e IRS1 no músculo, aumentando a sensibilidade a insulina (Elchebly *et al.*, 1999). Estes animais também são resistentes à obesidade induzida por dieta, sugerindo que o cérebro pode ser um importante sítio de ação desta proteína. Além disto, as ações da insulina também podem ser diminuídas pela ação de kinases, como GSK-3, mTOR, JNK, ERK, IKK e PKC, através da fosforilação em serina/treonina tanto do IR como do IRS1 (Figura 4). Estas fosforilações inibitórias promovem um mecanismo de *feedback* negativo na sinalização da insulina e podem estar envolvidas com outras vias que promovem estados de resistência a este hormônio ((Eldar-Finkelman & Krebs, 1997; Zick, 2001, Gual *et al.*, 2005).

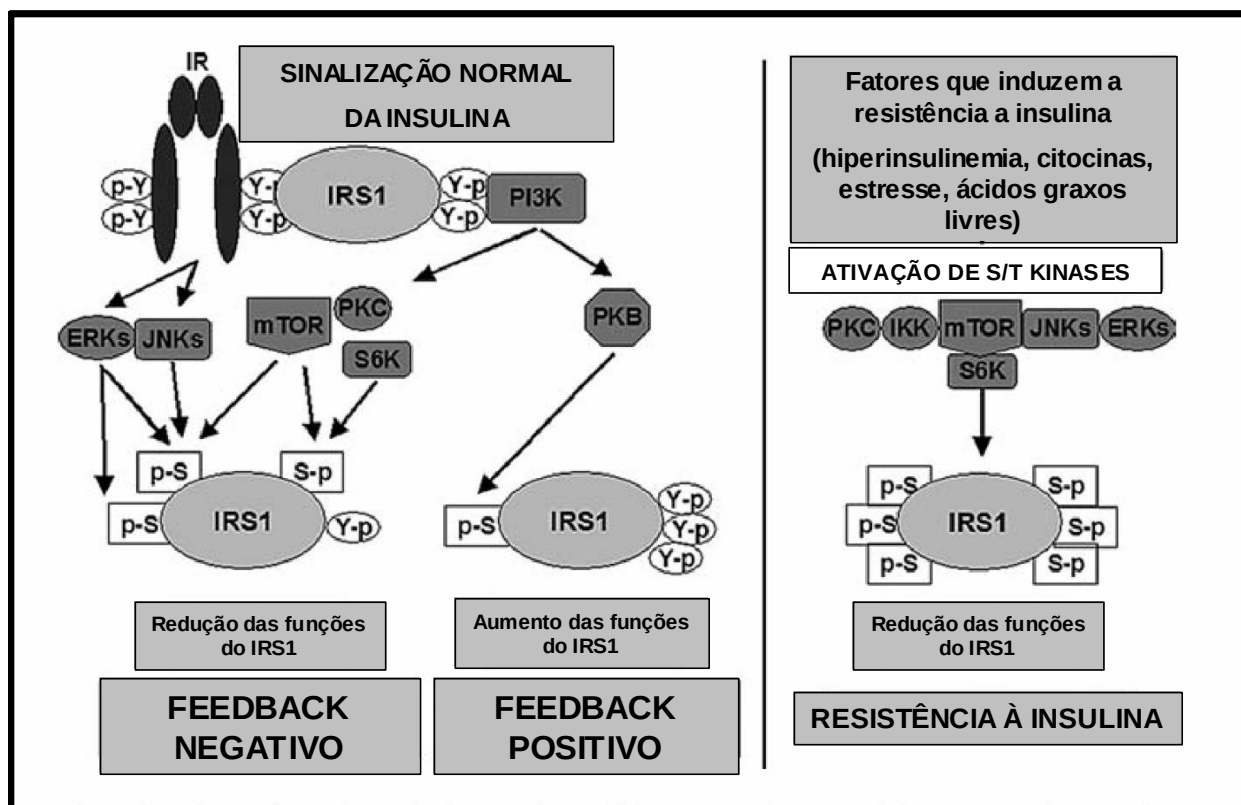


Figura 4- A fosforilação do IRS-1 em resíduos de Serina regula suas funções.

(adaptado de Gual *et al* ,2005)

1.5- A regulação do transporte de glicose

É sabido que os GLUTs são transportadores que facilitam a entrada de hexoses circulantes nas células de mamíferos (Mueckler; 1990) (Tabela 1). Embora tenham sido identificados genes para 11 isoformas de GLUTs no genoma humano, somente os GLUTs 1-5, 8 e 9 foram descritos como transportadores de açúcares (Gould & Holman, 1993; Doedger *et al*, 2000). O GLUT1 é expresso em eritrócitos humanos e em células endoteliais próximas aos vasos sanguíneos do cérebro. O GLUT3 é neuronal, e juntamente com o GLUT1 permite que a glicose atravesse a barreira hematoencefálica e atue nos neurônios. GLUT2 é considerado um transportador de glicose de baixa afinidade presente no fígado, intestino, rins e células β pancreáticas. Este transportador funciona como parte do sistema sensor de glicose nas células β e na absorção de glicose pelas células epiteliais intestinais. O GLUT4 é expresso no músculo e no tecido adiposo e é a isoforma mais responsiva a insulina, sendo o alvo dos mais recentes estudos correlacionados a diabetes (Watson & Pessin, 2001). O GLUT5 é um transportador de frutose expresso no intestino, e os GLUTs 8 e 9, recentemente identificados, parecem funcionar no desenvolvimento do blastocisto (GLUT8) ou em leucócitos e no cérebro (GLUT9) (Doedger *et al*, 2000; Carayannopolous *et al*, 2000).

A insulina aumenta o transporte de glicose no músculo e no tecido adiposo através da estimulação da translocação do GLUT4 do meio intracelular para a membrana plasmática. Evidências sugerem que o “pool” intracelular de vesículas contendo GLUT-4 não estão distribuídos de forma homogênea. Estudos demonstram que o GLUT4 parece residir em ao menos 2 pools de vesículas distintos (Figura 4), porém inter-relacionados, tanto em termos de conteúdo protéico quanto na sensibilidade a insulina (Ducluzeau *et al*, 2002). Propõe-se que uma proporção significativa destas vesículas reside em um pool endossomal que recicla continuamente dos estoques intracelulares para a membrana plasmática (Rodnick *et al*, 1992). Nestes endossomos reciclantes, também residem proteínas como o GLUT-1 e o Receptor de Transferrina (Davis *et al*, 1986; Clarke *et al*; 1994) Em um outro compartimento, que aparentemente não tem marcadores endossomais, há um pool estoque de vesículas de GLUT4 que pode conter cerca de 60 % do conteúdo responsivo a insulina nos adipócitos (Rea & James,1997). Este pool estoque parece funcionar como um reservatório de GLUT-4, que pode mobilizar mais eficientemente este transportador em resposta a insulina, quando comparado com o GLUT-4 residente nos endossomos reciclantes (Ducluzeau *et al*, 2002). Entretanto, a maquinaria necessária para a formação destes compartimentos ainda não está totalmente esclarecida.

No estado basal, a maior parte do conteúdo de GLUT-4 está localizado no interior da célula, devido a ciclagem lenta entre a membrana plasmática e o compartimento endossomal (Yang & Holman, 1993). É sabido que a estimulação com insulina promove um grande aumento da exocitose das vesículas de GLUT4, principalmente do pool estoque, e diminui sua internalização por endocitose, o que resulta em um aumento do conteúdo de GLUT-4 na membrana plasmática, e conseqüentemente, na captação de glicose (Pessin *et al.*, 1999).

	Distribuição nos tecidos	Funções
GLUT-1	Cérebro, eritrócitos, células endoteliais, tecido fetal e linhagens de células em cultura	Captação basal de glicose, transporte através da barreira hemato-encefálica e em células em crescimento
GLUT-2	Fígado, Rim, intestino e cél- β pancreática	Sensor de glicose nas células β , alta capacidade de transporte, maior transportador no fígado.
GLUT-3	Cérebro	Transporte basal, Captação preferencial na hipoglicemia
GLUT-4	Músculo e tecido adiposo	Translocação do transportador estimulada pela insulina. Vital na captação de glicose pós-prandial.
GLUT-5	Intestino	Responsável pela absorção de frutose no intestino.
GLUT-8	Blastocisto	Captação de glicose estimulada pela insulina no blastocisto

Tabela 1- Principais transportadores de glicose (GLUTs).

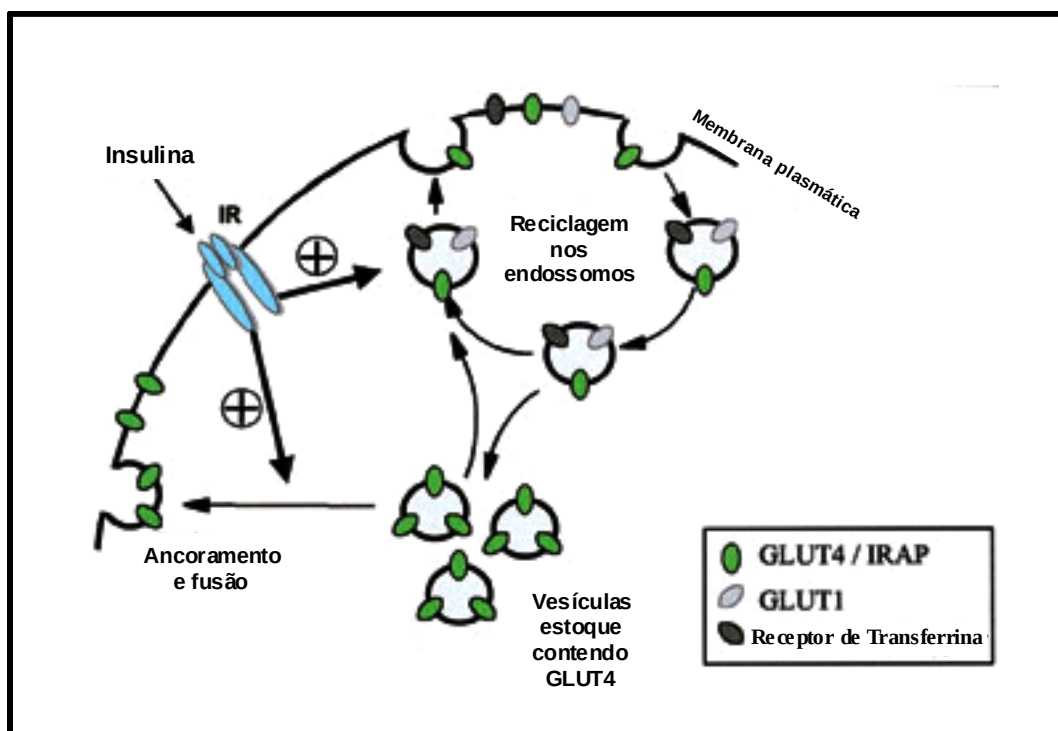


Figura 5- Compartimentalização intracelular das vesículas de GLUT-4 e mobilização pela insulina (Adaptado de Ducluzeau *et al*, 2002)

1.6 - O papel do citoesqueleto

Recentemente alguns estudos demonstraram claramente a importância do citoesqueleto de actina e microtúbulos sobre a translocação do GLUT4 mediada pela insulina. A insulina causa uma remodelagem dos filamentos de actina cortical próximos à membrana plasmática, induzindo a reorganização da mesma (Nakashima *et al.*, 2000). Este efeito provavelmente reflete a polimerização e despolimerização da actina envolvendo a formação da lamelipodia ou filopodia. O tratamento com agentes despolimerizantes como a citocalasina D e latrunculina A foram descritos como inibidores dos efeitos da insulina sobre o citoesqueleto de actina, a translocação do GLUT4 e captação de glicose em células aderentes em cultura (L6 miotubos e 3T3 L1 adipócitos) e em adipócitos de ratos (Tsakiridis *et al.*, 1995; Omata *et al.*, 2000; Kansaki & Pessin, 2001). De forma semelhante, a utilização de agentes despolimerizantes de microtúbulos como colchicina e nocodazole também inibem o movimento das vesículas (do pool estoque) e a captação de glicose. (Guilherme *et al.*, 2000, Olson *et al.*, 2001). Estes trabalhos demonstraram que o citoesqueleto de microtúbulos seria importante para manutenção da organização das vesículas do pool estoque de GLUT-4, mas não do pool reciclante. Fletcher e colaboradores (2000) sugerem que estas vesículas se movem ao longo da trama de microtúbulos em direção a superfície celular permitindo a exposição extracelular do GLUT4, através de sua ligação e fusão com a membrana plasmática (Figura 6),.

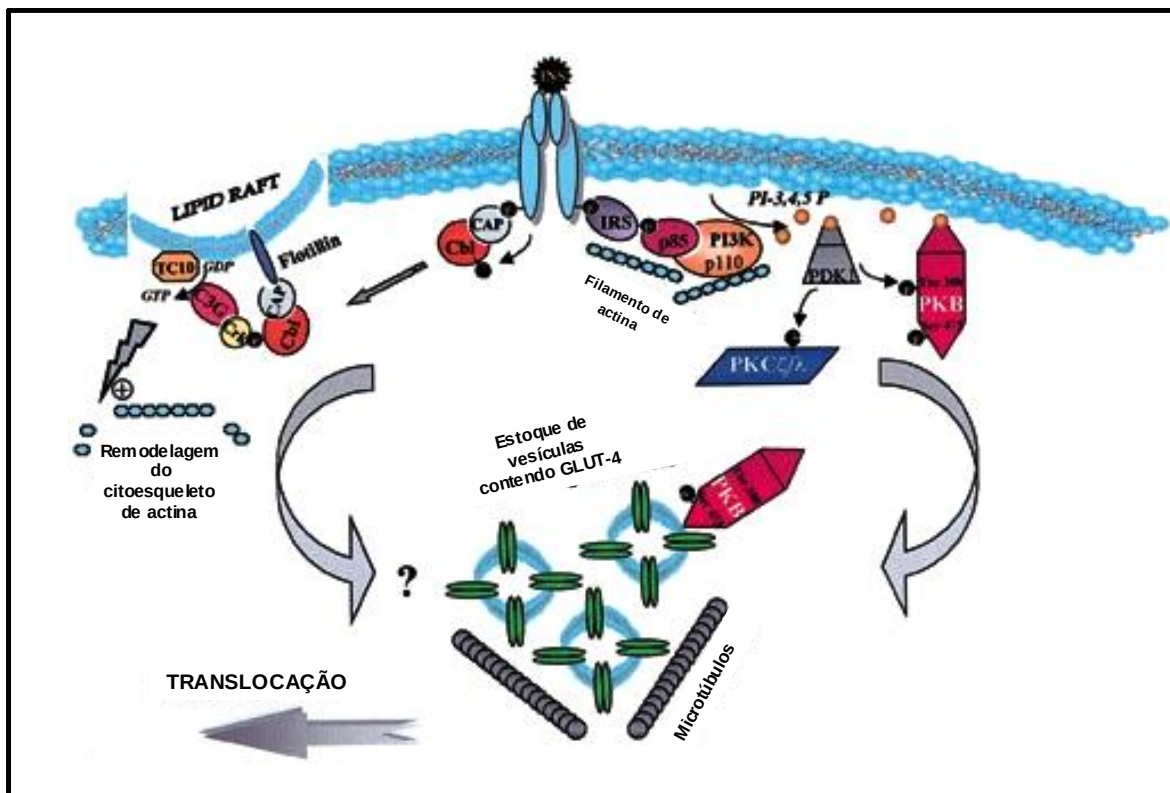


Figura 6- Vias de sinalização envolvidas no processo de translocação do GLUT-4 e o envolvimento do citoesqueleto de actina e microtúbulos neste processo. (Retirado de Ducluzeau et al, 2002)

1.7- Modelo experimental de desnutrição

As variações nutricionais durante a gestação a lactação podem determinar alterações temporais ou definitivas no desenvolvimento de mecanismos envolvidos com a homeostase. Vários estudos em animais têm explorado a relação entre a nutrição pré e pós-natal e os efeitos permanentes na sensibilidade à insulina. Alterações na sensibilidade à insulina e na tolerância à glicose foram detectadas na prole adulta de ratas alimentadas com uma dieta pobre em proteína (Swenne *et al*, 1987; Desai *et al*; 1995, Ozanne *et al*, 1996).

Baseado nestas referências, Moura e colaboradores (1997,1999) demonstraram em modelos com ratos que a restrição protéica na dieta das mães durante um período curto no início da lactação “programa” uma diminuição significativa na secreção de insulina na prole adulta. Entretanto, estes animais parecem desenvolver mecanismos adaptativos para otimizar a captação de glicose, já que não apresentam mudanças significativas nos níveis basais de glicose, indicando um aumento na sensibilidade à insulina. Dando continuidade a estes estudos, seguindo o modelo de dieta com 0% de proteína nos 10 primeiros dias de lactação já foi demonstrado :

a) Alterações no conteúdo de lactose e lipídeos no leite de ratas lactantes (Moura *et al*, 2002)

b) Uma variação de pressão arterial e uma relação entre a desnutrição e o comportamento alimentar, associado com os níveis plasmáticos de insulina e leptina (Moura *et al*, 2002).

c) Que a restrição protéica durante os 10 primeiros dias de lactação é capaz de causar efeitos duradouros na prole, tornando-a incapaz de apresentar uma resposta imune inata apropriada. Este efeito parece ser secundário a programação induzida pelo estado nutricional materno durante o período pós-natal causando um desequilíbrio entre a secreção de insulina e de glicocorticóides (Barja-Fidalgo *et al*, 2003).

d) Um aumento da secreção de insulina induzida pela glicose e na expressão do GLUT-2 nas células β pancreáticas de filhotes machos desnutridos com 21 dias de idade (Da Costa *et al*, 2004).

Objetivos

2- Objetivos:

Considerando o exposto anteriormente, nossos objetivos neste presente estudo foram:

- Avaliar o efeito da desnutrição materna durante a lactação sobre a secreção de insulina e a captação de glicose no músculo de ratos durante o desenvolvimento, relacionando-os com a expressão e ativação de proteínas chave na cascata da sinalização da insulina.
- Investigar a sinalização da insulina e o envolvimento do citoesqueleto de actina em tecido adiposo de ratos adultos submetidos a desnutrição durante o início da lactação

Material e Métodos

3- Material e Métodos

3.1-Modelo experimental de desnutrição

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas com 03 a 04 meses de idade. Os animais, provenientes da Fundação Oswaldo Cruz foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia da UERJ, sob condições de ciclo claro/escuro de 12 por 12 horas, temperatura ambiente de 23°C e com livre acesso à ração e água. O acasalamento foi realizado durante o período de 11 dias, na proporção de 03 fêmeas para 01 macho. Após a fecundação, as fêmeas foram separadas dos machos e colocadas em gaiolas individuais, recebendo ração industrializada específica para ratos contendo 22% de proteína (Labina-Purina) e água *ad libitum* durante todo o período de gestação.

Para um melhor desempenho lactotrófico, após o nascimento foram separados aleatoriamente 06 filhotes machos por ninhada (Moura *et al*; 1996). As ratas lactantes foram separadas em grupo controle (**C**), que recebeu ração industrializada contendo 22% de proteína durante todo o período de lactação e grupo desnutrido (**D**), que recebeu ração artesanal com 0% de proteína durante os 10 primeiros dias de lactação e a ração industrializada com 22 % de proteína do 11^o dia de lactação até o desmame dos filhotes (21^o dia). No 21^o dia, os animais de cada grupo foram separados da mãe, colocados em caixas com 6 animais e receberam água e ração com 22% de proteína, livremente, até o momento da realização dos experimentos (Figura 1).

