



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO

**EFEITO DA GLICOTOXIDADE NA FOSFORILAÇÃO DO  
RECEPTOR DE INSULINA DE ERITRÓCITOS HUMANOS  
E DE CÉLULAS NIH 3T3. EFEITO DO METFORMIN NA  
FOSFORILAÇÃO DE RECEPTORES ISOLADOS DE  
CÉLULAS NIH 3T3.**

**REGINA NOMIZO**

Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do Grau  
de Mestre em Ciências na Área de  
Tecnologia Nuclear.

Orientadora:  
Dra. Rosa Ferreira dos Santos

**São Paulo  
1999**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**EFEITO DA GLICOTOXICIDADE NA FOSFORILAÇÃO DO RECEPTOR  
DE INSULINA DE ERITRÓCITOS HUMANOS E DE CÉLULAS NIH 3T3.  
EFEITO DO METFORMIN NA FOSFORILAÇÃO DE RECEPTORES  
ISOLADOS DE CÉLULAS NIH 3T3.**

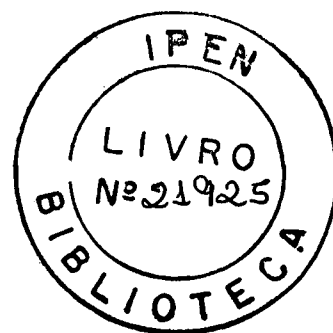
**REGINA NOMIZO**

**Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do grau de Mestre  
em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear**

**Orientador:**

**Dra. Rosa Ferreira dos Santos**

**SÃO PAULO**  
1999



*Aos meus pais, Minako e Tsumotu*

*Ao Auro, Américo e Rui, meus irmãos*

*À Kátia e Mika*

*À minha tia Junko e*

*À Andréa minha irmã de coração*

*Ao Décio, pelo estímulo constante,  
amor e amizade*

## AGRADECIMENTOS

- ◆ À Dra. Rosa Ferreira Santos, pelo estímulo ao meu desenvolvimento científico, pela confiança a mim depositada para fazer ciência e pela competência, amizade, apoio e orientação que tornou possível a realização deste trabalho.
- ◆ Ao meu irmão Auro, pelo exemplo de uma carreira científica exercida com muito entusiasmo, seriedade e dedicação plena.
- ◆ À Dra. Mileni Josefina Maria Ursich, Dra. Dalva Marreiro Rocha e Dra. Elizabeth Rossi da Silva, pelo apoio e incentivo constantes e pela amizade demonstrada nestes anos.
- ◆ À Rosa Tsunechiro Fukui, pelo apoio científico e pessoal a este trabalho, além do incentivo nos momentos de desânimo e pela amizade sincera demonstrada nestes anos.
- ◆ Aos colegas do Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio – LIM 18 pelo apoio, amizade, companheirismo e agradável convivência durante estes anos.
- ◆ Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, por ter permitido a utilização de suas dependências para a realização de cultura celular.
- ◆ À Dra. Vilma Regina Martins da Fundação Antônio Prudente, por ter cedido as células NIH 3T3 sem as quais este trabalho não poderia ser realizado.
- ◆ À Dra. Célia Regina W. Carneiro por ter me ensinado com paciência, passo a passo como trabalhar com cultura celular.

- ◆ Aos membros do Laboratório de Reação Inflamatória do Instituto Ludwig, pelo apoio, amizade e companheirismo durante estes anos.
- ◆ Ao laboratório de Nutrição Humana e Doenças Ósseas e Metabólicas – LIM 25, em especial o Pedrinho, pelas facilidades na utilização de equipamentos.
- ◆ Aos membros do Laboratório de Lípidos – LIM10, pela amizade e pelas facilidades na utilização de equipamentos.
- ◆ Aos funcionários do Departamento de Pós-graduação do IPEN, em especial a Aninha, sempre atenciosos e dispostos a ajudar em todas as dificuldades.
- ◆ Aos colegas de pós-graduação, em especial a Elaine por ter dividido os momentos de dificuldades, conquistas e felicidades durante a realização deste trabalho.
- ◆ À todos os meus amigos por terem me incentivado e apoiado em todos os momentos.
- ◆ À FAPESP e CNPq pela credibilidade e apoio financeiro na realização deste trabalho.
- ◆ E a todas as demais pessoas que colaboraram direta e indiretamente na realização deste trabalho.

**EFEITO DA GLICOTOXICIDADE NA FOSFORILAÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA DE ERITRÓCITOS HUMANOS E DE CÉLULAS NIH 3T3. EFEITO DO METFORMIN NA FOSFORILAÇÃO DE RECEPTORES ISOLADOS DE CÉLULAS NIH 3T3.**

*Regina Nomizo*

**RESUMO**

A atividade tirosina quinase do receptor de insulina (ATQRI) é uma importante passagem na via de transmissão intra-celular do sinal insulínico. Esta função está diminuída no Diabetes mellitus tipo 2 e em algumas patologias que se caracterizam por apresentar resistência à insulina. Embora vários estudos em pacientes e animais tenham demonstrado que a ATQRI é anormal no diabetes tipo 2, pouco se sabe sobre os efeitos de diferentes concentrações de glicose e, de substâncias anti-hiperglicemiantes nesta função do receptor. No presente estudo, tivemos como objetivos : 1 – Avaliar a ATQRI de eritrócitos de pacientes diabéticos tipo 2 em tratamento com sulfoniluréia, divididos em dois grupos, um em bom e outro em mau controle glicêmico; 2 – Estudar, *“in vitro”*, os efeitos de soluções concentradas de glicose, 16mM e 25mM, em dois períodos, 24 e 48 horas, sobre a ATQRI de células NIH 3T3 ; e 3 – Avaliar o efeito do cloridrato de Metformina (10µg/ml), sobre a ATQRI de células NIH 3T3. Os resultados do presente estudo demonstraram que em pacientes diabéticos tipo 2 tratados com sulfoniluréia, a ATQRI de eritrócitos foi maior no grupo com bom controle glicêmico, sugerindo que a diminuição da glicemia, estimulou o aumento da ATQRI. Os estudos *“in vitro”*, com células NIH 3T3, demonstraram que soluções concentradas de glicose reduziram a ATQRI e, este efeito foi dependente da concentração de glicose e, do tempo de exposição das células à glicose. Desta forma, soluções mais concentradas inibem a ATQRI em maior magnitude e, em menor período de tempo. Os resultados do presente estudo demonstraram também, que o Metformin estimulou a ATQRI de células NIH 3T3, após 6 e 12 horas de incubação mas, este efeito não foi verificado após 1 hora de incubação. Estes dados sugerem que o metformin tem um efeito direto sobre a ATQRI aumentando sua ação, e sensibilizando a ação da insulina na célula, e este efeito requer um período de tempo para ser desencadeado.

**EFFECT OF GLUCOTOXICITY IN THE INSULIN RECEPTOR  
PHOSPHORYLATION FROM HUMAN ERYTHROCYTHES AND FROM  
NIH 3T3 CELLS. METFORMIN EFFECT IN THE INSULIN RECEPTOR  
PHOSPHORYLATION FROM NIH 3T3 CELLS.**

*Regina Nomizo*

**ABSTRACT**

The insulin receptor tyrosine kinase (IRTK) is an important pathway of insulin action, and its activity is impaired in diabetes type 2 and in several pathologies with insulin resistance. Although studies in patients and in animals have demonstrated the abnormal function of IRTK in diabetes type 2, not very much is known about the effects of variations in plasma glucose concentrations and of the antihyperglycemic drugs in this function. The present study had the following goals: 1 - To evaluate the IRTK activity of receptors isolated from erythrocytes of patients with diabetes type 2 treated with sulfonylurea in good and poor glycemic control; 2 - To study, "*in vitro*", the effect of two different glucose concentrations 16mM/L and 25mM/L during 24 and 48 hours of incubation in IRTK of receptors isolated from NIH 3T3 cells and; 3 - To evaluate the effect of metformin during 1, 6 and 12 hours of incubation in the IRTK activity of NIH 3T3 cells insulin receptors. The present data demonstrated that in sulfonylurea treated patients with diabetes type 2, the IRTK activity of erythrocytes receptors was higher in patients with good glycemic control than in the ones with poor glycemic control. Thus, in patients with type 2 diabetes, the amelioration in IRTK activity was associated to lower plasma glucose concentrations. The studies "*in vitro*" with NIH 3T3 cells demonstrated that, the glucose concentrations can reduce the IRTK activity, and the magnitude of this reduction is dependent of the glucose concentrations and the time of the cell exposure to the glucose medium. Thus, the higher is the glucose concentration the shortest is the time of cell exposure for the IRTK inhibition. The results of the present study demonstrated also that metformin can directly increase the IRTK activity of NIH 3T3 cells receptors, and this effect was demonstrated after 6 and 12, but not after 1 hour of incubation. These data suggest that the metformin effect in stimulating the IRTK activity is time dependent.



## SUMÁRIO

| Tópicos  | Página |
|--|--------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 01     |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....   | 07     |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 08     |
| 3.1 Desenho do estudo .....  | 08     |
| 3.1.1 Estudo " <i>in vivo</i> " .....  | 08     |
| 3.1.2 Estudo " <i>in vitro</i> " .....   | 08     |
| 3.2 Materiais e Equipamentos .....   | 09     |
| 3.2.1 Materiais .....  | 09     |
| 3.2.2 Equipamentos .....   | 10     |
| 3.3 Métodos .....  | 11     |
| 3.3.1 Receptor de Insulina Isolado de Hemácias .....                                     | 11     |
| 3.3.1.1 Separação das Hemácias .....   | 12     |
| 3.3.1.2 Separação das Membranas .....  | 12     |
| 3.3.2 Cultura de Fibroblastos NIH 3T3 .....  | 13     |
| 3.3.3 Solubilização e Purificação Parcial dos Receptores de Insulina .....               | 13     |
| 3.3.3.1 Membranas de Eritrócitos .....   | 13     |
| 3.3.3.2 Fibroblastos NIH 3T3 .....   | 14     |
| 3.3.4 Dosagem de proteína .....  | 14     |
| 3.3.5 Ensaio da Ligação da Insulina ao Receptor .....                                    | 15     |
| 3.3.6 Autofosforilação do Receptor de Insulina .....                                     | 16     |
| 3.3.7 Atividade Tirosina Quinase Utilizando Substrato Exógeno<br>PolyGlu (4:1) Tyr ..... | 17     |
| 3.3.8 Dosagem de Glicose, Insulina e Glicohemoglobina .....                              | 18     |
| 3.3.9 Índice de Massa Corpórea (IMC) .....   | 19     |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.3.10   | Análise Estatística .....   | 19        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>20</b> |
| 4.1      | Estudo "in vivo" .....  | 20        |
| 4.1.1    | Características clínicas e metabólicas dos pacientes diabéticos tipo 2 tratados com sulfoniluréia .....   | 20        |
| 4.1.2    | Ligação da insulina aos receptores isolados de eritrócitos de pacientes diabético tipo 2, tratados com sulfoniluréia.....   | 23        |
| 4.1.3    | Atividade tirosina quinase em substrato artificial poly Glu (4:1) Tyr em receptores isolados de eritrócitos de pacientes diabéticos tipo 2, tratados com sulfoniluréia .....                | 24        |
| 4.2      | Estudo "in vitro" .....   | 26        |
| 4.2.1    | Ligação da insulina aos receptores isolados de células NIH 3T3.....   | 26        |
| 4.2.2    | Atividade tirosina quinase em substrato poly Glu (4:1) Tyr de receptores de insulina, isolados de células NIH 3T3 incubadas em meio com 16 mM e 25mM de glicose .....                       | 27        |
| 4.2.3    | Autofosforilação do receptor de insulina, solubilizado e parcialmente purificado de fibroblastos NIH 3T3, sobre o efeito de diferentes concentrações de glicose durante 24 e 48 horas ..... | 33        |
| 4.2.4    | Efeito do cloridrato de metformina sobre a atividade tirosina quinase do receptor de insulina .....   | 36        |
| 4.2.5    | Autofosforilação de receptores de insulina incubados com metformina .....   | 39        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>   | <b>48</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>49</b> |

## ABREVIATURAS

**ATP** – adenosina trifosfato

**ATQ** – atividade tirosina quinase

**ATQRI** – atividade tirosina quinase do receptor de insulina

**Bq** - bequerel

**cpm** – contagem por minuto

**DMEM** – meio de cultura Dulbecco modificado por Eagle

**DMID** – diabéticos insulino dependentes

**DMNID** –diabéticos não insulino dependentes

**EDTA** – ácido etileno diaminotetracético

**HgA1c** – glicohemoglobina

**ICM** – índice de massa corpórea

**IRS-1** – substrato 1 do receptor de insulina

**Ka** - constante de ativação da enzima

**Kd** – constante de dissociação do hormônio ao receptor

**Kg** – 10<sup>3</sup> gramas

**NSB** – ligação inespecífica

**PEG** – polietileno-glicol

**pH** – potencial de hidrogênio

**PMSF** – phenil metyl sulfonyl fluoride

**rpm** – rotações por minuto

**SDS** – sódio dodecil sulfato

**SDS-PAGE** – gel de poliacrilamida em sódio dodecil sulfato

**TEMED** –  $N,N,N',N'$  – tetramethylethylenediamine

**TNF alfa** – fator de necrose tumoral

$\mu$ l – microlitro,  $10^{-6}$  litros

**V<sub>basal</sub>** – atividade tirosina quinase endógena

**V<sub>max</sub>** – atividade tirosina quinase estimulada pela insulina

**V<sub>total</sub>** – atividade tirosina quinase total

## 1 INTRODUÇÃO

As células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas sintetizam insulina a partir de um precursor de 110 aminoácidos, de cadeia única, denominado pré-proinsulina. Após a migração, através da membrana do retículo endoplasmático rugoso, o peptídeo sinalizador N-terminal de 24 aminoácidos da pré-proinsulina é rapidamente clivado para formar a proinsulina. Neste momento, a molécula se dobra e formam-se as pontes dissulfeto. Na conversão da proinsulina humana em insulina no complexo de Golgi, quatro aminoácidos básicos e o conector restante ou peptídeo C são retirados por proteólise dando origem às duas cadeias peptídicas (A e B). A insulina é uma proteína constituída de duas cadeias, a cadeia A com 21 aminoácidos e a cadeia B com 30 aminoácidos, interligados por duas pontes dissulfeto, que unem duas cisteínas.(1,2)

A insulina desencadeia uma série de respostas biológicas celulares, como transporte de glicose, síntese de glicogênio, síntese protéica, síntese de lipídeos, crescimento e expressão gênicas. Sua ação na célula é iniciada pela ligação do hormônio ao receptor, que é uma glicoproteína (3,4,5) localizada na membrana celular e composta por duas subunidades alfa com peso molecular de aproximadamente 135 kDa e duas subunidades beta com peso molecular de aproximadamente 95 kDa (6,7,8). O receptor de insulina é derivado de um único precursor, o pró-receptor (9). A subunidade alfa é responsável pela ligação do hormônio ao receptor e a subunidade beta apresenta ação semelhante às enzimas da família das quinases, sendo responsável pela autofosforilação e pela fosforilação dos substratos do receptor (10).

