

***MARCO ANTÔNIO DE CARVALHO FILHO***

**S-Nitroação:**  
um novo mecanismo de resistência à insulina

***CAMPINAS***

***2005***

**MARCO ANTÔNIO DE CARVALHO FILHO**

**S-Nitroação:**  
um novo mecanismo de resistência à insulina

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica  
Médica, área de concentração em Clínica Médica*

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

**CAMPINAS**

**2005**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C253s

Carvalho Filho, Marco Antonio

S-Nitrosação: um novo mecanismo de resistência à insulina. /  
Marco Antonio de Carvalho Filho. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Mário José Abdalla Saad

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas.

1. Óxido nítrico. 2. Resistência à insulina. 3. Obesidade. 4.  
Diabetes Mellitus Tipo II. 5. Receptor de Insulina. 6. Substrato 1 do  
receptor de insulina. 7. Endotoxemia. I. Saad, Mário José Abdalla.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências  
Médicas. III Título.

(Slp/fcm)

---

**Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado**

---

---

**Orientador(a): *Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad***

---

---

**Membros:**

---

1. Prof. Dr. Milton de Arruda Martins \_\_\_\_\_

2. Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo \_\_\_\_\_

3. Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo \_\_\_\_\_

4. Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero \_\_\_\_\_

---

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data:**

---

## ***DEDICATÓRIA***

*Ao meu avô Domingos Guedes, que sempre procurou me ensinar o valor do trabalho, da dignidade e do amor ao próximo. Aos meus pais, por terem continuado sua obra.*

## *AGRADECIMENTOS*

---

A entrada na universidade foi para mim um momento de certa decepção. Inicialmente não encontrei no ambiente universitário o que procurava: a busca pela excelência, o desejo de conhecer, a liberdade para procurar. Até que no quarto ano de faculdade comecei a frequentar o laboratório do Prof. Mário Saad. Aqui encontrei guarida e incentivo. E voltei a acreditar na possibilidade de trabalhar em conjunto, buscando conhecer, e aplicar o conhecimento obtido na construção de uma sociedade mais justa. Gostaria de deixar registrado o meu agradecimento a este grupo de pessoas, que participaram ativamente da minha formação.

Ao professor Mário Saad, que além de ciência me ensinou humanidade, e a necessidade destes dois substantivos estarem juntos. Que me ensinou também que o prazer do caminho deve estar no caminhar. E que criou este ambiente fecundo, onde pessoas que gostam de estudar podem, com criatividade e autonomia, encontrar seu espaço.

Ao professor Lício, que me ensinou a forma discreta de exercer o conhecimento. E o quanto esta forma de conhecer pode construir, mesmo que em silêncio.

Ao professor Gontijo, que nos primeiros anos da iniciação científica me ensinou os segredos da bancada, e sempre me ofereceu a sua sincera amizade.

Ao amigo José Barreto, que me mostrou o quanto perito deve ser o conhecer.

Ao professor Marcelo, e ao professor Rui Curi, que abriram as portas de seus respectivos laboratórios para estes experimentos.

Ao professor J. Pinto, que ainda no segundo grau, em suas aulas de laboratório de física, despertou em mim a curiosidade científica.

Aos amigos Wilson Nadruz e Roberto Amazonas pela paciência nos momentos de infortúnio científico.

Aos colegas pós-graduandos, e alunos de iniciação científica, pela alegria do ambiente de trabalho.

Aos funcionários do laboratório e do Núcleo de Medicina Experimental, em particular ao Sr Márcio Alves da Cruz, cujos préstimos foram indispensáveis para realização deste trabalho.

	<i>PÁG.</i>
<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1- Obesidade como fator de risco para DM tipo 2</b> .....	18
<b>1.2- Mecanismos moleculares da ação insulínica</b> .....	20
<b>1.3- Mecanismos moleculares de resistência à insulina</b> .....	21
<b>1.4- Obesidade como doença inflamatória</b> .....	23
<b>1.5- A iNOS é uma proteína da via inflamatória e está relacionada à resistência à insulina</b> .....	26
<b>1.6- S-nitrosação: um mecanismo de regulação pós-translacional relacionado ao NO produzido a partir da ativação das NO-sintases</b> .....	28
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	33
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
<b>3.1- Fluorimetria</b> .....	36
<b>3.2- Biotinilação de Nitrosotiois</b> .....	39
3.2.1- Extração Tecidual.....	40
3.2.2- Bloqueio das Cisteínas livres (S-H) .....	40
3.2.3- Biotinilação dos nitrosotiois.....	40
3.2.4- Separação das proteínas biotiniladas.....	41
3.2.5- Preparação das amostras para eletroforese.....	41
<b>3.3- Imunoprecipitação com ANTI-SNO</b> .....	42
<b>4- RESULTADOS</b> .....	43
<b>5- DISCUSSÃO</b> .....	75
<b>6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	86



Akt – Proteína quinase B/Akt

Cbl – produto do proto oncogene Cbl

CYSNO – Nitroso-cisteína

DAN - Diaminonaftaleno

db/db – camundongo obeso e diabético com mutação no gene de receptor de leptina

eNOS/NOS 3 (*Endothelial Nitric Oxide Synthase*) – Óxido Nítrico Sintase Endotelial

Gab 1 (*Grb2-Associated Binder-1*) – proteína que se associa ao Grb 2

GLUT 4 – Transportador de glicose 4

GSNO – Nitroso-glutationa

HDL(*High Density Lipoprotein*) – lipoproteína de alta densidade

HIF (*Hypoxia Induced Factor*) – Fator Induzido por Hipóxia

IKK (*IkappaB kinase*) – Complexo enzimático com atividade serina-quinase

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1  $\beta$

IL-6 – Interleucina 6

iNOS/NOS 2 (*Inducible Nitric Oxide Synthase*) – Óxido Nítrico Sintase Induzível

IR $\beta$  (*Insulin Receptor  $\beta$* )– Subunidade  $\beta$  do receptor de insulina

IRS 1/2 (*Insulin Receptor Substrate 1/2*) – Substratos 1 e 2 do receptor de insulina.

Jnk 1 – c-jun N-terminal quinase 1

LPS – Lipopolissacáride

NAT – Naftriazol

NF $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa B*) – Fator de transcrição kappa B.

nNOS/NOS 1 (*Neuronal Nitric Oxide Synthase*) – Óxido Nítrico Sintase Neuronal

NO – Óxido Nítrico

NO<sup>+</sup> - Nitrosonium

N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – Trióxido de dinitrogênio

NO<sub>2</sub> – Dióxido de Nitrogênio

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Superóxido

ob/ob – Camundongo obeso com mutação no gene da leptina

ONOO<sup>-</sup> - Peroxinitrito

PI 3 quinase – Fosfatidil-inositol 3 quinase

PKC – Proteína Quinase C

PTP 1B (*Protein Tyrosine Phosphatase 1 B*) – Proteína Tirosina Fosfatase 1B

S-H – Grupamento tiol

SH2 (*Src Homology 2*) – Domínios protéicos com homologia ao proto oncogene Src2

Shc (*Src Homologys and Collagen Homology*) – Substrato do receptor de insulina

S-NO – Grupamento nitroso-tiol

TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

*RESUMO*



Evidências recentes implicam a indução da NO-sintase induzível (iNOS) no desenvolvimento de resistência à insulina associada à obesidade e endotoxemia. A indução da iNOS está associada ao aumento da produção de NO, que vem se mostrando um importante sinalizador intra-celular, modificando a função proteica por diversos mecanismos, incluindo Nitrosilação, Nitração e S-nitrosação. A S-nitrosação ocorre pela adição de um grupamento NO ao radical tiol (S-H) de um resíduo de cisteína, formando um nitrosotiol (S-NO). Neste estudo, investigamos se drogas doadoras de NO, Nitrosoglutatona (GSNO) ou Nitrosocisteína (CISNO), e a própria indução da iNOS seriam capazes de provocar S-nitrosação e com isso modificar a função de proteínas envolvidas na via de sinalização insulínica.

A insulina inicia suas ações intra-celulares após a ligação à subunidade  $\alpha$  do seu receptor transmembrana, o que provoca mudança conformacional e consequente auto-fosforilação da subunidade  $\beta$ , o que ativa sua capacidade tirosina-quinase. Ocorre, então, associação e fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), que uma vez fosforilado, se associa e ativa a fosfatidil inositol 3 quinase (PI 3 quinase), passo fundamental para a ativação da Akt, serina-quinase que modula tanto ações metabólicas quanto de crescimento desencadeadas pela insulina.

Neste estudo demonstramos que tanto GSNO quanto CISNO foram capazes de provocar resistência à insulina, tanto em músculo isolado, quanto em animais intactos. Esta resistência foi associada a menor sinalização de insulina pela via  $IR\beta$ /IRS-1/Akt. Após o tratamento com GSNO ou CISNO de músculo isolado ou de animais intactos, observamos S-nitrosação da subunidade  $\beta$  do receptor de insulina, o que provocou menor auto-fosforilação e menor atividade tirosina-quinase após estímulo com insulina. Observamos também S-nitrosação do IRS-1, e após o tratamento crônico com droga doadora, os níveis teciduais desta proteína estavam diminuídos. A Akt também foi alvo de S-nitrosação, que aconteceu em paralelo com a perda de sua capacidade serina-quinase, tanto basal, quanto estimulada por insulina.

Observamos indução da iNOS em três modelos de resistência à insulina, na obesidade induzida por dieta hiperlipídica, no camundongo diabético ob/ob e na endotoxemia

induzida pela infusão de LPS. Nestes três modelos, a sinalização de insulina pela via IR $\beta$ /IRS-1/Akt estava diminuída, e os níveis de S-nitrosação destas proteínas estava aumentado. Os níveis teciduais de IRS-1 também estavam diminuídos nos três modelos. O bloqueio da indução da iNOS por rosiglitazona no animal com obesidade induzida por dieta, ou por interferência na transcrição da iNOS no camundongo ob/ob, ou pela anulação do gene codificador da iNOS na endotoxemia induzida por LPS, diminuiu o desenvolvimento de resistência à insulina nestes modelos, e impediu a S-nitrosação destas proteínas. Portanto, a S-nitrosação de proteínas envolvidas na transmissão do sinal de insulina é um novo mecanismo molecular de resistência à insulina associado a indução da iNOS.

*ABSTRACT*



Evidence demonstrates that exogenous nitric oxide (NO) and the NO produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS) can induce insulin resistance in muscle. Here, we investigated whether this insulin resistance could be mediated by S-nitrosation of proteins involved in early steps of the insulin signal transduction pathway. Exogenous NO donated by S-nitrosoglutathione (GSNO) or by Nitrosocysteine (CYSNO) induced in vitro and in vivo S-nitrosation of the insulin receptor  $\beta$  subunit (IR $\beta$ ) and protein kinase B/Akt (Akt), and reduced their kinase activity in muscle. Insulin receptor substrate (IRS)-1 was also rapidly S-nitrosated, and its expression was reduced after chronic GSNO treatment. In three animal models of insulin resistance associated with enhanced iNOS expression – diet-induced obesity, the ob/ob diabetic mice and endotoxemia induced by LPS infusion – we observed enhanced S-nitrosation of IR $\beta$ /IRS-1 and Akt in muscle. Blocking iNOS induction in muscle by Rosiglitazone in diet-induced obesity, by iNOS anti-sense in ob/ob mice or by genetic knockout in endotoxemia reversed S-nitrosation of these proteins yielding an improvement in insulin action through this pathway. Thus, S-nitrosation of proteins related to insulin signal transduction is a novel molecular mechanism of iNOS-induced insulin resistance.

## *1- INTRODUÇÃO*

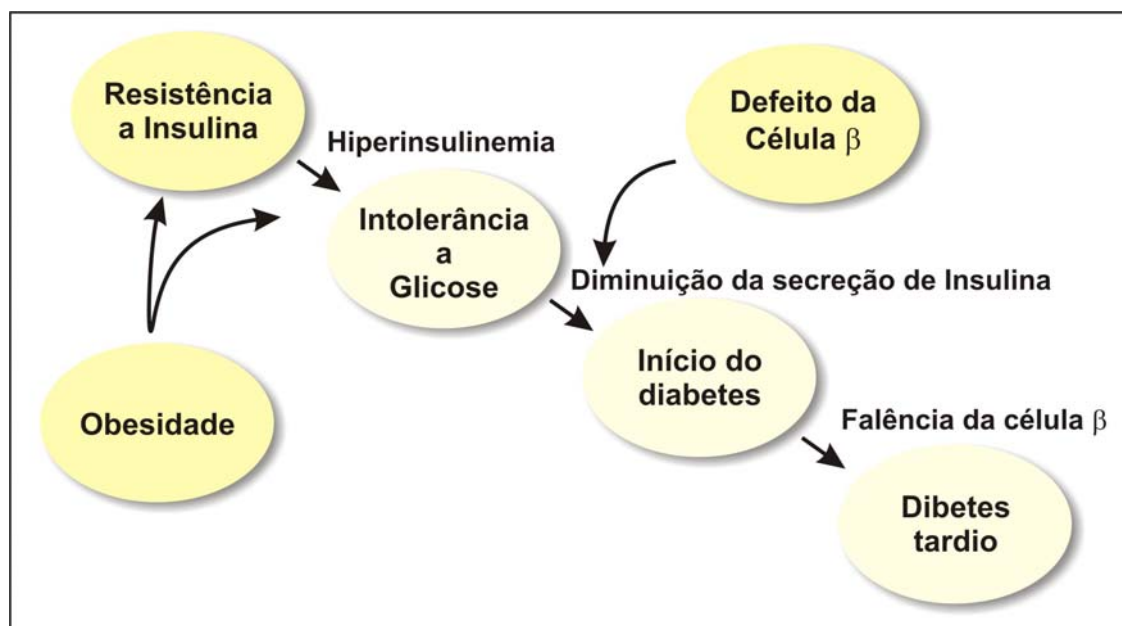


O Diabetes é uma doença metabólica cuja característica definidora é a hiperglicemia de jejum. Conhecida desde a antiguidade, somente no último século começamos a compreender sua etiopatogenia e fisiopatologia.

Desde a descoberta da insulina em 1922 por Banting e Best, um grande esforço tem sido feito para entender a fisiopatologia do Diabetes, doença de alta prevalência e morbi-mortalidade. Em 1936, Himsworth percebeu dois tipos principais de comportamento clínico dos pacientes diabéticos, o que futuramente permitiu a classificação dos pacientes portadores desta doença em dois grandes grupos principais (HIMSWORTH 1951). Em um deles, a administração de insulina exógena não era suficiente para controlar os níveis de glicemia. Neste grupo parecia haver uma perda de sensibilidade aos efeitos metabólicos da insulina. Esta idéia não foi bem recebida até o desenvolvimento do radioimunoensaio para dosagem de insulina em 1960 por Berson e Yalow (YALOW and BERSON 1960), que mostrou que nos pacientes com Diabetes de início tardio e muitas vezes associado à obesidade, os níveis plasmáticos de insulina são elevados. Esta idéia de resistência à insulina como mecanismo fisiopatológico básico do Diabetes tipo 2 foi consecutivamente comprovada por estudos de Roth (KAHN, FLIER et al. 1976), Reaven (OLEFSKY, FARQUHAR et al. 1973; REAVEN 1988) e Olefsky (KOLTERMAN, INSEL et al. 1980).

Hoje, entendemos que a resistência à insulina acontece em vários tecidos envolvidos com seus efeitos metabólicos (DEFRONZO 1988). Em tecido muscular há uma menor captação de glicose induzida por insulina. No fígado, há maior produção de glicose e gliconeogênese. No tecido adiposo, a captação de glicose está diminuída, mas os efeitos de hipertrofia continuam, contribuindo para o desenvolvimento da obesidade (KAHN 1994). No hipotálamo, há, ao menos em modelos animais, um também menor efeito anorexígeno deste hormônio (CARVALHEIRA, RIBEIRO et al. 2003). No entanto, o aparecimento clínico do Diabetes está relacionado a um evento posterior ao surgimento da resistência à insulina, que é a falência da célula  $\beta$  pancreática, que num determinado momento da evolução clínica do paciente perde a capacidade de compensar a resistência à insulina, com o aumento de sua secreção (LEVY, ATKINSON et al. 1998; MATTHEWS, CULL et al. 1998).

Vários estudos epidemiológicos, realizados em diferentes grupos populacionais, mostram que o Diabetes tipo 2 se desenvolve inicialmente pelo aparecimento de resistência à insulina, que precede a hiperglicemia, que só ocorre após a perda da capacidade de secreção de insulina (DE FRONZO 1988) (fig 1).



**Figura 1-** Estádios do desenvolvimento do DM Tipo 2.

Diferentes características epidemiológicas já foram relacionadas ao aparecimento de resistência à insulina, como envelhecimento, estilo de vida sedentário, história familiar e obesidade (HAMMAN 2002; RF 2002). Este último aparece como um fator de risco dos mais importantes devido à relação praticamente linear entre o ganho de peso e o aparecimento de resistência à insulina (OHLSON, LARSSON et al. 1985; COLDITZ, WILLETT et al. 1990). O entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da resistência à insulina é fundamental para o entendimento do Diabetes e para a busca de uma terapêutica eficaz.

## 1.1- Obesidade como fator de risco para DM tipo 2

Os mamíferos em geral, e a humanidade em particular, durante sua evolução tiveram de se adaptar aos tempos de privação energética e ao jejum prolongado. Desta forma, foram selecionados, ao longo do tempo, um genótipo com tendência ao acúmulo de energia, e um tecido especializado para esta tarefa, o tecido adiposo.

Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico, maior capacidade de produção de alimentos, e menor necessidade de gasto energético para obter o sustento, um novo problema surgiu. A maior disponibilidade de energia e a menor necessidade de gastá-la, associadas a este genótipo econômico levam a um acúmulo excessivo, e conseqüente obesidade.

A obesidade é definida clinicamente como ganho de peso, especialmente de tecido adiposo, capaz de provocar prejuízos para a saúde. Hoje, o mundo ocidental observa uma epidemia de obesidade, que se tornou sua doença metabólica mais comum, e um problema de saúde pública dos mais importantes, atingindo as diversas faixas etárias, inclusive crianças e adolescentes (KOPELMAN 2000).

Tanto em pacientes obesos quanto em modelos animais de obesidade observamos resistência à insulina (SWINBURN, NYOMBA ET AL. 1991; MONTAGUE, FAROOQI et al. 1997; CLEMENT, VAISSE et al. 1998). Desta forma, o aumento da prevalência de obesidade deverá acompanhar-se do aumento da prevalência de DM tipo 2.