[Digite texto]

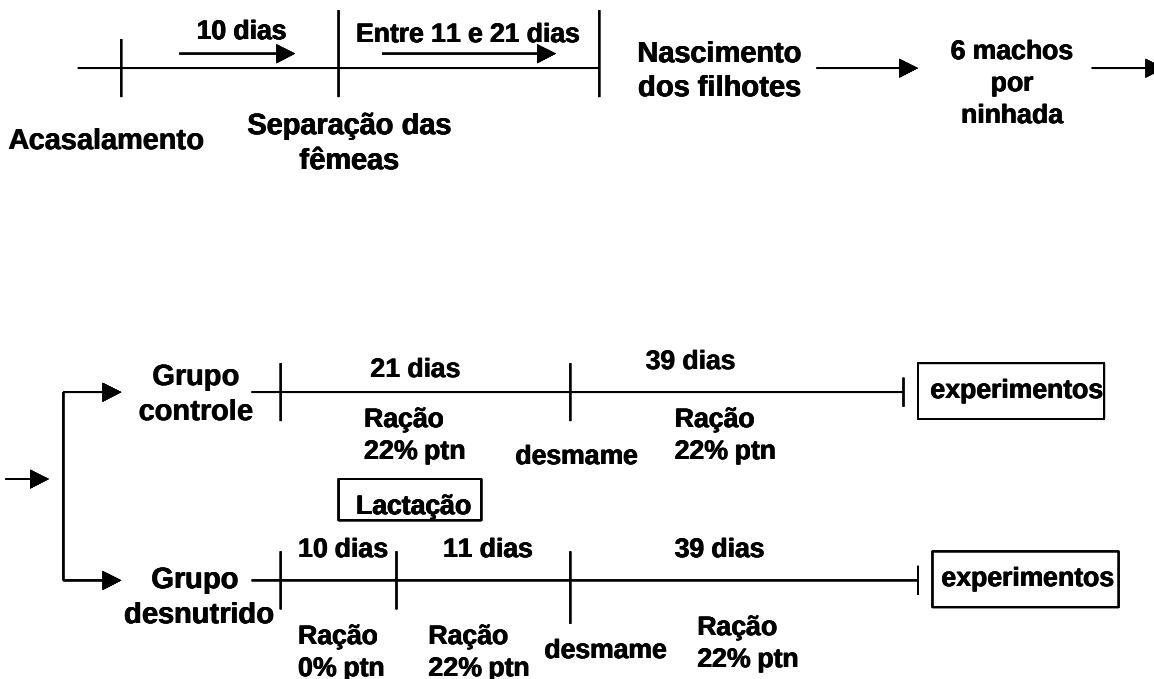


Figura 7- Esquema de acasalamento e separação do grupo de animais controles e desnutridos

3.2- Dietas

A ração industrializada específica para ratos e camundongos (Labina[®] Purina[®]), obtida comercialmente, é um alimento equilibrado e segue as recomendações do *National Research Council Institute of Health* - USA. A composição básica da ração é: carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, mistura de minerais, vitaminas e aminoácidos (Tabelas n.º 1 e 2).

A ração artesanal utilizada para o grupo de animais desnutridos é isocalórica em relação a ração industrializada, aprotéica (0% de proteína), foi elaborada por Moura e colaboradores (1999) e produzida artesanalmente no Laboratório de Farmacologia e Bioquímica Celular, do Instituto de Biologia da UERJ. A suplementação de vitaminas e minerais foi baseada na suplementação da ração comercial específica para ratos, nosso grupo controle. A composição básica da ração é: amido de milho (Maizena®), óleo de soja (Soya®), mistura de vitaminas e mistura de sais (Fórmula Antiga Homeopatia e manipulação) (Tabelas n.º 3 e 4).

Ração específica para ratos Labinal® (Purina®)

Níveis de garantia

Umidade (máxima)	12,5 %
Proteína bruta (mínimo)	22,0 %
Carboidrato (mínimo)	72,6 %
Lipídeos (mínimo)	5,4 %
Calorias/1 g de ração	4,21 Kcal ou 17,68 Kj
Material mineral (máximo)	10 %
Matéria fibrosa (máximo)	8,0 %
Cálcio (máximo)	1,4 %
Fósforo (mínimo)	0,8%

Tabela n.º 2: Composição básica da ração industrializada específica para ratos Labina® (Purina®), utilizada para os animais sem restrição protéica.

Ração específica para ratos Labina[®] (Purina[®]) Suplementação por Kg não mais do que:	
Vitaminas	Vitamina A: 12.000 UI, vitamina D ₃ : 1800 UI, vitamina E: 30 mg, vitamina K : 3 mg, vitamina B ₁ : 5 mg, vitamina B ₂ : 6 mg, vitamina B ₆ : 7 mg, vitamina B ₁₂ : 20 µg, ácido fólico: 1 mg, biotina: 1,5 mg, colina: 600 mg, niacina: 60 mg e ácido pantotênico: 20 mg.
Microelementos minerais	Ferro: 50 mg, zinco: 60 mg, cobre: 10 mg, iodo: 2 mg, manganês: 60 mg, selênio: 0,05 mg e cobalto: 1,5 mg
Aminoácidos	DL-metionina: 300 mg e lisina: 100 mg

Tabela n.º 3: Composição de micronutrientes da ração industrializada específica para ratos Labina[®] (Purina[®]), utilizada para os animais sem restrição protéica.

Ração artesanal (LFBC/IB/UERJ)	
Proteína	0 %
Carboidrato	88,9 %
Lipídeos	11,1 %
Calorias/1 g de ração	4,05 Kcal ou 17 KJ

Tabela n.º 4- Composição básica da ração artesanal utilizada para os animais com restrição protéica.

Ração específica artesanal (LFBC/IB/UERJ) Suplementação por Kg não mais do que:	
Vitaminas	Vitamina A: 12.000 UI, vitamina D ₃ : 1800 UI, vitamina E: 30 mg, vitamina K : 3 mg, vitamina B ₁ : 5 mg, vitamina B ₂ : 6 mg, vitamina B ₆ : 7 mg, vitamina B ₁₂ : 20 µg, ácido fólico: 1 mg, biotina: 1,5 mg, colina: 600 mg, niacina: 60 mg e ácido pantotênico: 20 mg.
Microelementos minerais	Ferro: 50 mg, zinco: 60 mg, cobre: 10 mg, iodo: 2 mg, manganês: 60 mg, selênio: 0,05 mg, cobalto: 1,5 mg, cálcio: 4207 mg, potássio: 2765 mg e sódio: 1226 mg

Tabela n.º 5- Composição de micronutrientes da ração artesanal utilizada para os animais com restrição protéica.

Todos os animais (filhotes) foram acompanhados diariamente com controle de peso e ingestão das rações, utilizando-se balança de precisão.

3.3- Transporte de glicose e sinalização da insulina em tecido muscular de ratos

Esta metodologia encontra-se descrita no Artigo 1 do Anexo desta tese .

3.4- Isolamento de adipócitos

Os adipócitos foram isolados do tecido adiposo do epidídimo de ratos adultos (90 dias de idade), em jejum de 12 horas, pelo método da collagenase

[Digite texto]

(Rodbell, 1964). Resumidamente, as bolsas de gordura do epidídimo foram incubadas em tampão Krebs-Ringer-Hepes, contendo 2 % BSA e 0.7mg/ml collagenase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (pH 7.4) e incubadas a 37°C por 40 min em um agitador a 120 rpm. Após a digestão, as células foram dissociadas mecanicamente e lavadas três vezes com tampão Krebs-Ringer (KRB) suplementado com Hepes 30 μ M e BSA 1% (pH 7,4). Em seguida, as células foram estimuladas ou não com diferentes concentrações (5, 10, 25, 50 e 100 nM) de insulina regular (Biohulin, Biobrás) por 10 minutos a 37° C. Após a incubação, as células foram homogeneizadas por 30 minutos no gelo em tampão de lise contendo de Hepes 50 mM, $MgCl_2$ 1mM, EDTA 10 mM, SDS 1% e os inibidores de proteases: PMSF 1 mM, aprotinina 1 μ M, leupeptina 1 μ M e inibidor de tripsina de soja 1 μ M. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976). Em seguida, as amostras foram tratadas com tampão de amostra 5x concentrado por 3 minutos a 90°C, congeladas e aliquoteadas para serem submetidas ao SDS-PAGE.

3.5- Captação de glicose

O transporte de glicose foi determinado como descrito por Kansaki e Pessin (2001). Após o isolamento dos adipócitos, as células foram tratadas na presença ou ausência de LY294002 (Calbiochem, San Diego, CA) por 10 min a 37°C antes da adição de insulina (100 nM) por 20 minutos a 37°C. As amostras foram então incubadas por 10 min na presença of 50 μ M 2-deoxy-D-[14C] glucose (1 μ Ci/ml, Amersham Biociences, UK) a 4°C por 10 minutos. As células foram então lavadas

[Digite texto]

3 vezes com tampão salina fosfato (PBS) gelado e solubilizadas em Triton X-100 1% em PBS a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, as alíquotas foram submetidas a contagem em contador de cintilação líquida. (Beta Counter, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford.

3.6-Imunoprecipitação

As células foram tratadas na presença ou ausência de 100 nM de insulina por 10 minutos a 37°C. Após o tratamento, os adipócitos foram lisados em tampão de lise para imunoprecipitação (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NaF 10 mM, Na_3VO_4 2 mM, NP-40 1%, SDS 0.1 % , aprotinina 1 μM , leupetina 1 μM e PMSF 1 mM) por 30 minutos a 4° C. O lisado celular (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) foi incubado por 2 horas a 4° C com anticorpo policlonal de cabra anti-IRS-1 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA) ou anti IRS-2 ((1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA). Após a incubação, foram adicionados 20 μl de proteína AG-agarose (Santa Cruz Biotechnology, USA) e incubados “overnight” a 4° C sob suave agitação. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e tratadas para posterior análise do conteúdo e ativação do IRS-1 e IRS-2 por Western blotting.

3.7- Western blotting

Amostras contendo 30 μg de proteínas foram submetidas ao SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 8%. Em seguida, foi realizada a transferência para uma

[Digite texto]

membrana de PVDF (PVDF Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) por 1 hora utilizando-se o sistema Semi-dry (BIO-RAD). A membrana foi então bloqueada com Tween-TBS (Tris- HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, Tween-20 0,01%) contendo BSA 1% por 30 minutos, seguida da incubação “overnight” com o anticorpo primário específico. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-subunidade β do receptor de insulina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology); anti-fosfotirosina (1:500, Santa Cruz Biotechnology); anti-IRS-1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology); anti-IRS-2 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology); anti-Akt (1:1000, Santa Cruz Biotechnology); anti- pS⁴⁷³Akt (1:2000, Promega). As membranas foram então incubadas com o anticorpo secundário específico conjugado com biotina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), seguida da incubação com peroxidase conjugada com estreptavidina (HRP- estreptavidin, 1:1000, Caltag Laboratories). As proteínas imunoreativas foram visualizadas pela marcação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma). As bandas foram quantificadas por densitometria, utilizando Scion Image Software .

3.8- Imunocitoquímica- Dupla marcação

Utilizamos a técnica de imunocitoquímica com dupla marcação para avaliar o citoesqueleto de actina e a expressão do transportador de glicose GLUT-4 nos adipócitos. Todo o procedimento foi realizado com as células em suspensão. Após o isolamento e tratamento com Latrunculina B (Calbiochem) e / ou insulina a 37°C, os adipócitos foram fixados com paraformaldeído 4% por 20 minutos,

[Digite texto]

permeabilizados por 5 minutos com PBS contendo 0.1% de Triton X-100 e lavados com PBS. Para a marcação do citoesqueleto de actina, foi realizada a incubação com faloidina-TRITC (Tetrarodamina Isotiocianato, Sigma) diluída em PBS (1:1000) por 1 hora e 30 minutos no escuro em câmara úmida. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS para dar início a dupla marcação. As lâminas foram incubadas overnight a 4° C com anticorpo anti-GLUT-4 (1:50, Santa Cruz Biotechnology) no escuro, lavados e incubados com anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com biotina (1:50, Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora. As células foram então lavadas com PBS e incubados com estreptavidina conjugada com FITC (Fluoresceína Isotiocianato, 1:50, Zymed Lab.) por 1 hora à temperatura ambiente. Após a lavagem do material, as lâminas foram montadas e cobertas com lamínula utilizando uma solução de N-propilgalacto 20 mM e glicerol 90% em PBS. A reação imunocitoquímica foi avaliada através de microscopia de fluorescência, utilizando o microscópio Olympus BX-40. As imagens foram captadas por câmara digital e analisadas pelo Image-pro Software.

3.9- Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média e desvio padrão. Os resultados obtidos para cada grupo experimental foram analisados estatisticamente utilizando-se análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste *t* de Bonferroni. A significância foi considerada para valores de $p < 0,05$.

Resultados

4- Resultados

4.1-: ARTIGO 1

Efeito da desnutrição materna durante a lactação sobre a secreção de insulina e a captação de glicose no tecido muscular de ratos durante o desenvolvimento: Relação com a expressão e ativação de proteínas chave na cascata da sinalização da insulina.

Os resultados deste trabalho encontram-se descritos no corpo do artigo em anexo, intitulado :

Upregulation of phosphatidylinositol 3-kinase and glucose transporter 4 in muscle of rats subjected to maternal undernutrition

Marta Sampaio de Freitas¹, Erica Patricia Garcia De Souza, Simone Vargas da Silva, Andrea da Rocha Kaezer, Rafael da Silva Vieira, *Anibal Sanchez Moura,

Christina Barja-Fidalgo

Biochimica et Biophysica Acta 1639: 8-16 (2003)

Neste trabalho demonstramos que a desnutrição materna no início da lactação induza um aumento da sensibilidade à insulina no tecido muscular da prole adulta, aumento este que parece estar diretamente relacionado com

alterações na expressão e na ativação de proteínas envolvidas na cascata de sinalização da insulina e metabolismo da glicose.

Foi observado uma diminuição na secreção de insulina acompanhada de normoglicemia nos animais adultos desnutridos. Acompanhando a resposta a insulina no músculo esquelético de ratos desde o período pós-natal, observamos que a ativação do receptor de insulina (IR), detectada através da fosforilação em resíduos de tirosina, após a estimulação com o hormônio, apresentou-se diminuída durante o período de restrição protéica (primeiros 10 dias de lactação) nos animais experimentais. Durante o período da lactação (21 dias), ocorreu uma diminuição na captação de glicose, na fosforilação do substrato para o receptor de insulina (IRS-1) e na translocação do GLUT-4 no tecido muscular. Estes parâmetros foram restabelecidos na idade adulta, quando observa-se um aumento significativo na captação de glicose e na translocação do GLUT-4 no músculo, associado com um aumento na expressão da PI3-kinase associada ao IRS-1.

Em conjunto, essas evidências sugerem que o equilíbrio do metabolismo glicêmico desses animais seja mantido, pelo menos em parte, através de uma maior translocação de GLUT4 no tecido muscular, promovendo uma maior captação de glicose através de um mecanismo compensatório para a menor secreção de insulina.

Up-regulation of phosphatidylinositol 3-kinase and glucose transporter 4 in muscle of rats subjected to maternal undernutrition

Marta Sampaio de Freitas^{a,*}, Erica Patricia Garcia De Souza^a,
Simone Vargas da Silva^a, Andrea da Rocha Kaezer^a, Rafael da Silva Vieira^a,
Anibal Sanchez Moura^b, Christina Barja-Fidalgo^a

^a*Departamento de Farmacologia, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 de setembro 87 fds, Vila Isabel, Rio de Janeiro 20551-030, RJ, Brazil*

^b*Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

Received 27 February 2003; received in revised form 3 June 2003; accepted 18 June 2003

Abstract

Early postnatal nutrition has been associated with the long-term effects on glucose homeostasis in adulthood. To elucidate the molecular mechanisms by which undernutrition during early life leads to changes in insulin sensitivity, we investigated the insulin signaling in skeletal muscle of rats during development. Offspring of dams fed with either protein-free or normal diets during the first 10 days of lactation were studied from lactation period until adulthood. Early maternal undernutrition impaired secretion of insulin but maintained normal blood glucose levels until adulthood. Insulin receptor (IR) activation after insulin stimulation was decreased during the period of protein restriction. In addition, glucose uptake, insulin receptor substrate 1 (IRS-1) phosphorylation and glucose transporter 4 (GLUT-4) translocation in muscle were reduced in response to insulin during suckling. In contrast, non- or insulin-stimulated glucose uptake and GLUT-4 translocation were found significantly increased in muscle of adult offspring. Finally, basal association of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) with IRS-1 was increased and was highly stimulated by insulin in muscle from adult rats. Our findings suggest that early postnatal undernutrition increases insulin sensitivity in adulthood, which appears to be directly related to changes in critical steps required for glucose metabolism.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: PI3-kinase; GLUT-4; Skeletal muscle; Undernutrition; Insulin sensibility

1. Introduction

Epidemiological and experimental studies have demonstrated that maternal nutrition environment during pre- and/or postnatal period may predispose to a higher susceptibility to chronic diseases in adulthood [1,2]. These studies provide evidence that specific biological mechanisms might operate at morphological, cellular or molecular level memorizing the metabolic effects of early nutritional environments [3,4]. The metabolic reorganization that might occur during developmental period could induce permanent effects on key organs activity, actively influ-

encing the development of degenerative diseases, most of them associated to the impairment of hormonal homeostasis, such as cardiovascular disease, hypertension, obesity and type 2 diabetes [5–16].

Different studies have shown that deprivation of protein calories during early stages of development has effects on glucose metabolism in adulthood [2,9,17–20]. Thus, some investigations have shown an increased insulin sensitivity in adult offspring from dams fed a low-protein diet during pregnancy and/or lactation [14,21–23]. In addition, it has been observed that adult offspring from dams fed with a protein-free diet during early lactation displayed reduction in insulin secretion associated with increase in insulin sensitivity [24–27].

The effect of insulin acutely stimulating glucose uptake and metabolism in peripheral tissues is essential for normal glucose homeostasis [28]. Insulin action involves multiple

* Corresponding author. Tel.: +55-21-2587-6398; fax: +55-21-2587-6808.

E-mail address: martaf@uerj.br (M. Sampaio de Freitas).

signaling pathways initiated by insulin binding to insulin receptor (IR), eliciting receptor autophosphorylation with receptor tyrosine kinase activation, resulting in tyrosine phosphorylation of several substrates [29–32]. One of these phosphorylated proteins, insulin receptor substrate 1 (IRS-1), is critical for the mitogenic and metabolic effects of the hormone [33]. The tyrosine phosphorylation of IRS-1 generates docking sites for several proteins containing Src homology 2 (SH2) domains [34]. Among these, the p85 regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), a necessary step on glucose transport stimulation [29,35], which is brought about primarily by translocation of the major insulin-responsive glucose transporter, GLUT-4, from intracellular vesicles to the plasma membrane [36].

Alterations in insulin sensitivity have been frequently associated to insulin receptor and postreceptor signaling defects. Naturally occurring mutations in the primary sequence of the IR, a low expression of IR molecules on the plasma membrane of the target cells, or alterations in insulin postreceptor signaling can result in decreased insulin sensitivity [37–39]. Recent evidence showed that a reduction in the association of PI3-kinase p85 subunit with IRS-1 could be a key abnormality related to insulin resistance in skeletal muscle [40]. Studies with GLUT-4 knockout mice have shown a direct involvement of GLUT-4 in insulin resistance and glucose tolerance [41]. In addition to the association between the glucose transporter and the reported pathologies, Katsumata et al. [42] demonstrated that GLUT gene expression in muscle seems to be regulated by nutritional status. Along this line, Ozanne et al. [18] showed that maternal malnutrition during fetal life induces an increase in insulin sensitivity apparently dependent on GLUT-4 up-regulation. It has been also demonstrated that undernutrition improves glucose uptake as well as GLUT-4 content [43,44], indicating that alterations in early steps of insulin signaling pathway may play an important role regulating insulin sensitivity.

The goal of this work was to investigate the effect of early maternal undernutrition on basal and insulin-induced glucose uptake in muscle during development. These results were then related to key proteins in the insulin-signaling cascade.