Funcionalmente, o receptor de insulina se comporta como uma enzima alostérica clássica, sendo a subunidade alfa reguladora e a subunidade beta catalítica. Quando a insulina se liga à subunidade alfa, ocorre uma mudança conformacional na molécula e a atividade quinase da subunidade beta é ativada (10), ocorrendo a transferência de grupos fosfatos de ATP para alguns resíduos de tirosina da subunidade beta (11,12). Estes resíduos de tirosina fosforilados, desencadeiam a fosforilação em cascata de outras proteínas específicas, que vão dar continuidade à transmissão do sinal insulínico, como o substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), o IRS-2 e o Sch (fosfoproteína que contém homologia src com 2 domínios SH) (13). Vários estudos demonstraram que há pelo menos seis tirosinas que são fosforiladas na subunidade beta do receptor de insulina (14,15), e que estão localizadas em três domínios de sua porção intracelular (16,17). No primeiro domínio, no aminoácido 960 está localizada uma tirosina que é fracamente fosforilada e desempenha importante papel na ligação do substrato ao receptor. O segundo domínio apresenta um grupo de três tirosinas nos aminoácidos 1146, 1150 e 1151 e a este domínio tem sido atribuído o papel regulador, sendo responsável pela autofosforilação do receptor. No terceiro domínio, localizado na porção carboxiterminal, estão presentes as tirosinas nos aminoácidos 1316 e 1322 que estão relacionadas à ativação de fatores de crescimento.

A ativação da função da tirosina quinase do receptor de insulina é fundamental para a transmissão do sinal intracelular (11,18,19). A perda ou redução da atividade de tirosina quinase do receptor de insulina está diretamente relacionada com a ausência ou redução da resposta biológica da insulina.

O receptor de insulina possui também resíduos de serina e treonina que, ao serem fosforilados, exercem efeito contra-regulador à atividade de tirosina quinase do receptor (20,21,22).

Vários estudos têm descrito a diminuição da atividade tirosina quinase do receptor de insulina em diferentes tipos celulares como, adipócitos (23,64,69), músculo esquelético (24,25,26,63), hepatócitos (27,33) e eritrócitos (28) de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e em patologias caracterizadas pela presença de resistência à insulina, como a Síndrome A de extrema resistência à insulina, o Leprechaunismo e a Síndrome de Rabson Mendenhall. A resistência insulínica tem importante papel na patogênese de várias síndromes endócrinas e no diabetes mellitus tipo 1,(61) caracterizando-se por uma interrupção na via de transmissão do sinal insulínico, que se inicia na ligação do hormônio ao receptor, culminando com a ativação do glicogênio sintetase e dos transportadores de glicose, ambos estimulando respectivamente a síntese de glicogênio e, a captação da glicose pelo músculo (5).

Fatores genéticos e funcionais podem inibir a função do receptor de insulina, induzindo estados de resistência insulínica. Mutações no gene do receptor determinam alterações em suas subunidades alfa ou beta, como no caso da Síndrome A de extrema resistência à insulina, do Leprechaunismo e da Síndrome de Rabson Mendenhall (5,29).

A resistência à insulina, determinada pelas mutações no receptor, apresenta-se características mais graves, apresentando-se logo na infância. Na Síndrome A, os pacientes apresentam crescimento normal, acantose nigricans e na fase pós-puberal desenvolvem hiperandrogenismo ovariano, com virilização, amenorréia e esterilidade. Com relação ao metabolismo da glicose podem apresentar desde intolerância à glicose até o desenvolvimento do diabetes mellitus.

O Leprechaunismo é extremamente raro, caracterizando-se pelo retardo no crescimento intra uterino e pós natal, diminuição do tecido subcutâneo, acantose nigricans e surdez apresenta também intolerância à glicose ou diabetes e tem sobrevida curta. Da mesma forma, a Síndrome

de Rabson Mendenhall caracteriza-se pela presença de acantose nigricans, hiperinsulinismo, intolerância à glicose ou diabetes e puberdade precoce .

Outros fatores que não são genéticos podem modular a função do receptor de insulina. Estes fatores são substâncias que de alguma forma interferem com a ligação do hormônio ao receptor ou com a fosforilação dos resíduos tirosinas da subunidade beta. Entre estas têm sido descritos os efeitos das catecolaminas, que determinam resistência insulínica pela inibição da fosforilação do receptor (30). Os esteres de forbol, que estimulam a proteína quinase C, determinam a fosforilação dos radicais serina do receptor e concomitante inibição da fosforilação em tirosina (31). A adenosina e a polilisina (32) e os hormônios tireoideanos (33) também inibem a atividade quinase do receptor por mecanismos não muito conhecidos. Mais recentemente têm sido demonstrados os efeitos inibidores exercidos pelas citocinas, como, por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF) alfa.

Por outro lado, entre as substâncias que sensibilizam a ação insulínica, encontram-se as tiazolidinedionas (34) e o cloridrato de metformina (37,38,67,68,70) que têm sido utilizados no tratamento de diabetes tipo 2 e de algumas patologias com resistência à insulina. Estas drogas caracterizam-se por estimular a via de transmissão intracelular do sinal insulínico.

O cloridrato de metformina é uma substância do grupo das biguanidas que vem sendo largamente utilizada como anti-hiperglicemiante oral no tratamento de diabéticos tipo 2, devido às suas propriedades de reduzir a produção hepática de glicose, reduzindo a hiperglicemia e, desta forma, aumentando a sensibilidade periférica à insulina (37,38). Quanto ao seu efeito periférico, tem sido relatado que o cloridrato de metformina aumentou a ligação da insulina a seus receptores, "in vitro", em diferentes tipos de células. Estudos clínicos demonstraram que pacientes com diabetes mellitus tipo 2, após o tratamento com cloridrato de metformina, apresentaram



redução da glicemia e da insulinemia, tanto de jejum, como durante o teste oral de tolerância à glicose (39,41) e esta melhora glicêmica esteve associada ao aumento da atividade tirosina quinase do receptor de insulina (39).

Apesar de vários estudos terem demonstrado que no diabetes tipo 2 a atividade tirosina quinase do receptor de insulina é anormal (4,23,24,25,27,28,40), ainda pouco se sabe sobre a influência de diferentes níveis glicêmicos e das substâncias utilizadas no tratamento de pacientes com diabetes tipo 2, sobre a atividade tirosina quinase do receptor. Desta forma, neste estudo tivemos como objetivo avaliar a importância que as variações da glicemia podem exercer sobre a atividade tirosina quinase de pacientes diabéticos tipo 2, submetidos ao mesmo tipo de tratamento.

Objetivando-se isolar o possível efeito das substâncias anti-hiperglicemiantes do efeito da glicemia por si, na função tirosina quinase do receptor, desenhou-se um estudo *"in vitro"*, onde células em cultura estariam em contato apenas com variações da concentração de glicose.

Por outro lado, tendo em vista que pouco se conhece sobre o efeito independente do cloridrato de metformina no mecanismo de ação celular da insulina, objetivou-se também avaliar a ação desta substância nesta função do receptor de insulina. Desenhou-se um estudo *"in vitro"*, onde fibroblastos de camundongos, células NIH 3T3, em cultura, foram colocados em contato com o cloridrato de metformina.

Na realização deste estudo, utilizamos como marcador o radioisótopo [ $^{32}\text{P}$ ] gama ATP que tem sido empregado em estudos do mecanismo de ação celular da insulina, que é caracterizada pela fosforilação de proteínas específicas, desencadeando uma reação em cascata (22,36,42,43,44), tendo sido fundamental no conhecimento da fisiopatologia de estados de resistência à insulina e principalmente no diabetes tipo 2. Assim como o [ $^{32}\text{P}$ ] gama ATP, utilizamos também o radioisótopo [ $^{125}\text{I}$ ], que há muito tem

sido empregado como marcador do mecanismo de ligação da insulina ao receptor (28,39,46,47,65), também contribuindo para o conhecimento da fisiopatologia das síndromes com resistência à insulina e diabetes tipo 2.

## 2 OBJETIVOS

1. Estudar o efeito de diferentes concentrações de glicose no plasma, sobre a ligação e a atividade tirosina quinase do receptor de insulina, isolado de eritrócitos de pacientes diabéticos tipo 2, em tratamento com sulfoniluréia.

Pelo fato de o estudo clínico apresentar a concomitância de algumas variáveis que podem interferir na função do receptor de insulina, desenhamos um estudo *“in vitro”* com as células NIH 3T3 onde o efeito isolado de cada variável pôde ser observado.

2. Estudar o efeito isolado de diferentes concentrações de glicose sobre a atividade tirosina quinase de receptores de insulina solubilizados e parcialmente purificados de células em cultura, NIH 3T3, utilizando os radioisótopos [ $^{32}\text{P}$ ] e [ $^{125}\text{I}$ ].

3. Estudar o efeito do cloridrato de metformina sobre a atividade tirosina quinase do receptor de insulina solubilizados e parcialmente purificados de células NIH 3T3, utilizando os radioisótopos [ $^{32}\text{P}$ ] e [ $^{125}\text{I}$ ].

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 DESENHO DO ESTUDO

#### 3.1.1 Estudo “*In vivo*”

O receptor de insulina foi isolado de eritrócitos de 25 pacientes diabéticos tipo 2 em diferentes controles glicêmicos e em tratamento com a sulfoniluréia, glibenclamida (15mg/dia), dividido em 3 dose às refeições. Foram considerados 2 grupos de pacientes, selecionados de acordo com os valores das glicemias de jejum e glicohemoglobina.

- ◆ Grupo I: Bom controle glicêmico, 9 pacientes, com idade de  $52,3 \pm 2,88$  e glicemias variando entre 5,0 a 9,0 mM e glicohemoglobina com valores variando de 5,5 a 9,0%.
- ◆ Grupo II: Mau controle glicêmico, 16 pacientes, com idade de  $52,5 \pm 2,29$  e glicemias variando entre 9,1 a 15,0 mM e glicohemoglobina com valores acima de 9,5% .

#### 3.1.2 Estudo “*In vitro*”

Fibroblastos de camundongos, células NIH 3T3, que normalmente expressam o receptor de insulina, foram submetidos às etapas requeridas para a manutenção e desenvolvimento celular. As células foram cultivadas no meio de Dulbecco, modificado por “Eagle” (DMEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB), onde foram acrescidas as substâncias cujo efeito se desejava

estudar e posteriormente, foram submetidas aos processos de isolamento e purificação do receptor de insulina.

Foram considerados 3 grupos de células:

- ◆ Grupo glicose: Células NIH 3T3 incubadas com soluções concentradas de glicose (Glicose 16 mM e 25 mM).
- ◆ Grupo Metformina: Células NIH 3T3 incubadas com 10µg/ml cloridrato de metformina.
- ◆ Grupo Controle: Células NIH 3T3 incubadas em meio DMEM (meio mínimo de Dulbbelco, modificado por Eagle).

## **3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS**

### **3.2.1 Materiais**

- ◆ Amostras de sangue dos pacientes.
- ◆ Insulina humana monocomponente marcada ( $^{125}\text{I}$  Tyr A<sup>14</sup>) de alta atividade específica adquirida da Amersham (Arlington Heights,IL);
- ◆ Insulina fria do Laboratório Biobrás,(MG BR);
- ◆ Lecitina de germe de trigo (WGA) (7 mg de lecitina/ml) e “Ricinus Communis Agarose” do Vector Laboratories (Burlingame,CA);
- ◆ Fosfato de Potássio Monobásico, Fosfato de Sódio Dibásico foram obtidos da Vetec, Química Fina Ltda (RJ-BR);
- ◆ Tripsina e Vernese do Instituto Adolfo Lutz (SP-BR).
- ◆ Os seguintes reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St Luis,MO): Albumina Bovina Fração V (BSA), Hepes, Lactose, Polietilenoglicol (PEG-600),

Phenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), Hystopaque 1077, Beta Mercaptoetanol , N-acetil D-glucosamina, Benzamidina, Aprotinina, Meio de Cultura de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM);

- ◆ Sucrose, Dithiotreitol (DTT), Tris-HCl (Hydroxymetyl Aminometano), Coomassie Brillante Blue G-250, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), Bis Acrilamida, acrilamida, Persulfato de Amônia e TEMED foram obtidos da Bio -Rad (Richmond,CA);
- ◆ Cloridrato de metformina foi obtido da Biobras;
- ◆ Heparina 5000UI/ml (Liquemine) da Roche.
- ◆ Triton X-100, EDTA, Etanol, Ácido Fosfórico, Metanol, Ácido perclórico , Cloreto de Magnésio, Cloreto de Manganês, Ácido Acético e DMSO (dimetil sulfoxido) foram adquiridos da Merck SA Ind. Química (RJ,BR);
- ◆ A Adenosina-5-trifosfato tetra (trietilamina) [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] (atividade específica de 10 a 40 Ci/mmol; 0,37 à 1,48 Tbq/mmol) foi obtido pela Du Pont-New Englad Nuclear ( Wilmington, DL);
- ◆ Os filmes para autoradiografia, X-OMAT AR, foram da Kodak (Rochester, NY).
- ◆ Os reagentes utilizados na cultura das células, como soro bovino fetal (SFB) , timidina e aminopiterina foram obtidos da GIBCO (Gaithersburg, MD).
- ◆ Os Fibroblastos NIH 3T3, foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Vilma Regina Martins da Fundação Antônio Prudente e do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer.