Com o ganho de peso e desenvolvimento da resistência à insulina, há um mecanismo compensatório de aumento da secreção pancreática de insulina, levando a hiperinsulinemia, para manter a glicemia em níveis normais (POLONSKY, GIVEN et al. 1988). Este estado de resistência à insulina, associado a hiperinsulinemia, está epidemiologicamente relacionado a um aumento da morbi-mortalidade cardiovascular (REAVEN 1988). Recentemente este estado foi definido como síndrome de resistência à insulina (2001).

Em pacientes portadores desta síndrome encontramos maior prevalência de hipertensão arterial, associada à disfunção endotelial (2001). No vaso sanguíneo, no nível molecular, há diminuição da ativação da NO sintase endotelial (eNOS), refletindo uma

resistência ao efeito vasodilatador da insulina, que é mediado pela ativação desta enzima, e também uma maior adesão de células mononucleares, predispondo à aterosclerose (STEINBERG, CHAKER et al. 1996; BALLETSCHOFER, RITTIG et al. 2000; CLELAND, PETRIE et al. 2000; ZECCHIN, BEZERRA et al. 2003).

Além da hipertensão arterial, a síndrome de resistência à insulina está associada a uma maior concentração plasmática de triglicérides (REAVEN, LERNER et al. 1967), e menor concentração de HDL (GOLAY, ZECH et al. 1987). A presença de hipertensão arterial, associada à disfunção endotelial e dislipidemia, explica, em parte, a grande propensão deste grupo de pacientes a morbi-mortalidade cardiovascular.

Outra manifestação clínica desta síndrome é a esteatoepatite não-alcoólica, que tem evolução clínica variável, mas pode causar cirrose hepática, com hipertensão portal e insuficiência hepatocítica (LUYCKX, LEFEBVRE et al. 2000).

A fertilidade também pode ser comprometida pela síndrome de resistência à insulina, e nas mulheres obesas, com esta síndrome, há uma maior prevalência da síndrome de ovários policísticos (DUNAIF 1997).

Mais recentemente, estudos epidemiológicos mostram também que pacientes obesos ou com resistência à insulina e hiperinsulinemia, estão sob maior risco de desenvolver neoplasias, inclusive com pior prognóstico do que pacientes magros (FACCHINI, HUA et al. 2001; CALLE, RODRIGUEZ et al. 2003).

Os dados epidemiológicos e experimentais atuais sugerem que aumento do peso corporal e resistência à insulina aparecem em paralelo, com possível e provável conexão molecular (WANNAMETHEE and SHAPER 1999; GOLDSTEIN 2003). Talvez, e esta é a nossa hipótese, o mesmo mecanismo molecular que é acionado pelo excesso de energia, leve, com o tempo, ao aparecimento de resistência à insulina.

Evolutivamente, em tempos de privação calórica, este mecanismo pode ter sido vantajoso e tenha permitido a sobrevivência de nossa espécie. Atualmente é deletério, e todas estas complicações citadas anteriormente e relacionadas à obesidade, estão também relacionadas à resistência à insulina. Portanto, entender os mecanismos fisiopatológicos que

levam ao aumento excessivo do peso corporal também é entender os mecanismos que levam a resistência à insulina. E mais, somente a compreensão dos mecanismos moleculares que levam a resistência à insulina, nos permitirá entender a etiopatogenia e fisiopatologia das complicações desta síndrome., permitindo uma abordagem terapêutica mais eficaz.

## **1.2- Mecanismos moleculares da ação insulínica**

A sinalização intracelular da insulina em tecidos insulino-sensíveis inicia-se com a ligação do hormônio a um receptor específico de membrana, o receptor de insulina (IR). O IR é uma proteína heterotetramérica com atividade tirosina-quinase, composta por duas subunidades  $\alpha$ , extra-celulares, onde localiza-se o sítio de ligação da insulina, e duas subunidades  $\beta$ , intra-celulares, onde localiza-se o sítio catalítico. A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  leva a mudança conformacional da subunidade  $\beta$ , e conseqüente auto-fosforilação, o que ativa sua capacidade tirosina-quinase.

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em resíduos de tirosina, incluindo membros da família dos substratos dos receptores de insulina (IRS-1/2/3/4), Shc, Gab-1 e Cbl. A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia à Src 2 (SH2). Dentre estas, destaca-se a PI 3-quinase. As funções fisiológicas do IRS-1/2 foram recentemente estabelecidas em camundongos sem os genes que codificam o IRS-1 ou IRS-2. O camundongo que não expressa IRS-1 apresenta resistência à insulina e retardo do crescimento, mas não é diabético (ARAKI, LIPES et al. 1994). Foi demonstrado que o IRS-2 pode compensar parcialmente a ausência de IRS-1, o que explicaria o fenótipo de resistência à insulina sem hiperglicemia deste camundongo.

O camundongo que não expressa IRS-2 foi posteriormente gerado (WITHERS, GUTIERREZ et al. 1998) e mostrou um fenótipo diferente do camundongo sem IRS-1: hiperglicemia acentuada devido a diversas anormalidades na ação da insulina nos tecidos periféricos, associada à falência da atividade secretória das células  $\beta$ . Esta

última alteração é provavelmente conseqüência da redução significativa da massa de células  $\beta$  pancreáticas.

A fosforilação das proteínas IRSs cria sítios de ligação para a PI 3-quinase, promovendo sua ativação. Atualmente, a PI 3-quinase é a única molécula intracelular inequivocadamente considerada essencial para o transporte de glicose (CZECH and CORVERA 1999). As proteínas alvo conhecidas dessa enzima são a Akt e as isoformas atípicas da PKC ( $\zeta$  e  $\lambda$ ). A Akt é uma serina-quinase também envolvida na mobilização do GLUT4 para a superfície celular e transporte de glicose (BROZINICK, ROBERTS et al. 2003).

### **1.3- Mecanismos moleculares de resistência à insulina**

Existem vários modelos experimentais de resistência à insulina, e o estudo destes modelos tem sido importante para a identificação dos mecanismos moleculares de resistência à insulina.

A ligação da insulina ao seu receptor é um potencial mecanismo de resistência à insulina, mas não se mostrou relevante nos modelos estudados (TRUGLIA, LIVINGSTON et al. 1985; MULLER 1987).

Já a autofosforilação do receptor de insulina após a ligação do hormônio está reduzida em diversas situações de resistência à insulina, assim como está reduzida também sua atividade tirosina-quinase (REDDY and KAHN 1988; SAAD, FOLLI et al. 1993). Isto pode acontecer secundariamente à ativação de fosfatases intracelulares, como, por exemplo, a PTP1B. O camundongo geneticamente modificado que não expressa PTP1B apresenta maior sensibilidade à insulina do que seu controle, quando submetido a tratamento com dieta hiperlipídica, modelo clássico de indução de resistência à insulina (ELCHEBLY, PAYETTE et al. 1999).

Outro mecanismo molecular de resistência à insulina acontece quando o IRS-1 é fosforilado em serina por serinas-quinases intracelulares. Uma vez fosforilado em serina, torna-se incapaz de ser fosforilado em tirosina, impedindo a ativação da PI 3 quinase,

bloqueando a transmissão do sinal insulínico (PAZ, HEMI et al. 1997; AGUIRRE, WERNER et al. 2002).

Além disso, o IRS-1 fosforilado em serina, pode inibir retrogradamente a ativação do IR, pois uma vez ligado ao receptor, inibe sua capacidade tirosina-quinase, impedindo a transmissão do sinal de insulina para outras moléculas de IRS-1, ou ainda para outros substratos deste receptor (HOTAMISLIGIL, PERALDI et al. 1996).

Diversas serinas-quinases foram identificadas como capazes de fosforilar o IRS-1 em serina, como, por exemplo, a c-jun N-terminal quinase 1 (Jnk1) (AGUIRRE, UCHIDA et al. 2000) e o complexo do IKK (GAO, HWANG et al. 2002).

Existem dois modelos animais clássicos para estudo da obesidade. Em um deles, a obesidade é induzida pela administração de uma dieta com aproximadamente 60% das calorias oriundas de gordura. Outro modelo é a obesidade geneticamente determinada em camundongos ob/ob que possuem mutação no gene codificador da leptina, e possuem deficiência deste hormônio. Paralelamente a obesidade, estes animais apresentam também resistência à insulina.

Nestes dois modelos animais encontramos maiores níveis de fosforilação em serina do IRS-1, em paralelo com aumento da atividade da Jnk1 (HIROSUMI, TUNCMAN et al. 2002). Em estudos realizados em cultura de diversos tipos celulares, encontramos aumento dos níveis de fosforilação em serina do IRS-1 após tratamento com ativadores da Jnk 1 (AGUIRRE, UCHIDA et al. 2000; RUI, AGUIRRE et al. 2001; AGUIRRE, WERNER et al. 2002). Camundongos geneticamente modificados que não expressam a Jnk 1 não desenvolvem resistência à insulina quando tratados com dieta hiperlipídica. O bloqueio genético da expressão da Jnk1 em camundongos ob/ob atenuou o fenótipo de resistência à insulina observado nestes animais. Nos dois modelos de obesidade, quando realizamos bloqueio genético da Jnk 1, observamos menores níveis de fosforilação em serina do IRS-1, sugerindo ser este um mecanismo importante de resistência à insulina na obesidade. Além disso, estes animais sem expressão da Jnk 1 ganham menos peso que os animais controle quando tratados com dieta hiperlipídica, o que sugere uma via molecular comum para ganho de peso e resistência à insulina (HIROSUMI, TUNCMAN et al. 2002).

Outra serina-quinase que se mostrou capaz de fosforilar o IRS-1 em serina e conseqüentemente provocar resistência à insulina é o complexo enzimático do IKK. Tanto o bloqueio farmacológico desta via por altas doses de salicilato, quanto o bloqueio genético, levaram a proteção da resistência à insulina associada à obesidade induzida por dieta hiperlipídica, ou geneticamente determinada. Esta proteção nos dois modelos foi associada a menor taxa de fosforilação em serina do IRS-1 (KIM, KIM et al. 2001; YUAN, KONSTANTOPOULOS et al. 2001; GAO, HWANG et al. 2002).

Analisando estes dados em conjunto, entendemos que bloqueios na transmissão do sinal de insulina intracelular podem estar relacionados à resistência às ações fisiológicas deste hormônio. E a reversão destes bloqueios à sinalização pode resultar em melhora da sensibilidade à insulina.

#### **1.4- Obesidade como doença inflamatória**

A sobrevivência dos organismos pluricelulares está relacionada a sua capacidade de combater infecções e reparar danos, assim como à capacidade de estocar energia em épocas de fartura para épocas de maior demanda energética. Os sistemas de reconhecimento de antígenos, assim como os sistemas de armazenamento energético são amplamente conservados desde espécies mais primitivas como *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila* até os mamíferos. Recentemente acumulam-se evidências que estes sistemas são interdependentes.

Faz parte da resposta imunológica normal a mobilização de energia dos estoques para combater o agente agressor (KHOVIDHUNKIT, KIM et al. 2004). E há muito são conhecidos os efeitos da má-nutrição sobre o sistema imunológico, que causa importante, e clinicamente reconhecida, imunossupressão (CHANDRA 1996; BLACKBURN 2001). O elo que faltava desta interdependência começou a ser desvendado ao longo das últimas duas décadas, com o reconhecimento de que a obesidade, estado de fartura energética, está relacionada a um estado pró-inflamatório subclínico relacionado à aterosclerose, hipertensão arterial e resistência à insulina (WELLEN and HOTAMISLIGIL 2005).



Diversos estudos epidemiológicos ligam tanto a obesidade quanto o DM tipo 2 a um estado de inflamação sub-clínico, onde encontramos elevação do nível sérico de diversas citocinas inflamatórias (PICKUP 2004).

Hoje, entendemos o adipócito como uma célula imunologicamente ativa, produtora de citocinas, que possuem ação reguladora também do metabolismo (WELLEN and HOTAMISLIGIL 2005).

A primeira molécula a ligar sistemas imune e metabólico foi o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (HOTAMISLIGIL, SHARGILL et al. 1993). Esta interleucina inflamatória foi descrita inicialmente como o princípio ativo que levava a necrose tumoral em animais com infecção bacteriana (GRAY, AGGARWAL et al. 1984; PENNICA, NEDWIN et al. 1984). Posteriormente foi identificada como mediador da hipertrigliceridemia e caquexia, observados em animais cronicamente parasitados (BEUTLER, GREENWALD et al. 1985). Como todas as interleucinas, possui um grande número de ações fisiológicas, e desencadeia suas funções intra-celulares a partir da ligação com seu receptor de membrana (HELLER and KRONKE 1994).

Estudos realizados em modelos animais de obesidade, e também em humanos obesos, uniformemente mostraram aumento dos níveis de TNF $\alpha$  circulante (KATSUKI, SUMIDA et al. 1998; WINKLER, SALAMON et al. 1998). Nestes modelos observamos também aumento dos níveis teciduais desta interleucina tanto em tecido adiposo, quanto em tecido muscular (HOTAMISLIGIL, ARNER et al. 1995; SAGHIZADEH, ONG et al. 1996). Nos modelos animais de obesidade desenvolvidos geneticamente onde observa-se menor resistência à insulina, observa-se também menor concentração sérica de TNF $\alpha$  (HOTAMISLIGIL, JOHNSON et al. 1996).

Outro achado interessante é que a administração de TNF $\alpha$  tanto a animais, quanto a humanos leva a um estado de resistência à insulina (VAN DER POLL, ROMIJN et al. 1991; LANG, DOBRESU et al. 1992).

O grupo de evidências definitivo para uma possível relação de causa e efeito entre TNF $\alpha$  e resistência à insulina, veio do estudo de modelos animais com mutação nos receptores de TNF $\alpha$  ou que não expressavam esta interleucina. Estes animais mostraram-se

protegidos do desenvolvimento de resistência à insulina associado à obesidade, fosse ela dieteticamente ou geneticamente determinada. Mesmo o camundongo ob/ob, apesar de não ter sua sensibilidade à insulina normalizada, apresentou grande melhora (UYSAL, WIESBROCK et al. 1997; VENTRE, DOEBBER et al. 1997).

Em estudos realizados em culturas de diversos tipos celulares sensíveis à ação insulínica, a administração de TNF $\alpha$  levou a uma menor atividade catalítica do receptor de insulina, caracterizada por menor autofosforilação do receptor após estímulo com insulina. Uma redução maior ainda é observada nos níveis de fosforilação do IRS-1 após estímulo insulínico. Dependendo do tipo celular estudado, observa-se ainda uma expressão tecidual reduzida tanto do IR, quanto do IRS-1 (FEINSTEIN, KANETY et al. 1993; HOTAMISLIGIL, MURRAY et al. 1994). Portanto a regulação negativa da sinalização insulínica modulada pelo TNF $\alpha$  parece acontecer tanto afetando a capacidade de fosforilação em tirosina destas proteínas, quanto através do controle de síntese e de degradação protéica.

Como já discutimos anteriormente, um dos principais mecanismos de resistência à insulina descritos é a fosforilação do IRS-1 em serina, notadamente a da posição 307. Isto impede que o IRS-1 seja posteriormente fosforilado em tirosina, e retrogradamente inibe a atividade tirosina-quinase do receptor de insulina. Duas serinas-quinases foram implicadas nesta ação, a Jnk1 e o complexo do IKK. A administração de TNF $\alpha$  a culturas de células leva a aumento da fosforilação em serina do IRS-1, em paralelo a ativação tanto da Jnk1 quanto do complexo do IKK, sendo este, possivelmente, um dos mecanismos moleculares pelo qual TNF $\alpha$  leva ao desenvolvimento de resistência à insulina (WELLEN and HOTAMISLIGIL 2005).

Além disso, o TNF $\alpha$  é capaz de ativar um fator de transcrição chamado NF $\kappa$ B que faz alça de retro-alimentação positiva na via inflamatória, aumentando a transcrição de diversas interleucinas relacionadas ao aparecimento de resistência à insulina, inclusive do próprio TNF $\alpha$  (TAK and FIRESTEIN 2001).

Após a descoberta deste comportamento do  $\text{TNF}\alpha$ , outras interleucinas pró-inflamatórias mostraram-se capazes de ativar vias celulares relacionadas ao desenvolvimento de resistência à insulina, como a IL-6 e a IL-1 $\beta$  (WELLEN and HOTAMISLIGIL 2005).

Desta forma, estabeleceu-se uma relação de causa e efeito entre a ativação das vias inflamatórias associadas à obesidade com o desenvolvimento de resistência a insulina.

### **1.5- A iNOS é uma proteína da via inflamatória e está relacionada à resistência à insulina**

A endotoxemia é uma situação clínica relacionada à resistência à insulina, onde observamos tanto maior produção hepática de glicose, quanto menor captação muscular de glicose induzida por insulina (SPITZER, BAGBY et al. 1989; VIRKAMAKI, PUHAKAINEN et al. 1992). A infusão de lipopolissacárides (LPS), obtidos de bactérias gram-negativas, em ratos ou humanos é um modelo experimental de endotoxemia (VIRKAMAKI and YKI-JARVINEN 1994; AGWUNOBI, REID et al. 2000).

Algumas horas após a infusão de LPS, dependendo da dose utilizada, observamos resistência à ação insulínica, tanto em modelos animais, quanto em humanos (VIRKAMAKI and YKI-JARVINEN 1994; AGWUNOBI, REID et al. 2000). Os mecanismos moleculares desta resistência à insulina induzida pela endotoxemia ainda não foram completamente esclarecidos.

A Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) produz NO a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina, e é importante componente do sistema imune inato, tendo sua expressão tecidual aumentada tanto após estímulo com certas interleucinas, quanto depois da infusão de LPS. Parece estar relacionada a controle de infestações intra-celulares, tendo poder, tanto bactericida, quanto de bloquear a via metabólica de certos patógenos (BOGDAN 2001). Inicialmente descrita em macrófagos, pode ter sua expressão tecidual induzida em vários tecidos diferentes, inclusive em tecidos insulino-sensíveis, como

muscular, adiposo e hepático (KURREK, ZAPOL et al. 1995; RIBIERE, JAUBERT et al. 1996; KAPUR, BEDARD et al. 1997).