2. Materials and methods

2.1. Animals and diets

The procedures used throughout this study were approved by our Institutional Ethics Committee and are in accordance to National Institutes of Health animal care guidelines. Wistar rats were housed in controlled temperature rooms at 23–25 °C. Virgin female rats were mated and the pregnant dams, housed in individual cages, were fed with a normal diet containing 23% protein during

gestation. After delivery, each lactating dam was kept with six male pups and one group of dams received a protein-free diet during the first 10 days of lactation while the other group received a normal diet. Both groups were fed ad libitum and diets were isocaloric, including vitamins and mineral mixture. The composition of the diets is shown in Table 1. At the end of lactation (day 21), the pups were separated from dams and received the normal diet until 60 days of age. The animals were divided in two groups: control group (C-group: offspring from dams which received normal diet) and undernourished group (UN-group: offspring from dams which received protein-free diet) and studied at ages 4, 8, 15, 21, 30 and 60 days. In all experiments, animals with the same age of the UN-group matched the C-group. Body weights were measured daily. Blood was collected and glucose levels were monitored using Advantage II Glucose Blood monitor (Roche Diagnosis Co, Indianapolis, IN, USA). Plasma insulin concentrations were determined by radioimmunoassay kit (ICN Pharmaceuticals Inc., Orangeburg, NY, USA).

2.2. Glucose transport studies

The glucose transport into muscle tissue was assayed using the isolated muscle strip technique as described earlier [46]. Briefly, tibialis anterior muscles were removed and 30-mg tissue strips were preincubated in Krebs–Ringer buffer in the presence or in the absence of insulin (1 μ M) for 20 min, at 37 °C under continuous gassing with 95% O₂/5% CO₂. Samples were incubated for 10 min in the presence of 1 mM 2-deoxy-D-[¹⁴C] glucose (15.4 Ci/mmol; New England Nuclear, Boston, MA, USA). After that, the muscle strips were homogenized in 1% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 10,000 $\times$ g. Radioactivity in the supernatant was determined by liquid scintil-

Table 1
Composition of control and protein-free diets

	Control diet ^a	Protein-free diet ^b
<i>Ingredients, g/kg</i>		
Soybean + wheat	230	0
Corn starch	676	1006
Soybean oil	50	50
Vitamin mixture ^c	4	4
Mineral mixture ^c	40	40
<i>Macronutrient composition, g/kg</i>		
Protein	23	0
Carbohydrate	66	89
Fat	11	11
Total energy, kJ/kg	17038.7	17038.4

^a Standard diet for rodents.

^b The protein-free diet was prepared using the control diet and replacing the protein by corn starch [25].

^c Vitamin and mineral mixture were formulated according to the American Institute of Nutrition AIN-93G recommendation for rodents diets [45].

lation counting (Beta Counter, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

2.3. Subcellular fractionation of skeletal muscle

Skeletal muscle membranes were isolated as described by Ozanne et al. [18]. Briefly, tibialis anterior muscle strips (30 mg) were incubated for 30 min at 37 °C in phosphate buffered saline (PBS) with insulin (1 µM). After incubation, tissue was homogenized in ice-cold homogenization buffer containing 50 mM Mes, pH 6.4, 1 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 1 µg/ml DNase, 0.5 µg/ml RNase and the following protease inhibitors: 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM benzamidine, 1 µM aprotinin, 1 µM leupeptin and 1 µM soybean trypsin inhibitor (Sigma Chemicals Co, St. Louis, MO, USA). For fractionation experiments, tissue was homogenized in 50 mM Mes, pH 6.4, 1 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 1 µg/ml DNase, 0.5 µg/ml RNase and protease inhibitors, centrifuged at 13,000 × g for 15 min and supernatant was centrifuged at 190,000 × g for 60 min. The pellet resuspended in homogenization buffer was overlayed onto a 25, 30 and 35% (wt/wt) step sucrose gradient and centrifuged at 150,000 × g for 75 min. Plasma membranes found on the sample layer–25% sucrose interface were washed in homogenization buffer and centrifuged at 150,000 × g for 60 min. Proteins were assayed and fractions were kept frozen at –70 °C.

2.4. Immunoprecipitation

After treatment with insulin, muscle strips (30 mg) were lysed in 50 mM Tris–HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 10% glycerol, 10% aprotinin, 10 µg/µl leupeptin, 2 µg/µl pepstatin and 1 mM PMSF. Lysates (2 µg/µl) were incubated overnight at 4 °C with polyclonal goat anti-IRS-1 antibody (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Then, protein A/G agarose (20 µl/mg protein; Santa Cruz Biotechnology) was added and samples were incubated at 4 °C under

rotation for 2 h. The content of IRS-1 and PI3-kinase associated to IRS-1 was analyzed by Western blotting as subsequently described.

2.5. Western blotting

Cellular proteins (30 µg total) were subjected to 10% SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride filters (PVDF Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) and blocked with Tween-TBS (20 mM Tris–HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.01% Tween-20) containing 1% bovine serum albumin. Primary antibodies used in Western analysis were anti-insulin receptor β-subunit (1:1000; Santa Cruz Biotechnology); anti-phosphotyrosine (1:500; Santa Cruz Biotechnology); anti-IRS-1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology); anti-GLUT-4 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology) or anti-PI3-kinase p85 subunit (1:1000; Santa Cruz Biotechnology). The PVDF filters were next incubated with appropriate secondary antibody conjugated to biotin (Santa Cruz Biotechnology) followed by 1-h incubation with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (1:1000; Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA). Immunoreactive proteins were visualized by 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) staining. The bands were quantified by densitometry, using Scion Image Software (Scion Co, Frederick, MD, USA).

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed using two-way ANOVA with Fisher's post-hoc test. A *P* value <0.05 was considered significant. Data are shown as means ± S.E.

3. Results

3.1. Body weight and growth rate during development

Maternal protein restriction during the first 10 days of lactation affected the offspring body weight at all ages analyzed (Table 2). Rats from UN-group presented a reduc-

Table 2
Weight, growth rate, blood glucose and plasma insulin in rats from control (C) and undernourished (UN) groups during development

	Age (days)									
	8		15		21		30		60	
	C	UN	C	UN	C	UN	C	UN	C	UN
Weight, g	21 ± 2.4 ^f	10.7 ± 1.0 ^g	34.4 ± 2.6 ^e	18.4 ± 3.2 ^f	56.9 ± 8.6 ^d	27.2 ± 2.2 ^e	93.2 ± 9.1 ^c	74.0 ± 5.5 ^d	258.0 ± 31.8 ^a	203.0 ± 18.0 ^b
Growth rate, g/day	1 ± 0.11 ^d	0.5 ± 0.05 ^e	1.8 ± 0.14 ^c	1.0 ± 0.17 ^d	3.8 ± 0.57 ^b	1.5 ± 0.12 ^c	4.0 ± 0.13 ^b	5.2 ± 0.39 ^a	5.5 ± 0.68 ^a	4.3 ± 0.38 ^b
Blood glucose, mmol/l	5.5 ± 0.7	4.7 ± 0.8	6.1 ± 0.9	5.5 ± 0.8	7.3 ± 0.7	6.4 ± 1.2	6.0 ± 1.0	5.6 ± 0.7	6.3 ± 0.7	6.7 ± 0.9
Plasma insulin, pmol/l	207 ± 45 ^c	195 ± 26 ^c	190 ± 17 ^c	230 ± 39 ^c	185 ± 31 ^c	245 ± 49 ^c	244 ± 59 ^c	225 ± 26 ^c	1142 ± 64 ^a	806 ± 169 ^b

Values are means ± S.E., *n* = 16. Data in a row without a common letter differ, *P* < 0.05.

tion (about 50%) in body weight during the suckling period (ages 8 until 21 days). After weaning, age 21 days, the differences in body weight between rats from both UN- and C-groups decreased to only about 20% (ages 30 and 60 days). The growth rate in rats from UN and control groups during the postnatal development was also measured (Table 2). The undernutritional conditions of dams during lactation resulted in a minor weight gain during lactation period when compared to controls. However, UN-group showed an accelerated gain of weight after the weaning, with a significant increase in growth rate at age 30 reaching values significantly higher than control rats.

3.2. Blood glucose and plasma insulin levels during development

Blood glucose and plasma insulin levels were evaluated throughout the postnatal development of rats from UN- and C-groups (Table 2). The glucose levels, analyzed from ages 8 until 60 days, were not different between both groups. Insulin levels, despite being quite similar in rats from C- and UN-groups until age 30 days, were significantly lower (30%) in rats from UN-group at age 60 days.

3.3. Effect of insulin on glucose uptake in skeletal muscle during development

Basal glucose uptake (i.e., the rate in the absence of acute insulin stimulation) was diminished in skeletal muscle from UN-group during the period of maternal undernutrition (age 8 d), as presented in Fig. 1. However, a significant increase in basal glucose uptake was observed in muscle from UN-group at ages 15 and 60 days. As expected, insulin increased muscle glucose uptake in C-group at all ages studied, especially after weaning (age 21 days: 1.78-fold; age 30 days: 1.93-fold; and age 60 days: 1.37-fold over basal

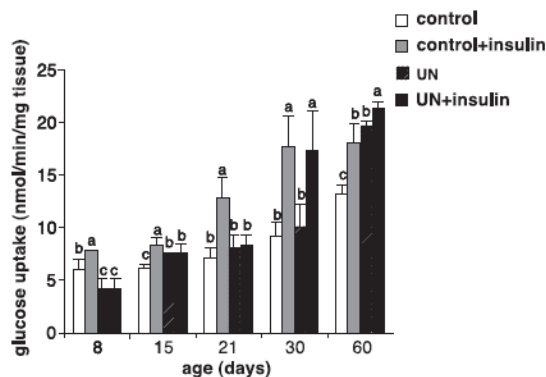


Fig. 1. Glucose uptake into isolated muscle from rats subjected to normal or protein-free diets. Muscle strips, isolated from control and maternal undernutrition (UN) groups at ages 8, 15, 21, 30 and 60 days, were stimulated with or without insulin before addition of 2-deoxy-D-[1- 14 C]glucose. Results are means $\pm$ S.E., $n=6$. Values without a common letter differ within each age group, $P<0.05$.

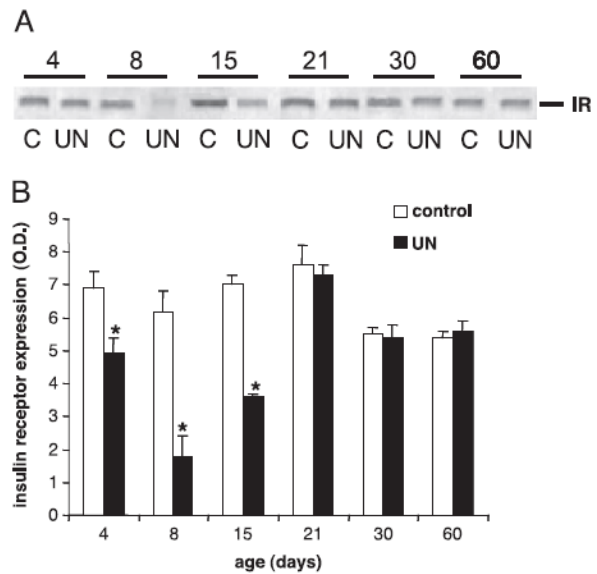


Fig. 2. Insulin receptor expression in muscle from rats subjected to normal or protein-free diets. Muscle strips were isolated from control (C) and maternal undernutrition (UN) groups at ages 4, 8, 15, 21, 30 and 60 days. (A) Western blotting probed with anti-IR β subunit antibody. (B) IR immunoreactivity quantified by scanning densitometry. Results are means $\pm$ S.E., $n=3$. * $P<0.05$ comparing undernourished group to control group.

values). In contrast, insulin was unable to stimulate glucose uptake by skeletal muscle from UN-group from age 8 until 21 days, although the insulin stimulation was restored at age 30 days. Although basal glucose uptake in muscle from UN-group at age 60 days was significantly higher when compared to C-group with the same age, insulin stimulation of muscle tissue from those rats was able to further increase glucose uptake.

3.4. Expression and tyrosine phosphorylation of IR in skeletal muscle

IR immunoreactivity was significantly reduced in muscle from UN-group at ages 4, 8 and 15 days, when compared to controls, as shown in Fig. 2. However, IR expression was completely restored in muscle tissue from UN-group, at ages 21 until 60 days.

The stimulatory effect of insulin on tyrosine kinase activity of IR (β -subunit) in muscle of rats during postnatal development is shown in Fig. 3. IR basal activity (non-stimulated) did not change throughout development in C-group. After insulin stimulation, tyrosine phosphorylation of IR increased at all ages analyzed ranging from two- to fourfold. On the other hand, UN-group at ages 4 and 8 days displayed a significant reduction in IR tyrosine phosphorylation when compared to C-group, either in non- or insulin-stimulated tissues. However, tyrosine kinase activity of IR was restored in skeletal muscle from UN-group at ages 15 until 60 days (Fig. 3A and B).

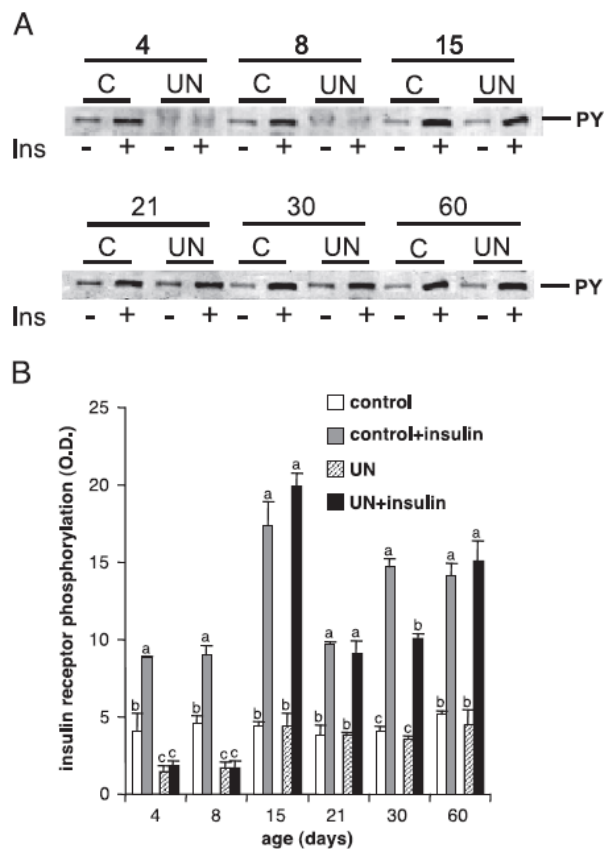


Fig. 3. Insulin receptor tyrosine phosphorylation in muscle from rats subjected to normal or protein-free diets. Muscle strips, isolated from control (C) and maternal undernutrition (UN) groups at ages 4, 8, 15, 21, 30 and 60 days, were stimulated with (+ Ins) or without (– Ins) insulin for 30 minutes. (A) Western blotting probed with anti-phosphotyrosine (PY) antibody. (B) Insulin receptor phosphorylation levels quantified by scanning densitometry of the bands. Results are means $\pm$ S.E., $n=3$. Values without a common letter differ within each age group, $P<0.05$.

3.5. IRS-1 expression and activity in skeletal muscle

IRS-1 protein content associated to plasma membrane and IRS-1 tyrosine phosphorylation were analyzed by Western blotting in muscle from C- and UN-groups (Fig. 4A and C). The expression of IRS-1 in muscle from C-group was not affected during postnatal development, at ages 4 until 60 days (Fig. 4A). Maternal undernutrition during lactation did not induce significant changes in the IRS-1 levels during postnatal development, except at age 8 days when an impressive decrease in protein content was observed in muscle from UN-group (Fig. 4A and B). IRS-1 tyrosine phosphorylation induced by insulin stimulation was observed in muscle from C-group at ages 4 until 60 days reflecting a physiological response of the tissue (Fig. 4C and D). However, insulin failed to induce IRS-1 phosphorylation in tissue from UN-group at ages 4 and 8 days. After this period, the phosphotyrosine content of IRS-1 progressively increased, although the response was still under control values being

restored at ages 30 and 60 days, and reaching a similar level to C-group (Fig. 4C and D).

3.6. GLUT-4 translocation in skeletal muscle

The translocation of GLUT-4 glucose transporter to plasma membrane after insulin stimulation was investigated in skeletal muscle from UN- and C-groups. Western blotting protein analysis with anti-GLUT-4 antibody in C-group indicated that non-stimulated tissues presented low levels of membrane-associated GLUT-4 that remained unaltered during postnatal development (Fig. 5A and B). The basal content of immunoreactive protein was low in muscle from UN-group at ages 4 and 8 days, although no differences were observed after ages 15 until 30 days, when compared to C-group. However, a significant increase of the basal

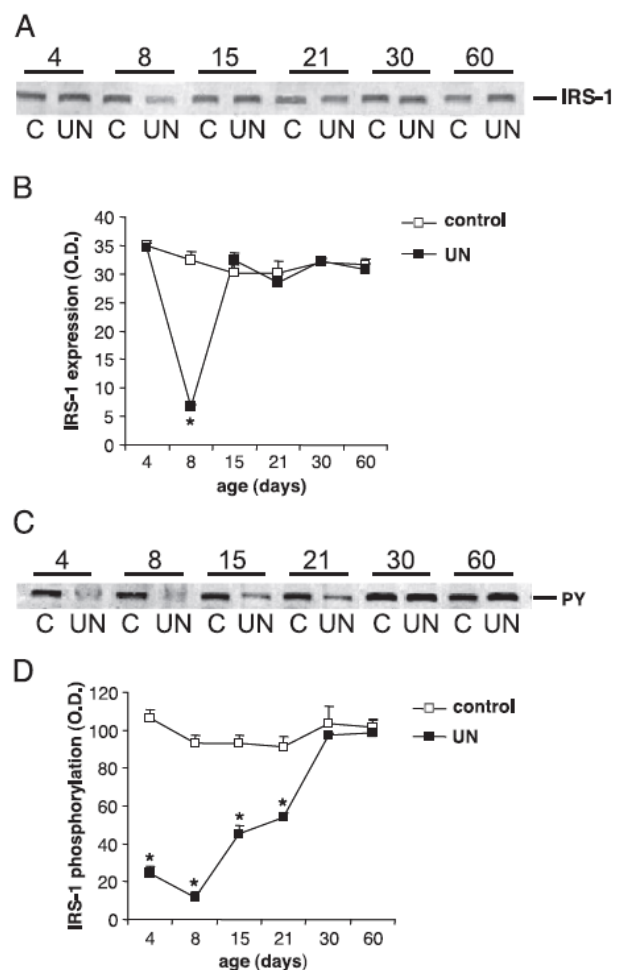


Fig. 4. Insulin receptor substrate 1 expression and phosphorylation in muscle from rats subjected to normal or protein-free diets. Muscle strips, isolated from control (C) and maternal undernutrition (UN) groups at ages 4, 8, 15, 21, 30 and 60 days, were stimulated with insulin for 30 min. (A, C) Western blotting probed with anti-IRS-1 and anti-phosphotyrosine (PY) antibodies. IRS-1 expression (B) and phosphorylation (D) levels quantified by scanning densitometry of the bands. Results are means $\pm$ S.E., $n=3$. * $P<0.05$ comparing undernourished group to control group.

GLUT-4 was observed in muscle plasma membrane from UN-group at age 60 days. Upon insulin stimulation, an increase of GLUT-4 translocation (threefold over basal levels) was measured in muscle from C-group and the levels of membrane-bound protein were quite similar at ages from 8 to 60 days. In contrast, acute insulin stimulation did not alter GLUT-4 content in muscle from UN rats at ages from 4 to 15 days. After that, GLUT-4 translocation to plasma membrane progressively increased upon insulin stimulation, being completely restored at age 30 days. An expressive change was the insulin-induced GLUT-4 translocation, which was found significantly increased in tissue of 60-day-old rats from UN-group when compared to control.