### 3.2.2 Equipamentos

- ◆ Pipetador Gilson P100,P200,P20 e repipetador automático Eppendorf;
- ◆ Centrífuga refrigerada tipo Sorvall, Connecticut, EUA, rotor SS34;
- ◆ Centrífuga refrigerada IEC modelo PR-6 centrifuge;
- ◆ Contador gama automático Packard Cobra;
- ◆ Cintilador Beta automático Packard;
- ◆ Agitador magnético e vortex 2 gene da marca V W R scientific;
- ◆ Densitômetro LKB-ultra scan XL da marca pharmacia;

- ◆ Secador de gel modelo 1125B da Bio-Rad;
- ◆ Fluxo laminar da marca VECO
- ◆ Estufa para cultura celular de atmosfera úmida de 95% de O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub> da marca Forma Scientifica;
  
- ◆ Espectrofotômetro (UV visível) Alm, modelo E 215 D.
- ◆ Peagâmetro, modelo B374, marca Micronal, (SP-Brasil);
- ◆ Cuba para eletroforese e fonte da marca Bio-Rad.

### **3.3 MÉTODOS**

#### **3.3.1 Receptor de Insulina Isolado de Hemácias**

##### **3.3.1.1 Separação das Hemácias**

Foram coletados de cada paciente 80 ml de sangue periférico com 50 µl heparina em tubos tipo falcon. As hemácias foram separadas das demais células do sangue periférico pelo método de BOYUM (48) conforme descrito a seguir :

O sangue foi centrifugado a 22°C por 10 min a 500 x g e o sobrenadante (plasma) foi desprezado. Ao precipitado foi acrescentada uma solução fisiológica (NaCl 0,9%), correspondente ao dobro do volume das hemácias isoladas. A mistura foi homogeneizada gentilmente e pipetada vagarosamente em tubos de poliestireno, contendo 5 ml de Ficoll 0.9%/Hipaque 33.9%, de maneira a formar um gradiente. A seguir, foram centrifugados a 500 x g durante 10 min a 4°C, sendo o sobrenadante aspirado e desprezado. Os eritrócitos permaneceram no fundo do tubo, formando o precipitado, livre das demais células.

### **3.3.1.2 Separação das Membranas**

A ruptura das hemácias foi realizada conforme o método de STECK e col. (49).

Aos eritrócitos isolados foram adicionados 400 ml do tampão 5mM Tris-fosfato, pH 8,0 e estes foram centrifugados a 20.000 x g, durante 15 min. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e desprezado e ao precipitado, foram adicionados 300ml de Tampão 0,5mM Tris-fosfato, pH 8,0 e este foi novamente centrifugado a 20.000 x g, por 15 min. Esta operação foi repetida por 5 vezes e a cada lavagem com o tampão observou-se que o sobrenadante e o precipitado foram se tornando mais claros, até o aparecimento de um precipitado branco leitoso que caracteriza as membranas. As membranas foram então lavadas com 200 ml de solução 50mM Hepes pH 7,6 e centrifugadas a 20.000 x g, por 15 min, sendo o sobrenadante desprezado.

O precipitado obtido nesta etapa foi congelado a -70°C em 3ml de solução contendo 50mM Hepes, e 50µM PMSF para análises posteriores.

Todo o procedimento descrito foi realizado a 4°C, as centrifugações foram realizadas na centrífuga refrigerada, Sorvall-Du Pont e o rotor utilizado foi o SS34.

### **3.3.2 Cultura de Fibroblastos NIH 3T3**

As células NIH 3T3 foram cultivadas no meio de Dulbecco modificado por "Eagle" (DMEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB),



utilizando garrafas Falcon 162 cm<sup>2</sup> em estufas de 37°C, em atmosfera úmida de 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>. Quando as células cultivadas atingiram por volta de 70 a 80% de confluência, elas foram expostas a diferentes concentrações de glicose, 16 mM ou 25mM por um período de 24 ou 48 horas ou ao tratamento com cloridrato de metformina (10µg/ml) durante 1, 6 e 12 horas.

Após o período de incubação as células foram lavadas com solução de NaCl 0,9%, nas garrafas Falcon onde foram cultivadas. As células foram removidas pela adição de 2,5 ml de tripsina 0,2% e Versene 0,02% e as garrafas foram mantidas sob homogeneização suave, até que todas as células estivessem em suspensão. A seguir foram adicionados 15 ml de meio DMEM e a suspensão de células foi transferida para um tubo cônico e centrifugado a 500 x g por 5 minutos a 22°C. As células foram então lavadas com uma solução de 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,6 a 500 x g por 5 minutos a 22°C e ressuspensas em 50 mM Hepes e 0,25M PMSF pH 7,6 em um volume final de 1,0 ml e congeladas a -70°C.

### **3.3.3 Solubilização e Purificação Parcial dos Receptores de Insulina**

#### **3.3.3.1 Membranas de Eritrócitos**

A solubilização das membranas foi realizada como descrito por GRICORESCU e col. (46).

As membranas foram descongeladas e solubilizadas com 10 ml de tampão de solubilização (150 mM NaCl, 50mM Hepes, pH 7,6; 1 mM PMSF e 2% de Triton X-100), homogeneizadas vigorosamente e permaneceram durante 12 horas a 4°C. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas a 17.000 x g durante 90 min a 4°C. O sobrenadante foi então aspirado e passado

na coluna de agarose "Ricinus Comminis" (2.0ml) até a saturação. Após a adsorção completa, a coluna foi lavada com 80 ml de Tampão III e a eluição foi realizada com 3,0 ml de Tampão II (150 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 7,6; 0,1 % Triton X-100 e 0,1 M Lactose). O procedimento de solubilização e purificação parcial dos receptores de insulina, tanto dos fibroblastos NIH 3T3 como dos eritrócitos foram realizados a 4°C.

### **3.3.3.2 Fibroblastos NIH 3T3**

As células foram descongeladas e solubilizadas volume a volume com o tampão de solubilização (150 mM NaCl, 50mM Hepes, pH 7,4, 1 mM PMSF e 2% de Triton X-100, 0.1 mg /ml aprotinina e 1 mM EDTA), durante 2 horas a 4°C. Após este período, as células foram centrifugadas a 17.000 x g durante 1 hora a 4°C. O sobrenadante contendo os receptores solubilizados foi aspirado e passado na coluna de lecitina de germe de trigo (1,0 ml) até a saturação. Após a adsorção completa, a coluna foi lavada com 80 ml de Tampão III (150mM de NaCl, 50 mM Hepes, pH 7,6, 0,1% de Triton X-100). A eluição foi realizada com 1,0 ml de Tampão II (0,3 M de N-acetil - D - glucosamina, 150 mM NaCl, 50mM Hepes, pH 7,6 e 0,1 % Triton X-100).

### **3.3.4 Dosagem de Proteína**

A determinação protéica dos eluatos dos receptores dos eritrócitos e dos fibroblastos NIH 3T3, solubilizados e parcialmente purificados, foi realizada pelo Método de BRADFORD (50), que consiste na ligação do "Coomassie Brilhante Blue" à proteína.

Soluções com diferentes concentrações de albumina (BSA), de 5 a 20 mg/ml, foram utilizadas para criar uma curva padrão. As diferentes concentrações

de albumina foram submetidas à reação com a solução de Bradford (0,01% (w/v) Coomassie Brilhante Blue G -250; 4,7% (w/v); etanol e 8,5% (w/v) ácido fosfórico).

A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro (UV visível) Alm, modelo E 215 D, usando como branco 1 ml do reagente de Bradford e 20 µl de tampão de eluição.

### 3.3.5 Ensaio da Ligação da Insulina ao Receptor

Os ensaios da ligação da insulina ao receptor isolado de eritrócitos e de fibroblastos NIH 3T3 foram realizados como previamente descrito por SANTOS e col. (44) com algumas modificações. Cinquenta microlitros de receptor de insulina parcialmente purificado, contendo cerca de 8 a 15 µg de proteína em Tampão II, foram incubados durante 16 horas a 4°C com 20 µl de insulina marcada [<sup>125</sup>I] A<sup>14</sup> (aproximadamente 20.000 cpm), na presença ou não de 20µl insulina fria na concentração de 40 µg/ml. O volume final foi ajustado para 200 µl, com tampão ligação (150 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7,6 e 1% de BSA).

Após o período de incubação foram acrescentados 100 µl de γ globulina bovina 0,3% e 300µl de PEG 20%, em todos os tubos, e estes foram agitados e centrifugados a 1.500 x g, a 4°C, durante 30 minutos, sendo o sobrenadante desprezado por aspiração.

Ao precipitado foram adicionados 1000 µl de PEG 10% e centrifugado a 1.500 x g por 30 minutos e o sobrenadante foi aspirado e desprezado. A radioatividade do precipitado foi determinada em contador gama. A ligação específica da insulina ao receptor foi definida como a ligação total na ausência de insulina fria menos a ligação diante da maior concentração de insulina fria, a qual

é considerada como ligação inespecífica (NSB). Os ensaios foram executados em duplicata.

### 3.3.6 Autofosforilação do Receptor de Insulina

A autofosforilação do receptor de insulina foi realizada como descrito previamente por KASSUGA e col. (6).

Foram pré-incubados 40 $\mu$ l (5 $\mu$ g a 10 $\mu$ g de proteína) do receptor de insulina extraído e parcialmente purificado de fibroblastos NIH 3T3 ou de eritrócitos, na presença ou não de 10  $\mu$ l de insulina porcina na concentração de 3000 mM/ml em tampão (50 mM Hepes, pH 7,6 e 150 mM NaCl e 1 mg de BSA), durante 60 minutos a 22°C. Após o período de incubação, a autofosforilação foi iniciada pela adição de 50  $\mu$ l de solução contendo 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM ATP e [<sup>32</sup>P] ATP 40  $\mu$ Ci /tubo, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM de Hepes, pH 7,6 e incubados a 0°C durante 30 minutos.

A reação de fosforilação foi interrompida pipetando-se 100  $\mu$ l de "Stopping Solution" (0.125 M Tris HCl, pH 6,8, 20mM ATP, 20 mM EDTA, 4% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), 100 mM DTT e 16% Sucrose), em um volume final de 200  $\mu$ l. Em seguida os tubos foram aquecidos a 100°C durante 3 minutos e congelados a -20°C.

As amostras foram descongeladas e 35  $\mu$ l das mesmas foram pipetados e corridos em gel de poliacrilamida SDS 7,5%, segundo LAEMMLI (51). Como marcadores de peso molecular, utilizamos 5  $\mu$ l por canaleta do padrão de eletroforese (Bio Rad) de peso molecular que corresponde de 14 a 200 kDa. Os géis foram corados em solução de "Coomassie Blue" (0.1% Coomassie Blue , 20% metanol e 2,5% ácido perclórico) e lavados de 3 a 5 vezes com uma solução de 10% ácido acético e 50% metanol, com o objetivo de se retirar o

excesso de corante. Em seguida, foram descorados com uma solução contendo 10% de ácido acético e 10% de metanol até o gel tornar-se transparente.

Para evitar rachaduras no gel, os mesmos foram lavados com uma solução contendo 10% de ácido acético e 2% de DMSO, algumas horas antes da secagem. Após a secagem foram expostos em filme Kodak X-Omate AR a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 72 horas, utilizando ECRAM como intensificador.

Os filmes foram revelados e analisados através de densitometria (densitômetro LKB-ultra scan XL-Pharmacia).

### **3.3.7 Atividade Tirosina Quinase Utilizando Substrato Exógeno Poly Glu (4:1)Tyr**

Neste ensaio, a função de tirosina quinase foi medida utilizando-se como acceptor Poly Glu (4:1) Tyr conforme descrito por BRAUN e col.(52).

Foram pré incubados 40  $\mu\text{l}$  de receptor de insulina parcialmente purificado (aproximadamente de 5 a 10  $\mu\text{g}$  proteína), na presença ou não de 10  $\mu\text{l}$  de insulina porcina na concentração de 3000 mM/ml em 50 mM Hepes e 150 mM NaCl e 1 mg de BSA pH 7,6 , por 60 minutos a  $22^{\circ}\text{C}$ . A fosforilação do substrato exógeno foi iniciada pela adição de 50  $\mu\text{l}$  da mistura, contendo substrato artificial (exógeno) , Poly Glu (4:1) Tyr (10 mg/ml), 0,4M  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM ATP,  $^{32}\text{P}$  ATP 5 $\mu\text{Ci}$ /tubo e 15  $\mu\text{l}$  de Tampão III , o volume total por tubo foi de 100  $\mu\text{l}$ . A reação de fosforilação foi interrompida após 30 minutos a  $22^{\circ}\text{C}$ , pipetando-se 50  $\mu\text{l}$  da solução de reação em quadrados de 2,5  $\text{cm}^2$  de papel de filtro 3mm, fosfocelulose (Whatmann), e imersos em solução de ácido fosfórico 75 mM conforme previamente descrito por SZTALRYD e col (38).

O número de moléculas de  $^{32}\text{P}$  incorporado à molécula de tirosina foi determinado pela contagem através do líquido de cintilação em contador beta. A

atividade de tirosina quinase foi expressa pelo número de picomoles de [ $^{32}\text{P}$ ] incorporados no Poly Glu, por minuto, por mg de proteína.

### 3.3.8 Dosagem de Glicose, Insulina e Glicohemoglobina

As amostras para dosagem de insulina e glicose foram colhidas com heparina e mantidas em gelo.

**Glicose:** As dosagens de glicose foram realizadas pelo método da glicose – oxidase. O coeficiente da variação intra-ensaio para as amostras-controle foi menor ou igual a 3% e o coeficiente inter-ensaio menor ou igual a 3,5%. Os valores foram expressos em mmol/L.

**Insulina:** A determinação da insulina foi feita por radioimunoensaio, utilizando -se insulina marcada com [ $^{125}\text{I}$ ], e a separação do complexo antígeno-anticorpo feita com polietilenoglicol (PEG 6000). As amostras foram dosadas em duplicatas, sendo a variação entre as mesmas menor ou igual a 3,1%. O limite para detecção do método é de 2 $\mu\text{U/ml}$ .