Em tecido muscular a indução da iNOS parece estar associada ao desenvolvimento de resistência à insulina. O tratamento de culturas de células musculares com LPS, TNF $\alpha$  e interferon  $\gamma$  levou a diminuição da captação de glicose induzida por insulina, em paralelo ao aumento da expressão da iNOS. Este efeito sobre a captação de glicose foi impedido com o tratamento concomitante com um bloqueador da iNOS, a saber, aminoguanidina. Houve também redução da resistência à insulina induzida pela infusão de LPS quando os animais foram tratados com Aminoguanidina (BEDARD, MARCOTTE et al. 1997). Finalmente, há aumento da expressão da iNOS em músculo de modelos animais de DM e obesidade, como os ratos Zucker e os camundongos db/db. O tratamento com aminoguanidina também atenuou a resistência à insulina observada nestes animais (SHIMABUKURO, OHNEDA et al. 1997; PIERCY, TOSELAND et al. 1998).

Este aumento da expressão da iNOS em modelos experimentais de obesidade sugere que esta é outra via da resposta imune inata que está ativada na obesidade, podendo ter participação fisiopatológica no desenvolvimento de resistência à insulina, de forma semelhante às vias inflamatórias anteriormente descritas.

Em 1997, Marete et al descreveram que tanto o NO liberado por drogas doadoras de NO, quanto o produzido pela iNOS, leva à diminuição da captação de glicose, tanto por células musculares em cultura, quanto por tecido muscular isolado de ratos. Estes achados sugerem uma participação direta do NO na indução de resistência à insulina a partir do aumento da expressão da iNOS. Além disso, mostraram que a resistência à insulina secundária a infusão de LPS, tanto em cultura de células musculares, quanto em tecido muscular isolado de ratos estava diretamente relacionada ao aumento da expressão da iNOS e maior produção de NO (KAPUR, BEDARD et al. 1997).

Mais tarde, em 2001, o mesmo grupo mostrou que camundongos geneticamente modificados que não expressam a iNOS, apesar de ganharem peso quando submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica, não desenvolvem resistência à insulina. Esta proteção

metabólica está relacionada a uma preservação da capacidade da insulina de ativar o IR e a Akt no tecido muscular destes animais (PERREAULT and MARETTE 2001).

Estes dados sugerem uma ligação da via de sinalização da iNOS com a via de sinalização da insulina, com uma possível regulação negativa da primeira em relação a segunda. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo ainda não foram descritos.

### **1.6- S-nitrosação: um mecanismo de regulação pós-translacional relacionado ao NO produzido a partir da ativação das NO-Sintases**

Nos últimos 10 anos demonstrou-se que além de suas ações vasodilatadoras, o NO tem também papel fundamental como sinalizador intra-celular, controlando várias funções da célula, modulando inclusive a apoptose (DAVIS, MARTIN et al. 2001).

As NO-Sintases são as principais fontes intracelulares de NO e são divididas em 3 subtipos. A NO Sintase Neuronal (nNOS ou NOS 1) e a NO Sintase Endotelial (eNOS ou NOS 3) são cálcio dependentes e exercem funções biológicas importantes em seus respectivos tecidos, como regulação da apoptose neuronal, no caso da nNOS, e vasodilatação, no caso da eNOS (DAVIS, MARTIN et al. 2001; FOSTER, McMahon et al. 2003). A NO Sintase Induzível (iNOS ou NOS 2) já foi descrita em detalhe, não é cálcio dependente e pode ter sua expressão induzida a partir do estímulo com interleucinas ou LPS.

Uma vez produzido, o NO pode modificar a função protéica através de processos químicos diferentes, descritos abaixo, que dependem principalmente da disponibilidade de espécies oxidantes e da concentração de NO liberada (DAVIS, MARTIN et al. 2001):

- 1 – Nitrosilação de metais de transição – O NO é capaz de ligar-se a metais de transição presentes em proteínas modulando sua função (RADI 1996). O metal de transição encontrado com maior frequência em proteínas é o ferro,

notadamente relacionado ao grupamento heme (COOPER 1999). Uma das proteínas com grupamento heme mais estudadas, e alvo da ativação por nitrosilação é a guanil ciclase, que possui importantes ações na vasculatura, função plaquetária e neurotransmissão (STONE and MARLETTA 1994). Outra proteína que possui grupamento heme e é modulada por nitrosilação é o citocromo p450 (WINK, OSAWA et al. 1993). O íon ferro pode ser também alvo de nitrosilação em outras proteínas que não possuem o grupo heme (COOPER 1999). A nitrosilação modula também proteínas através da ligação a outros metais de transição como o zinco (KRONCKE and CARLBERG 2000). A característica marcante da nitrosilação de metais de transição é que ela pode ocorrer em concentrações relativamente baixas de NO e não depende da oxidação prévia do NO (DAVIS, MARTIN et al. 2001).

2 – Nitração de tirosina – Este termo está relacionado à incorporação de  $-\text{NO}_2$  na posição 3 do anel fenólico de um resíduo de tirosina (MARTINEZ-RUIZ and LAMAS 2004). Vários mecanismos para a nitração foram propostos, dentre eles destacam-se aqueles mediados enzimaticamente por metalo-proteínas, e aqueles a partir da reação do resíduo de tirosina com peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (GOW, FARKOUH et al. 2004). Esta última reação acontece principalmente em situações de estresse oxidativo, já que depende da reação do NO com o radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), ou em ambientes celulares onde há maior produção de superóxido, como o mitocondrial ou em células inflamatórias ativadas (DAVIS, MARTIN et al. 2001). Existem exemplos de modulação protéica pela nitração induzida pela produção de NO, como é o caso da prostaciclina sintase e superóxido-dismutase (MACMILLAN-CROW, CROW et al. 1996; ZOU, LEIST et al. 1999).

3 – S-nitrosação ou S-nitrosilação – Esta modificação ocorre pela ligação covalente do NO com um grupamento tiol (S-H) presente em resíduos de cisteína, formando um S-nitrosotiol (S-NO) (STAMLER, SIMON et al. 1992). Acredita-se que uma reação direta do radical NO com o grupamento

tiol não leva a formação de um nitrosotiol (WINK, NIMS et al. 1994). Para tanto é necessária a oxidação do NO, após a reação com O<sub>2</sub>, e formação de N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (WINK, DARBYSHIRE et al. 1993; HOGG 2002). Esta reação acontece provavelmente com mais facilidade no ambiente hidrófobo da membrana celular (LIU, MILLER et al. 1998), ou em microambientes hidrófobos dentro da própria estrutura protéica (NEDOSPASOV, RAFIKOV et al. 2000), onde NO e O<sub>2</sub> podem existir em maiores concentrações. O N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pode parcialmente dissociar-se em [<sup>+</sup>ON·NO<sub>2</sub>], o que favorece a reação do radical nitrosonium (NO<sup>+</sup>) com o enxofre nucleofílico do grupamento tiol. Portanto a S-nitrosação pode ser entendida como uma transferência do radical nitrosonium e não do radical NO. Isto explica a possibilidade de acontecer trans-nitrosação, que é a S-nitrosação de um tiol diretamente por um nitrosotiol (ARNELLE and STAMLER 1995; LIU, RUDD et al. 1998; HOGG 1999). Este segundo mecanismo de S-nitrosação tem importância biológica devido à alta concentração celular de tióis de massa molecular pequena, como a glutatona, por exemplo, que poderiam funcionar como transportadores do nitrosonium para outros ambientes celulares distantes daqueles onde a formação do NO a partir da NO-sintase aconteceu (MARTINEZ-RUIZ and LAMAS 2004). Existem ainda outros modelos bioquímicos identificados in vitro para explicar a formação de nitrosotióis, como os obtidos a partir da doação de NO por nitrito (STAMLER, SIMON et al. 1992), ou catalizada até mesmo por metaloproteínas (HESS, MATSUMOTO et al. 2005). Várias proteínas podem ter sua função modificada por S-nitrosação, como por exemplo, p21<sup>ras</sup> (WILLIAMS, PAPPU et al. 2003), NFκB (MARSHALL and STAMLER 2001), a família HIF (fatores induzidos por hipóxia) (BRUNE and ZHOU 2003), metaloproteínases matriciais (GU, KAUL et al. 2002), e outros.

A S-nitrosação vem sendo valorizada como uma das principais formas de modificação protéica induzida pelo NO, devido a sua alta reatividade, por ocorrer em condições fisiológicas, e devido a grande quantidade de processos celulares regulados por S-nitrosação descritos ao longo dos últimos anos (HESS, MATSUMOTO et al. 2005).

Muitas comparações foram feitas entre S-nitrosação e fosforilação (STAMLER, LAMAS et al. 2001; MANNICK and SCHONHOFF 2002). Apesar de serem dois mecanismos de modificação protéica pós-translacionais, relacionados a alterações covalentes de resíduos aminoácidos, algumas diferenças devem ser ressaltadas. A especificidade da fosforilação acontece, pois a mesma é controlada enzimaticamente. Já a S-nitrosação, é uma reação química direta, mas também altamente específica, mas cuja especificidade não é determinada enzimaticamente (MARTINEZ-RUIZ and LAMAS 2004). Esta dependerá de outros fatores, tais como:

- 1 – Microambiente da cisteína alvo – Como a reação de S-nitrosação acontece com o ânion tiolato (proteína-S<sup>-</sup>), mais do que com o grupamento tiol (proteína-S-H), o pKa da cisteína é importante definidor da afeição para S-nitrosação, e dependerá da interação da cisteína alvo com aminoácidos vizinhos. Chegou-se a propor uma seqüência de aminoácidos próximas a cisteína alvo na estrutura primária da proteína que poderia prever esta capacidade de ser S-nitrosada. Mas ainda não há consenso sobre este assunto, já que muitas vezes a estrutura primária da proteína não prevê relações de vizinhança entre aminoácidos na estrutura terciária ou quaternária (LANE, HAO et al. 2001; MARTINEZ-RUIZ and LAMAS 2004; HESS, MATSUMOTO et al. 2005).
- 2 – Ambiente hidrófobo - Como o NO precisa reagir com O<sub>2</sub> para formar N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e então reagir com o grupamento S-H da cisteína; um ambiente hidrófobo, onde concentrações tanto de NO, quanto de O<sub>2</sub> serão maiores, favorece a S-nitrosação. Este ambiente hidrófobo pode ocorrer tanto dentro da própria proteína, quanto na vizinhança da membrana citoplasmática (LIU, MILLER et al. 1998; NEDOSPASOV, RAFIKOV et al. 2000).



3 – Regulação alostérica – Proteínas ligadas a metais de transição, em particular a  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ , podem catalisar a S-nitrosação de tióis próximos a partir de NO em solução (GOW, LUCHSINGER et al. 1999) ou promovendo a transnitrosação a partir de nitrosoglutationa (GSNO) (ROMEIO, CAPOBIANCO et al. 2003), ou nitrito (LUCHSINGER, RICH et al. 2003). As superóxido dismutases podem catalisar a S-nitrosação da hemoglobina a partir de NO em solução ou a partir de GSNO, por exemplo (GOW, LUCHSINGER et al. 1999).

4 – Interação das NO sintases com as proteínas alvo – Como a S-nitrosação depende de concentrações mais elevadas de NO, a co-localização das NO-sintases com a proteína a ser S-nitrosada pode também conferir especificidade. Isto é particularmente verdadeiro para a nNOS e para a eNOS, que produzem NO em menor quantidade do que a iNOS (GASTON 1999; NATHAN and SHILOH 2000; MANNICK and SCHONHOFF 2002; ZIOLO and BERS 2003).

Portanto, enquanto a fosforilação é regulada no nível molecular, a S-nitrosação é regulada tanto no nível molecular, quanto no nível submolecular, ou seja, atômico (MARTINEZ-RUIZ and LAMAS 2004).

Apesar do acúmulo progressivo de conhecimento sobre a biologia do NO, ainda existem grandes lacunas a serem preenchidas.

## ***2- OBJETIVOS***

Em resumo: obesidade e resistência à insulina têm alta prevalência e estão relacionados a grande morbi-mortalidade; a via inflamatória da resposta inata tem implicação etiopatogênica tanto na obesidade quanto na resistência à insulina; além do TNF $\alpha$ , da Jnk1 e do complexo do IKK, a iNOS faz parte da via inflamatória e regula negativamente a sinalização insulínica; e a iNOS tem a S-nitrosação como um dos seus mecanismos de sinalização celular. Assim,

Foram objetivos deste estudo:

- 1 – Investigar se proteínas da via de sinalização insulínica eram passíveis de S-nitrosação por drogas doadoras de NO, nitrosotíóis, e pela iNOS.
- 2 – Investigar se esta S-nitrosação pode alterar a função e expressão destas proteínas.
- 3 – Investigar se estados de resistência à insulina associados a maior expressão de iNOS, tais como obesidade e endotoxemia podem induzir S-nitrosação das proteínas da via de sinalização insulínica.
- 4 – Investigar se o bloqueio genético ou farmacológico da iNOS pode prevenir a S-nitrosação e a resistência à insulina.

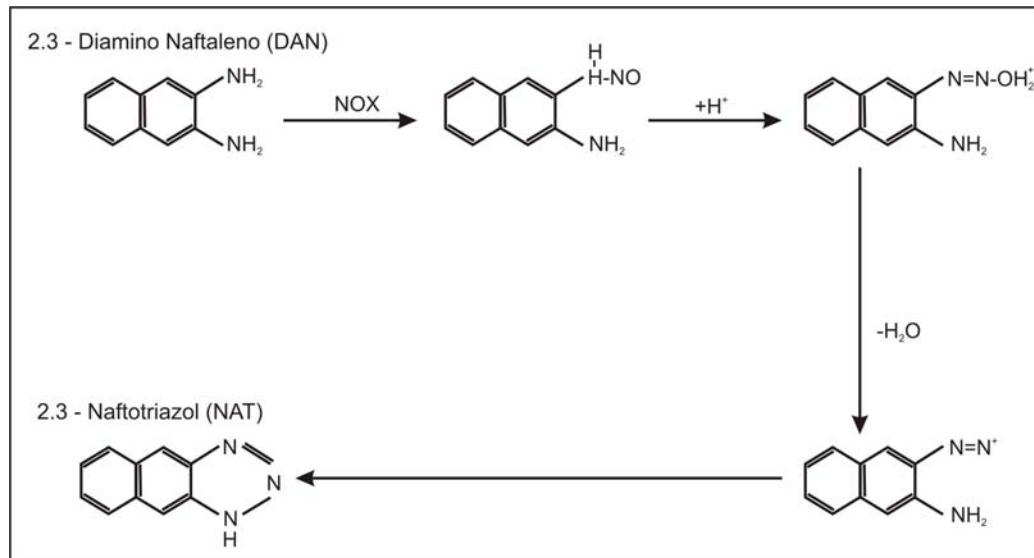
### *3- MATERIAIS E MÉTODOS*

O planejamento experimental, a característica dos animais estudados, os reagentes e soluções utilizados, o método utilizado para quantificação de proteínas fosforiladas por immunoblotting, e outras metodologias clássicas utilizadas estão descritas detalhadamente nos trabalhos apresentados na seção de resultados. Aqui preferimos descrever com maior detalhe as metodologias desenvolvidas para quantificação de S-nitrosação.

Para a identificação da S-nitrosação protéica, desenvolvemos em nosso laboratório 3 métodos diferentes, a saber:

### **3.1- Fluorimetria**

Como primeiro método desenvolvido, nos baseamos num trabalho de Miles e colaboradores, publicado no periódico *Methods in Enzimology* em 1996, (MILES, WINK et al. 1996), adaptado por Park e colaboradores para amostras de imunoprecipitação (PARK, HUH et al. 2000; PARK, PARK et al. 2000). Neste método, os autores usam uma reação química bem conhecida para dosar a quantidade de NO liberada por um determinado composto. O método baseia-se na conversão do composto fluorimetricamente inerte 2,3-diaminonaphtaleno ( DAN ) em 2,3- naphthotriazole (NAT), a partir da reação com um radical NO, em solução aquosa (FIG 2).



**Figura 2-** N – Nitroação do 2,3 Diaminonaftaleno (DAN) até 2,3 naftotriazol (NAT) pela reação com o NO liberado por agente N-Nitrosante.

São passos deste método:

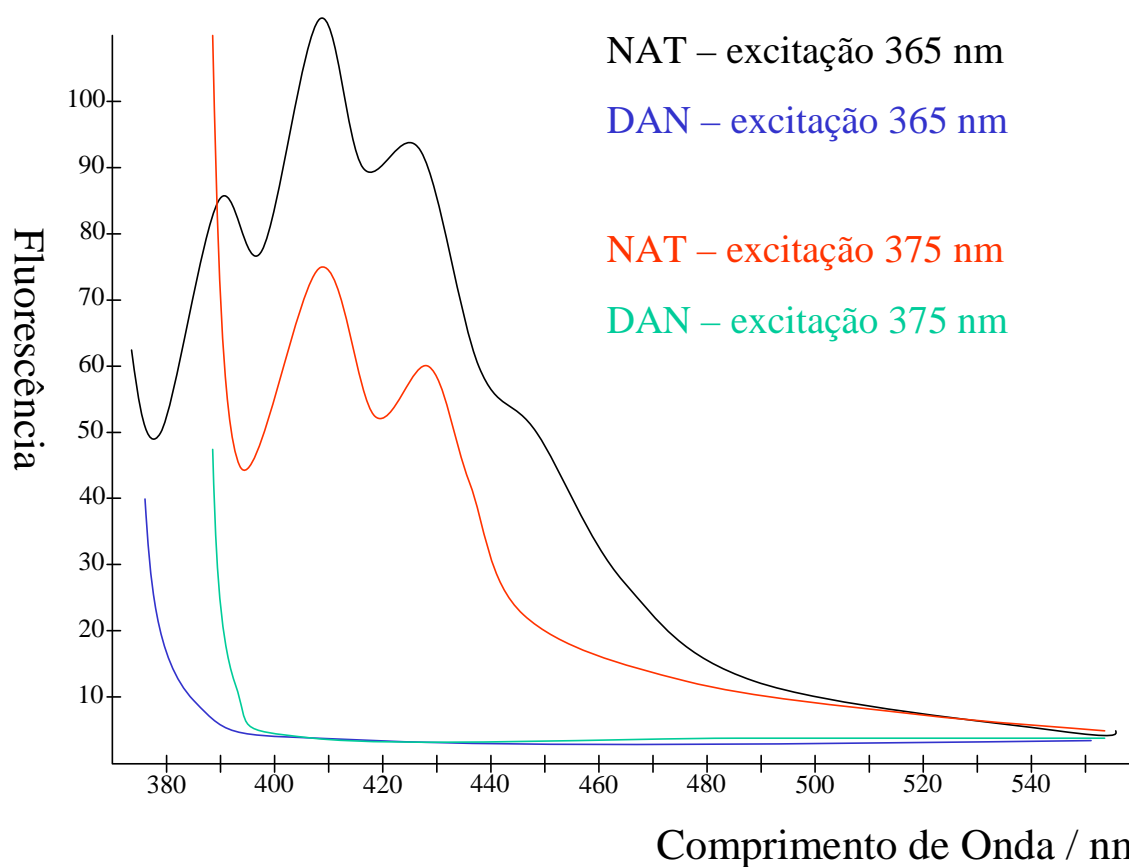
1 – Extração tecidual com homogeneização em tampão específico

Tampão:

- Tris-Hcl pH 7,5 50 mM
- NaCl 150 mM
- PSMF 1 mM
- Aprotinina
- Ortovanadato de sódio
- Fluoreto de Sódio
- NONIDET 1%
- SDS 1%

- 2 – Imunoprecipitação com anticorpo específico (nitrosotiol a ser estudado)
- 3 – Lavagem do imunoprecipitado com tampão de extração por 5 vezes e com PBS mais 2 vezes
- 4 – Incubação com 100 $\mu$ M HgCl<sub>2</sub> e 100  $\mu$ M DAN por 30 minutos em temperatura ambiente
- 5 – Adição de NaOH para concentração de 10mM
- 6 – Aferição da quantidade de NAT formado por fluorimetria em duas situações diferentes: excitação em 365 ou 375 nm.