3.7. Association of PI3-kinase with IRS-1 in skeletal muscle

It is well established that activation of PI3-kinase mediates GLUT-4 redistribution to the plasma membrane. The fact that non- or insulin-induced GLUT-4 translocation and glucose uptake were significantly higher in muscle from UN-group at age 60 days prompted us to investigate whether this effect could be related to PI3-kinase interaction with IRS-1. After insulin stimulation, muscle tissue from rats at age 60 days (C- and UN-groups) was lysed and IRS-1 was immunoprecipitated for PI3-kinase associated with

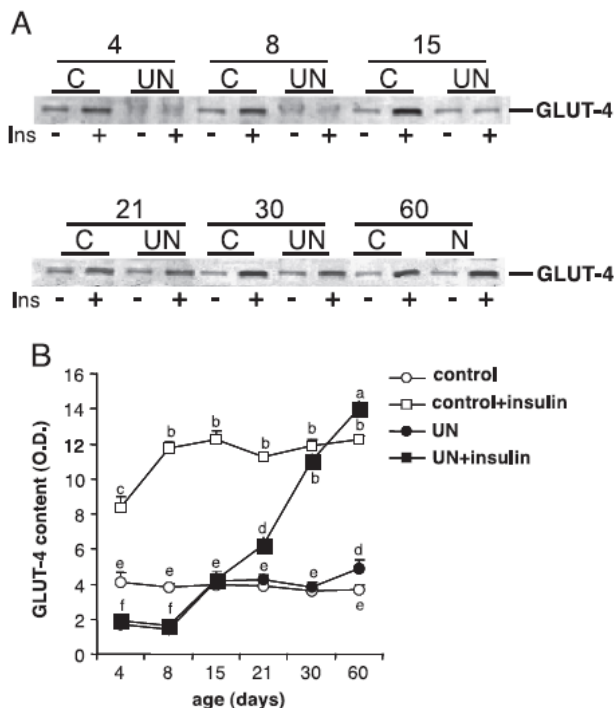


Fig. 5. GLUT-4 content in surface membranes in muscle from rats subjected to normal or protein-free diets. Muscle strips, isolated from control (C) and maternal undernutrition (UN) groups at ages 4, 8, 15, 21, 30 and 60 days, were stimulated with (+Ins) or without (–Ins) insulin for 30 min. (A) Western blotting probed with anti-GLUT-4 antibody. (B) GLUT-4 translocation quantified by scanning densitometry of the bands. Results are means $\pm$ S.E., $n = 3$. Values without a common letter differ within each age group, $P < 0.05$.

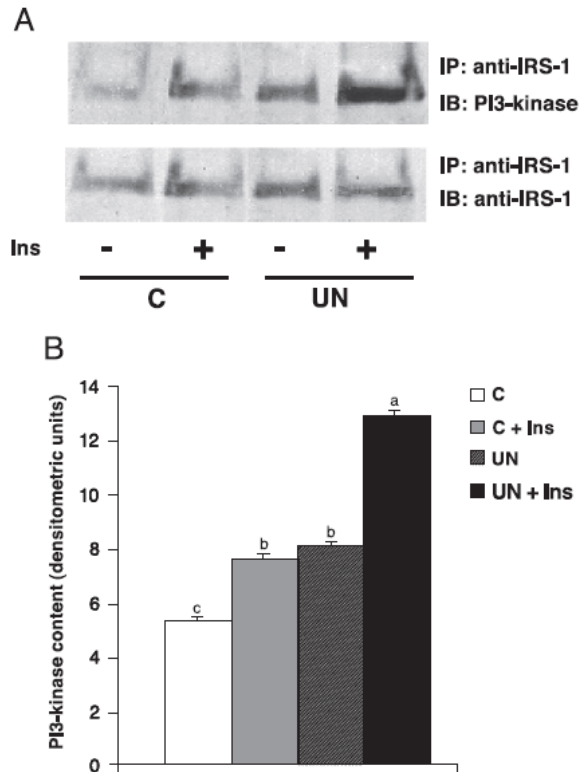


Fig. 6. PI3-kinase associated with IRS-1 in muscle from rats subjected to normal or protein-free diets. Muscle strips, isolated from control (C) and maternal undernutrition (UN) groups at age 60 days, were stimulated with (+Ins) or without (–Ins) insulin for 30 min. (A) Western blotting probed with anti-IRS-1 and anti-PI3-kinase p85 subunit antibodies. (B) PI3-kinase immunoccontent quantified by scanning densitometry of the bands. Results are means $\pm$ S.E., $n = 3$. Values without a common letter differ within each age group, $P < 0.05$.

IRS-1 analysis. Insulin induced an increase in IRS-1-associated PI3-kinase in muscle tissue from C-group when compared to non-stimulated tissue, as shown in Fig. 6. However, in muscle from UN-group, it can be observed that basal association of PI3-kinase with IRS-1 reached similar levels to those found in tissue from C-group after insulin stimulation. Upon insulin stimulation, IRS-1-associated PI3-kinase was highly increased in muscle from UN-group as compared to control group (Fig. 6A and B).

4. Discussion

Different studies have shown that nutritional deprivation during early stages of development is critical to glucose metabolism in adulthood [2,9,17–20,43,44]. Maternal nutritional status during early life has been often described as a determinant factor for programming alterations in insulin sensitivity and insulin-mediated effects in adulthood [8,18,20]. The molecular events by which food deprivation leads to changes in insulin sensitivity are not well understood, and the development of animal models of nutritional restriction becomes important to assemble

those of the human situation. Therefore, in order to elucidate the molecular mechanisms involved in the insulin programming induced by maternal undernutrition during early lactation, we investigated the insulin-mediated signaling responses in skeletal muscle of rats during development.

Undernutrition status during early lactation resulted in a significant reduction of body weight of UN offspring during the developmental period until the adult age with an increased rate of growth of UN-group at the end of developmental period. This capacity to compensate the lost of body weight in early life with a subsequent acceleration in weight gain was also described in previous studies on maternal undernutrition [9,15,16,25].

In this study, we showed that no significant variations in blood glucose and plasma insulin were observed in rats submitted to maternal protein restriction in early lactation at ages 8 until 30 days, when compared to control group. However, it was detected a significant decrease in insulin-induced glucose uptake into muscle tissue from UN-group, which was completely restored 30 days after birth. In addition, muscle tissue from early undernourished rats presented a compensatory increase in basal glucose uptake at age 60 days, which was further increased after insulin stimulation. Interestingly, in spite of presenting blood glucose levels similar to C-group, UN-group at age 60 days showed an expressive reduction in plasma insulin levels. These data suggest that UN-group could not overcome the metabolic damage caused by earlier nutritional environment, although they might use some other adaptive mechanisms in order to maintain glucose homeostasis. Taken together, these data suggest an increased sensitivity to the insulin actions programmed by the early adverse nutritional environment that lasts throughout the whole life. These results are in accordance to previous studies showing that adult rats subjected to protein restriction during early life display alterations in insulin secretion as a consequence of the metabolic programming induced by perinatal nutritional status [8,18–20,25].

The impairment of insulin-stimulated glucose uptake in early life and an apparent increase of insulin sensitivity in adulthood suggest alterations of insulin signaling in receptor and/or postreceptor levels. The present work shows that in spite of IR expression being down-regulated in muscle from UN-group at age 15 days, tyrosine kinase activity of IR was completely restored at age 10 days, when the malnutrition conditions were reversed. The recovery of IR activity detected before the restoration of IR expression suggests an adaptive mechanism to maintain glucose homeostasis during early development.

Interestingly, the time course of the low profile of IRS-1 activity is compatible with the decrease in glucose uptake by muscle tissue seen in UN-group during the whole period of lactation. Activation of IRS-1 is a key step by which insulin exerts its metabolic effects that culminate in glucose transport [33]. Insulin increases glucose incorporation mainly

due to its ability to induce translocation of GLUT-4 from intracellular pool to plasma membrane increasing glucose transport into the cell [47–49]. An increase in GLUT-4 translocation in response to insulin has also been reported in skeletal muscle from calorie-restricted rats [43,44,50]. In our experimental model, the basal content of GLUT-4 was significantly decreased in muscle during the maternal undernutrition period in contrast to the significant increase in muscle from UN-group at age 60 days. Insulin-induced GLUT-4 translocation to plasma membrane was profoundly diminished during the whole period of lactation followed by a significant increase in the cell surface of tissue in adulthood. These results demonstrate that energy imbalance during early development affects GLUT-4 trafficking from the intracellular pool to the plasma membrane in muscle and suggest that postnatal GLUT-4 regulation is sensitive to prominent changes in early nutritional status. Our findings are in accordance to previous studies showing that such adaptations associated with undernutrition may account to the improvement of insulin-induced glucose uptake [43,44]. Many studies have concluded that the increase in the cell surface of GLUT-4 does not correlate quantitatively with the degree of stimulation of glucose uptake [51,52].

The insulin-stimulated PI3-kinase pathway seems to be the main route involved in glucose uptake in most insulin-responsive cells, and IRS-1 interaction with and subsequent activation of PI3-kinase mediates this process [29,34]. To test this hypothesis, we investigated the association of PI3-kinase with IRS-1 in muscle from UN-group at age 60 days. Our results showed that, when compared to control, UN-group presented a significant increase in IRS-1-associated PI3-kinase in muscle under basal (non-stimulated) conditions reaching similar levels to those of insulin-stimulated control tissues. After insulin stimulation, PI3-kinase interaction with IRS-1 in tissue of UN-group increased 63% over control levels, a clear indication of PI3-kinase activation [34]. These alterations may contribute to the increase in insulin sensitivity observed in adult rats from UN-group. In addition to metabolic regulation, insulin also controls the transcription of important genes in its target cells [53]. This action is crucial for insulin metabolic effects and also for organism adaptation to environmental changes. Moreover, altered transmission of the insulin signal through the PI3-kinase pathway could be involved in the impaired regulation of gene expression [54].

It has been proposed that a stimulus or insult operating at a critical or sensitive period of development could result in a long-standing effect on the structure of the organism and that biological mechanisms may exist to memorize the metabolic effects of early nutritional environments [1–3]. Few studies have determined the effects of undernutrition on the insulin-signaling pathways, an important question to identify the cellular mechanism that could explain the improved muscle insulin sensitivity. Our findings provide evidence that maternal protein restriction in a short period of early life may affect insulin-dependent signaling in muscle

that could be involved with metabolic alterations in glucose homeostasis in adult life. Early undernutrition impairs secretion of insulin but maintains glucose normotolerance in adulthood. The muscle tissue presents an increase of non- or insulin-induced GLUT-4 translocation and basal glucose uptake. These alterations are probably related to an up-regulation of PI3-kinase interaction with IRS-1, however, the precise mechanisms involved require further elucidation. The basis for increase in insulin sensitivity in adulthood appears to be directly related to the altered protein content in the maternal diet imposed during early lactation, which could affect expression and activity of key proteins in the insulin signaling cascade.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Iolanda M. Fierro (UERJ, Brazil) and Dr. Leopoldo De Meis (UFRJ, Brazil) for the discussions and critical review of the manuscript. This work was supported by grants from FAPERJ, CNPq, PRONEX (MCT/FINEP/CNPq) and SR-2/UERJ (Brazil).

References

- [1] A. Lucas, Programming by early nutrition: an experimental approach. Programming by early nutrition: an experimental approach, *J. Nutr.* 128 (1998) 401S–406S (Suppl.).
- [2] R.A. Waterland, C. Garza, Early postnatal nutrition determines adult pancreatic glucose-responsive insulin secretion and islet gene expression in rats, *J. Nutr.* 132 (2002) 357–364.
- [3] B.E. Levin, The obesity epidemic: metabolic imprinting on genetically susceptible neural circuits, *Obes. Res.* 8 (2000) 342–347.
- [4] R.A. Waterland, C. Garza, Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 128 (1999) 179–197.
- [5] D.J. Barker, P.D. Gluckman, K.M. Godfrey, J.E. Harding, J.A. Owens, J.S. Robinson, Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life, *Lancet* 341 (1993) 938–941.
- [6] D.J. Barker, The fetal and infant origins of disease, *Eur. J. Clin. Invest.* 25 (1995) 457–463.
- [7] A. Cryer, H.M. Jones, The development of white adipose tissue. Effect of litter size on the lipoprotein lipase activity of four adipose-tissue depots, serum immunoreactive insulin and tissue cellularity during the first year of life in male and female rats, *Biochem. J.* 186 (1980) 805–815.
- [8] M. Desai, N.J. Crowther, S.E. Ozanne, A. Lucas, C.N. Hales, Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life, *Biochem. Soc. Trans.* 23 (1995) 331–335.
- [9] M. Desai, N.J. Crowther, A. Lucas, C.N. Hales, Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers, *Br. J. Nutr.* 76 (1996) 591–603.
- [10] I.M. Faust, P.R. Johnson, J. Hirsh, Long-term effects of early nutritional experience on the development of obesity in the rat, *J. Nutr.* 100 (1980) 2027–2034.
- [11] G.R. Goldberg, M. Prentice, Maternal and fetal determinants of adult diseases, *Nutr. Rev.* 52 (1994) 191–200.
- [12] P. Hahn, Effect of litter size on plasma cholesterol and insulin and some and adipose tissue enzymes in adult rodents, *J. Nutr.* 114 (1984) 1231–1234.
- [13] C.N. Hales, D.J.P. Barker, P.M.S. Clark, L.J. Cox, C. Fall, C. Osmond, P.D. Winter, Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64, *Br. Med. J.* 303 (1991) 1019–1022.
- [14] C.N. Hales, M. Desai, S.E. Ozanne, N.J. Crowther, Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis, *Biochem. Soc. Trans.* 24 (1996) 341–350.
- [15] W.Y. Kwong, A.E. Wild, P. Roberts, A.C. Willis, T.P. Fleming, Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension, *Development* 127 (2000) 4195–4202.
- [16] S.C. Langley-Evans, S.J.M. Welham, R.C. Sherman, A. Jackson, Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension, *Clin. Sci.* 91 (1996) 607–615.
- [17] C.N. Hales, D.J.P. Barker, Type-2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty hypothesis, *Diabetologia* 35 (1992) 595–601.
- [18] S.E. Ozanne, C.L. Wang, N. Coleman, G.D. Smith, Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats, *Am. J. Physiol.* 271 (1996) E1128–E1134.
- [19] I. Swenne, C.J. Crace, R.D.G. Milner, Persistent impairment of insulin secretory response to glucose in adult rats after limited period of protein-calorie malnutrition early life, *Diabetes* 36 (1987) 454–458.
- [20] P. Vague, D. Raccach, The syndrome of insulin resistance, *Horm. Res.* 38 (1992) 28–32.
- [21] S.C. Langley, R.F. Browne, A.A. Jackson, Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero, *Comp. Biochem. Physiol.* 109 (1994) 223–229.
- [22] S.E. Ozanne, B.T. Nave, C.L. Wang, P.R. Shepherd, J. Prins, G.D. Smith, Poor fetal nutrition causes long-term changes in expression of insulin signaling components in adipocytes, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 273 (1997) E46–E51.
- [23] S.E. Ozanne, Metabolic programming in animals, *Br. Med. Bull.* 60 (2001) 143–152.
- [24] A.S. Moura, A.R. Carpinelli, F.B. Barbosa, C. Gravena, P.C.F. Mathias, Undernutrition during early lactation as an alternative model to study the onset of diabetes mellitus type II, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 92 (1996) 73–83.
- [25] A.S. Moura, J.S. Caldeira-Filho, P.C.F. Mathias, C.C.N.F. De Sá, Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 96 (1997) 179–192.
- [26] J.S. Caldeira-Filho, A.S. Moura, Undernutrition during early lactation period induces metabolic imprinting leading to glucose homeostasis alteration in aged rats, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 108 (2000) 213–226.
- [27] A.S. Moura, C.C.N. Franco de Sá, H.G. Cruz, C.L. Costa, Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of insulin and leptin, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35 (2002) 617–622.
- [28] B. Cheatham, C.R. Kahn, Insulin action and the insulin signaling network, *Endocr. Rev.* 16 (1995) 117–142.
- [29] A. Virkamaki, K. Ueki, C.R. Kahn, Protein–protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 931–943.
- [30] Y. Ebina, L. Ellis, K. Jarnagin, M. Edery, L. Graf, E. Clauser, J.H. Ou, F. Masiarz, Y.W. Kan, I.D. Goldfine, et al., The structural basis for hormone-activated transmembrane signalling, *Cell* 40 (1985) 747–758.
- [31] A. Ullrich, R.J. Bell, E.Y. Chen, R. Herrera, L.M. Petruzzelli, T.J. Dull, A. Gray, L. Coussens, Y.C. Liao, M. Tsubokawa, et al., Human IR and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes, *Nature (Lond.)* 313 (1985) 756–761.
- [32] A. Ullrich, A. Gray, A.W. Tam, T. Yang-Feng, M. Tsubokawa, C. Collins, W. Henzel, T. Le Bon, S. Kathuria, E. Chen, et al., Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with IR suggests structural determinants that define functional specificity, *EMBO J.* 5 (1986) 2503–2512.
- [33] S.B. Waters, K. Yamaguchi, J.E. Pessin, Functional expression of

- insulin receptor substrate-1 is required for insulin-stimulated mitogenic signaling, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 22231–22234.
- [34] M.F. White, The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action, *Mol. Cell. Biochem.* 182 (1998) 3–11.
- [35] T. Okada, Y. Kawano, T. Sakakibara, O. Hazeki, M. Ui, Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes: studies with a selective inhibitor wortmannin, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3568–3573.
- [36] J.E. Pessin, D.C. Thurmond, J.S. Elmendorf, K.J. Coker, S. Okada, Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking: location! location! location!, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 2593–2596.
- [37] E. Imano, H. Kadowaki, T. Kadowaki, N. Iwana, T. Watari, R. Kawamori, T. Kamada, S.I. Taylor, Two patients with insulin resistance due to decreased levels of IR mRNA, *Diabetes* 40 (1991) 548–557.
- [38] M.J. Saad, F. Folli, J.A. Kahn, C.R. Kahn, Modulation of IR, IR substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats, *J. Clin. Invest.* 92 (1993) 2065–2072.
- [39] S.I. Taylor, T. Kadowaki, H. Kadowaki, D. Accili, A. Cama, C. McKeon, Mutations in insulin-receptor gene in insulin-resistant patients, *Diabetes Care* 13 (1990) 257–279.
- [40] K. Cusi, K. Maezono, A. Osman, M. Pendergrass, M.E. Patti, T. Pratipanawatr, R. DeFronzo, C.R. Kahn, L.J. Mandarino, Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle, *J. Clin. Invest.* 105 (2000) 311–320.
- [41] A. Zisman, O.D. Peroni, E.D. Abel, M.D. Michael, F. Mauvais-Jarvis, B.B. Lowell, J.F.P. Wojtaszewski, M.F. Hirshman, A. Virkamaki, L. Goodyear, et al., Targets disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance, *Nat. Med.* 6 (2000) 924–928.
- [42] M. Katsumata, K.A. Burton, J. Li, M. Dauncey, Suboptimal energy balance selectively up-regulates muscle GLUT gene expression but reduces insulin-dependent glucose uptake during postnatal development, *FASEB J.* 13 (1999) 1405–1413.
- [43] M. Agote, L. Goya, S. Ramos, C. Alvarez, M.L. Gavete, A.M. Pascual-Leone, F. Escrivá, Glucose uptake and glucose transporter proteins in skeletal muscle from undernourished rats, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281 (2001) E1101–E1109.
- [44] M.L. Gavete, M. Agote, M.A. Martin, C. Alvarez, F. Escrivá, Effects of chronic undernutrition on glucose uptake and glucose transporter proteins in rat heart, *Endocrinology* 143 (2002) 4295–4303.
- [45] P.G. Reeves, F.H. Nielsen, G.C. Fahey, AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of AIN-76A, *J. Nutr.* 123 (1993) 1939–1951.
- [46] S. Lund, G.D. Holman, O. Schmitz, O. Pedersen, Contraction stimulates translocation of glucose transporter Glut4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 5817–5821.
- [47] G.I. Bell, T. Kayano, J.B. Buse, C.F. Burant, J. Takeda, D. Lin, H. Fukumoto, S. Seino, Molecular biology of mammalian glucose transporters, *Diabetes Care* 13 (1990) 198–208.
- [48] S.W. Cushman, L.J. Wardzala, Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 4758–4762.
- [49] A.G. Douen, T. Ramlal, S. Rastogi, P.J. Bilan, G.D. Cartee, M. Vranic, J.O. Holloszy, A. Klip, Exercise induces recruitment of the “insulin-responsive glucose transporter”. Evidence for distinct intracellular insulin and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 13247–13430.
- [50] D.J. Dean, J.T. Brozinick Jr., S.W. Cushman, G.D. Cartee, Calorie restriction increases cell surface GLUT-4 in insulin-stimulated skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 275 (1998) E957–E964.
- [51] R. Somwar, W. Niu, D.Y. Kim, G. Sweeney, V.K. Randhawa, C. Huang, T. Ramlal, A. Klip, Differential effects of phosphatidylinositol 3-kinase inhibition on intracellular signals regulating GLUT4 translocation and glucose transport, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 46079–46087.
- [52] G. Sweeney, R. Somwar, T. Ramlal, A. Volchuk, A. Ueyama, A. Klip, An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 10071–10078.
- [53] R.M. O’Brien, D.K. Granner, Regulation of gene expression by insulin, *Physiol. Rev.* 76 (1996) 1109–1161.
- [54] F. Andreoli, M. Laville, P.-H. Ducruzeau, N. Veja, P. Vallier, Y. Khalfallah, J.-P. Riou, H. Vidal, Defective regulation of phosphatidylinositol 3-kinase gene expression in skeletal muscle and adipose tissue of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients, *Diabetologia* 42 (1999) 358–364.