**Glicohemoglobina:** Para a dosagem da glicohemoglobina foram coletadas amostras de sangue com EDTA (10%). O método consiste na determinação da hemoglobina total (Hb) e a hemoglobina A (HbA) após os eritrócitos terem sido lisados com uma solução que proporciona uma baixa pressão osmótica. A Hb é determinada colorimetricamente e a HbA pelo método de imunoturbidimetria, através do equipamento Cobas-Integra. A relação da concentração de ambos resulta a concentração da HbA em %. As dosagens foram realizadas em duplicatas. O limite para a detecção do método é de 0,9  $\mu\text{mol/L}$  (1,5 mg/dL) para o teste de Hb e de 0,22  $\mu\text{mol/L}$  (0,4 mg/dL) para o teste da HbA. O valor normal é de 5,5 a 8,5%

### 3.3.9 Índice de Massa Corpórea (IMC)

O índice de massa corpórea foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{IMC} = \frac{\text{peso do paciente (kg)}}{\text{altura (m}^2\text{)}}$$

### 3.3.10 Análise Estatística

A ligação da insulina aos receptores foi analisada pelo método de SCATCHARD (53) considerando-se o número de ligações máximas (Bmax) e a afinidade do hormônio pelo receptor (Kd).

A análise de variância para medidas não pareadas foi utilizada para a análise e comparação dos resultados e grupos. Foram considerados estatisticamente significantes as diferenças com  $p$  igual ou menor que 0,05.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Estudo “*In vivo*”

#### 4.1.1 Características clínicas e metabólicas dos pacientes diabéticos tipo 2, tratados com sulfoniluréia.

Os pacientes diabéticos tipo 2 tratados com sulfoniluréia, glibenclamida 15 mg/dia, dividida em três doses às refeições, foram selecionados e divididos em dois grupos, de acordo com o seu controle glicêmico. Considerou-se um grupo em bom controle glicêmico, aqueles que possuíam glicemias de jejum variando entre 5,0 a 9,0 mM e o outro grupo de pacientes em mau controle, com glicemias de jejum entre 9,1 a 15,0 mM Figura 1. Foram considerados também como padrão para controle glicêmico os valores da glico-hemoglobina, sendo que os pacientes com bom controle glicêmico apresentaram o resultado da glico-hemoglobina entre 5,5 a 8,5% e o grupo com mau controle apresentou valores acima de 9,1% Figura 2 .

As características clínicas e metabólicas dos 2 grupos de pacientes estão representadas nas Tabelas 1 e 2 respectivamente.



**Tabela 1** - Características clínicas dos pacientes diabéticos tipo 2, tratados com sulfoniluréia.

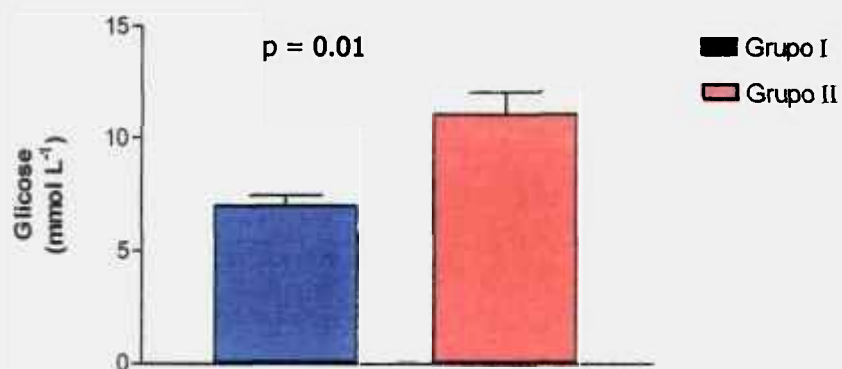
| Grupos de Pacientes | N  | IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) | Sexo (M/F) | Idade (anos) |
|---------------------|----|--------------------------|------------|--------------|
| I                   | 9  | 27.0 ± 0.37              | 4/5        | 52.3 ± 2.88  |
| II                  | 16 | 28.0 ± 0.41              | 6/10       | 52.5 ± 2.29  |
| p                   |    | NS                       |            | NS           |

N – número de pacientes; IMC – índice de massa corpórea.

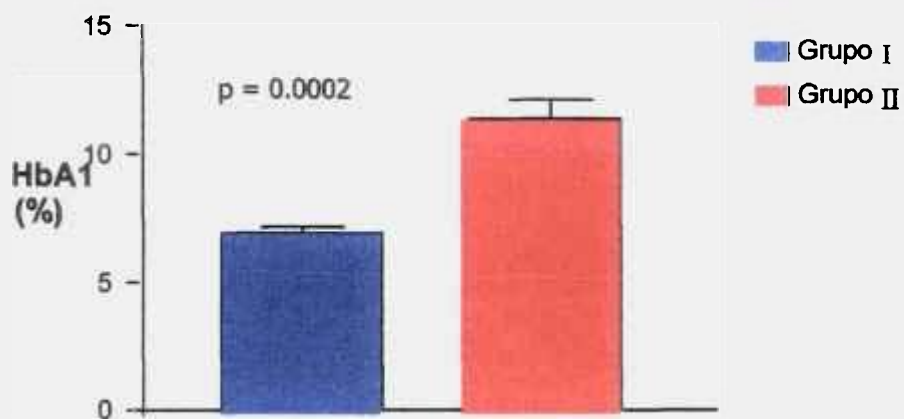
**Tabela 2** - Características metabólicas dos pacientes diabéticos tipo 2 tratados com sulfoniluréia.

| Grupos de Pacientes | Glicose (mmol L <sup>-1</sup> ) | Insulina (pmol L <sup>-1</sup> ) | HbA <sub>1c</sub> (%) |
|---------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| I                   | 7.0 ± 0.44                      | 74.0 ± 9.45                      | 7.0 ± 0.17            |
| II                  | 11.0 ± 1.06                     | 79.0 ± 8.26                      | 11.4 ± 0.73           |
| p                   | 0.01                            | NS                               | 0.0002                |

Os valores são as médias e o erro padrão das médias de 9 e 16 diferentes ensaios; glicose e insulina de jejum; HbA<sub>1c</sub> = glico-hemoglobina.



**Figura 1** - Glicemia de jejum dos 2 grupos de pacientes diabéticos tipo 2, tratados com sulfoniluréia.



**Figura 2-** Glico-hemoglobina dos 2 grupos de pacientes diabéticos tipo 2, tratados com sulfoniluréia.

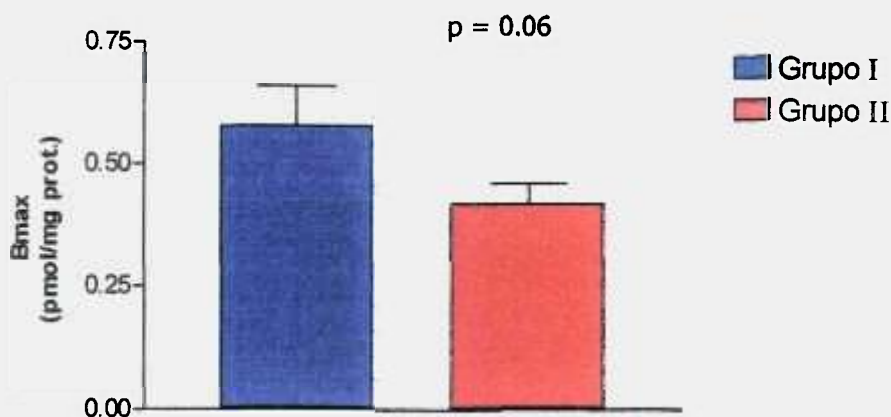
#### 4.1.2 Ligação da insulina aos receptores isolados de eritrócitos de pacientes diabéticos tipo 2, tratados com sulfoniluréia

Os resultados da ligação da insulina aos receptores (Bmax), isolados de eritrócitos de pacientes diabéticos tratados com sulfoniluréia, estão descritos na Tabela 3. Verificou-se que houve tendência ao número de receptores ser maior no grupo com menores glicemias (GI), embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa ( $p=0,06$ ), Figura 3. A constante de dissociação (Kd) foi semelhante em ambos os grupos, sugerindo que a afinidade do hormônio pelo receptor não foi diferente entre os grupos.

**Tabela 3** - Ligação da insulina a receptores isolados de eritrócitos de pacientes diabéticos tipo 2, tratados com sulfoniluréia e em diferentes controles glicêmicos.

| GRUPOS DE PACIENTES | Bmax            | Kd              |
|---------------------|-----------------|-----------------|
| I                   | $0.58 \pm 0.08$ | $1.74 \pm 0.34$ |
| II                  | $0.42 \pm 0.04$ | $1.29 \pm 0.17$ |
| p                   | 0.06            | NS              |

Os valores são as médias e o erro padrão das médias de 25 diferentes ensaios. Bmax= ligação máxima da insulina ao receptor (pmol/mg de proteína). Kd = constante de dissociação do hormônio ao receptor (nM).



**Figura 3** - Ligação da insulina a receptores isolados de eritrócitos de pacientes diabéticos tipo 2 tratados com sulfoniluréia.

#### **4.1.3 Atividade tirosina quinase em substrato artificial Poly Glu (4:1) Tyr de receptores isolados de eritrócitos de pacientes diabéticos tipo 2, tratados com sulfoniluréia**

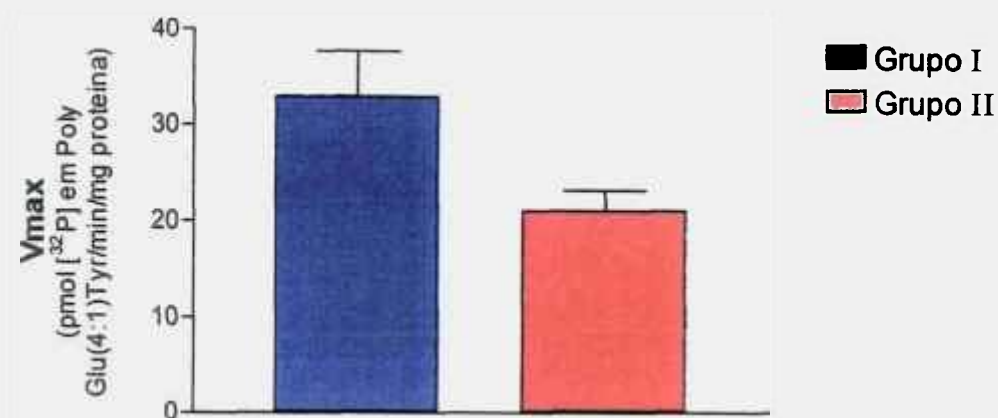
Os resultados da atividade tirosina quinase de receptores de insulina (ATQRI) em substrato artificial PolyGlu (4:1) Tyr estão apresentados na Tabela 4. Verificou-se que a ATQRI endógena ( $V_{\text{basal}}$ ), embora não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa, foi maior nos pacientes com menores glicemias. Da mesma forma, a ATQRI estimulada pela insulina ( $V_{\text{max}}$ ) foi maior no grupo com glicemias menores, Figura 4. O  $V_{\text{total}}$ , que é a soma do  $V_{\text{basal}}$  e o  $V_{\text{max}}$ , também foi maior nos pacientes com glicemias menores. Não houve diferença na constante de ativação da enzima ( $K_a$ ) entre os grupos.

Estes dados mostram que os pacientes com concentrações plasmáticas de glicose menores apresentaram maior atividade tirosina quinase estimulada pela insulina.

**Tabela 4** - Atividade tirosina quinase de receptores de insulina isolados de eritrócitos de pacientes diabéticos tipo 2, tratados com sulfoniluréia, apresentando diferentes controles glicêmicos.

| <b>GRUPOS DE PACIENTES</b>            |                |                |          |
|---------------------------------------|----------------|----------------|----------|
| <b>Atividade<br/>tirosina quinase</b> | <b>I</b>       | <b>II</b>      | <b>p</b> |
| <b>V<sub>basal</sub></b>              | $15.3 \pm 1.7$ | $11.6 \pm 1.0$ | 0.06     |
| <b>V<sub>total</sub></b>              | $48.1 \pm 5.9$ | $33.0 \pm 2.6$ | 0.01     |
| <b>V<sub>max</sub></b>                | $33.0 \pm 4.7$ | $21.0 \pm 2.2$ | 0.01     |
| <b>K<sub>a</sub></b>                  | $2.1 \pm 0.7$  | $2.8 \pm 0.6$  | NS       |

Os resultados correspondem às médias e erro padrão das médias de 9 e 16 diferentes ensaios. A Atividade tirosina quinase é expressa em: pmol [<sup>32</sup>P] em PolyGlu (4:1)Tyr/min/mg proteína. V<sub>basal</sub>: atividade tirosina quinase sem o estímulo da insulina. V<sub>max</sub> : atividade tirosina quinase estimulada pela insulina. V<sub>total</sub> = a soma das atividades basal e a estimulada pela insulina. K<sub>a</sub> = concentração de insulina requerida para a obtenção da metade da ativação máxima da atividade tirosina quinase, (nM).



**Figura 4** - Atividade tirosina quinase estimulada pela insulina (Vmax) de receptores de insulina, isolados de eritrócitos de pacientes diabéticos tipo 2 tratados, apresentando diferentes controles glicêmicos.

## 4.2 Estudo “*In vitro*”

### 4.2.1 Ligação da insulina aos receptores isolados de células NIH 3T3

Os receptores incubados com insulina, conforme previamente descrito em métodos, apresentaram ligação máxima igual a  $0.64 \pm 0.02$  pmol/mg de proteína. Estes valores estão de acordo com os reportados em estudos anteriores (32,34), sugerindo também serem as células NIH 3T3 um modelo adequado e sensível para o estudo do receptor de insulina .