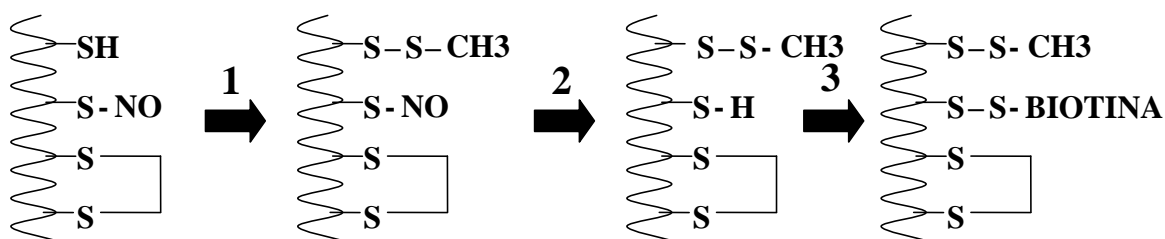
Na figura 3 podemos observar os espectros obtidos com a leitura de amostras equimolares de DAN e NAT após excitação com comprimentos de onda indicados.



**Figura 3-** Espectros obtidos com a leitura de amostras equimolares de DAN e NAT após excitação com comprimentos de onda indicados.

### 3.2- Biotinilação de Nitrosotiois

Este método para detecção de nitrosotiois foi publicado por Jaffrey e colaboradores no periódico eletrônico Science STKE (JAFFREY and SNYDER 2001), e identifica os compostos S-nitrosados numa seqüência de reações que descreveremos a seguir. Imaginemos uma determinada proteína que possua resíduos de cisteína que podem estar S-nitrosados ou não. Na primeira etapa do método as cisteínas livres, não S-nitrosadas, são bloqueadas através da metilação com MMTS (metil-metano-tiosulfonato). A seguir, as cisteínas hipoteticamente S-nitrosadas são reduzidas a sua forma livre, a partir da adição e incubação com ácido ascórbico. No próximo passo, as cisteínas recém liberadas são submetidas à incubação com HPDP-biotina, que formará compostos do tipo –S-S-BIOTINA. Então as amostras são incubadas com estreptavidina-AGAROSE, ou neutravidina-AGAROSE, que têm afinidade pela biotina, e posteriormente centrifugadas e lavadas. O pellet que conterá somente proteínas originalmente S-nitrosadas na amostra inicial, é então incubado com tampão para separação em gel de poliacrilamida. Após a separação, é realizada transferência para membrana de nitrocelulose, e immunoblotting com anticorpo contra a proteína a ser investigada. Podemos visualizar o método de forma esquemática na figura 4:



**1 – Metilação – MMTS**

**2 – Redução das cisteínas S-nitrosadas**

**3 - Biotinilação**

**Figura 4-** Método de Biotinilação – Apresentação esquemática

O método de biotinilação em detalhes



### 3.2.1- Extração Tecidual

- Extração e homogeneização tecidual utilizando-se o tampão 1 em temperatura de 4°C, com as amostras protegidas da luz . Concentração de aproximadamente 1 grama de tecido para 16 ml de tampão.
- Centrifugação a 2000g por 10 minutos a 4°C.
- Separação do sobrenadante.
- Dosagem da concentração protéica.
- Acrescentar CHAPS 10%, para concentração final de 0,4% na amostra.
- Separar alíquotas com a mesma quantidade de proteína , para um volume máximo de 100µl.

### 3.2.2- Bloqueio das Cisteínas livres (S-H)

- Acrescentar 300 µl da Solução Bloqueadora em cada tubo. Homogeneização e incubação a 50°C por 30 minutos, protegido da luz, em agitação contínua, ou freqüente.
- Ao final da incubação, acrescentar 800µl de acetona a -20°C em cada tubo. Deixar encubando a -20°C por 10 minutos.
- Centrifugar por 10 minutos a 2000g e 4°C. Ressuspender o pellet com mais 800µl de acetona a -20°C, centrifugar novamente com mesmos parâmetros e separar o pellet.

### 3.2.3- Biotinilação dos nitrosotiois

- Acrescentar 60µl do tampão 2 para ressuspender o pellet.
- Acrescentar 2µl de uma solução de Ácido ascórbico 50mM. Agitar vigorosamente.

- Acrescentar 20µl de uma solução 4mM de HPDP-Biotina por tubo. Agitar a mistura e deixar reagir em temperatura ambiente por 1 hora. Não precisa mais proteger da luz.
- Após a incubação, acrescentar 200µl de acetona a -20°C e incubar por 20 minutos a -20°C para remover a HPDP-biotina.
- Centrifugar as amostras por 10 minutos, 2000g a 4°C. Ressuspender com mais 200µl de acetona a -20°C. Nova centrifugação com mesmos parâmetros e separação do pellet.

#### 3.2.4- Separação das proteínas biotinizadas

- Ressuspender o pellet com 60µl do tampão 2 (0,1 ml por mg de proteína na amostra inicial)
- Acrescentar 120µl do tampão 3.
- Acrescentar 25µl de estreptavidina-agarose ou neutravidina-agarose para purificar as proteínas biotinizadas.
- Incubação por 1 hora em temperatura ambiente.
- Centrifugar 1 minuto a 200g.
- Lavar o pellet 5 vezes com 500µl do tampão 4. Centrifugar a 200g por 5 segundos em temperatura ambiente entre cada lavada.

#### 3.2.5- Preparação das amostras para eletroforese

- Incubar o pellet com 30µl do tampão 5
- Acrescentar 10µl do tampão de Laemili por amostra.
- Ferver por 5 minutos, centrifugar e separar o sobrenadante para separação por eletroforese em gel de poliacrilamida.

**TAMPÃO 1**

- Hepes.NaOH pH 7,7 250 Mm
- EDTA 1 mM
- Neocuproina 0,1 mM

**TAMPÃO 2**

- Tampão 1
- SDS 1%

**TAMPÃO 3**

- Hepes.NaOH pH 7,7 20 mM
- NaCl 100 mM
- EDTA 1 mM
- Triton x-100 0,5%

**TAMPÃO 4**

- Tampão 3
- NaCl 600 mM

**TAMPÃO 5**

- Hepes.NaOH pH 7,7 20 mM
- NaCl 100 mM
- EDTA 1 mM
- 2-mercaptoetanol 100 mM

**SOLUÇÃO BLOQUEADORA**

- Tampão 1
- SDS 2,5%
- MMTS 20 mM

**3.3- Imunoprecipitação com ANTI-SNO**

Além dos dois métodos anteriores, recentemente desenvolveu-se um anticorpo que reconhece cisteínas S-nitrosadas, embora possa ter uma certa afinidade contra cisteínas livres. No entanto este anticorpo só tinha sido usado para imunistoquímica e immunoblotting.

Como nós tínhamos dois métodos diferentes para identificação de cisteínas S-nitrosadas, os utilizamos como padrão ouro, e assim, testamos e comparamos com a imunoprecipitação com este anticorpo. Esta foi realizada utilizando-se como tampão de extração o descrito na seção 1 destes métodos, e a seqüência dos procedimentos está descrita na seção específica de cada trabalho.

## ***4- RESULTADOS***

# S-Nitrosation of the Insulin Receptor, Insulin Receptor Substrate 1, and Protein Kinase B/Akt

## A Novel Mechanism of Insulin Resistance

Marco A. Carvalho-Filho,<sup>1</sup> Mirian Ueno,<sup>1</sup> Sandro M. Hirabara,<sup>2</sup> Amedea B. Seabra,<sup>3</sup> José B.C. Carnevali,<sup>1</sup> Marcelo G. de Oliveira,<sup>3</sup> Lício A. Velloso,<sup>1</sup> Rui Curi,<sup>2</sup> and Mario J.A. Saad<sup>1</sup>

**Evidence demonstrates that exogenous nitric oxide (NO) and the NO produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS) can induce insulin resistance in muscle. Here, we investigated whether this insulin resistance could be mediated by S-nitrosation of proteins involved in early steps of the insulin signal transduction pathway. Exogenous NO donated by S-nitrosoglutathione (GSNO) induced in vitro and in vivo S-nitrosation of the insulin receptor  $\beta$  subunit (IR $\beta$ ) and protein kinase B/Akt (Akt) and reduced their kinase activity in muscle. Insulin receptor substrate (IRS)-1 was also rapidly S-nitrosated, and its expression was reduced after chronic GSNO treatment. In two distinct models of insulin resistance associated with enhanced iNOS expression—diet-induced obesity and the *ob/ob* diabetic mice—we observed enhanced S-nitrosation of IR $\beta$ /IRS-1 and Akt in muscle. Reversal of S-nitrosation of these proteins by reducing iNOS expression yielded an improvement in insulin action in both animal models. Thus, S-nitrosation of proteins involved in insulin signal transduction is a novel molecular mechanism of iNOS-induced insulin resistance. *Diabetes* 54:959–967, 2005**

**N**itric oxide (NO) is a free radical gas and biological signaling molecule produced by the intracellular enzyme NO synthase (1). The reactivity of NO toward molecular oxygen, thiols, transition metal centers, and other biological targets enables NO to act as an ubiquitous cell-signaling molecule with diverse physiological and pathophysiological roles (1,2). In this regard, NO can react with cysteine residues in the presence of O<sub>2</sub> to form S-nitrosothiol adducts (3,4), altering the activity of proteins including H-ras (5), the olfactory cyclic

nucleotide-gated channel (6), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (7). The reversible regulation of protein function by S-nitrosation (see AUTHORS' NOTE at the end of the article) has led to the proposal that S-nitrosothiols function as posttranslational modifications, analogous to those created by phosphorylation or acetylation (4).

Evidence demonstrates that exogenous NO and the NO produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS) can modulate insulin action in muscle. NO donors induce dose-dependent inhibition of maximal insulin-stimulated glucose transport in isolated muscles and in cultured L6 muscle cells, without affecting insulin binding to its receptor (8). iNOS was not detected in resting muscle; however, its induction has been associated with impaired insulin-stimulated glucose uptake in isolated rat muscles (8).

iNOS induction may be involved in the pathogenesis of some situations of insulin resistance, such as obesity-linked type 2 diabetes (9–11) and LPS-induced endotoxemia (12). In obese human subjects (13,14) and in several animal models of obesity (15,16), insulin resistance is also associated with increased systemic and tissue concentrations of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6.

It is well established that proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6) and endotoxins synergistically increase NO production via increased expression of iNOS in rat skeletal muscle and cultured myocytes and adipocytes (8,17,18). Recently, Perreault and Marette (19) demonstrated that genetic disruption of iNOS protects against obesity-linked insulin resistance, preventing impairments in phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt (Akt) activation by insulin in muscle.

In light of the evidence that NO and increased iNOS expression are associated with reduced insulin action and that S-nitrosation is a posttranslational modification that can modulate protein function, we investigated whether insulin resistance could be mediated by S-nitrosation of proteins involved in the early steps of the insulin signal transduction pathway.

### RESEARCH DESIGN AND METHODS

Antiphosphotyrosine, anti-insulin receptor  $\beta$  subunit (IR $\beta$ ), anti-insulin receptor substrate (IRS)-1, and anti-Akt antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-p[ser<sup>473</sup>]Akt antibody was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The anti-nitrosocystein antibody was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Human recombinant insulin (Humulin R) was purchased from Eli Lilly (Indianapolis, IN). Rosiglitazone was from

From the <sup>1</sup>Department of Internal Medicine, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, Brazil; the <sup>2</sup>Department of Physiology and Biophysics, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; and the <sup>3</sup>Chemistry Institute, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, Brazil.

Address correspondence and reprint requests to Mario J.A. Saad, Departamento de Clínica Médica, FCM, UNICAMP, 13081-970, Campinas, Brazil. Email: msaad@fcm.unicamp.br.

Received for publication 10 June 2004 and accepted in revised form 1 January 2005.

Akt, protein kinase B/Akt; ASO, antisense oligonucleotides; DIO, diet-induced obese; GSK, glycogen synthase kinase; GSNO, S-nitrosoglutathione; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IR $\beta$ , insulin receptor  $\beta$  subunit; IRS, insulin receptor substrate; SNO, S-nitrosothiol.

© 2005 by the American Diabetes Association.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

GlaxoSmithKline (Harlow, U.K.). Routine reagents were purchased from Sigma unless otherwise specified.  $^{125}\text{I}$ -protein A,  $\text{D}$ -[ $^{14}\text{C}$ ]glucose, and 2-deoxy-D-[2,6- $^3\text{H}$ ]glucose were from Amersham (Amersham, U.K.). L-[1- $^{14}\text{C}$ ]glucose was obtained from NEN Life Sciences Products (Boston, MA).

Male Wistar rats and *ob/ob* diabetic mice were obtained from the UNICAMP Central Animal Breeding Center (Campinas, São Paulo, Brazil). Animals were allowed free access to standard rodent food and water ad libitum. Acute experiments were performed with 8-week-old Wistar rats and *ob/ob* diabetic mice. Diet-induced obese (DIO) animals were obtained by high-fat diet administration to one group of Wistar rats, which started at 8 weeks of age for 24 weeks, with controls of the same age. The high-fat diet consisted of 55% calories derived from fat, 29% from carbohydrate, and 16% from protein similar to that previously described (20). Food was withdrawn 6 h before the experiments. One group of DIO animals and one group of its controls were treated with 4 mg/kg rosiglitazone by oral gavage for 10 days before tissue extraction. The ethics committee at the University of Campinas approved all experiments involving animals.

**iNOS antisense oligonucleotide treatment.** Phosphothiolate-modified oligonucleotides for iNOS (sense, 5'-GCATACCTGAAGGTG-3' and antisense 5'-GCATACCTGAAGGTG-3') were obtained from Invitrogen (Gaithersburg, MD). The sequence was obtained from the NCBI Entrez Nucleotide Bank based on the *Mus musculus* iNOS mRNA complete code. Adult *ob/ob* diabetic and control mice were treated with sense or antisense iNOS oligonucleotides diluted in Tris/EDTA buffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA) and injected once a day at 10:00 A.M. (10.0 nmol/dose, 24, 48, and 72 h after the onset of the experimental period).

**S-nitrosoglutathione treatment.** S-nitrosoglutathione (GSNO) was prepared by the reaction of glutathione with sodium nitrite in acidic solution, as previously reported (21). Acute treatment was performed by GSNO injection intraperitoneally 30 min before muscle extraction. Chronic treatment was performed by 0.1 mol/l GSNO intraperitoneally injected every 2 h, until completing four doses in 8 h.

**Glucose uptake and glycogen synthesis measurements.** Thirty minutes before the beginning of the experiment, GSNO (GSNO group) or PBS (control group) was injected in the peritoneal cavity of the animals. Soleus muscles were isolated and incubated as previously described (22). The muscles were incubated in Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 5.6 mmol/l glucose, 0.2  $\mu\text{Ci/ml}$  2-deoxy-D-[2,6- $^3\text{H}$ ]glucose, and 0.3  $\mu\text{Ci/ml}$  D-[ $^{14}\text{C}$ ]glucose, with 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ , at 37°C and 120 rpm. Incubation was performed for 1 h in the absence or presence of 10 mU/ml insulin. GSNO was present in the incubation media of the GSNO group. 2-Deoxy-D-[2,6- $^3\text{H}$ ]glucose uptake and [ $^{14}\text{C}$ ]glycogen synthesis were determined as previously described (23,24).

**The 30-min insulin tolerance test.** Rats or mice were fasted for 6 h and submitted to an insulin tolerance test. Briefly, 1.5 IU/kg insulin was infused intraperitoneally to anesthetized rats or mice, and glucose was measured at 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25, and 30 min thereafter. Glucose disappearance rate ( $K_{\text{it}}$ ) was calculated from the formula  $0.693/t_{1/2}$ . The glucose  $t_{1/2}$  was calculated from the slope of the least square analysis of blood glucose concentration during the linear phase of decline (25).

**IR $\beta$ , IRS-1, and S-nitrosothiol immunoprecipitation and Western blot analysis.** Wistar rats or mice were injected with either saline or insulin ( $10^{-5}$  mol/l), and 90 s later, soleus muscle was removed and homogenized as already described (26).

In immunoprecipitation studies, muscle lysates were incubated with anti-IR $\beta$  (0.3 mg/ml), anti-IRS-1 (1:1,000), or anti-S-nitrosothiol (SNO) (1:200) antibodies for 2 h and then incubated with protein A Sepharose for a further 2 h. Beads were then washed with Tris containing 1% Triton X-100, boiled in Laemmli buffer for 5 min, and subjected to Western blotting analysis. Anti-nitrosocystein immunoprecipitates were always handled in the dark to decrease SNO auto-degradation.

Samples from whole-tissue extracts, immunoprecipitates, or biotinylated nitrosocysteines were subjected to SDS-PAGE electrophoresis, and immunoblotting was performed as described (26). Immunoreactive bands were detected by the enhanced chemiluminescence method (RPN 2108 ECL Western blotting analysis system; Amersham Biosciences).