4.2- A sinalização da insulina em tecido adiposo de ratos adultos submetidos a desnutrição durante o início da lactação

Neste estudo objetivamos investigar a sinalização da insulina no tecido adiposo, para elucidar os mecanismos pelos quais a desnutrição durante o início da lactação pode causar mudanças na sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos. Demonstramos que adipócitos isolados de ratos desnutridos apresentam a Akt e o GLUT4 constitutivamente ativados, independentemente da integridade do citoesqueleto de actina. Assim como no tecido muscular, observamos um aumento na captação de glicose. Entretanto, os adipócitos destes animais apresentaram uma menor sensibilidade a insulina, o que futuramente pode favorecer um quadro de resistência. Os dados sugerem que a desnutrição em um período crítico do desenvolvimento pode gerar mecanismos adaptativos a nível molecular e celular relacionados com a homeostase glicêmica. Estes resultados deram origem a um manuscrito em fase de redação (Anexo 1- Artigo 2), intitulado “Constitutive AKT activation and GLUT4 translocation in adipocytes of adult rats submitted to maternal protein restriction during early lactation”, de autoria de Érica Patrícia Garcia de Souza, Marta Sampaio de Freitas, Simone Vargas da Silva, Gisele Barreto Félix, Aníbal Sanchez Moura, e Christina Barja-Fidalgo.

TABELA 1*Peso corporal e da gordura do epidídimo de ratos adultos dos**Grupos controle (C) e desnutrido (D)*

	C	D
Peso corporal, g	292. $\pm$ 22.6	260 $\pm$ 16.0*
Gordura Epididimal, g	3.5 $\pm$ 0.44	2.25 $\pm$ 0.27*

Valores representam a média $\pm$ desvio padrão, $n = 12$. * $P < 0.05$ comparado com o grupo C

4.2.1- Avaliação do Peso corporal

O peso corporal de ratos do grupo D apresentou uma redução de cerca de 20% aos 90 dias de vida, quando comparado com o controle. Estes dados corroboram com o que havíamos observado anteriormente (De Freitas *et al*, 2003). A restrição proteica materna durante os 10 primeiros dias de lactação causou também uma redução do peso da gordura epididimal da prole adulta, quando comparada com o controle, como demonstrado na tabela 1.

4.2.2- Curva dose resposta da insulina sobre a fosforilação em tirosina em adipócitos

Uma curva dose resposta com concentrações crescentes de insulina foi realizada para avaliar qual concentração do hormônio estaria estimulando a fosforilação em tirosina das proteínas envolvidas na cascata de sinalização da insulina em adipócitos (**Figura 1**). Para isto, analisamos em extrato celular de

[Digite texto]

adipócitos o conteúdo de proteínas fosforiladas em tirosina com peso equivalente a 95 kDa, que corresponde ao peso molecular da subunidade β do IR. Podemos observar (**Figura 1, painéis A e B**) que em adipócitos de animais controle e desnutridos a concentração ideal que estimulou a fosforilação máxima em resíduos de tirosina no IR foi de 100 nM. Entretanto, as células adiposas do grupo desnutrido apresentaram um menor nível de fosforilação em tirosina nas várias concentrações de insulina utilizadas, quando comparado com o grupo controle. A partir destes resultados e de dados da literatura (Ozanne *et al*, 2001; Kanzaki & Pessin, 2001), estabelecemos a concentração de 100 nM de insulina como sendo a dose a ser utilizada nos experimentos posteriores.

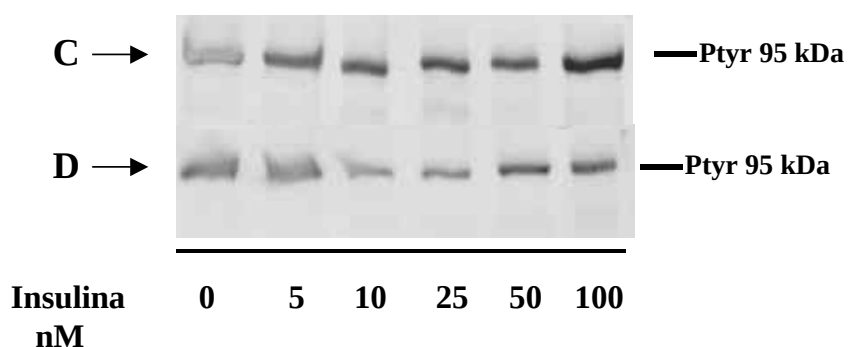
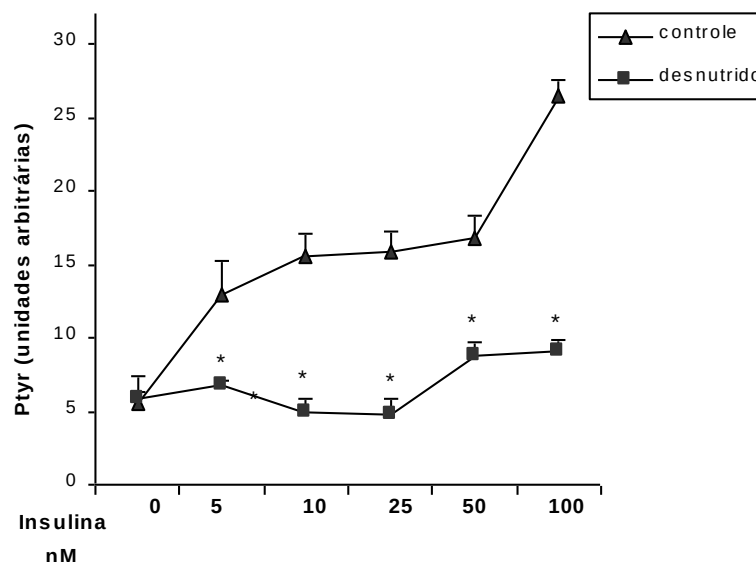
A**B**

Gráfico 1- Curva dose resposta de insulina sobre a fosforilação em tirosina em adipócitos isolados de ratos. Adipócitos em tampão KRBH isolados dos grupos controle (C) e desnutrido (D) foram incubados por 10 minutos a 37°C na ausência ou presença das concentrações indicadas de insulina. (A) Western blotting revelado com anticorpo anti-fosfotirosina (Ptyr). (B) Quantificação do conteúdo das bandas por densitometria. Resultados representam a média $\pm$ desvio padrão. *p<0,05 quando comparado com o grupo controle.

4.2.3- Expressão e fosforilação em tirosina do receptor de insulina em adipócitos

Como demonstrado na **Figura 2 (A e B)**, não observamos diferenças significativas na expressão do IR tanto em adipócitos do grupo controle como desnutrido, tratados ou não com insulina. Na **Figura 3**, observamos o efeito estimulatório da insulina sobre a atividade tirosina kinase da subunidade β do IR em adipócitos dos grupos C e D. Podemos notar um aumento significativo na fosforilação em tirosina do IR nos grupos controle e desnutrido após a estimulação com insulina, quando comparados com seus respectivos grupos no estado basal. Entretanto, o grupo desnutrido tratado com insulina apresentou uma menor fosforilação em tirosina do IR quando comparado com o grupo controle tratado (**Figura 3B**).

4.2.4- Expressão e fosforilação em tirosina do IRS-1 em adipócitos

O conteúdo e a fosforilação em tirosina do IRS-1 em adipócitos dos grupos C e D foram analisados por Imunoprecipitação seguida de Western blotting. Como demonstrado na **Figura 4 (A e B)**, não observamos diferenças significativas quanto a expressão do IRS-1 em adipócitos dos grupos C e D tratados ou não com insulina. Na **Figura 5**, podemos observar um aumento significativo na fosforilação em tirosina do IRS-1 nos grupos controle e desnutrido após a estimulação com insulina, quando comparados com seus respectivos grupos no estado basal. No entanto, assim como o IR, o grupo D tratado com insulina apresentou uma menor fosforilação em tirosina do IRS-1 quando comparado com o grupo C tratado (**Figura 5B**).

[Digite texto]

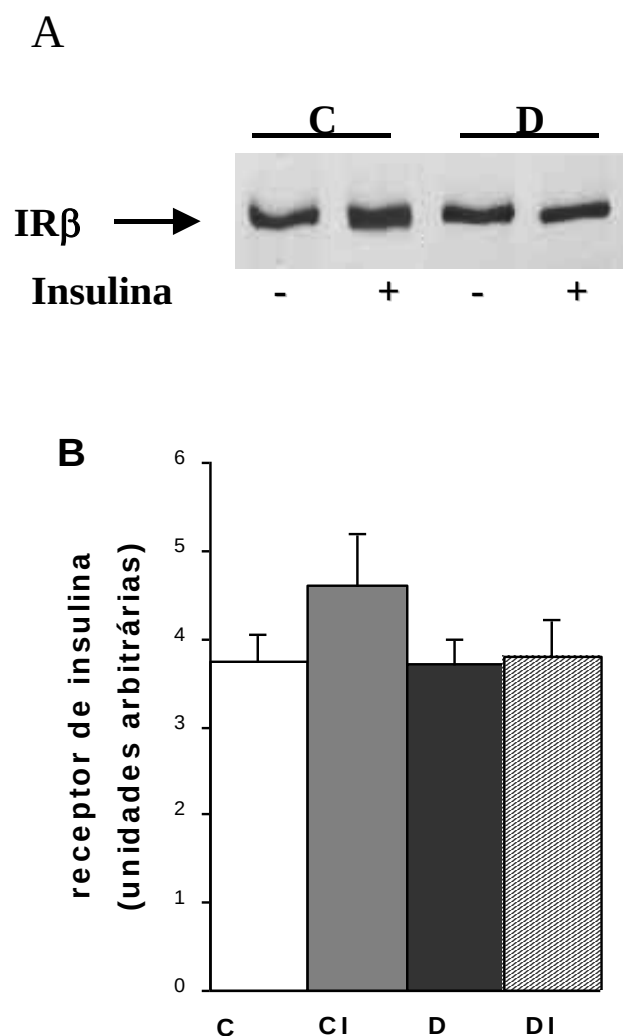


Gráfico 2- Expressão do receptor de insulina em adipócitos de ratos controle e desnutridos. Adipócitos em tampão KRBH isolados dos grupos controle (C) e desnutrido (D) foram incubados por 10 minutos a 37°C na ausência ou presença de 100 nM de insulina (CI, DI). (A) Western blotting revelado com anticorpo anti-IR. (B) Quantificação do conteúdo das bandas por densitometria. Resultados representam a média $\pm$ desvio padrão, n=6

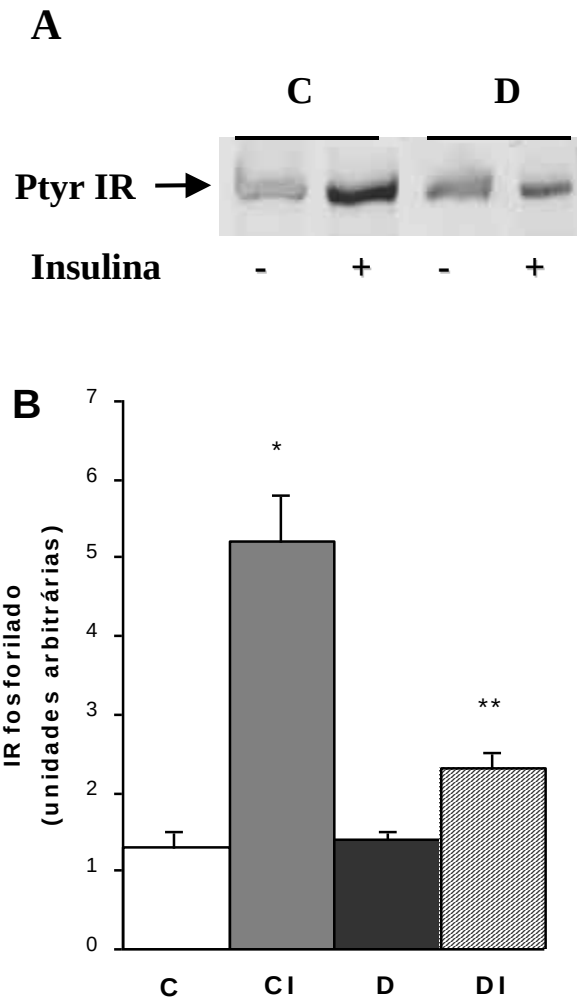


Gráfico 3- Fosforilação em tirosina do receptor de insulina em adipócitos de ratos controle e desnutridos. Adipócitos em tampão KRBH isolados dos grupos controle (C) e desnutrido (D) foram incubados por 10 minutos a 37°C na ausência ou presença de 100 nM de insulina (CI, DI). (A) Western blotting revelado com anticorpo anti-fosfotirosina (Ptyr). (B) Quantificação do conteúdo das bandas por densitometria. Resultados representam a média $\pm$ desvio padrão, n=6 . *p< 0,05 quando comparado com o grupo controle. ** p< 0,05 quando comparado com o grupo desnutrido.

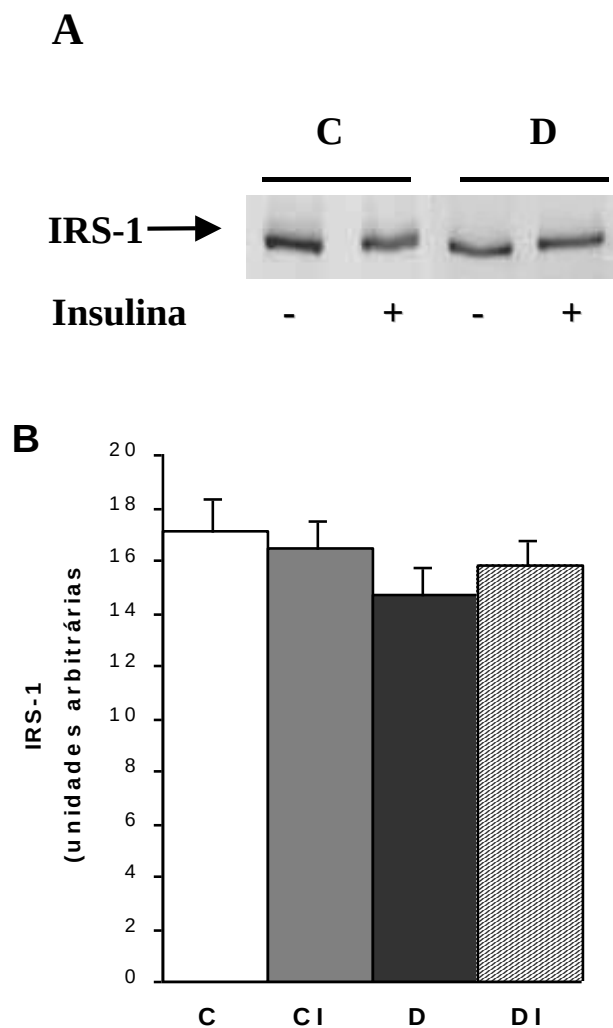


Gráfico 4- Expressão do substrato do receptor de insulina em adipócitos de ratos controle e desnutridos. Adipócitos em tampão KRBH isolados dos grupos controle (C) e desnutrido (D) foram incubados por 10 minutos a 37°C na ausência ou presença de 100 nM de insulina (CI, DI) e o lisado celular imunoprecipitado com anticorpo anti-IRS-1. (A) Western blotting revelado com anticorpo anti-IRS-1. (B) Quantificação do conteúdo das bandas por densitometria. Resultados representam a média $\pm$ desvio padrão, n=6 .

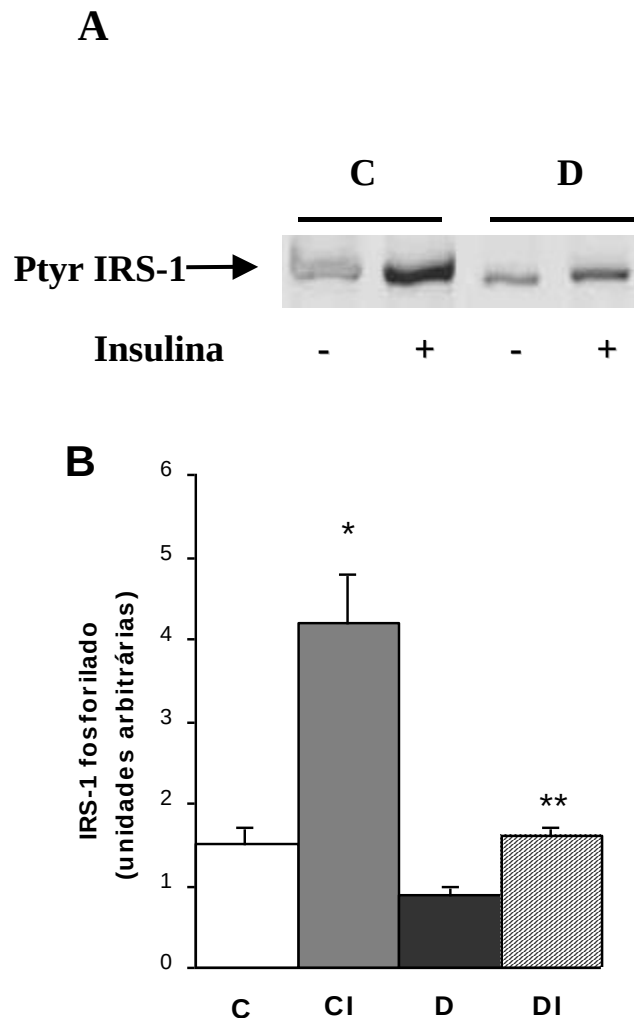


Gráfico 5- Fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina em adipócitos de ratos controle e desnutridos. Adipócitos em tampão KRBH isolados dos grupos controle (C) e desnutrido (D) foram incubados por 10 minutos a 37°C na ausência ou presença de 100 nM de insulina (CI, DI) e imunoprecipitados com anticorpo anti-IRS-1. (A) Western blotting revelado com anticorpo anti-fosfotirosina (Ptyr). (B) Quantificação do conteúdo das bandas por densitometria. Resultados representam a média $\pm$ desvio padrão, $n=6$. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle. ** $p < 0,05$ quando comparado com o grupo desnutrido.