#### **4.2.2 Atividade tirosina quinase em substrato PolyGlu (4:1) Tyr de receptores de insulina, isolados de células NIH 3T3 incubadas em meio com 16 mM e 25mM de glicose**

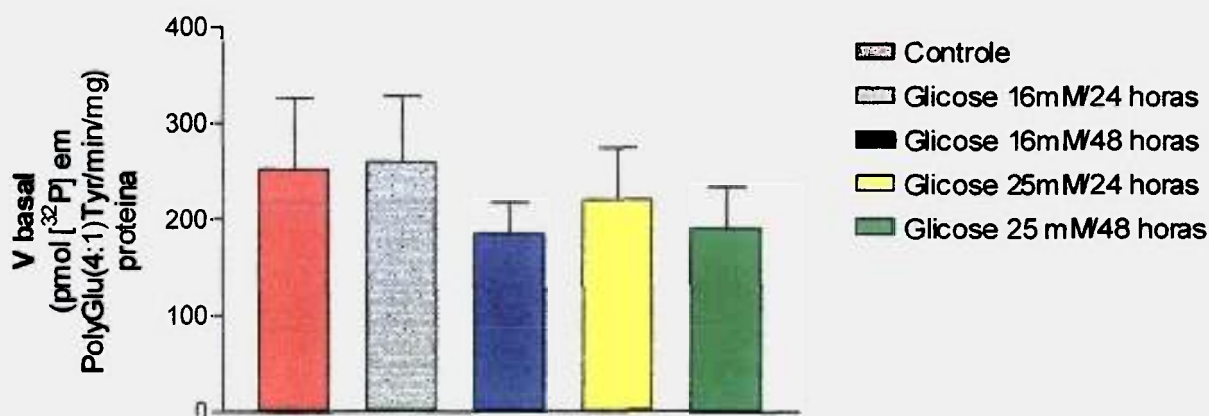
Com o objetivo de verificarmos o efeito de diferentes concentrações de glicose em função do tempo de incubação, na atividade de fosforilação do receptor de insulina, células NIH 3T3 foram incubadas durante dois diferentes períodos de tempo, 24 e 48 horas, com concentrações de glicose de 16mM (G16mM) e 25mM (G25mM), conforme descrito em Métodos item 3.3.2. Analisamos as atividades de fosforilação endógena e a estimulada pela insulina dos receptores de insulina solubilizados e parcialmente purificados das células NIH 3T3.

**Atividade tirosina quinase endógena (*V<sub>basal</sub>*):** Os resultados da atividade tirosina quinase endógena não foram diferentes entre os grupos G16mM e G25mM ( $p=0.80$ ) ou entre cada um destes grupos e o grupo controle, tanto após 24 como 48 horas de incubação ( $p=0.82$ ), Tabela 5 e Figura 5; sugerindo que a atividade de fosforilação endógena do receptor de insulina de células NIH 3T3 não foi sensível às duas diferentes concentrações de glicose do meio, nos períodos de incubação de 24 e de 48 horas.

**Tabela 5** - Efeito de diferentes concentrações de glicose durante 24 e 48 horas de incubação, na fosforilação endógena ( $V_{\text{basal}}$ ) do receptor de insulina.

|                | Controle | G16mM/24h | G16mM/48h | G25mM/24h | G25mM/48h |
|----------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>V basal</b> | 253±73   | 261±67    | 185±33    | 222±53    | 191±44    |

Os resultados são as médias e o erro padrão das médias de 10 diferentes ensaios. A Atividade tirosina quinase é expressa em : pmol [ $^{32}\text{P}$ ] em PolyGlu (4:1)Tyr /min/mg proteína. G16mM/24h e G16mM/48h: células incubadas com 16mM de glicose por 24 e 48 horas respectivamente. G25mM/24h e G25mM/48h: células incubadas com 25mM de glicose durante 24 e 48 horas.



**Figura 5** - Efeito de diferentes concentrações de glicose durante 24 e 48 horas de incubação na fosforilação endógena ( $V_0$ ) do receptor de insulina. Glicose 16mM/24h e Glicose 16mM/48h: células incubadas com 16mM de glicose por 24 e 48 horas respectivamente. Glicose 25mM/24h e Glicose 25mM/48h: células incubadas com 25mM de glicose por 24 e 48 horas.



**Atividade tirosina quinase total (Vtotal):** O Vtotal corresponde soma da atividade basal (Vbasal) e a estimulada pela insulina (Vmax). Nos grupos G16mM e G25mM após 24 horas de incubação, não foi estatisticamente diferente da do grupo controle (C), respectivamente ( $626 \pm 53$  vs  $487 \pm 62$  vs  $616 \pm 101$   $p=0.09$ ). Porém, o Vtotal dos grupos G16mM e G25mM, após 48 horas de incubação, foi menor do que o do grupo controle, respectivamente ( $439 \pm 43$  vs  $415 \pm 70$  vs  $616 \pm 101$   $p=0.04$ ). Resultados apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6 -** Efeito de diferentes concentrações de glicose durante 24 e 48 horas de incubação na fosforilação dos receptores de insulina isolados das células NIH 3T3.

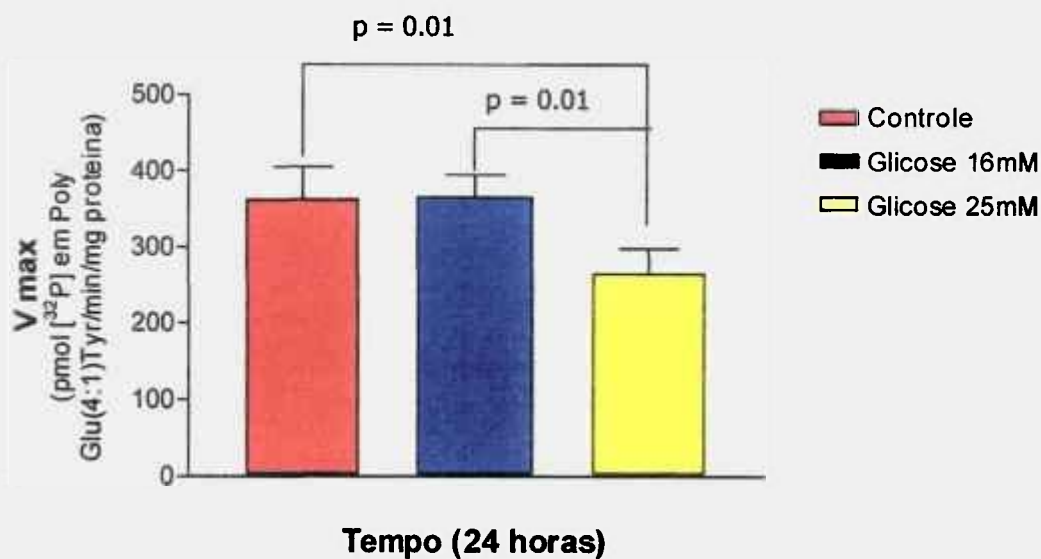
| Atividade Tirosina Quinase |                               |                              |
|----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
|                            | Vmax                          | Vtotal                       |
| Controle                   | $364 \pm 41$ <sup>a,c,d</sup> | $616 \pm 101$ <sup>e,f</sup> |
| G 16mM/24h                 | $365 \pm 30$ <sup>b</sup>     | $626 \pm 53$                 |
| G 25mM/24h                 | $265 \pm 34$ <sup>a,b</sup>   | $487 \pm 62$                 |
| G 16mM/48h                 | $254 \pm 38$ <sup>c</sup>     | $439 \pm 43$ <sup>f</sup>    |
| G 25mM/48h                 | $224 \pm 31$ <sup>d</sup>     | $415 \pm 70$ <sup>e</sup>    |
| p                          | 0.014                         | NS                           |

Os resultados são as médias e o erro padrão de 10 diferentes ensaios. A Atividade tirosina quinase é expressa em: pmol [<sup>32</sup>P] em PolyGlu (4:1)Tyr /min/mg proteína. Vmax: Atividade tirosina quinase estimulada pela insulina. Vtotal = é a soma da atividade basal e a estimulada pela insulina. G16mM: células incubadas com 16mM de glicose. G25mM: células incubadas com 25mM de glicose. (<sup>a,b,c,d</sup>= $p=0.01$ ) (<sup>e,f</sup>= $p=0.049$ ).

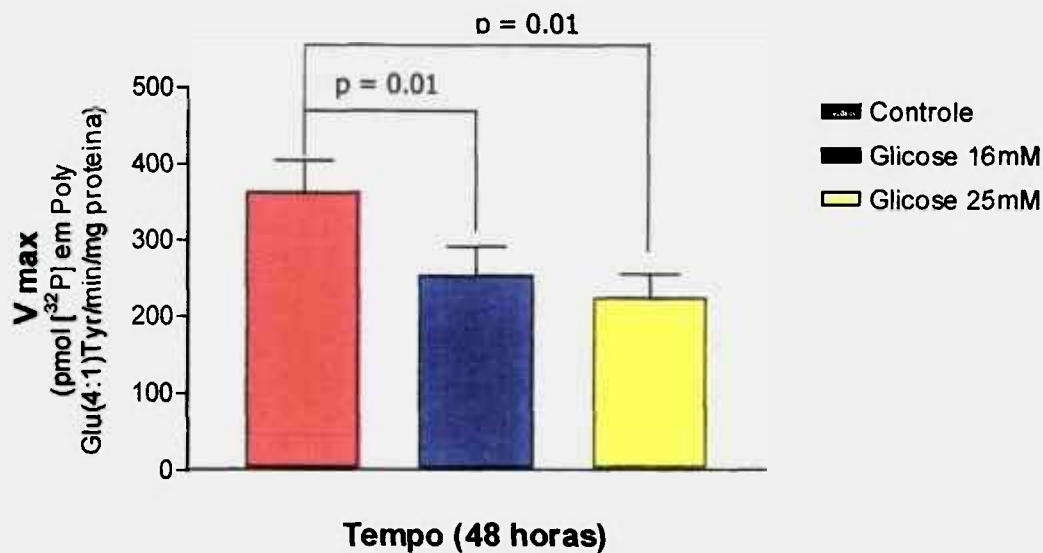
**Atividade tirosina quinase estimulada pela insulina ( $V_{max}$ ):** A atividade tirosina quinase do grupo G16mM, após 24 horas de incubação, não foi diferente da do grupo controle (C), respectivamente ( $365 \pm 30$  vs  $364 \pm 41$ ,  $p=0.83$ ). Porém, o  $V_{max}$  do grupo G25mM, após 24 horas de incubação, foi menor do que o do grupo controle (C), respectivamente ( $265 \pm 34$  vs  $364 \pm 41$ ,  $p = 0.01$ ). Por outro lado o  $V_{max}$ , após 24 horas de incubação, foi menor, nas células incubadas com concentrações de glicose 25mM, do que nas incubadas com glicose 16mM, respectivamente ( $265 \pm 34$  vs  $365 \pm 30$ ,  $p = 0.01$ ). Estes dados sugerem que, após 24 horas de incubação, a inibição da atividade tirosina quinase estimulada pela insulina, de receptores de insulina de células NIH 3T3, foi maior nas células incubadas com concentrações de glicose 25mM, não apresentando diferença nas células incubadas com glicose 16mM, Tabela 6 e Figura 6a.

Considerando-se o período de incubação de 48 horas, observou-se que o  $V_{max}$  das células NIH 3T3 incubadas com glicose 16mM foi menor do que nas células controle, respectivamente ( $254 \pm 38$  vs  $364 \pm 41$ ,  $p = 0.01$ ); da mesma forma, com 25mM de glicose, o  $V_{max}$  foi menor do que em células controle ( $224 \pm 31$  vs  $364 \pm 41$ ,  $p = 0.01$ ) Tabela 6 e Figura 6b. Entretanto, após 48 horas de incubação, não houve diferença entre o  $V_{max}$  das células G16mM comparadas às células G25mM, respectivamente ( $254 \pm 38$  vs  $224 \pm 31$ , NS).

Estes dados mostram que, após 48 horas de incubação, a atividade tirosina quinase estimulada pela insulina do receptor de insulina, isolado de células NIH 3T3, foi menor do que o grupo controle, tanto em células incubadas com glicose 16mM como com glicose 25mM e não houve diferença entre estes dois grupos. Os resultados deste estudo sugerem que a concentração de glicose é a variável que primeiro determina a redução da atividade tirosina quinase estimulada pela insulina do receptor de insulina, isolado de células NIH 3T3, quando se consideram independentemente duas variáveis: sendo uma, a concentração de glicose do meio e o tempo de incubação das células neste meio.



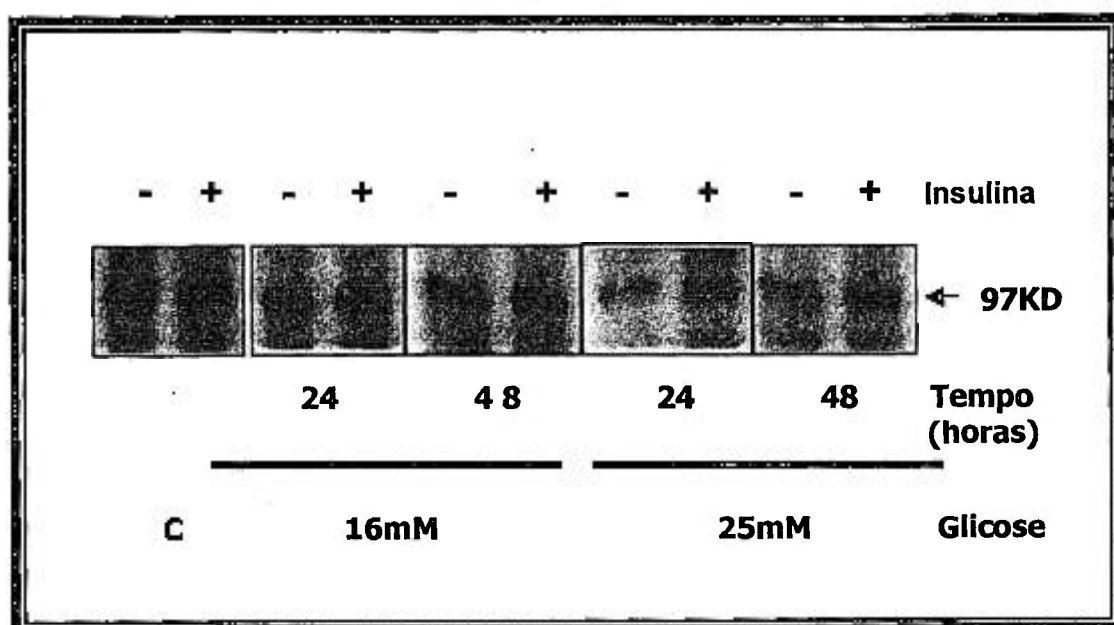
**Figura 6<sup>a</sup>** - Efeito de diferentes concentrações de glicose durante 24 horas de incubação na atividade tirosina quinase estimulada pela insulina (Vmax) de receptores de insulina, isolados de fibroblastos NIH 3T3.