**Detection of S-nitrosated proteins by biotin switch method.** The biotin switch assay was performed essentially as previously described (27,28). Extracts were adjusted to 0.5 mg/ml of protein, and equal amounts were blocked with four volumes of blocking buffer (225 mmol/l HEPES, pH 7.7, 0.9 mmol/l neocuproine, 2.5% SDS, and 20 mmol/l methylmethanethiosulfonate) at 50°C for 30 min with agitation. After blocking, extracts were precipitated with two volumes of cold acetone ( $-20^\circ\text{C}$ ), chilled at  $-20^\circ\text{C}$  for 10 min, centrifuged at 2,000g at 4°C for 5 min, washed with acetone, dried out, and resuspended in 0.1 ml HENS buffer (250 mmol/l HEPES, pH 7.7, 1 mmol/l EDTA, 0.1 mmol/l neocuproine, and 1% SDS) per milligram of protein. Until this point, all operations were carried out in the dark. A 1/3 volume of 4 mmol/l

biotin-HPDP and 2.5 mmol/l ascorbic acid was added and incubated for 1 h at room temperature. Proteins were acetone-precipitated again and resuspended in the same volume of HENS buffer.

For purification of biotinylated proteins, samples from the biotin switch assay were diluted with two volumes of neutralization buffer (20 mmol/l HEPES, pH 7.7, 100 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, and 0.5% Triton X-100), and 15  $\mu\text{l}$  neutravidin-agarose per milligram protein in the initial extract was added and incubated for 1 h at room temperature with agitation. Beads were washed five times with washing buffer (20 mmol/l HEPES, pH 7.7, 600 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, and 0.5% Triton X-100) and incubated with elution buffer (20 mmol/l HEPES, pH 7.7, 100 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, and 100 mmol/l 2-mercaptoethanol) for 20 min at 37°C with gentle stirring. Supernatants were collected, and proteins were separated by SDS-PAGE.

**Detection of S-nitrosation by fluorimetry.** Muscle lysates were submitted to immunoprecipitation using the anti-IR $\beta$  antibody. The immunoprecipitated pellets were washed five times with lysis buffer (29) and then twice with PBS. The pellets were incubated with 1.3 mmol/l  $\text{HgCl}_2$  and 7.8 mmol/l 2,3-diaminonaphthalene for 30 min at 37°C and centrifuged, and then 0.75 mol/l NaOH was added. The quantity of fluorescent naphotriazole generated from the reaction between 2,3-diaminonaphthalene and NO released from S-nitrosated IR $\beta$  was monitored by fluorimetry, using a Perkin-Elmer HTS 7000 spectrofluorimeter with excitation wavelength at 375 nm and emission measured at a wavelength of 450 nm (30,31).

**Insulin receptor autophosphorylation and tyrosine kinase activity.** IR $\beta$  tyrosine kinase activity was measured in vitro by autophosphorylation and by its ability to induce tyrosine phosphorylation of its natural substrate IRS-1. The IR $\beta$  was immunoprecipitated from rat muscle with or without previous  $10^{-9}$  mol/l insulin infusion in the cava vein. This dose of insulin can induce conformational change of IR $\beta$  but not its autophosphorylation. After immunoprecipitation, half of the aliquots were treated with  $10^{-2}$  mol/l GSNO diluted in PBS and the other half with PBS only for 30 min. After extensive washing of immunoprecipitates, a kinase assay was performed by adding 15  $\mu\text{mol/l}$  ATP (32) and the same amount of immunopurified IRS-1 to each immunoprecipitate (33) to measure the ability of IR $\beta$  to phosphorylate IRS-1. The IRS-1 was immunopurified, as previously described, from the livers of control rats (33). Tyrosine phosphorylation was measured by immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibody.

**Akt activity.** Soleus muscles were removed from rats treated, or not treated, with  $10^{-5}$  mol/l insulin. Akt activity was measured with the Akt Kinase Assay Kit (Cell Signaling catalog no. 9840). Briefly, Akt was immunoprecipitated from the muscle of rats, with or without previous  $10^{-5}$  mol/l insulin infusion in the cava vein. The immunoprecipitates were incubated with  $10^{-2}$  mol/l GSNO diluted in PBS or with PBS alone for 30 min. After extensive washing, the immunoprecipitates were then incubated with glycogen synthase kinase (GSK)- $\alpha/\beta$ , which is a substrate to Akt, and Akt activity was measured by immunoblotting to phospho-GSK- $\alpha/\beta$ .

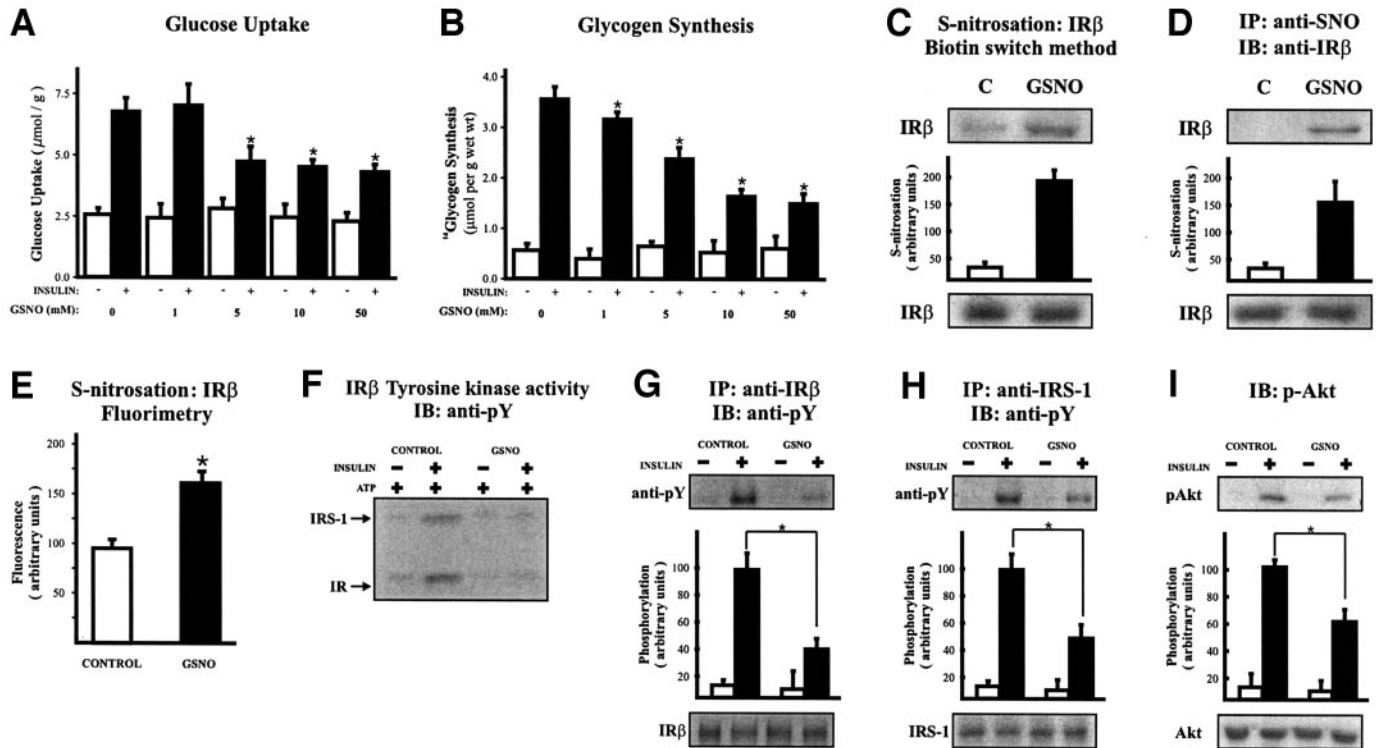
**Statistical analysis.** The results of blots are presented as direct comparisons of bands or dots in autoradiographs and quantified by densitometry using the Scion Image software (ScionCorp, Frederick, MD). Data were analyzed by the two-tailed unpaired Student's *t* test or by repeat-measures ANOVA (one-way or two-way ANOVA) followed by post hoc analysis of significance (Bonferroni test) when appropriate, comparing experimental and control groups. The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

**GSNO induces insulin resistance in isolated and in vivo muscle by means of S-nitrosation.** Isolated soleus muscle was treated with increasing GSNO doses for 30 min and then with insulin or saline for a further 1 h. Insulin-stimulated glucose uptake (Fig. 1A) and glycogen synthesis (Fig. 1B) were progressively reduced when GSNO doses were increased. We hypothesized that NO can modulate insulin action in muscle by inducing S-nitrosation of proteins involved in the early steps of insulin signaling. The ability of NO donors to induce S-nitrosation of IR $\beta$  was investigated by three different methods after the treatment of isolated soleus muscle with 10 mmol/l GSNO, a dose that induced maximal reduction of insulin-stimulated glucose uptake and glycogen synthesis.

GSNO induces S-nitrosation of IR $\beta$  as demonstrated by the biotin switch method (Fig. 1C), by immunoprecipitation with anti-SNO and immunoblotting with anti-IR $\beta$  (Fig.





**FIG. 1.** Effect of GSNO on insulin sensitivity and IR $\beta$  S-nitrosation in isolated soleus muscle. Dose response of GSNO treatment on glucose uptake (A) and glycogen synthesis (B) in isolated rat soleus muscle is shown. GSNO induced S-nitrosation of IR $\beta$ , as demonstrated by the biotin switch method (C), immunoprecipitation (IP) with anti-SNO followed by immunoblotting (IB) with anti-IR $\beta$  (D), and fluorimetry after incubation with diaminonaphtalen (E) are indicated. F: Effect of GSNO treatment in vitro on in vivo insulin-induced IR $\beta$  tyrosine kinase activity measured by autophosphorylation and by its ability to phosphorylate immunopurified IRS-1. Insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR $\beta$  (G) and IRS-1 (H) and serine phosphorylation of Akt (I) after insulin (10  $\mu\text{M}$ ) stimulation for 5 min are indicated. \* $P < 0.05$ , control vs. GSNO-treated soleus. Bars in A, B, E, G, H, and I represent means  $\pm$  SE from six to eight isolated soleus.

1D), and by fluorimetry (Fig. 1E). The results were reproduced by the three methods; however, the biotin switch method was slightly more sensitive.

In parallel with S-nitrosation of IR $\beta$ , in vitro GSNO treatment reduced insulin-induced IR $\beta$  autophosphorylation and IR $\beta$  kinase activity, as demonstrated by the reduction in purified IRS-1 tyrosine phosphorylation, which was decreased by 70% (Fig. 1F).

The effect of GSNO on IR $\beta$  and IRS-1 tyrosine phosphorylation and Akt serine phosphorylation was investigated in isolated soleus muscle. A 50–60% decrease in insulin-induced IR $\beta$  and IRS-1 tyrosine phosphorylation in GSNO-treated muscle (Fig. 1G and H) was found. GSNO treatment also reduced insulin-induced Akt serine phosphorylation by 40%. (Fig. 1I).

Male Wistar rats were also treated with GSNO to investigate whether this NO donor could induce insulin resistance in vivo. Thirty minutes after GSNO administration, an insulin resistance condition was established, as indicated by a lower plasma glucose disappearance rate after the 30 min of the insulin tolerance test ( $K_{\text{itt}}$ ) (Fig. 2A). Insulin resistance was associated with enhanced S-nitrosation of the IR $\beta$  (Fig. 2B). S-nitrosocysteine, another NO donor, when administered to rats, also induced insulin resistance and IR $\beta$  S-nitrosation (data not shown).

Treatment with GSNO for 30 min (Fig. 2C and D) also led to S-nitrosation of IRS-1, as demonstrated by the biotin switch method, but did not change IRS-1 protein levels and IRS-1 serine phosphorylation levels (data not shown). However, when GSNO was given during 8 h, the increased

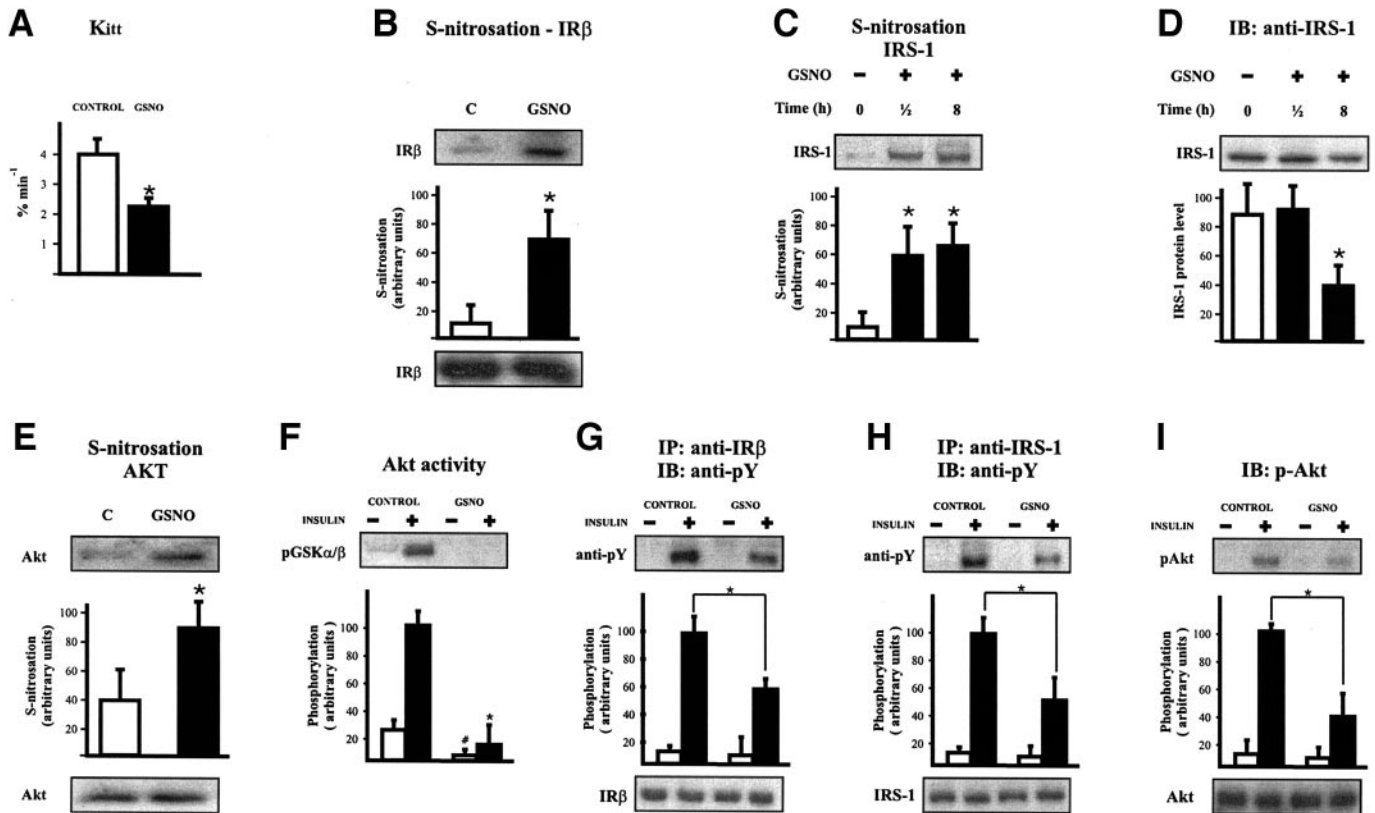
S-nitrosation of IRS-1 (Fig. 2C) was associated with a reduced concentration of this protein in the muscle (Fig. 2D).

We also observed enhanced S-nitrosation of Akt after acute treatment with GSNO (Fig. 2E). A reduction in insulin-induced Akt activity after in vitro GSNO treatment, as demonstrated by decreased GSK- $\alpha/\beta$  phosphorylation, was found (Fig. 2F). Because insulin was administered in vivo and GSNO treatment was performed in vitro, we can conclude that S-nitrosation of Akt directly inhibits its kinase activity. We did not observe S-nitrosation of IRS-2 or p85 or p110 subunits of phosphatidylinositol 3-kinase (data not shown).

We demonstrated that GSNO administration to rats induced an  $\sim$ 50% reduction in insulin-induced IR $\beta$  and IRS-1 tyrosine phosphorylation (Fig. 2G and H) and a 60% reduction in insulin-induced Akt serine phosphorylation (Fig. 2I) in muscle. In preliminary experiments, the S-nitrosation levels of IR $\beta$ , IRS-1, and Akt were also investigated in other muscles with different fiber composition, such as gastrocnemius and adutor longus, and the findings were similar, independently of the muscle used.

**Diet-induced obesity is associated with enhanced S-nitrosation.** Table 1 shows comparative data regarding controls, DIO rats, DIO rats submitted to rosiglitazone treatment, and *ob/ob* mice and their respective controls.

Soleus muscles of male Wistar rats treated with a high-fat diet for 24 weeks were removed, and S-nitrosated proteins were determined and compared with those of controls that received standard rodent food for the same



**FIG. 2.** Effect of GSNO on insulin sensitivity and S-nitrosation in muscle of intact rat. **A:** In vivo effect of acute GSNO (100 mmol/l) treatment on glucose disappearance rates, measured by the 30-min insulin tolerance test. S-nitrosation of IR $\beta$  (**B**) after acute GSNO treatment is shown. S-nitrosation of IRS-1 (**C**) and IRS-1 protein level (**D**) after acute and chronic GSNO treatment is indicated. **E:** Akt S-nitrosation after acute GSNO treatment. **F:** Immunoprecipitated Akt activity after insulin stimulation in vivo and GSNO treatment in vitro, as demonstrated by its capability to phosphorylate its purified substrate GSK $\alpha/\beta$ . Insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR $\beta$  (**G**) and IRS-1 (**H**) and serine phosphorylation of Akt (**I**) after acute GSNO treatment are shown. S-nitrosation was determined in all experiments by the biotin switch method. \* $P < 0.05$ , insulin control vs. insulin GSNO. # $P < 0.05$ , basal control vs. basal GSNO. Bars in **A**, **G**, **H**, **I**, and **J** represent means  $\pm$  SE from four to eight rats. IB, immunoblotting; IP, immunoprecipitated.

period. We observed an increase in iNOS protein expression in the muscle of obese animals (Fig. 3A). This increase in iNOS expression was associated with enhanced S-nitrosation of IR $\beta$ , IRS-1, and Akt (Fig. 3B–D).