[Digite texto]

4.2.5- Expressão e ativação do IRS-2 em adipócitos

O conteúdo e a fosforilação em tirosina do IRS-2 em adipócitos dos grupos C e D foram analisados por Imunoprecipitação seguida de Western blotting. Como demonstrado na **Figura 6 (A)**, não observamos diferenças significativas quanto a expressão do IRS-2 em adipócitos dos grupos C e D tratados ou não com insulina. Na **Figura 6B**, podemos observar um aumento significativo na fosforilação em tirosina do IRS-2 nos grupos controle após a estimulação com insulina, quando comparados com seu respectivo grupo no estado basal. No entanto, diferentemente do IRS-1, o grupo D apresentou uma maior fosforilação do IRS-2 no estado basal, que não foi aumentada pela estimulação com insulina. Esta ativação alcançou os mesmos níveis observados no grupo controle estimulado com insulina.

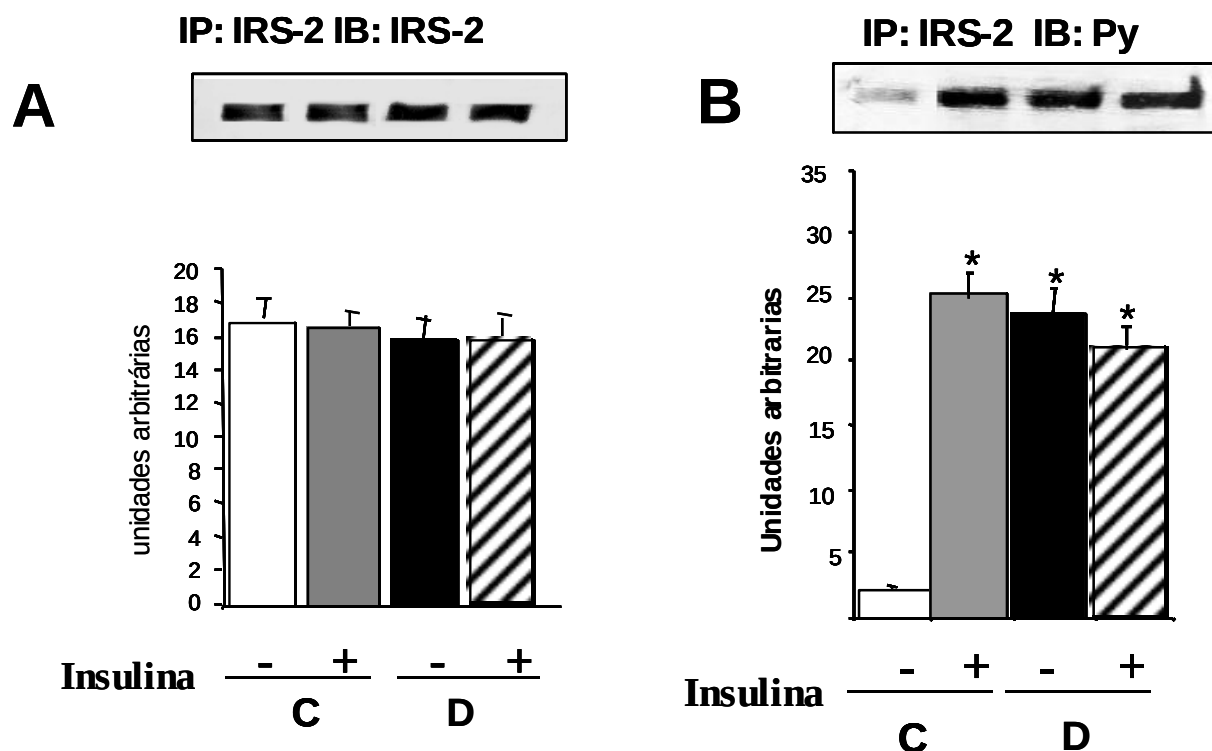


Gráfico 6 - Expressão do substrato do receptor de insulina tipo 2 (IRS-2) em adipócitos de ratos controle e desnutridos. Adipócitos em tampão KRBH isolados dos grupos controle (C) e desnutrido (D) foram incubados por 10 minutos a 37°C na ausência ou presença de 100 nM de insulina (CI, DI), seguido de imunoprecipitação (IP) para IRS-2. (A) Western blotting revelado com anticorpo anti-IRS-2. (B) Western blotting revelado com anticorpo anti-fosfotirosina (Py). Gráficos representam a quantificação do conteúdo das bandas por densitometria. Resultados representam a média $\pm$ desvio padrão, n=3 .

4.2.6- Ação da insulina e do LY294002 sobre a captação de glicose

A partir dos resultados obtidos, fez-se necessário investigar a ação da insulina sobre a captação de glicose nos adipócitos dos ratos controle e desnutridos. Como apresentado na Figura 7, a insulina aumentou significativamente a captação de glicose nos adipócitos do grupo controle (C: $1.08 \pm 0,13$; CI: $4,26 \pm 1,03$; pmol/min/ μ g de proteína). Entretanto, de acordo com os resultados anteriores, o grupo desnutrido apresentou uma maior captação em condições basais (captação independente de insulina), quando comparado com o grupo controle basal e, após a estimulação com insulina, não foi capaz de aumentar a captação de glicose (D: $5,01 \pm 1,65$; DI: $4,8 \pm 0,95$).

Tem sido demonstrado que a PI3-kinase é um importante efetor em eventos posteriores (downstream) à ativação de IRS-1/IRS-2 na cascata de sinalização da insulina, estando envolvida com a translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática (Somwar *et al.*, 2001). Para avaliar o envolvimento da PI3-kinase neste processo, utilizamos o LY294002, um inibidor específico desta enzima. O tratamento com LY294002 inibiu a captação de glicose estimulada pela insulina nos adipócitos do grupo controle incubados com 10 μ M ($P < 0,05$) e 30 μ M ($P < 0,01$), alcançando níveis similares ao estado basal. Em contraste, somente uma inibição parcial (cerca de 35 %) foi observada sobre a captação de glicose no estado basal e estimulada pela insulina nos adipócitos de ratos Desnutridos tratados com a maior concentração (30 μ M) de LY294002. Estes resultados indicam uma possivelmente uma superativação da PI3-kinase nos adipócitos do grupo D.

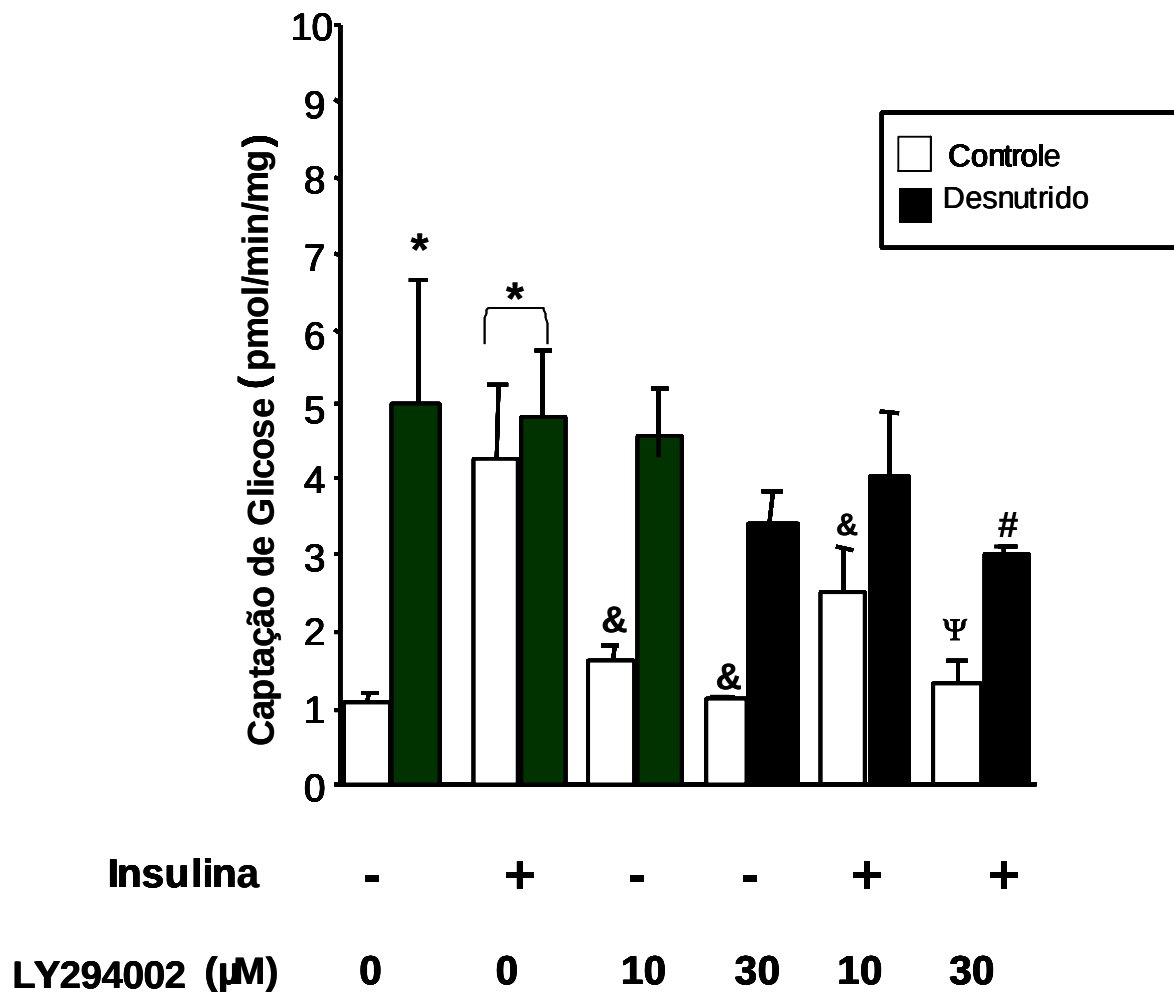


Gráfico 7– Efeito do LY294002 sobre a captação de glicose estimulada pela insulina em adipócitos isolados de ratos controle e desnutridos. Adipócitos em tampão KRBH isolados dos grupos controle (C) e desnutrido (D) foram incubados por 30 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram incubadas por 10 min com as concentrações indicadas de LY294002. Após este tempo as células foram estimuladas ou não com 100 nM de insulina por 20 min. A captação 2-deoxy-D-[1-14C]glicose foi medida como descrito no Material e Métodos. Resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. *P < 0.05 comparado com o grupo Controle sem insulina. # P < 0.05 comparado com grupo D. & P < 0.05 comparado com C tratado com insulina. Ψ P < 0.01 comparado com grupo C+ insulina.

4.2.7- Efeito do tratamento com a insulina sobre ativação da Akt

Como está mostrado na Fig. 8, os níveis de expressão da Akt não foram diferentes entre os grupos D e C. Contudo, a fosforilação em Serina⁴⁷³ da Akt no estado basal (sem estimulação com insulina) apresentava-se aumentada nos adipócitos dos ratos D, alcançando os mesmos níveis de ativação das células controle estimuladas com insulina. O tratamento com insulina falhou em induzir um maior aumento de fosforilação da Akt nos adipócitos do grupo desnutrido.

4.2.8- Imunolocalização do Glut-4 em adipócitos

Utilizamos a técnica de imunocitoquímica para visualizar a distribuição do GLUT-4 na membrana dos adipócitos de ratos controle e desnutridos, antes e após o estímulo com insulina. No grupo controle, sob condições basais (não estimulação) observamos que a marcação para o GLUT-4 encontrava-se no meio intracelular, em pequenos pontos distribuídos pelo citoplasma e próximos a membrana (**Figura 9A**). O tratamento com insulina resultou na redistribuição e aumento da imunofluorescência para o GLUT-4 na superfície celular (**Figura 9B**). Corroborando os resultados anteriores, observa-se em adipócitos de ratos do grupo D, mesmo na ausência de insulina uma maior marcação e intensidade de fluorescência para o transportador de glicose na membrana celular, quando comparado com o controle basal (**Figura 9C**). A estimulação com insulina aumentou a translocação de GLUT4, acarretando uma alteração do perfil de fluorescência na célula que apresenta alguns pontos citoplasmáticos de marcação

para o GLUT-4 na superfície celular de adipócitos de animais desnutridos (**Figura 9 D**).

4.2.9- Marcação para o citoesqueleto de actina em adipócitos

Dados da literatura têm demonstrado que o citoesqueleto de actina está envolvido na translocação do GLUT-4 para a membrana após o estímulo de adipócitos com a insulina (Omata *et al.*, 2000; Kanzaki e Pessin, 2001). As possíveis alterações no citoesqueleto de actina em adipócitos dos grupos C e D antes e após o estímulo com insulina foram investigadas por microscopia ótica utilizando um marcador fluorescente de polímeros de actina (faloidina-TRITC). Como observado na **Figura 9A**, no grupo C, em condições basais, os filamentos de actina localizam-se muito próximos à membrana celular (actina cortical) e apresentam pouca intensidade de fluorescência. Após o estímulo com insulina, há um aumento na fluorescência da actina cortical nos adipócitos controle (**Figura 9B**). Entretanto, nas células do grupo D, já em condições basais, observamos uma marcação para a actina cortical semelhante a do grupo C estimulado com insulina (**Figura 9C**). Após a estimulação, podemos visualizar um aumento na intensidade de fluorescência juntamente como um espessamento da actina cortical (**Figura 9D**), comparando com o grupo controle tratado.

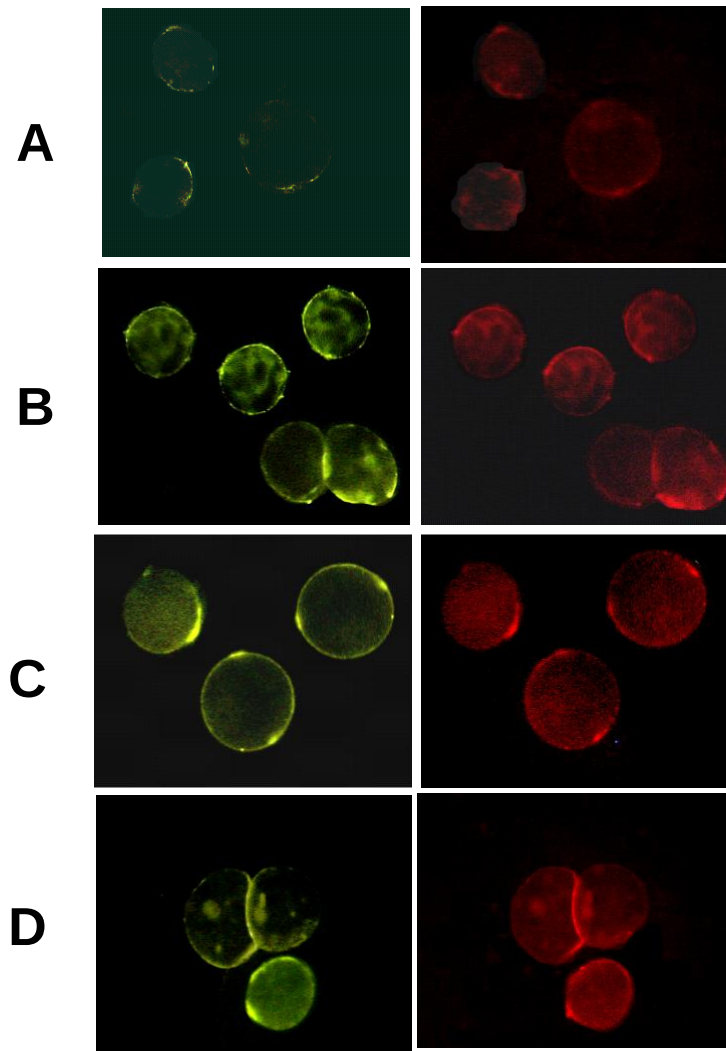


Gráfico 9—Imunolocalização do GLUT-4 e do citoesqueleto de actina em adipócitos isolados de ratos controle e desnutridos. Adipócitos em tampão Krebs-Ringer-Hepes foram incubados a 37°C por 30 min, e então estimulados por mais 10 min sem (A,C) ou com (B, D) insulina (100 nM). As células foram fixadas e dupla marcação realizada com anticorpos anti-GLUT-4 e faloidina-TRITC, como descrito no Material e Métodos. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência de células do grupo Controle (A,B,) e desnutrido (C,D). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes..

4.2.10- Efeito do tratamento com Latrunculina B sobre a localização subcelular do GLUT-4 e do citoesqueleto de actina

A translocação do GLUT4 mediada pela insulina é um processo dinâmico que requer um citoesqueleto de actina funcional. Para determinar o papel do citoesqueleto de actina na translocação do GLUT-4 mediada pela insulina nos adipócitos do grupo Desnutrido, adipócitos foram tratados com Latrunculina B. Este agente despolimerizante do citoesqueleto de actina é descrito como efetivo na dissociação dos filamentos de actina nos adipócitos de ratos. A figura 10 mostra os efeitos deste agente sobre a dinâmica do citoesqueleto de actina e a translocação do GLUT-4, mostrando também a colocalização dessas proteínas na microscopia de fluorescência. O tratamento de células controle com insulina, como já demonstrado, aumentou a quantidade de actina cortical polimerizada e imunofluorescência para o GLUT-4 (**Figura 10 B**), com alguns pontos de colocalização destas proteínas na membrana e no citoplasma (merge). Quando as células foram tratadas com 60 μ M de Latrunculina B (**Figura 10 C, D**) ou 100 μ M (**Figura 10 E, F**) por 1 hora, observa-se uma diminuição concentração-dependente dos filamentos de actina e uma redução significativa da imunofluorescência para GLUT4, com reduzida co-localização (merge). Como descrito em estudos anteriores (Omata et al, 2000; Kanzaki & Pessin, 2001), esse tratamento também resulta em uma inibição completa do rearranjo do citoesqueleto e da translocação do GLUT-4 estimulado pela insulina (**Figura 10 D, F**). Os adipócitos de ratos D, conforme descrito anteriormente, apresentaram maior imunofluorescência para actina e GLUT4 sob condições basais, com alguns pontos de co-localização presentes na membrana (**Figura 10 G**). A estimulação destas células com insulina [Digite texto]

parece ter alterado a distribuição do GLUT-4, com uma maior mobilização do pool citoplasmático, e também a polimerização de actina nos adipócitos de ratos D (**Figura 10 H**), com pontos de colocalização bem definidos. O tratamento com 60 μ M de Latrunculina B não foi capaz de dissociar os filamentos de actina e também não afetou o padrão de distribuição do GLUT4 na superfície celular observado anteriormente. Analisando as imagens “merged” podemos observar que havia poucos pontos de colocalização e uma persistente imunofluorescência do GLUT4 nestas células (**Fig 10 I, J**). A despolimerização do citoesqueleto de actina e a inibição da translocação do GLUT4 só foi efetiva com o tratamento com 100 μ M Latrunculina B nos adipócitos de ratos D (**Figura 10 K,L**). Entretanto, esta inibição não foi completa, quando comparado com o controle (**Figura 10 E,F**), demonstrando ainda alguma marcação para o GLUT4 na membrana plasmática destas células (**Fig 10 K,L- merge**).

4.2.11- Efeito do tratamento com a Latrunculina B sobre a ativação da Akt estimulada pela insulina

Para investigar se o tratamento com Latrunculina B poderia afetar a ativação da Akt nos adipócitos de ratos D (**Figura. 11 A,B**) nós analisamos a razão do conteúdo de Akt fosforilada/ conteúdo de Akt total. O tratamento com Latrunculin B causou uma diminuição da ativação da Akt de modo concentração-dependente no grupo Controle. Entretanto, a fosforilação em resíduos de serina da Akt foi inibida somente com o tratamento com 100 μ M Latrunculina B nos adipócitos de ratos D (**Fig 11 B**). No entanto, esta inibição foi parcial quando

[Digite texto]

comparada com as células do grupo controle, demonstrando uma maior resistência destas células a este agente despolimerizante.