**Figura 6b** - Efeito de diferentes concentrações de glicose durante 48 horas de incubação na atividade tirosina quinase estimulada pela insulina (Vmax) de receptores de insulina, isolados de fibroblastos NIH 3T3.

#### 4.1 Autofosforilação do receptor de insulina, solubilizado e parcialmente purificado de fibroblastos NIH 3T3, sobre o efeito de diferentes concentrações de glicose durante 24 e 48 horas

Os resultados da autofosforilação do receptor de insulina, incubados com diferentes concentrações de glicose durante 24 e 48 horas, estão demonstrados na Figura 7 e Tabela 7.



**Figura 7** - Autofosforilação do receptor de insulina, solubilizado e parcialmente purificado de fibroblastos NIH 3T3, sob o efeito de diferentes concentrações de glicose durante 24 e 48 horas.

Através do auto-radiograma, Figura 7, verificamos que a intensidade das bandas diminuíram em relação às concentrações de glicose. Isto é, quando as células foram incubadas com 16mM de glicose, durante 24 horas, não foi verificada diferença entre a intensidade das bandas; porém, com 48 horas podemos notar uma diminuição na intensidade das bandas em que o receptor recebeu ou não estímulo pela insulina.

Por outro lado, nas incubações com 25mM de glicose, já nas primeiras 24 horas, podemos notar a diminuição da intensidade das bandas em que o receptor recebeu ou não estímulo pela insulina e, após 48 horas, esta diminuição se manteve.

Estes dados podem ser verificados também na Tabela 7, onde os valores são apresentados em unidades arbitrárias (AU) em porcentagem.

**Tabela 7 - Autofosforilação do receptor de insulina de células NIH 3T3, submetidas ao efeito de soluções de glicose 16mM e 25mM.**

| <b>Grupos de células</b> | <b>Insulina</b> |          |
|--------------------------|-----------------|----------|
|                          | <b>-</b>        | <b>+</b> |
| Controle                 | 93              | 100      |
| G16mM/24h                | 67              | 94       |
| G16mM/48h                | 52              | 61       |
| G25mM/24h                | 42              | 47       |
| G25mM/48h                | 41              | 51       |

Os valores são reportados em unidades arbitrárias (UA) em (%). (-) Leitura da autofosforilação endógena. (+) Leitura da autofosforilação estimulada pela insulina. As leituras foram realizadas em densitometria, considerando a densidade ótica do grupo controle estimulado com insulina, como 100%.

#### **4.2.4 Efeito do cloridrato de metformina sobre a atividade tirosina quinase do receptor de insulina.**

Os resultados da incubação das células NIH 3T3 com cloridrato de metformina, em diferentes tempos, estão representados na Tabela 8 e Figura 8.

**Atividade tirosina quinase basal ( $V_{\text{basal}}$ ):** Não houve diferença estatisticamente significativa no valor do  $V_{\text{basal}}$  do receptor de insulina das células submetidas a diferentes tempos de exposição ao cloridrato de metformina. Tabela 8.

**Atividade tirosina quinase estimulada pela insulina ( $V_{\text{max}}$ ):** Após uma hora de incubação com  $10\mu\text{g/ml}$  do cloridrato de metformina, não foi observado aumento do  $V_{\text{max}}$  em relação às células controle. Entretanto, após 6 e 12 horas de incubação, houve aumento do  $V_{\text{max}}$  em relação às células controle ( $314\pm 66$  vs  $163 \pm 42$   $p=0.03$ ) e ( $313\pm 68$  vs  $163\pm 42$   $p=0.04$ ) respectivamente, Figura 8.

Por outro lado, não houve diferença entre os resultados de 6 e 12 horas de incubação.

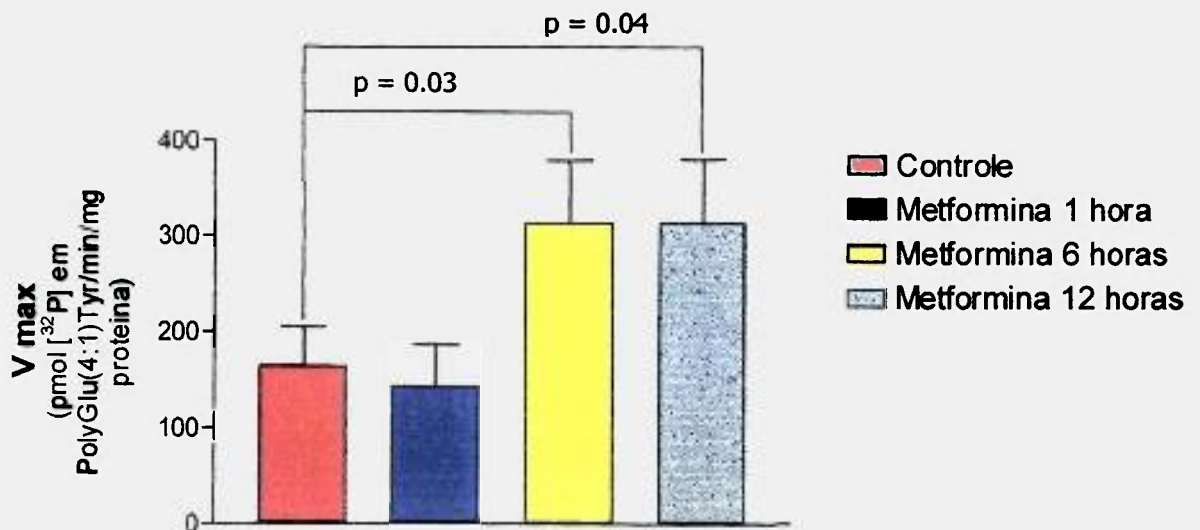
**Atividade tirosina quinase total ( $V_{\text{total}}$ ):** Observou-se que o  $V_{\text{total}}$  foi maior do que o do grupo controle nas células incubadas durante 6 e 12 horas, ( $526\pm 74$  vs  $326\pm 40$ ,  $p=0.01$ ) e ( $499\pm 60$  vs  $326\pm 40$ ,  $p=0.01$ ), respectivamente, Tabela 8.



**Tabela 8 - Atividade tirosina quinase de receptores de insulina isolados de células NIH 3T3 submetidas ao efeito do cloridrato de metformina , durante períodos diferentes de tempo.**

| <b>Atividade Tirosina Quinase</b> |                |                       |                       |
|-----------------------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Grupos de Células</b>          | <b>V basal</b> | <b>V max</b>          | <b>V total</b>        |
| Controle                          | 177±27         | 163±42 <sup>a,b</sup> | 326±40 <sup>c,d</sup> |
| Metformina 1 hora                 | 112 ± 18       | 143 ± 44              | 254 ± 45              |
| Metformina 6 horas                | 211 ± 19       | 314 ± 66 <sup>a</sup> | 526 ± 74 <sup>c</sup> |
| Metformina 12 horas               | 186 ± 10       | 313 ± 68 <sup>b</sup> | 499 ± 60 <sup>d</sup> |

Os resultados são as médias e o erro padrão de 10 diferentes ensaios. A Atividade tirosina quinase é expressa em : pmol [<sup>32</sup>P] em PolyGlu (4:1)Tyr /min/mg proteína. Vo: Atividade tirosina quinase sem o estímulo da insulina. Vmax: Atividade tirosina quinase estimulada pela insulina. Vtotal = é a soma das atividades basais e estimulada pela insulina. <sup>a</sup>=p=0.03 , <sup>b</sup>= p=0.04 e <sup>c,d</sup>=p=0.01.

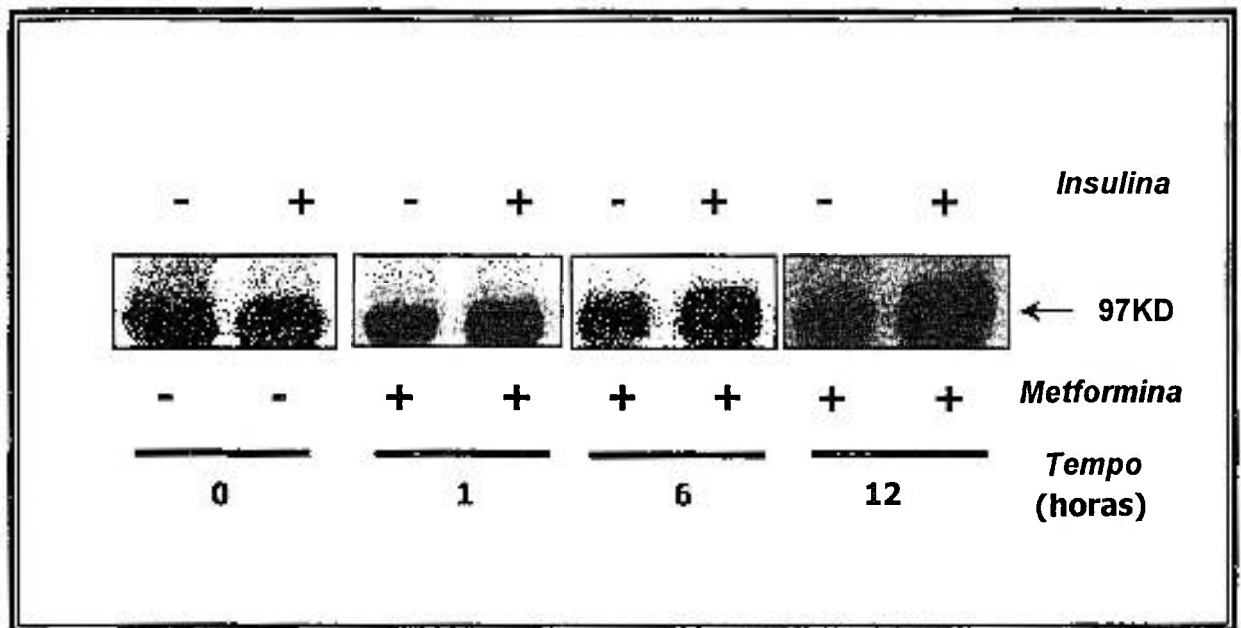


**Figura 8** - Atividade tirosina quinase de receptores de insulina isolados de células NIH 3T3, submetidas ao efeito do cloridrato de metformina, durante períodos diferentes de tempo.

Estes resultados mostram que o tempo de exposição das células ao cloridrato de metformina foi importante na determinação do efeito da substância sobre a função do receptor.

#### 4.2.5 Autofosforilação de receptores de insulina incubados com metformina.

Os resultados da autofosforilação estão representados na Figura 9 e Tabela 9, onde podemos verificar um aumento da autofosforilação do receptor de insulina estimulada pela insulina, quando comparada às células controle. Este aumento tornou-se mais evidente quando as células foram expostas à Metformina por um período mais prolongado como em 6 e 12 horas e confirmam aqueles demonstrados na fosforilação do substrato exógeno [PolyGlu(4:1)] Tyr.



**Figura 9** - Autofosforilação do receptor de insulina isolado de células NIH 3T3, previamente expostas durante 1,6,12 horas a 10 $\mu$ g/ml de cloridrato de metformina com [ $^{32}$ P] ATP, na presença ou não de insulina.

**Tabela 9** - Autofosforilação do receptor de insulina de células NIH 3T3, submetidas ao efeito da Metformina.

| Grupos de células   | Insulina |     |
|---------------------|----------|-----|
|                     | -        | +   |
| Controle            | 91       | 100 |
| Metformina 1 hora   | 67       | 92  |
| Metformina 6 horas  | 73       | 150 |
| Metformina 12 horas | 83       | 160 |

Os valores são reportados em unidades arbitrárias (UA) (%). (-) Leitura da autofosforilação endógena. (+) Leitura da autofosforilação estimulada pela insulina. As leituras foram realizadas em densitometria, considerando a densidade ótica do grupo controle estimulado com insulina, como 100%.

## 5 DISCUSSÃO

O diabetes mellitus é uma doença de grande importância, por acometer aproximadamente 10% da população mundial. Caracteriza-se pela falência do efeito insulínico na célula, com estado de hiperglicemia e alteração nos metabolismos de carboidratos, lipídios e proteínas, desencadeando complicações importantes como: retinopatia, nefropatia, neuropatia e doenças cardiovasculares (54,55). Os pacientes diabéticos podem ser clinicamente classificados como insulino-dependentes (DMID ou diabéticos tipo 1) ou não-insulino dependentes (DMNID ou diabéticos tipo 2), os quais representam 90% da população de diabéticos.

Tanto para o DMID como para o DMNID existem componentes genéticos e ambientais que podem levar ao desenvolvimento da doença.

No DMID há vários indícios de que as influências ambientais, bem como as genéticas, possuem um papel importante na doença. Entretanto, os fatores genéticos no DMID são bem caracterizados e relacionam-se com os genes que controlam a resposta imune. Há considerável evidência de que o DMID seja uma doença auto-imune das células  $\beta$  do pâncreas. Os anticorpos para componentes das células das ilhotas são detectados em até 80% dos pacientes com DMID, logo após o estabelecimento ou antes do início da doença.

O DMNID é a maioria entre os pacientes diabéticos. Numerosos fatores colocam pessoas de alto risco de desenvolver o DMNID, como história familiar e as pessoa com peso superior a 20% do ideal, por isso é considerada como sendo uma doença multifatorial, onde qualquer combinação de fatores ambientais e genéticos que excedam um limiar pode resultar na doença.

A insulina é utilizada para o tratamento de pacientes com DMID; no tratamento dos DMNID são utilizados os hipoglicemiantes orais como as sulfoniluréias, os anti-hiperglicemiantes orais como as biguanidas e os sensibilizadores da ação da insulina, as glitazonas (56).