Insulin resistance was demonstrated by a reduction in the  $K_{\text{itt}}$  of obese animals (Fig. 3E). Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IR $\beta$  was reduced in the skeletal muscle of obese animals by 50% (Fig. 3F). Insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation was also reduced by 50% (Fig. 3G), and this was accompanied by a 40% reduction in IRS-1 protein content in the skeletal

**TABLE 1**  
Characteristics of rats and mice studied

	<i>n</i>	Body weight (g)	Plasma glucose (mg/dl)	Insulin ( $\mu$ U/ml)
Control	10	532 $\pm$ 38*	112 $\pm$ 4	11 $\pm$ 2*
DIO	12	953 $\pm$ 61	122 $\pm$ 5	23 $\pm$ 3
DIO/rosiglitazone	12	962 $\pm$ 58	118 $\pm$ 7	18 $\pm$ 6
<i>ob/+</i>	8	18.2 $\pm$ 0.6†	117 $\pm$ 17‡	12 $\pm$ 4‡
<i>ob/ob</i>	8	34.2 $\pm$ 0.4	335 $\pm$ 34	85 $\pm$ 21
<i>ob/ob</i> treated with iNOS ASO	8	33.5 $\pm$ 0.6	272 $\pm$ 28	27 $\pm$ 12

Data are means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$ , control  $\times$  DIO and control  $\times$  rosiglitazone; † $P < 0.05$ , *ob/+*  $\times$  *ob/ob* and *ob/+*  $\times$  *ob/ob* treated with iNOS ASO; ‡ $P < 0.05$ , *ob/+*  $\times$  *ob/ob*.

muscle (Fig. 3H). Insulin-induced Akt activation was reduced by 40% when compared with controls (Fig. 3I). The experiments were also repeated with rats treated on the high-fat diet for 4 weeks with very similar results of S-nitrosation and insulin-induced tyrosine phosphorylation but without reductions in IRS-1 protein expression (data not shown).

**iNOS antisense oligonucleotide treatment reduces S-nitrosation and restores insulin signaling in the muscle of *ob/ob* diabetic mice.** In the *ob/ob* mice, another model of insulin resistance, we found enhanced expression of iNOS in muscle (Fig. 4A). We treated *ob/ob* mice with iNOS antisense oligonucleotide (ASO) and studied S-nitrosation of these proteins and insulin signaling. In these experiments, *ob/ob* diabetic mice were also treated with sense oligonucleotide, yielding identical results to those of the untreated *ob/ob* diabetic mice (data not shown). iNOS ASO efficiently blocked the expression of the protein, as demonstrated by a reduction of almost 80% in iNOS protein levels in the muscle (Fig. 4A). In *ob/ob* mice treated with iNOS ASO, no changes were observed in endothelial NOS (eNOS) or neuronal NOS (nNOS) protein expression in muscle, suggesting that the ASO used was specific for iNOS (data not shown).

Treatment of *ob/ob* diabetic mice with iNOS ASO for 3 days lowered the plasma glucose level from 335  $\pm$  34 to 272  $\pm$  28 ( $P < 0.05$ ). As shown in Fig. 4B, the glucose



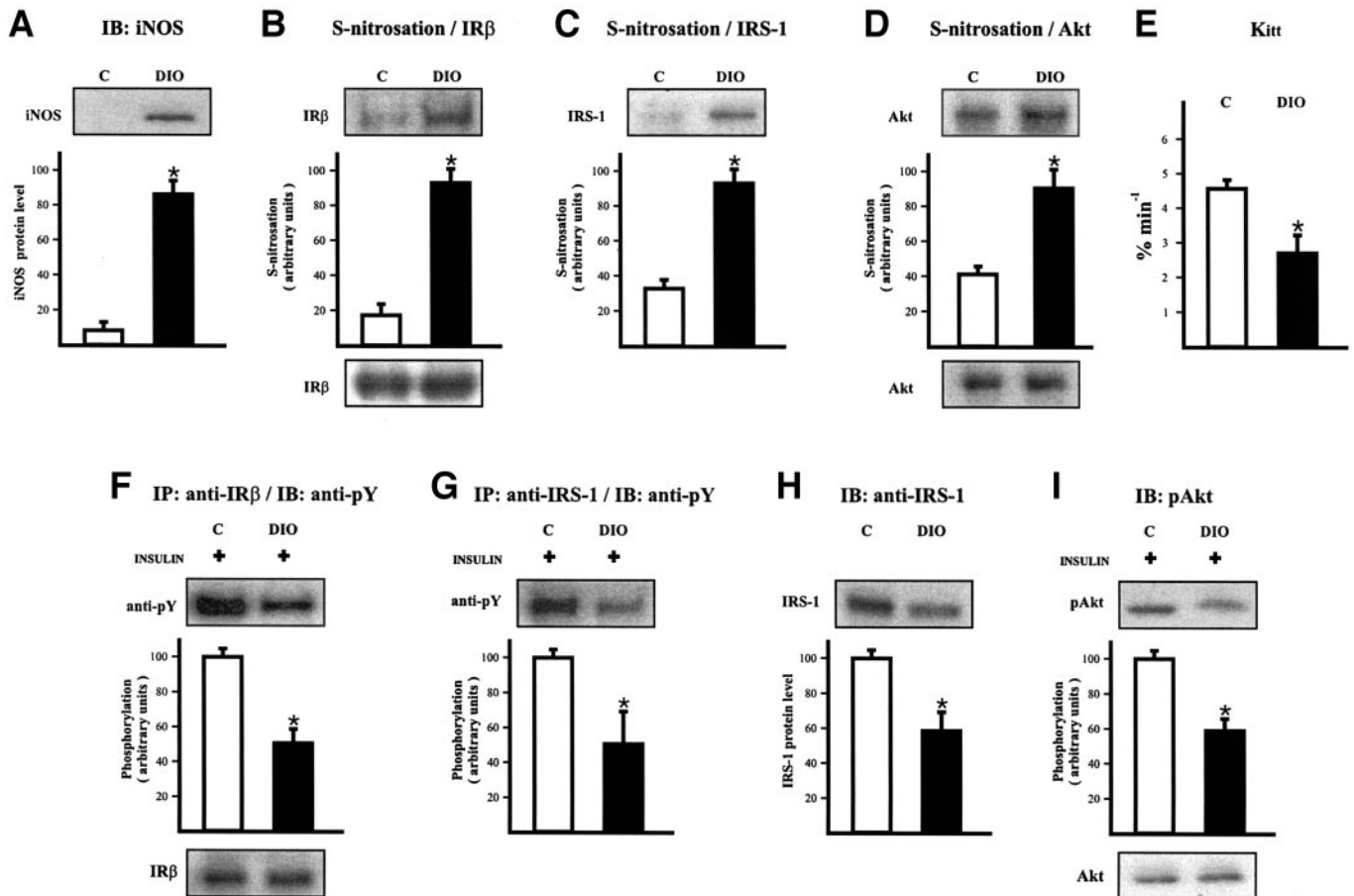


FIG. 3. Effect of DIO on insulin sensitivity and S-nitrosation of IR $\beta$ , IRS-1, and Akt in muscle. **A**: iNOS expression in muscle of DIO animals. S-nitrosation of IR $\beta$  (**B**), IRS-1 (**C**), and Akt (**D**) is shown, determined by the biotin switch method. **E**: Insulin sensitivity evaluated by glucose disappearance rates measured by the 30-min insulin tolerance test. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IR $\beta$  (**F**) and IRS-1 (**G**), IRS-1 protein level (**H**), and Akt serine phosphorylation (**I**) in muscle of DIO animals are shown. \* $P < 0.05$ , control vs. DIO. Bars represent means  $\pm$  SE from six to eight rats. IB, immunoblotting; IP, immunoprecipitated.

disappearance rate at 30 min in the insulin tolerance test was significantly lower in *ob/ob* diabetic mice, and this reduction was reversed by iNOS ASO treatment, indicating an improvement in insulin sensitivity. We demonstrated an enhanced S-nitrosation of IR $\beta$ , IRS-1, and Akt in the muscle of *ob/ob* diabetic animals, which was reversed in iNOS ASO-treated *ob/ob* mice (Fig. 4C–E).

The insulin-stimulated IR $\beta$  and IRS-1 tyrosine phosphorylation were reduced in muscle of the *ob/ob* mice, and these reductions were reversed in the muscle of the iNOS ASO-treated *ob/ob* mice (Fig. 4F and G). iNOS antisense treatment also restored the IRS-1 protein content in muscle (Fig. 4H). The insulin-stimulated serine phosphorylation of Akt was reduced in the muscle of *ob/ob* mice but not in the muscle of iNOS ASO-treated *ob/ob* mice (Fig. 4I).

**Rosiglitazone reduces S-nitrosation of IR $\beta$ /IRS-1/Akt and improves insulin sensitivity in diet-induced obesity.** Thiazolidinediones, ligands of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , which have an insulin-sensitizing effect, were recently found to be inhibitors of the expression of iNOS (34).

Male Wistar rats received a high-fat diet for 24 weeks, and a subgroup of these animals received rosiglitazone at 4 mg/kg body wt for 10 days. Figure 5A shows that rosiglitazone improved insulin sensitivity in animals with

diet-induced obesity. Rosiglitazone did not improve insulin sensitivity in control rats (data not shown). The results also demonstrated that rosiglitazone treatment decreased iNOS expression in the muscle of treated animals (Fig. 5B) and attenuated the S-nitrosation of IR $\beta$ , IRS-1, and Akt (Fig. 5C–E), in parallel with an improvement in insulin signaling (Fig. 5F–I).

## DISCUSSION

S-nitrosation, the formation of SNO by covalent addition to cysteine residues of a NO moiety, shares many features in common with phosphorylation, the prototypic post-translational modification involved in signal transduction regulation, and has been shown to regulate the function of a broad spectrum of proteins in intact cells (35). Important recent findings include demonstrations of major roles for S-nitrosation in vesicle-mediated insulin release (36), in protein processing associated with neurodegeneration of Parkinson's disease (37), and in the essential mechanisms of vectorial membrane trafficking (38). In the present study, we demonstrated that some proteins involved in early steps of insulin action can be S-nitrosated and that this posttranslational modification alters their function, suggesting a mechanism for iNOS-induced insulin resistance.

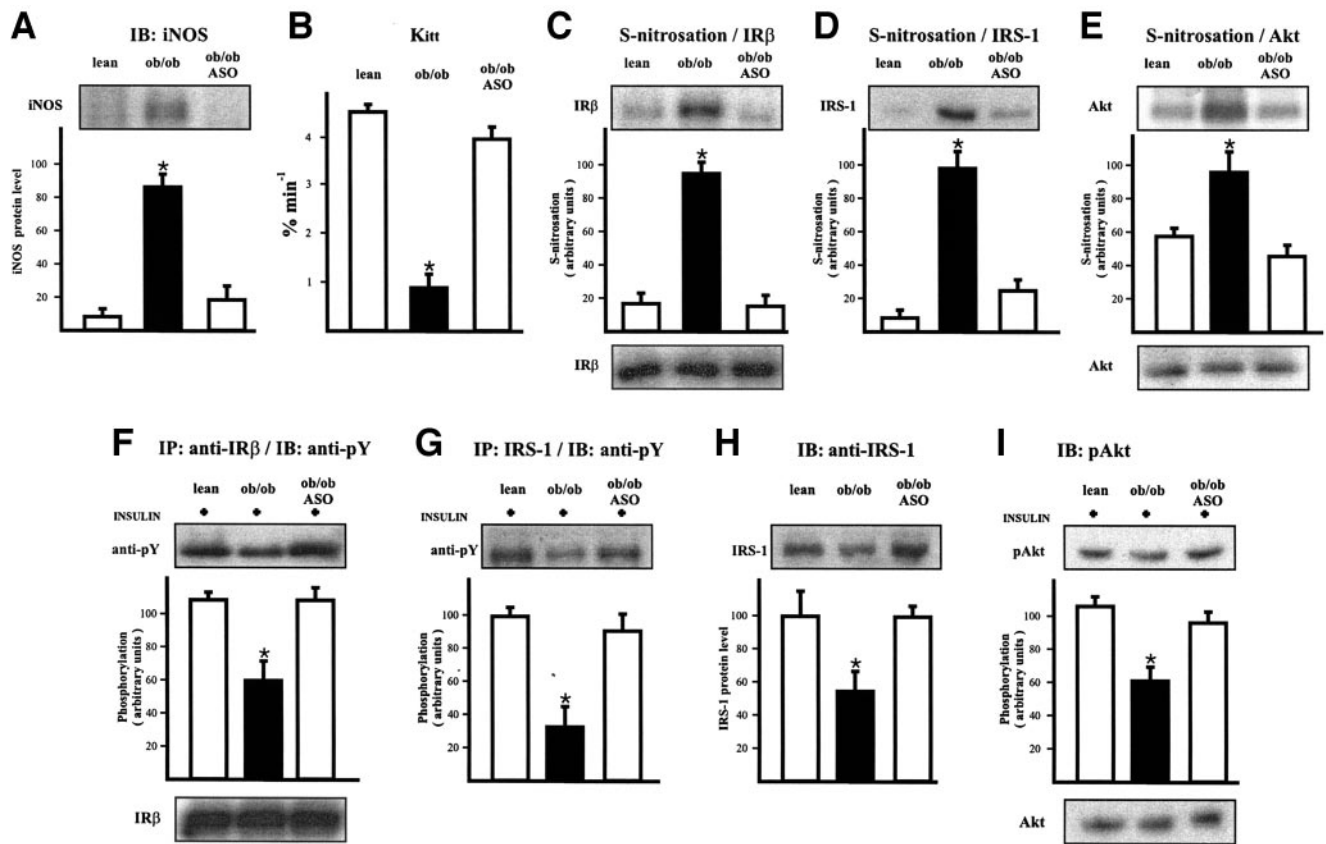


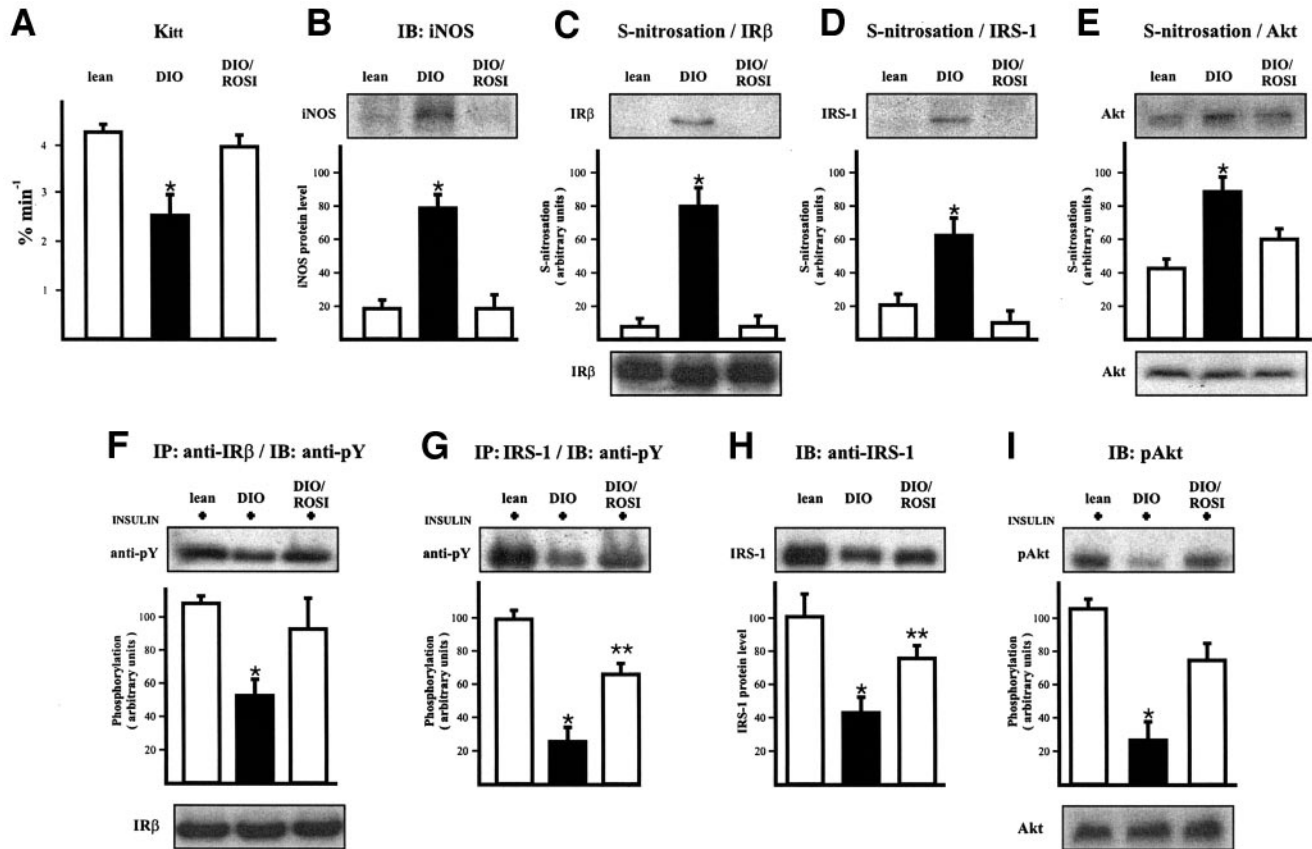
FIG. 4. Effect of iNOS antisense oligonucleotide (ASO) on iNOS expression, S-nitrosation of IR $\beta$ /IRS-1/Akt, and insulin signaling in muscle of *ob/ob* diabetic mice. *A*: iNOS protein level in *ob/ob* diabetic mice compared with iNOS ASO-treated *ob/ob* mice. *B*: Insulin sensitivity evaluated by glucose disappearance rates, measured by the 30-min insulin tolerance test. S-nitrosation of IR $\beta$  (*C*), IRS-1 (*D*), and Akt (*E*) is shown, determined by the biotin switch method. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IR $\beta$  (*F*) and IRS-1 (*G*), IRS-1 protein levels (*H*), and insulin-stimulated serine phosphorylation of Akt (*I*) is indicated. \* $P < 0.05$ , *ob/ob* vs. lean and *ob/ob* ASO. Bars represent means  $\pm$  SE from six to eight mice. IB, immunoblotting; IP, immunoprecipitated.