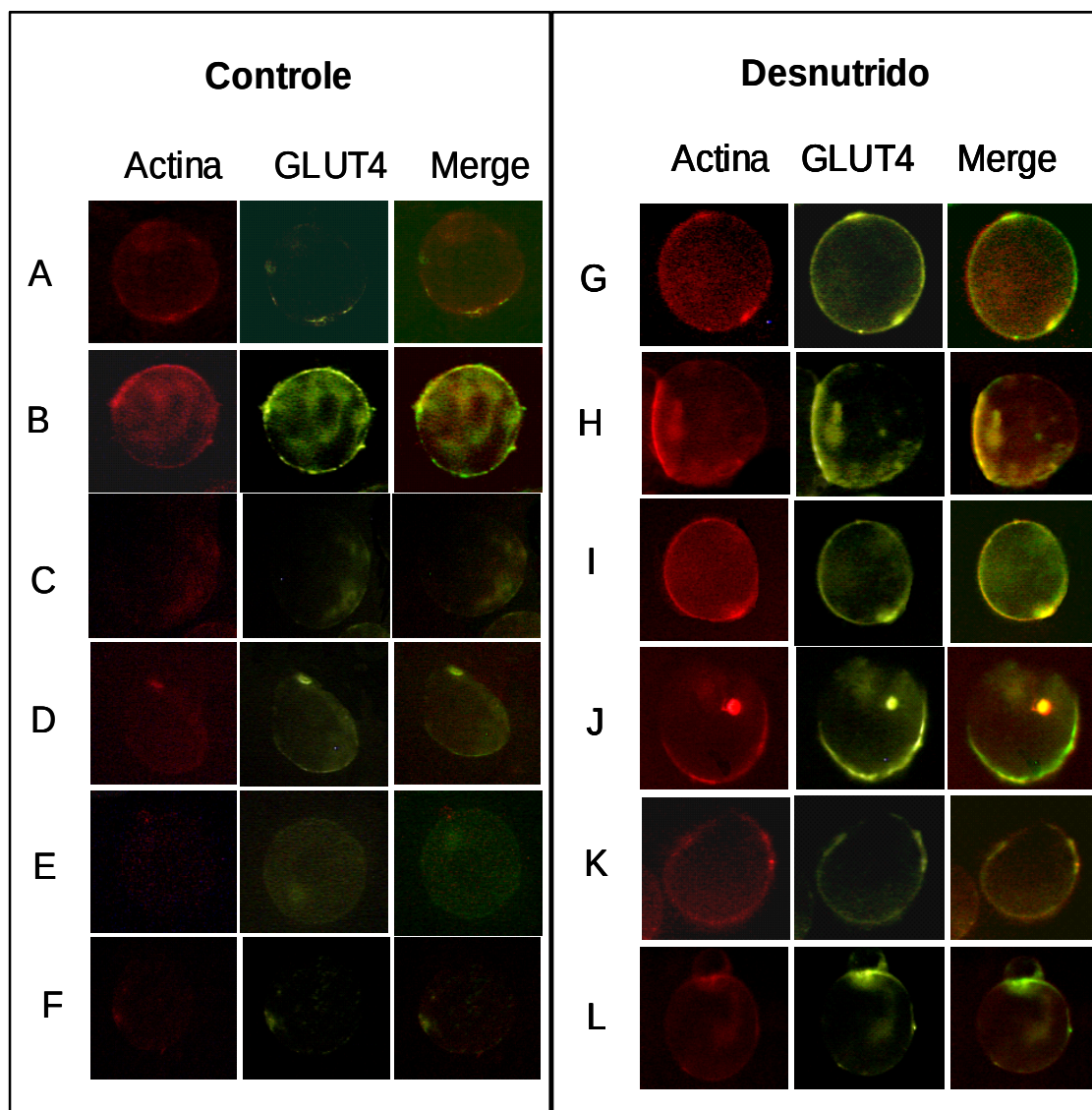
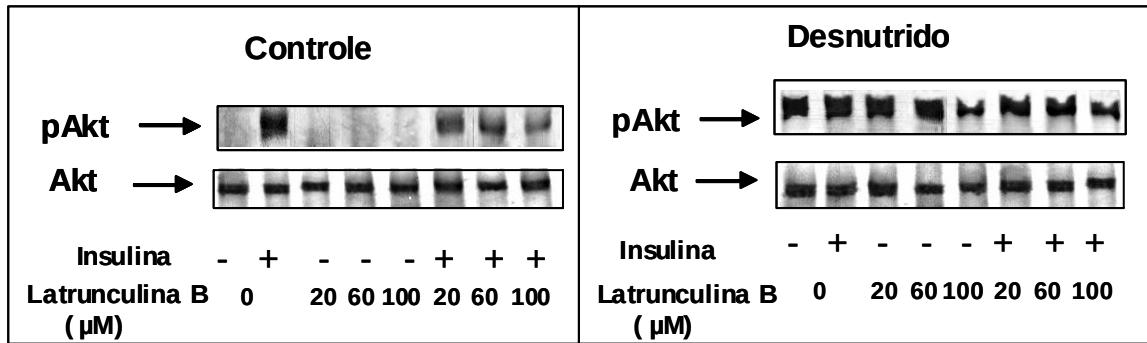


Gráfico 10 – Efeito do tratamento com Latrunculina B sobre a localização subcelular do GLUT-4 e citoesqueleto de actina nos adipócitos isolados de ratos controle e desnutridos. Após a incubação na ausência (A,B,G,H) ou presença de 60 μ M (C,D,I,J) ou 100 μ M (E,F,K,L) de latrunculina B a 37°C por 1 h, adipócitos em tampão Krebs-Ringer-Hepes foram incubados por mais 20 min com (B,D,F,H,J,L) ou sem (A,C,E,I,G,K) insulina 100 nM. As células foram fixadas e dupla marcação realizada com anticorpos anti-GLUT-4 e faloidina-TRITC, como descrito no Material e Métodos. Estas são imagens aumentadas obtidas por microscopia de fluorescência de células representativas do grupo Controle (A-F) e Desnutrido (G-L) em aumento de 400X. As colunas localizadas a direita de cada painel representam imagens colocalizadas. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.



B

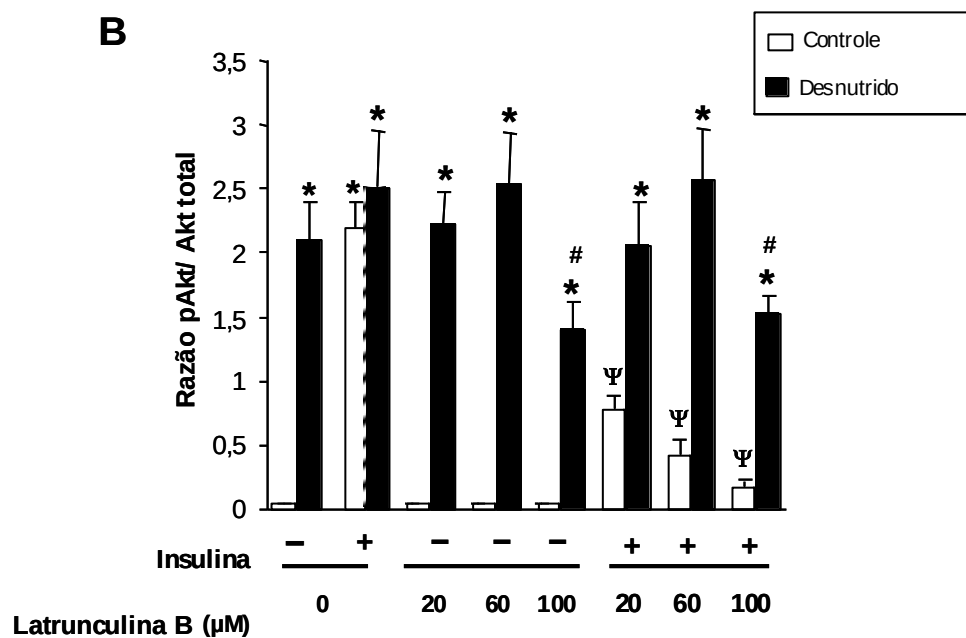


Gráfico 11 – Efeito do tratamento com Latrunculina B sobre a ativação da Akt em adipócitos isolados de ratos controle e desnutridos. Adipócitos isolados de ratos Controle (C) e desnutridos (D) foram tratados com ou sem latrunculina B nas concentrações indicadas por 1 h, e então estimuladas ou não com insulina 100 nM a 37° C por 10 min. Extrato total de células foi submetido ao Western blotting (A) e revelado com anticorpos anti-Akt e anti-pAkt. (B) Quantificação das bandas por densitometria e razão da Akt fosforilada e Akt total níveis. Resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. * $P < 0.01$ comparado com grupo C. # $P < 0.01$ comparado com grupo D+ insulina. Ψ $P < 0.01$ comparado com o grupo C+ insulina.

Discussão

5-Discussão

A influência de fatores ambientais no início da vida tem sido descrita como de importância substancial para o risco de desenvolvimento de doenças futuras (Lucas, 1998; Waterland & Garza, 1999). Este “imprinting” fisiológico tem sido estudado numa variedade de sistemas e reflete a ação de mecanismos específicos durante um determinado período do desenvolvimento que podem exercer efeitos organizacionais persistentes. Estes mecanismos modulam as adaptações ocorridas para otimizar a sobrevivência quando em condições de desnutrição, estresse ou outras privações, e podem levar a alterações permanentes no metabolismo do indivíduo. Entretanto, estas respostas podem ser deletérias se uma mudança inesperada vir a ocorrer em um ambiente futuro (Seckl,1998).

Vários estudos têm demonstrado que a privação nutricional durante o início do desenvolvimento é crítica para o metabolismo da glicose (Desai *et al.*,1996; Ozane *et al.*,1999; Waterland & Garza,2002;). O estado nutricional durante o início da vida tem sido descrito também como um fator determinante para programar alterações na sensibilidade à insulina na vida adulta (Vague *et al.*,1992; Desai *et al.*, 1995). Os mecanismos moleculares pelos quais a desnutrição pode causar alterações na sensibilidade a insulina não são bem conhecidos, e o desenvolvimento de modelos experimentais de restrição nutricional em animais

são de grande importância para a elucidação deste processo. Com o intuito de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na programação da insulina induzida pela desnutrição materna no início da lactação, nós investigamos a sinalização mediada pela insulina no músculo esquelético e no tecido adiposo de ratos durante o desenvolvimento.

Nós mostramos que a desnutrição materna durante o início da lactação causou uma redução significativa do peso corporal nos filhotes durante todo o período de desenvolvimento até os 60 dias de vida, quando os ratos são considerados adultos. Contudo, observamos que o grupo desnutrido, quando comparado ao controle, apresentou uma taxa de crescimento mais elevada ao final do desenvolvimento com uma subsequente aceleração no ganho de peso, sugerindo uma maior capacidade de compensar a perda de massa corpórea inicial. Estes resultados corroboram com outros estudos sobre desnutrição materna descritos na literatura (Langley-Evans *et al.*, 1996; Moura *et al.*, 1997; Kwong *et al.*, 2000).

Analizando a homeostase glicêmica dos animais submetidos a restrição protéica no início da lactação, observou-se nas células musculares uma maior captação de glicose basal e estimulado pela insulina, aos 60 dias de idade. Apesar dos níveis glicêmicos no grupo D não serem diferentes dos controles, os ratos desnutridos com 60 dias de idade apresentaram uma redução expressiva nos níveis de insulina plasmática quando comparados com o grupo controle. Estes resultados sugerem que o grupo desnutrido parece ser capaz de superar o dano

[Digite texto]

metabólico causado pelo meio nutricional no início da vida, utilizando mecanismos adaptativos para a manutenção da homeostase glicêmica. Em conjunto, nossos dados indicam um aumento permanente na sensibilidade à insulina, programado pelo meio nutricional restrito durante o período pós-natal. Estes resultados vão ao encontro a outros estudos que demonstraram que ratos adultos submetidos à restrição protéica no período pré ou pós-natal apresentam alterações na secreção de insulina como consequência da programação metabólica induzida pelo estado nutricional pré- ou pós-natal (Swenne *et al*, 1987; Desai *et al*, 1995; Moura *et al*, 1997).

As alterações na captação de glicose e um aumento aparente na sensibilidade à insulina na vida adulta sugerem que possa estar ocorrendo alterações na sinalização da insulina ao nível do receptor (IR) ou pós-receptor. A ativação do IR e do IRS-1 é uma etapa crítica pela qual a insulina exerce seus efeitos metabólicos que culminam no transporte da glicose (Waters *et al*, 1993). Investigando a expressão e ativação destas proteínas, não observamos alterações significativas do IR e IRS-1 no músculo esquelético de ratos D adultos.

A insulina promove a captação de glicose devido a sua habilidade de induzir a translocação do GLUT-4 do “pool” intracelular para a membrana plasmática, promovendo a entrada de glicose dentro da célula (Saltiel & Kahn., 2001, Watson e Pessin, 2001).. Em nosso modelo experimental, na idade adulta (60 dias),.

observamos um aumento significativo no conteúdo de GLUT-4 no estado basal e após estimulação com a insulina na membrana plasmática do músculo esquelético de ratos Desnutridos. Corroborando com este resultado, dados da literatura demonstram um aumento na translocação do GLUT-4 em resposta à insulina no músculo esquelético de ratos adultos que foram submetidos a restrição calórica (Dean *et al.*,1998, Agote *et al*, 2001) e protéica (Ozanne *et al*, 1996). Mais precisamente, Ozanne e colaboradores (1996) observaram em modelo de restrição protéica (dieta contendo 8% de proteína) durante a gestação e lactação efeitos permanentes que levavam a um aumento na sensibilidade à insulina, sem causar mudanças morfológicas nas fibras musculares de ratos adultos. Estes resultados demonstram que a qualidade da dieta imposta durante um período crítico do desenvolvimento altera o tráfico do GLUT-4 no músculo esquelético, sugerindo que sua regulação pós-natal é sensível a mudanças no estado nutricional.

A via da PI3-kinase parece ser a principal rota envolvida na captação de glicose na maioria das células responsivas a insulina, e sua interação com o IRS-1 promove este processo (White,1998). Para averiguar esta hipótese, nós investigamos a associação da PI3-kinase com o IRS-1 no músculo de ratos desnutridos com 60 dias. Nossos resultados demonstraram um aumento significativo da PI3-kinase associada ao IRS-1 no tecido muscular do grupo desnutrido, sob condições basais, alcançando níveis similares aos do grupo controle estimulado com insulina. Após a estimulação com este hormônio, observamos um aumento na interação da PI3-kinase com o IRS-1 de cerca de [Digite texto]

63% acima dos níveis do controle no grupo D, uma indicação clara da ativação desta proteína. Assim, estas alterações observadas nos ratos adultos do grupo D contribuem para o aumento na sensibilidade a insulina observado nestes animais. Além da regulação metabólica, a insulina também promove a transcrição de genes importantes nas suas células-alvo (O'Brien & Granner, 1996). Esta ação é crucial para os efeitos metabólicos da insulina e também para a adaptação do organismo a mudanças no meio ambiente. Além disso, a transmissão alterada do sinal mediado pela insulina através da via da PI3-kinase pode estar envolvido no prejuízo da regulação da transcrição gênica (Andreelli et al., 1999).

Em resumo, nesta parte do nosso trabalho, observamos que ratos adultos submetidos a desnutrição durante o início da lactação apresentam uma menor secreção de insulina plasmática acompanhados de uma maior ativação da PI3-kinase associada ao IRS-1 e uma maior translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática no músculo esquelético, indicando um aumento da sensibilidade à insulina neste tecido. Este aumento de sensibilidade se reflete numa maior capacidade de captação de glicose em condições basais e estimuladas pela insulina. Estas alterações podem ter sido causadas pelas variações expressivas observadas no conteúdo e ativação do IR, IRS-1, e GLUT-4 acionados durante o início do desenvolvimento, gerando mecanismos adaptativos para manter a homeostase glicêmica e, consequentemente, otimizar a ação hormonal na vida adulta.

A partir destes resultados, resolvemos investigar então a sinalização da insulina no tecido adiposo destes animais. Além de ser um alvo importante das ações deste hormônio, este tecido periférico regula a sensibilidade a insulina e parece ter um importante papel nos estados de resistência a este hormônio, além de secretar adipocinas como o TNF- α , leptina, adiponectina e resistina (Czech, 2002; Stears & Byrne, 2001; Kahn & Flier, 2000).

Inicialmente, fomos investigar qual seria a concentração de insulina que estaria estimulando a fosforilação em tirosina de proteínas envolvidas na cascata da sinalização da insulina nos adipócitos isolados de ratos controle e desnutridos. A partir destes resultados e de dados da literatura (Omata *et al*, 2000), estabelecemos a concentração de 100 nM de insulina como sendo a dose ideal a ser utilizada nos experimentos.

Não foram observadas diferenças significativas na expressão do IR e IRS-1 em adipócitos dos grupos controle e desnutrido. Entretanto, observamos uma diminuição do efeito estimulatório da insulina sobre a atividade tirosina kinase da subunidade β do IR e do IRS-1 em adipócitos do grupo Desnutrido, indicando uma diminuição da ativação de duas proteínas cruciais para a ação desse hormônio. Esta inibição da ativação poderia estar ocorrendo devido a ação de fosfatases, que causam uma rápida desfosforilação do IR e IRS-1 após a dissociação com a insulina. Como exemplo, podemos citar a PTP1B, visto que evidências demonstram que esta fosfatase é o principal regulador fisiológico da sinalização da insulina, sendo capaz de se ligar e desfosforilar o IR *in vitro* (Drake e Posner,

1998;Elchebly et al 1995). Estudos avaliando a expressão e associação da PTP1B com o IR seriam necessários para elucidar este processo.

Entretanto, aparentemente como mecanismo compensatório, observamos uma maior fosforilação basal do IRS-2 em adipócitos de animais Desnutridos, que não foi aumentada pela estimulação com insulina. O papel específico dos diferentes IRS na sinalização da insulina ainda não está totalmente elucidado. Contudo, estudos indicam um mecanismo compensatório entre estas proteínas na sinalização da insulina. Camundongos deficientes para IRS-1 são capazes de compensar esta ausência com a ativação de outros IRS, como nos hepatócitos com o IRS-2, e no músculo e tecido adiposo com o IRS-3 (Palti *et al*, 1995; Yamauchi *et al*, 1996; Kaburagi *et al*, 1997). A ativação do IRS-2 no tecido adiposo pode predominar sobre o IRS-1 em estados de resistência a insulina (Kido *et al*, 2000; Hirata *et al*, 2003).

Dando prosseguimento aos estudos, avaliamos o papel da PI3-kinase na captação de glicose, através da utilização de um inibidor específico. De acordo com o resultado anterior, o grupo desnutrido apresentou uma maior captação em condições basais (captação independente de insulina), e a posterior estimulação com insulina não foi capaz de aumentar a captação de glicose. Somente a maior concentração de LY294002 (30 μ M), foi capaz de causar uma inibição parcial sobre a captação de glicose no estado basal e estimulada pela insulina nos adipócitos de ratos desnutridos, indicando que possivelmente a via da PI3-kinase estaria super-ativada nos adipócitos do grupo D, levando ao aumento da ativação

[Digite texto]

da via IRS-2/PI3-kinase no estado basal , porém com resistência à ação da insulina. Nossos dados corroboram com estudo feito por Ozanne (2001) e colaboradores, que demonstraram em modelo de restrição protéica um aumento da captação de glicose no estado basal com resistência a insulina em adipócitos de ratos velhos. A Akt/PKB é uma enzima downstream a ativação da PI3-kinase, conhecida por mediar várias ações da insulina, incluindo a estimulação da captação de glicose em adipócitos (Zdychová e Komers, 2005). Interessantemente, demonstramos pela primeira vez na literatura que a Akt pode apresentar-se constitutivamente ativada em decorrência da desnutrição materna durante o início da lactação em tecido adiposo de ratos adultos.