O receptor de insulina é uma passagem importante no mecanismo de ação celular e molecular da insulina, sendo o estudo de sua função etapa vital no conhecimento da fisiopatologia do diabetes tipo 2, das síndromes com resistência insulínica e no conhecimento dos mecanismos de ação de substâncias utilizadas no tratamento dessas patologias.

No presente trabalho, avaliamos o efeito de diferentes concentrações de glicose na atividade tirosina quinase do receptor de insulina ( ATQRI ), sendo este estudo dividido em 2 etapas: na primeira foi realizado um estudo "*in vivo*", em pacientes diabéticos tipo 2, tratados com sulfoniluréia, que apresentavam diferentes controles glicêmicos e na segunda, um estudo "*in vitro*", em cultura de fibroblastos de camundongo, células NIH 3T3. Além disto, verificamos também "*in vitro*" o efeito do cloridrato de metformina na atividade tirosina quinase do receptor de insulina.

No estudo "*in vivo*", os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com o seu controle glicêmico, considerando-se um grupo em bom controle glicêmico (GI), no qual os pacientes apresentavam glicemias de jejum variando entre 5,0 a 9,0mM, e o outro grupo em mau controle (GII), com glicemias de jejum entre 9,1 a 15,0mM, como demonstrado na Figura 1. Foram considerados também, como padrão para controle glicêmico, os valores da glicohemoglobina, cuja média foi normal para o grupo GI e aumentada para o grupo GII, respectivamente ( 7.0 %  $\pm$  0.17 e 11.4 %  $\pm$  0.73 ), como mostra a Figura 2. Todos os pacientes foram submetidos a tratamento com sulfoniluréia.

A análise dos resultados mostrou que, embora o número de receptores de insulina, isolados dos eritrócitos não tenha sido diferente entre os 2 grupos de pacientes, houve tendência a ser maior no grupo com glicemias menores (GI), embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa,  $p=0,06$ , conforme demonstrado na Figura 3. A constante de dissociação do hormônio ao receptor ( $K_d$ ) foi semelhante entre os grupos, sugerindo que a afinidade da insulina ao receptor não foi diferente entre os mesmos.

A atividade tirosina quinase estimulada pela insulina, de receptores de insulina ( $V_{max}$ ) dos pacientes diabéticos tipo 2 do grupo com bom controle glicêmico, foi maior do que a do grupo com mau controle glicêmico, sendo esta diferença estatisticamente significativa  $p=0.01$ , Figura 4.

Estes dados sugerem que as concentrações de glicose no plasma dos pacientes interferiram na atividade do receptor de insulina, de tal forma que quanto maior a concentração de glicose, menor a atividade tirosina quinase. Isto foi demonstrado tanto na atividade independente ao estímulo insulínico, que é a atividade basal ( $V_{basal}$ ), como na atividade estimulada pela insulina ( $V_{max}$ ).

Estes dados não são concordantes com GRUNBERGER e col (62) que estudaram ATQRI de eritrócitos de pacientes com diabetes tipo 2 tratados com sulfoniluréia, não encontrando diferença entre pacientes tratados e não tratados. A discordância entre os resultados de GRUNBERGER (62) e os do presente estudo se devem a vários fatores : os pacientes de GRUNBERGER foram tratados durante apenas um mês com sulfoniluréia, enquanto que os pacientes do presente estudo encontravam-se há pelo menos 6 meses em tratamento; os pacientes de GRUNBERGER não eram homogêneos em relação ao controle glicêmico e não foram agrupados de acordo com o mesmo, como os pacientes do presente estudo. Nota-se também no estudo de GRUNBERGER que os pacientes não foram selecionados de acordo com o índice de massa corpórea , desta forma compondo um grupo heterogêneo de pacientes com peso normal, pacientes obesos e com sobrepeso. A consideração do peso dos pacientes é

importante, tendo em vista os resultados dos estudos de OLEFSKY (55) em adipócitos e de SANTOS e cols em eritrócitos (39) que demonstram que a superposição de obesidade ao diabetes interfere na função do receptor de insulina.

Os resultados deste estudo estão de acordo, entretanto com os de MULLER e cols (45) que utilizaram como modelo adipócitos de ratos, BERTI e cols (57) que utilizaram fibroblastos de ratos transfectados com receptor de insulina humano e demonstraram que a hiperglicemia reduziu a atividade tirosina quinase do receptor de insulina destas células.

Os resultados do presente estudo sugerem o efeito inibidor que a glicose exerce sobre a função do receptor de insulina, de tal forma que variações nos níveis glicêmicos podem estar relacionadas às variações na função do receptor, podendo contribuir para um estado de resistência à insulina.

Tendo em vista que no estudo do receptor de insulina "*in vivo*" há uma série de variáveis presentes, que podem interferir na função do receptor de insulina, fica difícil interpretar isoladamente o efeito da glicose sobre a mesma. Com o objetivo de investigar isoladamente o efeito da glicose sobre a ATQRI, desenhamos estudos "*in vitro*" com células NIH 3T3. Em contrapartida, com o objetivo de também testar o modelo escolhido de forma antagônica à da glicose, desenhou-se um estudo "*in vitro*", utilizando-se uma substância que sensibiliza o efeito da insulina, que é o cloridrato de metformina.

O estudo do efeito da glicose na atividade de fosforilação do receptor de insulina foi realizado submetendo-se as células NIH 3T3 a meios de cultura com duas concentrações diferentes de glicose, 16mMol/L (G16mM) e 25mMol/L (G25mM) durante períodos de 24 e 48 horas. Foi observado que a atividade de fosforilação endógena (V<sub>basal</sub>) do receptor não foi diferente diante das duas concentrações de glicose, em ambos os períodos de incubação, Tabela 5.



Por outro lado, a ATQRI estimulada pela insulina ( $V_{max}$ ), após 24 horas de incubação, foi menor no grupo G25mM, mas não no grupo G16mM, que apresentou valores semelhantes ao grupo controle como demonstrado na Figura 6a.

Após 48 horas de incubação, tanto no grupo G16mM quanto no G25mM, o  $V_{max}$  foi menor do que no grupo controle, sugerindo que o efeito inibitório na fosforilação do receptor foi dependente do tempo de exposição e da concentração de glicose no meio de cultura ao qual as células foram submetidas.

Estes dados sugerem que quanto maior a concentração de glicose, maior o efeito inibitório na ATQRI de células NIH 3T3. As células submetidas durante um período maior às concentrações menores de glicose, também apresentaram redução da ATQRI do receptor. Estes resultados foram reproduzidos na autofosforilação conforme o auto- radiograma, demonstrado na Figura 7 e Tabela 7.

Os resultados obtidos estão de acordo com os de FRITTITA e cols (26) que estudaram músculo esquelético e tecido adiposo, com os de MULLER e cols (45) que estudaram adipócitos de rato e com os de IDE e cols (58) que estudaram fibroblastos de rato que expressavam o receptor de insulina humano, todos demonstrando o efeito inibitório da glicose sobre a ATQRI. Estes autores verificaram que esta inibição foi decorrente da ativação de diferentes isoformas de proteína quinase C, que estimulam a fosforilação dos resíduos serina do receptor de insulina, que por sua vez inibem a fosforilação em tirosina. HARING e col (59) e TAKAYAMA e col (18) demonstraram a inibição da ATQRI em estudos "*in vitro*" utilizando adipócitos tratados com ésteres de forbol, que agem ativando a proteína quinase C (PKC).

Em estudos anteriores (39), verificou-se que pacientes diabéticos tipo 2, apresentaram aumento da ATQRI após o tratamento com o cloridrato de metformina, entretanto, como houve também melhora da glicemia após o tratamento, não se pode concluir se o aumento da atividade tirosina quinase foi

decorrente do efeito direto da metformina sobre o receptor ou se foi devido à redução da glicemia.

No presente estudo, investigamos o efeito isolado do cloridrato de metformina em receptores de insulina de fibroblastos de camundongos, com o objetivo de melhor compreender a ação desta substância no mecanismo de ação da insulina.

O estudo do efeito do cloridrato de metformina em diferentes tempos (1, 6 e 12 horas), sobre a ATQRI de células NIH 3T3, demonstrou que na concentração de 10 $\mu$ g/ml, o cloridrato de metformina estimulou significativamente a ação da insulina na atividade tirosina quinase após 6 e 12 horas de incubação, porém não após 1 hora de incubação, Tabela 8 e Figura 8. Estes dados sugerem que o efeito da metformina sobre o receptor de insulina é dependente do tempo de exposição do receptor à mesma.

Verificou-se ainda que não houve diferença entre os valores da atividade tirosina quinase estimulada pela insulina, quando se comparou 6 e 12 horas de incubação, sugerindo que a metformina, após atingir sua ação máxima, manteve este efeito durante pelo menos 12 horas.

Estes resultados são concordantes com o estudo anterior com pacientes obesos não diabéticos, tratados com metformina (47), no qual foi demonstrado que após o tratamento houve aumento da ATQRI de eritrócitos desses pacientes e este aumento esteve associado a níveis de glicemias semelhantes antes e após o tratamento e houve também redução das concentrações de insulina plasmática após o tratamento. Estes resultados sugerem que o cloridrato de metformina estimulou a ATQRI, com conseqüente aumento da sensibilidade insulínica e redução da insulinemia plasmática.

Outros estudos, tanto "*in vitro*" como em animais de laboratório, demonstraram o efeito da metformina no receptor de insulina. ROSSETTI e col. (38), utilizando adipócitos de ratos diabéticos por estreptozotocina, demonstraram

o aumento da atividade tirosina quinase dos receptores de insulina após o tratamento com metformina.

BRADLEY e cols (60) em estudo *"in vitro"*, utilizando *"Oocitos de Xenopus"* também observaram o aumento da atividade tirosina quinase do receptor após o tratamento das células com o cloridrato de metformina.

Por outro lado, autores como JACOBS e cols (61) são discordantes, por não terem demonstrado o efeito da metformina na fosforilação do receptor de insulina de adipócitos de ratos não diabéticos. A discordância destes resultados está relacionada às diferenças metodológicas, como, por exemplo, ao curto período de tempo de exposição das células ao cloridrato de metformina.

Os resultados do presente estudo sugerem que a hiperglicemia modula a atividade de fosforilação do receptor de insulina de pacientes com diabetes tipo 2 e este efeito é inibitório e diretamente dependente da concentração de glicose no plasma.

Os resultados do estudo com células NIH 3T3 demonstram de forma mais clara o efeito da glicose sobre o receptor de insulina e, são concordantes com os resultados do estudo em pacientes diabéticos.

No estudo *"in vitro"*, com células NIH 3T3, observa-se que o efeito inibitório da glicose sobre o receptor de insulina é dependente primeiramente da concentração e depois do tempo de exposição da célula à glicose.

Vários estudos têm demonstrado o efeito da metformina em suprimir a produção hepática de glicose em pacientes diabéticos; neste estudo ficou demonstrado, que o cloridrato de metformina estimulou diretamente a fosforilação do receptor de insulina, sendo portanto uma substância que sensibiliza a ação da insulina na célula.

## 6 CONCLUSÕES

- 1- A atividade tirosina quinase estimulada pela insulina de receptores isolados de eritrócitos de pacientes diabéticos tipo 2, tratados com sulfoniluréia, foi maior no grupo com menores concentrações plasmáticas de glicose.
- 2- A glicose reduziu a atividade tirosina quinase estimulada pela insulina de receptores de células NIH 3T3. Este efeito inibitório foi diretamente relacionado às concentrações de glicose do meio e ao tempo de exposição das células à glicose.
- 3 - O cloridrato de metformina estimulou a atividade tirosina quinase estimulada pela insulina de receptores de células NIH 3T3 e este efeito foi dependente do tempo de exposição das células à substância.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- OYER PE, CHO S, PETERSON J D, STEINER D F.: Studies on human proinsulin isolation and amino acid sequence of the pancreatic C-peptide. *J. Biol. Chem*, 246:1375-1386,1971.
- 2- CHANCE RE, ELLIS RM, BROMER WW.: Porcine proinsulin characterization and amino acid sequence. *Science*, 161:1615-1617,1968.
- 3- FREYEHED P, ROTH J, NEVILLE DM JR: Insulin receptors in the liver: specific binding of [<sup>125</sup>I] insulin bioactivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68:1833-1837, 1971.
- 4- CUATRECASAS P.: Insulin-receptor interactions in adipose tissue cells: direct measurement and properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:1264-1268,1971.
- 5- KAHN C. R.: Insulin action, diabetogenes , and the cause of type II diabetes. *Diabetes*: 43, 8, 1066 –1084,1994.
- 6- KASSUGA M , KICK Y, BLITHE DL,KARLSSON F A, HARING HU,KAHN CR: Insulin-stimulation of phosphorylation of the subunit of the insulin receptor: formation of both phosphoserine and phosphotyrosine. *J Biol. Chem* 257:9891-94,1982.

- 7- O'HARE T, PILCH PF: Intrinsic kinase activity of insulin receptor. internalization. *J Biochem* 22:315-24,1990.
- 8- KAHN C.R. & GOLDFINE A. B.: Molecular determinants of insulin action. *J.Diab.Comp.* 7:92-105,1993.
- 9- KASSUGA M, HEDO JA, YAMADA KM, KAHN CR : The structure of insulin receptor and its subunits: evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *J Biol. Chem.*257:10392-10399,1982.
- 10- KASSUGA M, KARLSSON FA, KAHN CR : Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* 215:185-187,1982.
- 11- ROSEN OM: After insulin binds. *Science* 237:1452-1458, 1987.
- 12- ROSEN OM, HERRERA R, OLLOWE Y, PETRUZZELLI LM, COBB M: Phosphorylation activates the insulin receptor protein tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3237-40,1983.
- 13- SAAD MJA, ARAK E, MIRALPEIX M, ROTHENBERG PL, WHITE MF, KAHN CR: Regulation of insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Invest* 92:2065-2072,1993.
- 14- WHITE MF, TAKAYAMA S, KAHN CR: Differences in the sites of phosphorylation of the insulin receptor in vivo and in vitro. *J Biol. Chem.* 260:9470-9478, 1985.