Initially, we demonstrated that the NO donor, GSNO, reduces insulin-stimulated glucose metabolism in incubated rat soleus muscle. These effects were associated with increased S-nitrosation of IR $\beta$  in both isolated muscle and in the intact rat. This posttranslational modification was accompanied by a reduction in insulin-induced insulin receptor autophosphorylation and tyrosine kinase activity. The administration of GSNO also leads to S-nitrosation of IRS-1. Interestingly, the administration of this NO donor for 8 h, which allows a more prolonged S-nitrosation of IRS-1, is also accompanied by a reduction in IRS-1 protein content. A recent report demonstrated that the administration of NO donors to C2C12 myocytes induced IRS-1 degradation and, consequently, reduced protein content in a time- and dose-dependent manner (39). Taking these data together, it may be suggested that an increase in IRS-1 S-nitrosation may favor its degradation and explain the reduced protein content observed in the muscle of the intact rats that received the NO donor. This may be important, since in some situations of insulin resistance, there is a reduction in IRS-1 expression in muscle, contributing to reduced insulin sensitivity (40,41). In addition, GSNO administration also led to Akt S-nitrosation, which was accompanied by a reduction of its basal and insulin-stimulated kinase activity. The S-nitrosation of IR $\beta$  and Akt, and their reduced kinase activity, is associated with an important reduction of insulin signaling, which may

play an important role in the reduced glucose transport and glycogen storage in isolated muscle treated with the NO donor and also in the insulin resistance of the animals that received this drug.

Two previously described molecular mechanisms related to insulin resistance are increased phosphotyrosine phosphatase (PTPase) activity, mainly protein tyrosine phosphatase 1B (42), and increased serine phosphorylation of IRSs (43), possibly mediated by many kinases, including protein kinase C (44), mitogen-activated protein kinase (45), and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (46). We suggest that S-nitrosation is a novel mechanism of iNOS-induced insulin resistance, since the administration of an NO donor, which increased S-nitrosation of IRS-1, did not change the serine phosphorylation level of this protein, and recent data show that the administration of NO donors to different cell types reduces PTP1B activity (47). The insulin resistance induced by S-nitrosation seems to occur in at least three different steps of insulin action, i.e., by reducing IR $\beta$  autophosphorylation and tyrosine kinase activity, by reducing IRS-1 protein content, and by reducing Akt activity.

Recently, Gow et al. (48) demonstrated that protein S-nitrosation is coupled with the activity of all major forms of NO synthase. Furthermore, previous data have shown that iNOS expression is induced in several situations associated with insulin resistance, including DIO, genetic



**FIG. 5.** Effect of rosiglitazone (ROSI) on insulin sensitivity, iNOS protein level, S-nitrosation of IR $\beta$ /IRS-1/Akt, and insulin signaling in muscle of DIO animals. **A:** Insulin sensitivity, as evaluated by glucose disappearance rates and measured by the 30-min insulin tolerance test. **B:** iNOS protein level in the muscle of DIO animals compared with rosiglitazone-treated DIO animals. S-nitrosation of IR $\beta$  (**C**), IRS-1 (**D**), and Akt (**E**) is shown, as determined by the biotin switch method. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IR $\beta$  (**F**) and IRS-1 (**G**), IRS-1 protein levels (**H**), and insulin-stimulated serine phosphorylation of Akt (**I**) are indicated. \* $P < 0.05$ , DIO vs. lean. \*\* $P < 0.05$ , DIO vs. DIO/ROSI. Bars represent means  $\pm$  SE from six to eight rats. IB, immunoblotting; IP, immunoprecipitated.

obesity, and endotoxemia (12,17,19). Here we investigated whether the phenomenon of S-nitrosation could also be observed in the muscle of animal models of insulin resistance. In DIO and *ob/ob* diabetic mice, there was an increase in iNOS expression in muscle, with a parallel increase in the S-nitrosation of IR $\beta$ , IRS-1, and Akt. As previously described, we also observed a reduced insulin signaling in the muscle of these animals (26). In *ob/ob* diabetic mice, the reduction of iNOS expression by ASO is accompanied by a reduction of S-nitrosation and improvement of insulin signaling through IR $\beta$ , IRS-1, and Akt and a reversal of insulin resistance. These data demonstrate that the insulin resistance observed in DIO and *ob/ob* diabetic mice is accompanied by an increase in iNOS expression and in S-nitrosation of proteins involved in early steps of insulin action. Moreover, in *ob/ob* mice, the reduction in iNOS expression is followed by the reduction in S-nitrosation of these proteins and reversal of insulin resistance. Targeted disruption of iNOS prevents whole-body and skeletal muscle insulin resistance in mice rendered obese by feeding a high-fat diet, which seems to be secondary to preservation of insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR $\beta$  and IRS-1 and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle of obese iNOS knock-out mice (19). Although our data suggest that S-nitrosation of these proteins is a potential mechanism of iNOS-induced insulin resistance, we cannot rule out that ty-

rosine nitration may also contribute to NO-mediated insulin resistance in these models.

Other molecular mechanisms of insulin resistance have been demonstrated in the muscle of DIO rats and *ob/ob* mice, including an increase in IRS serine phosphorylation and also an increase in protein tyrosine phosphatase 1B activity (42,43). It is possible that multiple mechanisms can contribute to insulin resistance, and reversal of one of them can improve insulin action, as we demonstrate here and as previously demonstrated for other mechanisms (42,46,49).

Finally, our data raise the possibility that agents that reduce iNOS expression or activity and, consequently, reduce S-nitrosation might have beneficial effects on obesity- and septicemia-linked insulin resistance and associated complications. Recently, thiazolidinediones, a class of synthetic ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  with insulin-sensitizing effects, were found to be potent inhibitors of iNOS induction in several cell types (34,50,51). When administered to diet-induced obese animals, rosiglitazone was able to reduce iNOS expression, improve insulin signaling, reduce insulin resistance, and decrease the S-nitrosation observed in these obese animals. These effects may explain part of the improving effects of thiazolidinedione on insulin sensitivity in obese diabetic subjects.

The results presented herein may represent a potential



mechanism involved in the iNOS-induced insulin resistance. The increase in iNOS expression provokes enhanced production of NO that can induce S-nitrosate IR $\beta$ , IRS-1, and Akt, inducing downregulation of insulin signaling.

#### ACKNOWLEDGMENTS

M.A.C.-F. and A.B.S. hold a graduate fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, projects 01/03176-5 and 01/7869-9, respectively.

#### AUTHORS' NOTE

Despite the lack of a consensus about the use of nitrosation or nitrosylation to describe the modifications induced in proteins and other substrates through their reaction with NO, we are using "S-nitrosation" throughout this article to emphasize that the modification we are referring to is a nitrosative modification of the cysteine residues of the insulin receptor, IRS-1, and Akt. This modification is associated with the formation of an SNO group and rules out the coordination of NO to a metal center as a nitrosyl ligand. In the opinion of the authors, only this last class of reactions should be named "nitrosylation" reactions.

#### REFERENCES

- Lane P, Gross SS: Cell signaling by nitric oxide. *Semin Nephrol* 19:215–229, 1999
- Gross SS, Wolin MS: Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 57:737–769, 1995
- Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J: S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:444–448, 1992
- Stamler JS, Toone EJ, Lipton SA, Sucher NJ: (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron* 18:691–696, 1997
- Lander HM, Ogiste JS, Pearce SF, Levi R, Novogrodsky A: Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J Biol Chem* 270:7017–7020, 1995
- Broillet MC, Firestein S: Direct activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel through modification of sulfhydryl groups by NO compounds. *Neuron* 16:377–385, 1996
- Molina y Vedia L, McDonald B, Reep B, Brune B, Di Silvio M, Billari TR, Lapetina EG: Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation. *J Biol Chem* 267:24929–24932, 1992
- Kapur S, Bedard S, Marcotte B, Cote CH, Marette A: Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 46:1691–1700, 1997
- Shimabukuro M, Ohneda M, Lee Y, Unger RH: Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease. *J Clin Invest* 100:290–295, 1997
- Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH: Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2498–2502, 1998
- Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH: Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1784–1789, 2000
- Sugita H, Kaneki M, Tokunaga E, Sugita M, Koike C, Yasuhara S, Tompkins RG, Martyn JA: Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E386–E394, 2002
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM: Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409–2415, 1995
- Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW: C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:972–978, 1999
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87–91, 1993
- Hotamisligil GS, Spiegelman BM: Tumor necrosis factor- $\alpha$ : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43:1271–1278, 1994
- Bedard S, Marcotte B, Marette A: Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 325:487–493, 1997
- Kapur S, Marcotte B, Marette A: Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia. *Am J Physiol* 276:E635–E641, 1999
- Perreault M, Marette A: Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 7:1138–1143, 2001
- Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ, Kraegen EW: Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am J Physiol* 251:E576–E583, 1986
- Oliveira MG, Shishido SM, Seabra AB, Morgon NH: Thermal stability of primary S-nitrosothiols: roles of autocatalysis and structural effects on the rate of nitric oxide release. *J Phys Chem A* 106:8963–8970, 2002
- Crettaz M, Prentki M, Zaninetti D, Jeanrenaud B: Insulin resistance in soleus muscle from obese Zucker rats: involvement of several defective sites. *Biochem J* 186:525–534, 1980
- Ceddia RB, William WN Jr, Curi R: Comparing effects of leptin and insulin on glucose metabolism in skeletal muscle: evidence for an effect of leptin on glucose uptake and decarboxylation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:75–82, 1999
- Leighton B, Cooper GJ: Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro. *Nature* 335:632–635, 1988
- Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corgnati A, Muggeo M: Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 68:374–378, 1989
- Saad MJ, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR: Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest* 90:1839–1849, 1992
- Jaffrey SR, Snyder SH: The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE* 2001:PL1, 2001
- Martinez-Ruiz A, Lamas S: Detection and proteomic identification of S-nitrosylated proteins in endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 423:192–199, 2004
- Park HS, Park E, Kim MS, Ahn K, Kim IY, Choi EJ: Selenite inhibits the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) through a thiol redox mechanism. *J Biol Chem* 275:2527–2531, 2000
- Miles AM, Wink DA, Cook JC, Grisham MB: Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. *Methods Enzymol* 268:105–120, 1996
- Wink DA, Grisham MB, Mitchell JB, Ford PC: Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. *Methods Enzymol* 268:12–31, 1996
- Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA: Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem* 271:22100–22104, 1996
- Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM: Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem* 271:13018–13022, 1996
- Li M, Pascual G, Glass CK: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* 20:4699–4707, 2000
- Stamler JS, Lamas S, Fang FC: Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106:675–683, 2001
- Rizzo MA, Piston DW: Regulation of beta cell glucokinase by S-nitrosylation and association with nitric oxide synthase. *J Cell Biol* 161:243–248, 2003
- Chung KK, Thomas B, Li X, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L, Dawson VL, Dawson TM: S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science* 304:1328–1331, 2004
- Matsushita K, Morrell CN, Cambien B, Yang SX, Yamakuchi M, Bao C, Hara MR, Quick RA, Cao W, O'Rourke B, Lowenstein JM, Pevsner J, Wagner DD, Lowenstein CJ: Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell* 115:139–150, 2003
- Sugita H, Sugita M, Kaneki M: iNOS gene disruption restores depressed IRS-1 expression in skeletal muscle and ameliorates insulin resistance in (ob/ob) mice (Abstract). *Diabetes* 52 (Suppl. 1):A299, 2003
- Saad MJ, Folli F, Kahn JA, Kahn CR: Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Invest* 92:2065–2072, 1993
- Zecchin HG, Bezerra RM, Carvalho-Filho JB, Saad MJ, Metzke K, Franchini KG, Saad MJ: Insulin signalling pathways in aorta and muscle

- from two animal models of insulin resistance: the obese middle-aged and the spontaneously hypertensive rats. *Diabetologia* 46:479–491, 2003
42. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML, Kennedy BP: Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283:1544–1548, 1999
  43. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM: IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271:665–668, 1996
  44. Chin JE, Liu F, Roth RA: Activation of protein kinase C  $\alpha$  inhibits insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *Mol Endocrinol* 8:51–58, 1994
  45. De Fea K, Roth RA: Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272:31400–31406, 1997
  46. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS: A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333–336, 2002
  47. Li S, Whorton AR: Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B in intact cells by S-nitrosothiols. *Arch Biochem Biophys* 410:269–279, 2003
  48. Gow AJ, Chen Q, Hess DT, Day BJ, Ischiropoulos H, Stamler JS: Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. *J Biol Chem* 277:9637–9640, 2002
  49. Klamon LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, Moghal N, Lubkin M, Kim YB, Sharpe AH, Stricker-Krongrad A, Shulman GI, Neel BG, Kahn BB: Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol* 20:5479–5489, 2000
  50. Kwon G, Xu G, Marshall CA, McDaniel ML: Tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced pancreatic beta-cell insulin resistance is mediated by nitric oxide and prevented by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> and aminoguanidine: a role for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activation and inos expression. *J Biol Chem* 274:18702–18708, 1999
  51. Maggi LB Jr, Sadeghi H, Weigand C, Scarim AL, Heitmeier MR, Corbett JA: Anti-inflammatory actions of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> and troglitazone: evidence for heat shock-dependent and -independent inhibition of cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression. *Diabetes* 49:346–355, 2000

**Targeted disruption of iNOS prevents LPS induced S-nitrosation of IR $\beta$ /IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice.**

Marco A. Carvalho-Filho<sup>1</sup>, Mirian Ueno<sup>1</sup>, José B. C. Carvalheira<sup>1</sup>, Lício A. Velloso<sup>1</sup>, Mario J. A. Saad<sup>1</sup>.

Departamento de Clínica Médica<sup>1</sup>, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

Nonstandard abbreviations: nitric oxide synthase (NOS); protein kinase B/Akt, (Akt); insulin receptor  $\beta$  subunit (IR $\beta$ ); insulin receptor substrate (IRS); insulin tolerance test (ITT)

Running Head: Targeted disruption of iNOS prevents insulin resistance

Corresponding Author:

Mario J. A. Saad

Departamento de Clínica Médica – FCM, UNICAMP

13081 970 – Campinas SP, Brazil

Email: [msaad@fcm.unicamp.br](mailto:msaad@fcm.unicamp.br)

Phone/Fax: +55 19 37888950

## **ABSTRACT**

We have previously demonstrated that the insulin resistance associated with iNOS induction in two different models of obesity, diet induced obesity and the ob/ob mice, is mediated by S-nitrosation of proteins involved in insulin signal transduction: insulin receptor  $\beta$  subunit (IR $\beta$ ), insulin receptor substrate 1(IRS-1) and Akt. S-nitrosation of IR $\beta$  and Akt impairs their kinase activities. S-nitrosation of IRS-1 reduces its tissue expression. In this study, we observed that LPS induced insulin resistance in the muscle of wild type mice, as demonstrated by reduced insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR $\beta$  and IRS-1, reduced IRS-1 expression and reduced insulin-induced serine-phosphorylation of Akt. This resistance occurred in parallel with enhanced iNOS expression, which was accompanied by S-nitrosation of IR $\beta$ / IRS-1 and Akt.

In the muscle of iNOS<sup>-/-</sup> mice, we did not observe enhanced iNOS expression, nor any S-nitrosation of IR $\beta$ / IRS-1 and Akt after LPS treatment. Moreover, insulin resistance was not present. The preservation of insulin-induced tyrosine-phosphorylation of IR $\beta$  and IRS-1, of IRS-1 protein expression and of insulin-induced serine-phosphorylation of Akt, observed in LPS treated iNOS<sup>-/-</sup> mice strongly suggests that the insulin resistance induced by LPS is iNOS mediated, probably through S-nitrosation of proteins of early steps of insulin signalling.

## INTRODUCTION

Septic patients and animal models of sepsis or endotoxemia exhibit many metabolic alterations, including attenuated responsiveness to insulin (9; 19; 20). The occurrence of insulin resistance during sepsis is demonstrated by diminished glucose tolerance and hyperinsulinemia (22; 23).

Administration of Gram-negative bacterial lipopolysaccharide (LPS) has been used as a model of severe infection in man and animals (5; 11). LPS is a key mediator of many of the host responses resulting from Gram-negative bacteremia and sepsis; inducing many genes involved in the immune, inflammatory, and acute phase responses. Among these genes, inducible nitric oxide synthase (iNOS) has been implicated in both protective and detrimental host responses to sepsis and endotoxemia (17; 21; 24). LPS decreases glucose uptake and induces iNOS expression in isolated soleus (8), and induces insulin resistance in rats (1).

Accumulating evidence implicates a potential link between iNOS and insulin resistance. In several situations of insulin resistance, such as diet-induced, genetic obesity and endotoxemia, there is an iNOS induction in tissues classically related to insulin signaling (3; 8). Recently, Perreault and Marette demonstrated that genetic disruption of iNOS protects against obesity-linked insulin resistance, preventing impairments in phosphatidyl inositol-3-kinase (PI-3 kinase) and Akt activation by insulin in muscle (13).

We have recently demonstrated, in our laboratory, that the insulin resistance associated with iNOS induction in two different models of obesity, diet-induced obesity and the ob/ob mice, is mediated by S-nitrosation of proteins involved in insulin signal



transduction, i. e., insulin receptor  $\beta$  subunit (IR $\beta$ ), insulin receptor substrate 1(IRS-1) and Akt. S-nitrosation of IR $\beta$  reduces its autophosphorylation and tyrosine-kinase activity (3). In addition, S-nitrosation of IRS-1 is associated with its reduced tissue expression, possibly mediated by increased proteasome-mediated degradation (3; 16). Finally, S-nitrosation of Akt is associated with decreased serine-kinase activity of this enzyme, in basal states and after insulin stimulation (3; 25).

These previous data suggest that S-nitrosation may also contribute to the molecular mechanism of reduced insulin sensitivity induced by LPS or sepsis. In this study, we investigated whether LPS treatment induces insulin resistance by means of S-nitrosation of proteins involved in insulin signal transduction, and whether genetic disruption of iNOS could prevent this state of insulin resistance.

## Methods

*Materials.* Antiphosphotyrosine, anti-insulin receptor  $\beta$  subunit (IR $\beta$ ), anti-insulin receptor substrate 1 (IRS-1), anti-protein kinase B (Akt) and anti-inducible NO synthase (iNOS) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-pAkt was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Human recombinant insulin (Humulin R) was purchased from Eli Lilly (Indianapolis, IN). Routine reagents were purchased from Sigma unless otherwise specified.  $^{125}\text{I}$ -Protein A was from Amersham (Amersham, UK).

*Animals.* The iNOS knockout mice used were C57BL/6-backcrossed *Nos2*<sup>-/-</sup> mice purchased from the Jackson Labs (C57BL/6-Nos2tm1Lau colony). Animals were allowed free access to standard rodent chow and water *ad libitum*. All experiments were performed with 8 week-old C57BL/6 or iNOS<sup>-/-</sup> mice. Food was withdrawn 6 h before the experiments. The Ethics Committee at the University of Campinas approved all experiments involving animals.

*LPS treatment.* Eight hs before experiments, C57BL/6 and *Nos2*<sup>-/-</sup> mice received injections i.p. of saline alone or saline plus LPS (10mg/Kg).