Sabendo que este aumento na ativação da via IRS-2/PI3-kinase/Akt poderia estar favorecendo a translocação do GLUT-4 em adipócitos de animais D, nós avaliamos a distribuição deste transportador nestas células. Como demonstrado em estudos anteriores, o tratamento de adipócitos normais com insulina resultou na redistribuição e aumento de expressão do GLUT-4 na superfície celular (Omata *et al.*, 2000; Kanzaki & Pessin., 2001). Contudo, corroborando com o aumento na captação de glicose , os adipócitos dos animais do grupo D, apresentam, mesmo na ausência de estimulação com insulina, um aumento da expressão membranar de GLUT-4. Este aumento pode ser devido a uma maior distribuição do pool das vesículas de GLUT-4. Sabe-se que o pool de GLUT4 responsivo a insulina é bioquimicamente distinto daquele redistribuído na membrana plasmática em resposta a outros estímulos (Millar *et al.*, 2000; Kandrér *et al.* 1995). Entretanto, as características físicas precisas da compartimentalização [Digite texto]

responsiva a insulina e os mecanismos de retenção intracelular ainda não estão totalmente esclarecidos. Estes dados indicam que a ativação destas proteínas sinalizantes e uma maior captação de glicose sob condições basais, cria um mecanismo de compensação. Porém, em contraste com o músculo esquelético, a ausência de estimulação com a insulina pode favorecer o estabelecimento de um quadro de resistência a insulina no tecido adiposo de ratos desnutridos.

Recentemente, alguns estudos demonstraram que o citoesqueleto de actina poderia estar envolvido nos processos de exocitose celular e na translocação do GLUT-4 para a membrana após o estímulo com a insulina em células em cultura e adipócitos isolados (Omata *et al.*, 2000; Emoto *et al.*, 2001). Estes trabalhos denominaram a localização dos filamentos de F-actina nos adipócitos como actina cortical, por estarem dispostos muito próximos a membrana da célula. É sabido também que a insulina é capaz de causar o reestruturação da actina cortical, e agentes despolimerizantes de actina causam uma menor captação de glicose e translocação do GLUT-4 nestas células, demonstrando a necessidade da integridade do citoesqueleto de actina nestes processos (Tsakiridis *et al.*, 1994; Kansaki & Pessin., 2001). Interessantemente, em condições basais, nas células do grupo D observamos uma marcação para a actina cortical semelhante a do grupo C estimulado com insulina. Após a estimulação, podemos visualizar um aumento da polimerização de actina visualizado como um espessamento da actina cortical no grupo controle tratado, mas não no desnutrido. Estes resultados nos sugeriram um possível papel modulador do citoesqueleto de actina na translocação do GLUT-4 mediada nos adipócitos de ratos desnutridos.

[Digite texto]

Com o intuito de avaliar a importância do citoesqueleto neste processo, utilizamos a Latrunculina B, um agente despolimerizante dos filamentos de actina, que atua seqüestrando os monômeros de actina, estabelecendo um estado desorganizado. Interessantemente, os adipócitos de ratos desnutridos apresentaram uma maior resistência aos efeitos deste agente. Em contraste com o grupo controle, onde observamos uma inibição total, somente a maior concentração do inibidor foi capaz de diminuir a imunofluorescência para actina e o Glut-4 nos adipócitos de ratos desnutridos. Nas imagens superpostas ainda visualizamos uma sutil marcação para o GLUT4 na membrana destas células. Estudos recentes sugerem que o citoesqueleto de actina pode funcionar como um condutor ou organizador do complexo de proteínas da sinalização da insulina para a translocação do GLUT4 (Khayat, *et al*, 2000, Patel *et al*, 2003). Eyster e colaboradores (2005) demonstraram claramente que este papel organizacional da rede de actina é necessário em uma etapa anterior a ativação da Akt na sinalização da insulina em adipócitos 3T3-L1, pois a expressão gênica da Akt1 constitutivamente ativa nestas células sinaliza para a translocação do GLUT4 mesmo na ausência de um citoesqueleto íntegro. O efeito inibitório da Latrunculina B sobre a ativação da Akt em adipócitos de ratos D seguiu o mesmo padrão observado anteriormente para o GLUT-4, apresentando uma inibição parcial somente em altas concentrações.. A expressão gênica da Akt1/PKB α constitutivamente ativa na membrana (myr-Akt) sinaliza em células transfectadas para a translocação do GLUT4 na ausência de insulina e na presença de

wortmanina (Hausdorff *et al*, 1999; Khon *et al*, 1996). Comparando nossos resultados com estes estudos podemos sugerir que a maior resistência dos adipócitos de ratos desnutridos à ação da Latrunculina B pode ser devida a ativação constitutiva da proteína Akt/PKB.

O aumento da ativação da via IRS-2/Pi3-kinase/Akt pode influenciar nas alterações observadas sobre a captação de glicose e a translocação de GLUT4 no tecido adiposo de ratos desnutridos no estado basal. Este mecanismo pode ter sido acionado como forma de adaptação e otimização da utilização da glicose em estados de privação nutricional. Entretanto, a ausência de aumento na fosforilação de proteínas e na captação de glicose estimulada pela insulina no tecido adiposo epididimal de ratos desnutridos pode ser um indicativo de resistência á insulina neste tecido. Contudo, este processo pode estar sendo compensado pelo aumento da captação de glicose induzida pela insulina observada no músculo esquelético destes animais (Artigo 1). Porém, evidências sugerem que os adipócitos desempenham um papel crucial no estabelecimento da resistência a insulina e na síndrome metabólica (Kitamura e Acilli, 2004, Hotamisligil, 2000). Estudos posteriores, com animais mais velhos e/ ou alterações na dieta serão necessários para esclarecer esta suposição.

Estas alterações na ativação de proteínas chave da cascata da sinalização da insulina observadas nos tecidos muscular e adiposo são evidências claras de como estes animais conseguem manter-se normoglicêmicos apesar da

hipoinsulinemia. Um esquema da regulação da ativação da insulina nos tecido adiposo e muscular neste modelo experimental está ilustrado na figura 1.

Estudos propõem que estímulos ou insultos atuando em um período sensível ou crítico do desenvolvimento podem resultar em um efeito duradouro no organismo, e mecanismos biológicos podem existir para memorizar os efeitos metabólicos causados pelo meio nutricional (Lucas.,1998; Waterland & Garza., 2002). Poucos estudos determinaram os efeitos da desnutrição sobre as vias de sinalização da insulina, uma importante questão que identifica o mecanismo celular que pode explicar o aumento na sensibilidade a insulina nos tecidos muscular e adiposo. Nossos resultados demonstram evidências que a restrição protéica materna em um curto período no início da vida pode afetar a sinalização mediada pela insulina nos tecidos muscular e adiposo de ratos, provavelmente relacionado com as alterações observadas na homeostase glicêmica na vida adulta. As bases para o aumento na sensibilidade a insulina na vida adulta parecem estar diretamente relacionadas com a alteração no conteúdo protéico da dieta materna imposta durante o início da lactação, a qual pode ter afetado a expressão e atividade de proteínas-chave na cascata de sinalização da insulina nos tecidos periféricos.

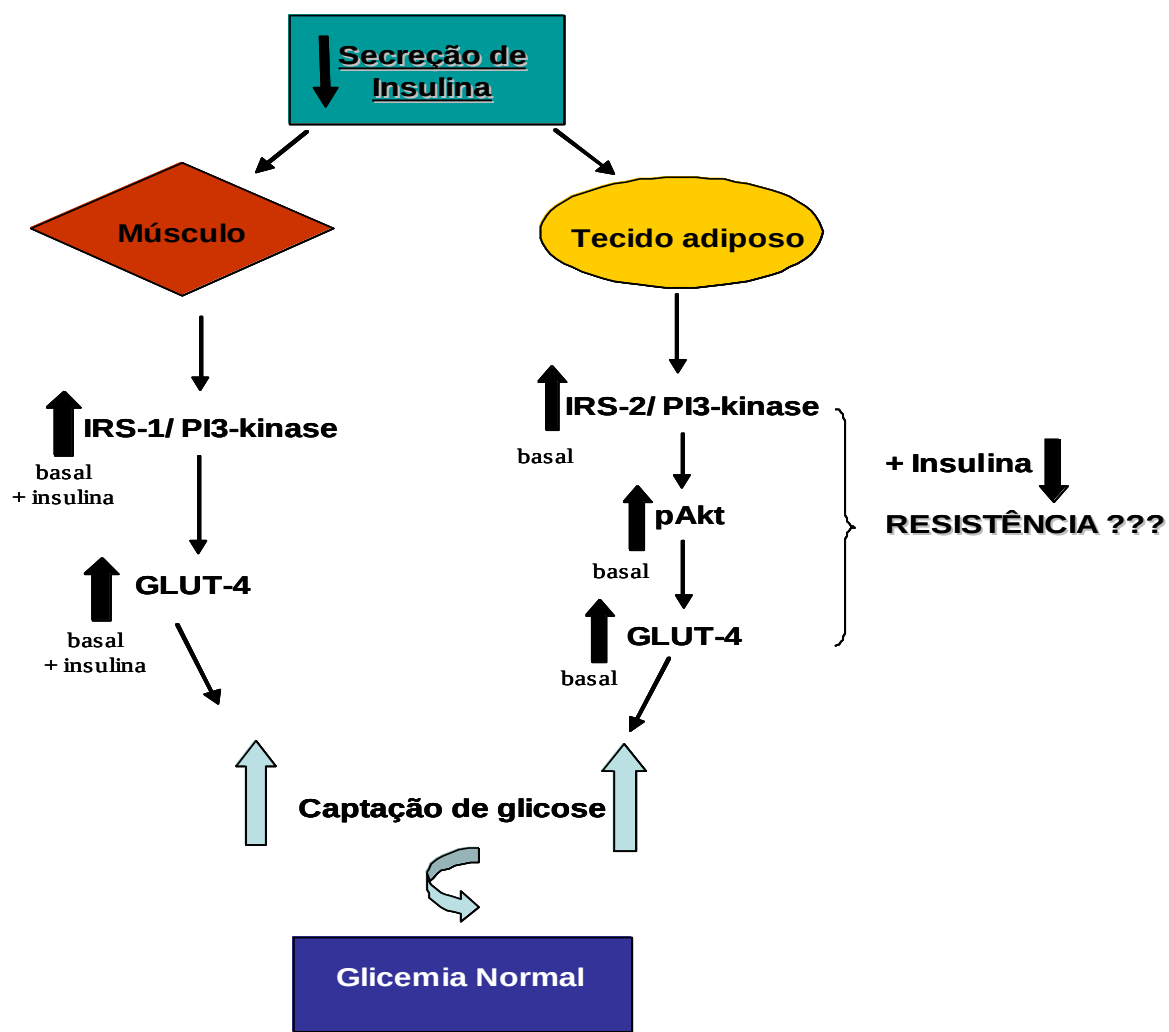


Figura 8- Sinalização da insulina no músculo e tecido adiposo de ratos adultos submetidos a desnutrição no início da lactação.

5.1- Sumário dos resultados

- Animais desnutridos durante o início da lactação apresentam uma redução significativa do peso corporal e da gordura epididimal quando comparados com o grupo controle.
- A desnutrição materna pós-natal parece programar para alterações permanentes na secreção de insulina.
- Durante o período de restrição protéica, há uma menor ativação do receptor de insulina (IR) após a estimulação com o hormônio no músculo esquelético de ratos desnutridos.
- Durante o período da lactação, observamos uma diminuição na captação de glicose, na fosforilação do IRS-1 e na translocação do GLUT-4 no tecido muscular do grupo desnutrido.
- Na idade adulta, uma menor ativação do IR e do IRS-1 foi observada no tecido adiposo de ratos desnutridos. Esta inibição foi compensada por uma maior ativação do IRS-2.
- Em animais desnutridos adultos, um aumento da PI3-kinase associada ao IRS-1 e na translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática é observado nas células musculares, culminando no aumento da captação de glicose neste tecido.
- Nos adipócitos isolados de animais desnutridos com 90 dias de idade, observamos uma maior ativação da PI3-kinase e da Akt ,um aumento na translocação do GLUT-4 e da captação de glicose no estado basal.

- Entretanto, a estimulação com a insulina não foi capaz de aumentar a ativação da via IRS2/PI3-kinase/Akt , a imunofluorescência para o GLUT4 e a captação de glicose, indicando um quadro de resistência a este hormônio.
- Os adipócitos de ratos desnutridos adultos apresentam alterações na distribuição do citoesqueleto de actina, com maior resistência aos efeitos despolimerizantes da Latrunculina B sobre a translocação do GLUT4, provavelmente devido a ativação constitutiva da Akt, que mantém-se a ti

6- Conclusão

À partir destes dados podemos concluir que respostas adaptativas a condições nutricionais impostas durante uma fase crítica do desenvolvimento podem ocorrer determinando alterações significativas nos mecanismos celulares e moleculares regulados pela insulina. Tais alterações podem estar envolvidas com as modificações na homeostase glicêmica observada na vida adulta.

Referências

5.0- Referências:

Agote M, Goya L, Ramos S, Alvarez C, Gavete ML, Pascual-Leone AM, and Escrivá F. Glucose uptake and glucose transporter proteins in skeletal muscle from undernourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1101-E1109, 2001

Barja-Fidalgo C, Garcia-Souza EP, Silva SV, Rodrigues AL, Anjos-Valotta EA, Sannomyia P, DeFreitas MS, and Moura AS. Impairment of inflammatory response in adult rats submitted to maternal undernutrition during early lactation: role of insulin and glucocorticoid. *Inflamm Res.* 52(11):470-476, 2003

Barker DJ. The fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest.* 25: 457-63,1995

Caldeira-Filho JS and Moura AS. Undernutrition during early lactation period induces metabolic imprinting leading to glucose homeostasis alteration in aged rats. *Res. Commun. Pathol. Pharmacol.* 108:213-226,2000.

De Freitas MS, Garcia-Souza EP, Silva SV, Kaezer AR, Vieira RS, Moura AS, and Barja-Fidalgo C. Up-regulation of phosphatidylinositol 3-kinase and glucose transporter 4 in muscle of rats subjected to normal protein undernutrition. *Bioch. Bioph. Acta*, 1639: 8-16, 2003

Desai M, Crowther NJ, Ozanne SE, Lucas A, and Hales CN. Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem Soc Trans* 23: 331-335, 1995

Eyster CA, Duggins QS, and Olson AL. Expression of constitutively active Akt/Protein kinase B signals GLUT4 translocation in the absence of an intact actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 280 (18):17978-85, 2005

[Digite texto]

Gual P, Marchand-Brustel YL, and Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87:99-109, 2005

Hales CN and Ozanne SE. The dangerous road of catch-up growth *J. Physiol* 547: 5-10, 2003.

Hausdorff, S. F., Fingar, D. C., Morioka, K., Garza, L. A., Whiteman, E. L., Hirata AE, Alvarez-Rojas F, Carnevalheira JB, Carnevalho CR, Dolnikoff MS, Abdalla Saad MJ. Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. *Life Sci* 73:1369-1381 (2003).

Hoet JJ and Hanson MA. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol* 514.3: 617-627, 1999

Kaburagi Y, Satoh S, Tamemoto H, Yamamoto-Honda R, Tobe K, Veki K, Yamauchi T, Kono-Sugita E, Sekihara H *et al.* 1997 Role of insulin receptor substrate 1 and pp660 in the regulation of insulin-induced glucose transport and GLUT4 translocation in primary adipocytes. *J Biol Chem* 272: 25839-25844 (1997)

Kansaki M and Pessin JE. Insulin stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling. *J Biol Chem.* 276 (45):42436-44, 2001

Kido, Y; Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF, Accili D. Tissue specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest* 105: 199-205, (2000)

Kitamura Y and Accilli D. New insights into the integrated physiology of insulin action. *Rev End Metab Diso* 5: 143-149, 2004

Kohn, A. D., Summers, S. A., Birnbaum, M. J., and Roth, R. A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31372–31378

Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach *J. Nutr.*128: 401S-406S (suppl), 1998

Lucas A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Arch Dis Child . Nutr.* 71: 288-290, 1994

Malide D, Dwyer NK, Blanchette-Mackie EJ, and Cushman SW. Immunocytochemical Evidence that GLUT4 Resides in a Specialized Translocation Post-endosomal VAMP2-positive Compartment in Rat Adipose Cells in the Absence of Insulin. *J Histochem Cytochem.* 45(8):1083-96, 1997.

Millar, C. A., Meerloo, T., Martin, S., Hickson, G. R. X., Shimwell, N. J.,Kandror, K. V., Coderre, L., Pushkin, A. V., and Pilch, P. F. (1995) *Biochem. J.* **307**, 383–390

Moura AS, Carpinelli AR,Barbosa FB, Gravena C,and Mathias P.C.F. Undernutrition during early lactation as an alternative model to study the onset of diabetes mellitus type II. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 92: 73-83, 1996.

Moura AS, Caldeira-Filho JS, Mathias PCF, and De Sá CCNF. Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 96:179-192,1997.

Moura AS, Franco de Sá CCN, Cruz HG, and Costa CL. Malnutrition during lacatation as a metabolic imprinting factorinducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of insulin and leptin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35:617-622, 2002

Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, and Ui M. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes: studies with a selective inhibitor wortmannin. *J. Biol. Chem.* 269: 3568-3573., 1994

Omata W, Shibata H, Li L, Takata K, and Kojima I. Actin filaments play a critical role in insulin-induced exocytotic recruitment but not in endocytosis of GLUT4 in isolated rat adipocytes. *Biochem J* 346: 321-328, 2000

Ozanne SE, Dorling MW, Wang CL et al. Impaired PI3-kinase activation in adipocytes from early growth restricted male rats. *Am J Physiol Endo Metab* 280: E534-E539, 2001

Ozanne SE, Nave BT, Wang CI et al, Poor fetal nutrition causes long term changes in expression of insulin signaling components in adipocytes. *Am J Physiol* 273: E46-E51, 1997

Ozanne SE, Smith GD, Tikerpa J et al, Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein malnourished rats dams. *Am J Physiol* 270: E55-E64, 1996

Ozanne SE, Wang CI, Coleman N et al, Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein malnourished rats. *Am J Physiol* 271: E1128-E1134, 1996

Ozanne SE, Dorling MW, Wang CL, Nave BT. Impaired PI3-kinase activation in adipocytes from early growth-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E534-E539, 2001.

Palti M, Sun XJ, Bruening JC, Araki E, Lippis MA, White MF, e Kanh CR. 4/ps insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1 deficient mice. *J Biol Chem* 16: 3074-3079 (1995)

Roith DL and Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 24 (3): 588-597, 2001

Saltiel AR and Kahn R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806, 2001

Saltiel AR and Pessin JE. Insulin signaling in time and space. *Trends Cell Biol* 12 (2): 65-71, 2002

Summers, S. A., and Birnbaum, M. J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 24677–24684

Tsakiridis T, Vranic M, and Klip A. Phosphatidylinositol 3-kinase and the actin network are not required for the stimulation of glucose transport caused by mitochondrial uncoupling: comparison with insulin action. *Biochem J.*;309:1-5, 1995.

Wakelam, M. J. O., James, D. E., and Gould, G. W. (2000) *Traffic* **1**, 141–151

Waterland RA and Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease *Am. J. Clin. Nutr.* 128: 179-197, 1999.

Watson RT and Pessin JE. Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. *Exp Cell Res* 271: 75-83, 2001

White MF. Insulin signaling in health and disease. *Science* 302: 1710-1711, 2003

Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Hueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, Takahashi Y, Yoshizawa, F, Aizawa F *et al.* Insulin signaling and insuling actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate-1 deficient mice. *Mol Cell Biol* 16: 3074-3084, (1996)

Zick Y. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol* 11: 437-441, 2001;