- 15- FEENER EP, BECKER JM, KING GL, WILDEN PA, SUN XJ, KAHN CR, WHITE MF,: Insulin stimulates serine and tyrosine phosphorylation in the juxtamembrane region of the receptor. *J Biol Chem* 268:11256-11264, 1993.
- 16- HERRERA R, ROSEN OM : Autophosphorylation of the insulin receptor in vitro: designation of phosphorylation sites and correlation with receptor kinase activation. *J.Biol.Chem.* 261:11980-11985,1985.
- 17- CZECH MP, YU KT, LEWIS RE, DAVIS RJ, MOTTOLA C, MACDONALD RG, NECESSARY PC, CORVERA S: Insulin receptor kinase and its mode of signaling membrane components. *Diab Metab Rev* 1:33-54, 1985.
- 18- TAKAYAMA S, WHITE MF, KAHN CR: Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 263:3440-3447, 1988.
- 19- WHITE, M.F. AND KAHN C.R.: The insulin signaling system. *J Biol. Chem* 269:1-4, 1994.
- 20- MAEGAWA H, MCCLAIN D, FREIDNEBERG G, OLEFSKY J, NAPIER M, LIPARI T, DULL T, LEE J, ULLRICH A : Properties of a human insulin receptor with a COOH-terminal truncation. II. Truncated receptors have normal kinase activity but are defective in signaling metabolic effects. *J Biol Chem* 263, (38) 8912-8917, 1988.
- 21- SCHALLER MD, BORGMAN CA, COBB BS, VINES RR, REYNOLDS AB, PARSONS JT: pp125FAK, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5192-5196, 1992.

- 22- DUNAIF A., XIA J., BOOK C.B., SCTHER S. AND TANG Z.: Excessive insulin receptor serina phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. *J Clin. Invest.*,96: 801-810,1995.
- 23- TAKAYAMA S, KAHN CR, KUBO K, FOLEY J: Alteration in insulin receptor autophospholation in insulin resistence:correlation with altered sensitivity to glucose tranport and lipolysis to insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 66:992-99,1988.
- 24- CARO JF, SINHA MK, RAJU SM, ITTOP O, PORIES WJ, FLICKINGER EG, MEELHEIN D, DOHM GL: Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with or without diabetes. *J Clin Invest* 79:1330-30,1987.
- 25- MAEGAWA H, HIGETA Y, GAWA K, KOBAYASHI M: Impaired autophosphorylation of insulin receptors from abdominal skeletal muscle in non-obese subjects with NIDDM. *Diabetes* 40:815-19,1991.
- 26- FRITTITA L., SPAMPINATO D., SOLINI A., NOSADINI R. GOLDFINE I.D., VIGNERI R. AND TRISCHITTA V.: Elevated PC-1 content in cultured skin fibroblasts correlates with decreased in vivo and in vitro insulin action in nondiabetic subjects. *Diabetes* 47: 1095-1100,1998.
- 27- CARO J F, SINHA M K, RAJU S M, ITTOOP I , PORIES W J, FLICKINGER E G, MEELHEIM D, DOHM G L: Studies on the mechanism of insulin resistance in the liver from humans with non insulin-dependent diabetes: Insulin action and binding in isolated hepatocytes,insulin receptor structure,and kinase activity. *J Clin Invest* 78:249-258,1986.



- 28- SANTOS R F, PALMIERI M G, WAJCHENBERG B L, REAVEN G M, AZHAR S. Insulin receptor tyrosine kinase activity is decreased in Erythrocytes from non-obese patients with NIDDM. *Hormone and Metabolic Research* 26, 6, 283 – 287, 1994.
- 29- MOLLER D. E, O COHEN, Y. YAMAGUSHI, F. GRIGORESCU, J S FLIER.: Prevalence of mutations in insulin receptor gene in subjects with features of the type A syndrome of insulin resistance. *Diabetes* 43, 2, 247-255, 1994.
- 30- HARING HU, KIRSCH D, OBERMAIER B, ERMEL B, MACHICAO F.: Decreased tyrosine kinase activity of insulin receptor isolated from rat adipocytes rendered insulin resistant by catecholamine treatment in vitro. *Biochem J* 234:59-66, 1986.
- 31- HARING HU, KIRSCH D, OBERMAIER B, ERMEL B, MACHICAO F.: Tumor promoting phorbol esters increase the Km of the ATP-binding site of the insulin receptor kinase from rat adipocytes. *J Biol Chem* 261:3869-3875, 1986.
- 32- KLEIN HH, CIARALDI TP, FREIDENBERG GR, OLESFSKY JM.: Adenosina modulates insulin activation of insulin receptor kinase in intact rat adipocytes. *Endocrinology* 120:2339-2345, 1987.
- 33- CARO JF, CECCHIN F, FOLLI F, MARCHINI C, BINHA MK.: Effect of T&D3 primary cultures of rat hepatocytes. *Horm Metab Res* 20:327-332, 1988.
- 34- KELLERER M, HARING H.U. Pathogenesis of insulin resistance: modulation of the insulin signal at receptor level. *Diabetes Res Clin Pract.* Aug. 28 Suppl P S173-177, 1995.

- 35- HÄRING H.U , KELLERER M , MOSTHAF L. Modulation of insulin receptor signalling : significance of altered receptor isoform patterns and mechanism of hyperglycemia-induced receptor modulation . *Diabetologia*. Sep. 37 Suppl 2P S149-54, 1994.
- 36- KRODER G., BOSSENMAIER B. KELLERER M., CAPP E., STOYANOV B., MÜHLHÖFER A., BERTI L., HORIKOSHI H., ULLRICH A., AND HÄRING H.: Tumor necrosis factor-  $\alpha$  and hyperglycemia-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 97: 1471-1477,1996.
- 37- GRIGORESCU F., LAURENT A , CHAVANIEU A , CAPONY J P.: Cellular mechanism of metformin action. *Diabete Metabol* 17 : 146-149,1991.
- 38- ROSSETTI L , DE FRONZO RA, GHERZI R , STEIN P , CORDERA R . Effect of metformin treatment on insulin action in diabetic rats. In vivo and in vitro correlations. *Metabolism*, 39: 425-435, 1990.
- 39- SANTOS R F , NOMIZO R , WAJCHENBERG B L , REAVEN G M, AZHAR S.: Changes in Insulin receptor tyrosine kinase activity associated with metformin treatment of diabetes type 2. *Diabete & Metabolisme* , 21, 1-7, 1995.
- 40- HANSEN T., C, BJORBAEK, K GRONSKOV, J F BAK, PEDERSEN O.: Expression of Insulin Receptor Spliced Correlates in muscle from patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J. Clin Endocr and Metabolism*, 1994 77: 1500-1505, 1994.
- 41- WU M S , JOHNSTON P , SHEU W H , HOLLENBECK C B , GOLDIFINE I D , REAVEN G M . Effect of metformin on carbohydrate and lipoprotein metabolism in NIDDM. *Diabetes Care*, 13 : 1 – 8, 1990,.

- 42- KEIN H H, FREIDENBERG G R, KLADDE M, OLEFSKY J M: Insulin activation of insulin receptor tyrosine kinase in intact rat adipocytes:an in vitro system to measure histone kinase activity of insulin receptors activated in vivo. *J Biol Chem* 261:1842-47,1986.
- 43- WHITE MF, SHOELSON SE,KEUTMANN II, KAHN CR: A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the insulin receptor. *J Biol Chem* 263:2969-2980, 1988.
- 44- SANTOS R.F., MONDON C.E., REAVEN G.M. AZHAR S. : Effects of exercise training on the relationship between insulin binding and insulin -stimulated tyrosine kinase activity in rat skeletal muscle: *Metabolism*, vol 38,N° 4,376-386,1989.
- 45- MÜLLER, H.K.; KELLERER,M.; ERMEL,B.; MÜHLHÖFER,A; OBERMAIER-KUSSER,B.; VAGT,B.; and HÄRING,H.U.: Prevention by protein kinase C inhibitors of glucose-induced insulin-receptor tyrosine kinase resistance in rat fat cells. *Diabetes* 40:1440-48,1991.
- 46- GRIGORESCU,F., WHITE,F.M,KAHN,R C: Insulin binding and insulin-dependent Phosphorylation of the Insulin Receptor solubilized from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*,258,22,13708-13716,1983.
- 47- SANTOS, R.F. , NOMIZO R. , BOSCO A. , WAJCHENBERG B. L. , REAVEN G. M. , AZHAR S. . Effect of metformin on insulin - stimulated tyrosine kinase activity of erythrocytes from obese women with normal glucose tolerance. *Diabete & Metabolisme*, 23 , 143 – 148,1997.

- 48- BOYUM A: A one stage procedure for isolation of granulocytes and linfocytes from human blood: general sedimentation sedimentation properties of while blood cells in a 1g gravity field. *Scand J Clin Lab Invest* 21(Suppl.97);51-76,1968.
- 49- STECK,T,L, WEINTEIN,R S, STRAUS,J H,AND WALLACH,D F H :Insid-out red cell membrane vesicles: preparation and purification. *Science* 168,255-257,1970.
- 50- BRADFORD M M A: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248 - 254,1976.
- 51- LAEMMLI UR: Cleavage of structural proteins durang the assembly of the head of bacteriophage T4 . *Nature* 227:680-685,1970.
- 52- BRAUN,S. , RAYMOND,W.E., AND RACKER,E.: Synthetic tyrosine polimers as substrates and inhibitors of tyrosines specific protein - kinases : *J. Biol. Chem.*,259, 2051-205,1984.
- 53- SCATCHARD G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci*, :51, 660-672,1949.
- 54- LERNMARK A: Insulin dependent (type 1) diabetes etiology, pathogenesis and natural history. In: *De Groot IJ (ed) Endocrinology,3<sup>rd</sup> ed.*,W.B.Saunders Co. Philadelphia, 1423-1435,1995.
- 55- OLEFSKY JM: Diabetes mellitus (type2): etiology and pathogenesis and natural history. In: *De Groot IJ (ed) Endocrinology,3<sup>rd</sup> ed.*,W.B.Saunders Co. Philadelphia, 1436-1463,1995.

- 56- TURNER RC, CULL CA, FRIGHI V, HOLMAN RR.: Glycemic control whit diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requerement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) group. *JAMA* 2;281 (21):2005-12, 1999.
- 57- BERTI L, MOSTHAF L, KRODER G, KELLERER M, TIPPMER S, MUSHACK J, SEFFER E, SEEDORF K, AND HARING HU.: Glucose-induced translocation of protein kinase C isoforms in rat fibroblasts is paralleled by innhibition of the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 269:3381-3386, 1994.
- 58- IDE,R, MAEGAWA, H. KASHIWAGI, A.; KIKKAWA R, SHIGETA Y.: High glucose condition desensitizes insulin action at the levels of receptor kinase. *Endocrine J* 42:1-8,1995.
- 59- HARING HU, MEHNERT H.: Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus:candidates for signal transmitter defect causing insulin resistance of skeletal muscle *Diabetologia* 36:176-182, 1993.
- 60- BRADLEY J STITH, MARC L GOALSTONE, RONALD ESPINOZA, CORI MOSSEL, DAWN ROBERTS, AND NICHOLAS WIERNSPERGER. : The antidiabetic drug metformin elevates receptor Tyrosine kinase Activity and Inositol 1,4,5-Triphosphate Mass in *Xenopus* oocytes. *Endocrinology* , 137 : 2990-2999, 1996.
- 61- JACOBS,D.B.; HAYES,G.R.;TRUGLIA,J.A. and LOCKWOOD D.H.: Effects of metformin on insulin receptor tyrosine kinase activity in rat adipocytes. *Diabetologia* 29:798-801,1986.

- 62- GRUMBERGER, G.: Insulin and IGF receptor function among type II diabetic responders and nonresponders to glyburide. *J Lab Clin Med* 121:4, 555-561,1993
- 62- DONNELLY R., M. J. REED, S. AZHAR, G M REAVEN . Expression of the major isoenzyme of pretein kinase c in skeletal muscle , nPKC , varies with the muscle type and in response to fructose induced insulin resistance. *Endocrinology*, 135, 2369-2374, 1994.
- 63-SZTALRYD,C ., S. AZHAR,G.M. REAVEN : Differences in insulin action as a function of anatomical sites of newly differentiated adipocytes obtained in primary culture. *J.Clin. Invest.* 88 : 1629 -1635,1991.
- 64- HEDO JA, HARRISON LC, ROTH J, : Binding of insulin receptor to lectins: Evidence for commoon carbohydrate determinants on several membrane receptors. *Biochemistry* 20:3385-3392, 1981.
- 66- VOGT,B. ;MUSHACK,J.;SEFFER,E.;HARING, H.U. : The translocation of the glucose transporter subtypes Glut 1 and Glut 4 in isolated fat cells is differently regulated by phorbolsters. *Biochem J* 275: 597-600, 1991.
- 67- MATTHAEL,S; REIBOLD,JP; HAMANN,A; BENECKE H; GRETEN H AND KLEIN H.H.: In vivo metformin tretment ameliorates insulin resistance: Evidence for potentiation of insulin-induced translocation and increased function activity of glucose transporters in obese (fa/fa) Zucker rat adipocytos. *Endocrinology* 133:304-311,1993.
- 68- BRADLEY.J.S.; WORONOFF K., and WIERNSPERGER N.: Stimulation of the intracelular portion of human insulin receptor by the antidiabetic drug metformin. *Biochemical Pharmacology* 55:533-536,1998.

- 69- KELLER,M.; SEFFER,E; MUSHACK,J;OBERMAIER-KRUSSE,B. ; HARING, H.U. TPA inhibits insulin stimulated PIP-I-hydrolysis in fat cell membranes: evidence for modulation of insulin dependent phospholipase C by protein kinase C. *Biochem Biophys Res. Commun.* 172:446-454,1990.
- 70- DOMINGUEZ L J, DAVIDOFF A J, SRINIVAS P R, STANDLEY P, WALSH MF AND SOWERS JR.: Effects of metformin on tyrosine kinase activity, glucose transport, and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. *Endocrinology* 137:113-121, 1996.
- 71- REAVEN G. M.: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, December, 37, 12, 1595 –1607,1988.