*Thirty-minute insulin tolerance test.* Mice were fasted for 6 h and submitted to an insulin tolerance test. Briefly, 1.5 IU/Kg insulin was infused intraperitoneally in mice and glucose was measured at 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25, 30 min thereafter. The glucose disappearance rate ( $K_{it}$ ) was calculated from the formula  $0.693/t_{1/2}$ . The glucose  $t_{1/2}$  was calculated from the slope of the least square analysis of blood glucose concentration during the linear phase of decline (2).

*IR $\beta$ , and IRS-1 immunoprecipitation.* Mice were injected intraperitoneally either with saline or insulin (3.8U/Kg) and 90s after soleus muscle were removed and homogenized as described (18). Muscle lysates were incubated with anti-IR $\beta$  (0.3mg/ml) or anti-IRS-1 (1:1000) antibodies for 2h and then incubated with protein A Sepharose for a further 2h. Beads were then washed with Tris containing 1% Triton X-100 and phosphatase inhibitors, boiled 5 min in Laemmli buffer and subjected to western-blotting analysis.

*Western-blot analysis.* Muscle extracts, immunoprecipitates or biotinylated nitrosocysteines were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis, and immunoblotting was performed as described (14). Immunoreactive bands were detected by the enhanced chemiluminescence method (RPN 2108 ECL Western blotting analysis system – Amershan Biosciences).

*Detection of S-nitrosated proteins by biotin switch method.* The biotin switch assay was performed essentially as previously described (7; 10). Extracts were adjusted to 0.5 mg/mL of protein and equal amounts were blocked with 4 volumes of blocking buffer (225 mM Hepes, pH 7.7, 0.9 mM neocuproine, 2.5% SDS, and 20 mM MMTS) at 50°C for 30 min with agitation. After blocking, extracts were precipitated with 2 volumes of cold acetone (-20°C), chilled at -20°C for 10 min, centrifuged at 2000g, 4°C for 5 min, washed with acetone, dried out, and resuspended in 0.1 mL HENS buffer (250 mM Hepes, pH 7.7, 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproine, and 1% SDS) per mg of protein. Until this point, all operations were carried out in the dark. A 1/3 vol of biotin-HPDP 4 mM and 2.5 mM ascorbic acid were added, and incubated for 1 h at room temperature. Proteins were acetone-precipitated again and resuspended in the same volume of HENS buffer.

For purification of biotinylated proteins, samples from the biotin switch assay were diluted with two volumes of neutralization buffer (20 mM Hepes, pH 7.7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.5% Triton X-100) and 15  $\mu$ L of neutravidin-agarose per mg of protein in the initial extract was added and incubated for 1 h at room temperature with agitation. Beads were washed five times with washing buffer (20 mM Hepes, pH 7.7, 600 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.5% Triton X-100) and incubated with elution buffer (20 mM Hepes, pH 7.7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 100 mM 2-mercaptoethanol) for 20 min at 37°C with gentle stirring. Supernatants were collected and proteins were separated by SDS-PAGE.

*Insulin receptor autophosphorylation and tyrosine-kinase activity.* IR $\beta$  tyrosine kinase activity was measured *in vitro* by autophosphorylation and by its ability to induce tyrosine phosphorylation of its natural substrate, IRS-1. The IR $\beta$  was immunoprecipitated from mice muscle with or without previous insulin 10<sup>-9</sup>M infusion in the cava vein. This dose of insulin can induce a conformational change in IR $\beta$ , but not its autophosphorylation. After extensive washing of immunoprecipitates, a kinase assay was performed by adding 15  $\mu$ M ATP (15) and the same amount of immunopurified IRS-1 to each immunoprecipitate (12), in order to measure the ability of IR $\beta$  to phosphorylate IRS-1. The IRS-1 was immunopurified as previously described, from the livers of control mice (12). Tyrosine phosphorylation was measured by immunoblotting with antiphosphotyrosine antibody.

*Akt activity.* Soleus muscles were removed from mice treated, or not, with 10<sup>-5</sup>M insulin. Akt activity was measured with the Akt Kinase Assay Kit (Cell Signaling cat #9840). Briefly, Akt was immunoprecipitated from the muscle of mice, with or without previous 10<sup>-5</sup>M insulin infusion in the cava vein. After extensive washing, the immunoprecipitates were

then incubated with Glycogen Synthase Kinase (GSK)- $\alpha/\beta$ , which is a substrate to Akt, and Akt activity was measured by immunoblotting to phospho-GSK- $\alpha/\beta$ .

*Statistical analysis.* The results of blots are presented as direct comparisons of bands in autoradiographs and quantified by densitometry using the Scion Image software (ScionCorp, Frederick, MD, USA). Data were analyzed by the two-tailed unpaired Student's *t* test or by repeat-measures analysis of variance (one-way or two-way ANOVA) followed by *post hoc* analysis of significance (Bonferroni test) when appropriate, comparing experimental and control groups. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

*Effect of LPS on iNOS expression and insulin sensitivity.* Initially, we investigated whether LPS treatment could induce iNOS protein expression in muscle of wild-type and iNOS<sup>-/-</sup> mice. After 8hs of LPS (10mg/Kg) treatment, we observed enhanced iNOS expression in the muscle of wild-type mice, but not in muscle of iNOS<sup>-/-</sup> mice (Figure 1a)

To investigate whether enhanced iNOS expression may be associated with insulin resistance, we performed the i.p. insulin tolerance test after LPS treatment in wild-type and iNOS<sup>-/-</sup> mice, 8 hs after administration of LPS, we noticed insulin resistance in wild-type mice but not in iNOS<sup>-/-</sup> mice, as expressed by lower plasma glucose disappearance rates, measured by the 30minute-insulin tolerance test ( $K_{itt}$ ) (Figure 1b).

*Effect of LPS on insulin-induced IR $\beta$  autophosphorylation, tyrosine-kinase activity, S-nitrosation and protein level.* LPS treatment reduced insulin-induced IR $\beta$  autophosphorylation in the muscle of wild-type mice by 73% ( $p < 0.05$ ), but not in the muscle of iNOS<sup>-/-</sup> mice (Figure 2a). This reduction was accompanied by decreased insulin-induced IR $\beta$  tyrosine-kinase activity, as demonstrated by reduced purified IRS-1 tyrosine-phosphorylation by immunoprecipitated IR $\beta$  from muscle of LPS treated wild-type mice (Figure 2a).

We also observed a reduction in insulin-induced IR $\beta$  tyrosine-phosphorylation after LPS treatment in the muscle of wild-type mice, but not in the muscle of iNOS<sup>-/-</sup> mice (Figure 2b). LPS treatment was associated with enhanced S-nitrosation of IR $\beta$  in the muscle of

wild-type mice but not in the muscle of iNOS<sup>-/-</sup> mice (Figure 2c). The IRβ protein level was not affected by LPS treatment in either wild-type or iNOS<sup>-/-</sup> mice (Figure 2d).

*Effect of LPS on IRS-1 tyrosine-phosphorylation, S-nitrosation and protein level.* LPS treatment reduced insulin-induced IRS-1 tyrosine-phosphorylation in the muscle of wild-type mice by 62% (p<0.05), but not in the muscle of iNOS<sup>-/-</sup> mice (Figure 3a). In the muscle of LPS-treated wild-type mice, we observed enhanced S-nitrosation of IRS-1, which was accompanied by a reduced IRS-1 protein level (reduced by 47%, p<0.05). These alterations were not observed in iNOS<sup>-/-</sup> mice (Figures 3b and 3c).

*Effect of LPS on Akt serine-kinase activity, serine-phosphorylation, S-nitrosation and protein level.* After 8 hs of LPS treatment, we observed a reduction in immunoprecipitated Akt serine-kinase activity in the muscle of wild-type mice, as demonstrated by its reduced capacity to phosphorylate its substrate GSKα/β. Immunoprecipitated Akt from the muscle of iNOS<sup>-/-</sup> mice did not present this reduction in serine-kinase activity (Figure 4a). Insulin-induced Akt serine-phosphorylation was also reduced in the muscle of LPS-treated wild-type mice, but not in the muscle of iNOS<sup>-/-</sup> mice (Figure 4b).

LPS treatment led to increased S-nitrosation of Akt in the muscle of wild-type mice, but not in the muscle of iNOS<sup>-/-</sup> mice (Figure 4c). LPS treatment had no effect on Akt protein level in the muscle of either wild-type or iNOS<sup>-/-</sup> mice (Figure 4d).

## Discussion

Recent studies demonstrate that exogenous NO and the NO produced by iNOS can modulate insulin action in muscle. NO donors induce dose-dependent inhibition of maximal insulin-stimulated glucose transport in isolated muscles and in cultured L6 muscle cells, without affecting insulin binding to its receptor (8). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) was not detected in resting muscle, however, its induction has been associated with impaired insulin-stimulated glucose uptake in isolated rat muscles (8).

Endotoxemia is a clinical and experimental situation related to insulin resistance and iNOS induction. LPS impairs insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle, the major tissue for insulin-mediated glucose uptake (22). However, the molecular mechanisms involved in this reduction were not completely understood. Therefore, since LPS induces iNOS expression in muscle, we decided to investigate whether the enhanced NO production by this enzyme could induce S-nitrosation of proteins involved in insulin signal transduction and, consequently, insulin resistance.

Recently, we demonstrated that iNOS induction in the muscle of diet-induced obese rats and ob/ob is associated with enhanced NO production and enhanced S-nitrosation of IR $\beta$ , IRS-1 and Akt. S-nitrosation of IR $\beta$  and Akt is associated with reductions in their kinase activities, downregulating IR $\beta$ /IRS-1/PI 3-kinase/Akt pathway (3). Since this pathway plays a central role in metabolic actions of insulin in muscle, including stimulation of glucose uptake and glycogen synthesis, a down regulation of this pathway in muscle by S-nitrosation may be an important mechanism of iNOS-induced insulin resistance.



Initially, we observed that LPS treatment induced insulin resistance in parallel with augmented iNOS expression in the muscle of wild-type mice. Insulin-stimulated IR $\beta$  tyrosine-kinase activity and tyrosine-phosphorylation were reduced in this tissue, and its S-nitrosation was enhanced. As we have previously demonstrated, S-nitrosation of IR $\beta$  is associated with its reduced tyrosine-kinase activity.

S-nitrosation of IRS-1 by a NO donor or after iNOS induction is associated with reduced protein expression in muscle without altering mRNA levels, which suggests an enhanced IRS-1 protein degradation after S-nitrosation (16). We observed that iNOS induction in diet-induced obesity and in ob/ob mice was associated with enhanced S-nitrosation of IRS-1 and its reduced protein level in muscle. Pharmacological or genetic blockage of iNOS prevented the reduction in the IRS-1 protein level in these two models of insulin resistance. LPS treatment induced S-nitrosation of IRS-1 which was accompanied by reduced IRS-1 protein expression, in accordance to that observed in the other two models of insulin resistance previously studied.

In agreement with this observation, previous data show that S-nitrosation of Akt after NO donor treatment of cultured myoblasts and in the muscle of db/db diabetic mice is associated with reduced serine-kinase activity of this enzyme (25). LPS treatment also led to S-nitrosation of Akt, a serine-kinase involved in glucose uptake induced by insulin in muscle. This S-nitrosation in LPS treated mice was accompanied by reduced Akt kinase activity. Substitution of cysteine 224 of human Akt1/PKB $\alpha$  by serine conferred resistance to NO donor induced S-nitrosation and inactivation of Akt1/PKB $\alpha$ , indicating that a major S-nitrosation acceptor site in Akt1/PKB $\alpha$  is cysteine 224, which is conserved in Akt1 / Akt2 and Akt3.

Targeted disruption of iNOS prevents the whole-body and skeletal muscle insulin resistance in mice rendered obese by feeding a high-fat diet, which seems to be secondary to preservation of insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR $\beta$  and IRS-1, and PI 3-kinase activity in skeletal muscle of obese iNOS knockout mice (13). The data presented in this study show that targeted disruption of iNOS also prevented LPS induced skeletal-muscle insulin-resistance in addition to preventing S-nitrosation of IR $\beta$ , IRS-1 and Akt. Therefore, the preservation of insulin-induced tyrosine-phosphorylation of IR $\beta$  and IRS-1; the maintainance of IRS-1 protein expression, and of insulin-induced serine-phosphorylation of Akt, observed in LPS treated iNOS<sup>-/-</sup> mice strongly suggests that the insulin resistance induced by LPS is iNOS mediated, probably through S-nitrosation of proteins of early steps of insulin signalling.

Other molecular mechanisms of insulin resistance have been demonstrated in animal models of sepsis, including an increase in JNK activity and in IRS-1 ser 307 phosphorylation in muscle (1; 4; 6). It is possible that multiple mechanisms can contribute to insulin resistance in these animals, and reversal of one of them can improve insulin action, as we demonstrated here with the iNOS knockout mice, and previously demonstrated for other mechanisms of insulin resistance in obese animals (4; 6).

Taken together, our data suggest that skeletal-muscle insulin resistance, induced by LPS treatment, is related to iNOS induction, augmented NO production and S-nitrosation of proteins involved in insulin signal transduction, IR $\beta$ , IRS-1 and Akt.

## References

1. **Barreiro GC, Prattali RR, Caliseo CT, Fugiwara FY, Ueno M, Prada PO, Velloso LA, Saad MJ and Carvalheira JB.** Aspirin inhibits serine phosphorylation of IRS-1 in muscle and adipose tissue of septic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 992-997, 2004.
2. **Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corgnati A and Muggeo M.** Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. In: *J Clin Endocrinol Metab*, 1989, p. 374-378.
3. **Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JB, de Oliveira MG, Velloso LA, Curi R and Saad MJ.** S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* 54: 959-967, 2005.
4. **Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML and Kennedy BP.** Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283: 1544-1548, 1999.
5. **Fong YM, Marano MA, Moldawer LL, Wei H, Calvano SE, Kenney JS, Allison AC, Cerami A, Shires GT and Lowry SF.** The acute splanchnic and peripheral tissue metabolic response to endotoxin in humans. *J Clin Invest* 85: 1896-1904, 1990.
6. **Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M and Hotamisligil GS.** A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420: 333-336, 2002.
7. **Jaffrey SR and Snyder SH.** The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. In: *Sci STKE*, 2001, p. PL1.
8. **Kapur S, Bedard S, Marcotte B, Cote CH and Marette A.** Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 46: 1691-1700, 1997.
9. **Ling PR, Bistrrian BR, Mendez B and Istfan NW.** Effects of systemic infusions of endotoxin, tumor necrosis factor, and interleukin-1 on glucose metabolism in the rat: relationship to endogenous glucose production and peripheral tissue glucose uptake. *Metabolism* 43: 279-284, 1994.
10. **Martinez-Ruiz A and Lamas S.** Detection and proteomic identification of S-nitrosylated proteins in endothelial cells. In: *Arch Biochem Biophys*, 2004, p. 192-199.
11. **Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM and Wilmore DW.** Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 318: 1481-1486, 1988.

12. **Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF and Spiegelman BM.** Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. In: *J Biol Chem*, 1996, p. 13018-13022.
13. **Perreault M and Marette A.** Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 7: 1138-1143, 2001.
14. **Saad MJ, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF and Kahn CR.** Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest* 90: 1839-1849, 1992.
15. **Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC and Velloso LA.** Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. In: *J Biol Chem*, 1996, p. 22100-22104.
16. **Sugita H, Fujimoto M, Yasukawa T, Shimizu N, Sugita M, Yasuhara S, Martyn JA and Kaneki M.** Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 280: 14203-14211, 2005.
17. **Symeonides S and Balk RA.** Nitric oxide in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 13: 449-463, x, 1999.
18. **Tremblay F, Lavigne C, Jacques H and Marette A.** Defective insulin-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle of high fat-fed rats is associated with alterations in both Akt/protein kinase B and atypical protein kinase C (zeta/lambda) activities. *Diabetes* 50: 1901-1910, 2001.
19. **Virkamaki A, Puhakainen I, Koivisto VA, Vuorinen-Markkola H and Yki-Jarvinen H.** Mechanisms of hepatic and peripheral insulin resistance during acute infections in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 673-679, 1992.
20. **Virkamaki A and Yki-Jarvinen H.** Role of prostaglandins in mediating alterations in glucose metabolism during acute endotoxemia in the rat. *Endocrinology* 136: 1701-1706, 1995.
21. **Weimann J, Bloch KD, Takata M, Steudel W and Zapol WM.** Congenital NOS2 deficiency protects mice from LPS-induced hyporesponsiveness to inhaled nitric oxide. *Anesthesiology* 91: 1744-1753, 1999.
22. **Westfall MV and Sayeed MM.** Basal and insulin-stimulated skeletal muscle sugar transport in endotoxic and bacteremic rats. *Am J Physiol* 254: R673-679, 1988.
23. **White RH, Frayn KN, Little RA, Threlfall CJ, Stoner HB and Irving MH.** Hormonal and metabolic responses to glucose infusion in sepsis studied by the hyperglycemic glucose clamp technique. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 11: 345-353, 1987.
24. **Wong JM and Billiar TR.** Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. *Adv Pharmacol* 34: 155-170, 1995.

25. **Yasukawa T, Tokunaga E, Ota H, Sugita H, Martyn JA and Kaneki M.** S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *J Biol Chem* 280: 7511-7518, 2005.

## Figure Legends

**Figure 1** – Effect of LPS on iNOS protein level and insulin sensitivity. (a) iNOS protein level in muscle of wild type (WT) and iNOS<sup>-/-</sup> mice with or without i.p. LPS treatment. (b) Glucose disappearance rate in wild type, LPS-treated, iNOS<sup>-/-</sup> and LPS-treated iNOS<sup>-/-</sup> mice. \*, p<0.05. Bars represent mean ± s.e.from 6-8 experiments

**Figure 2** – Effect of LPS on IRβ tyrosine-kinase activity / tyrosine-phosphorylation / S-nitrosation and protein level in muscle of wild-type (WT) and iNOS<sup>-/-</sup> mice. a: effect of LPS 10 mg/Kg *in vivo* treatment on *in vitro* IRβ tyrosine-kinase activity in muscle of wild type (WT) and iNOS<sup>-/-</sup> mice measured by autophosphorylation and by its ability to phosphorylate immunopurified IRS-1. b: IRβ tyrosine phosphorylation after insulin stimulation. c: IRβ S-nitrosation as demonstrated by “the biotin switch method”. d: IRβ protein level. \*, p<0.05. Bars represent mean ±s.e.from 6-8 experiments.

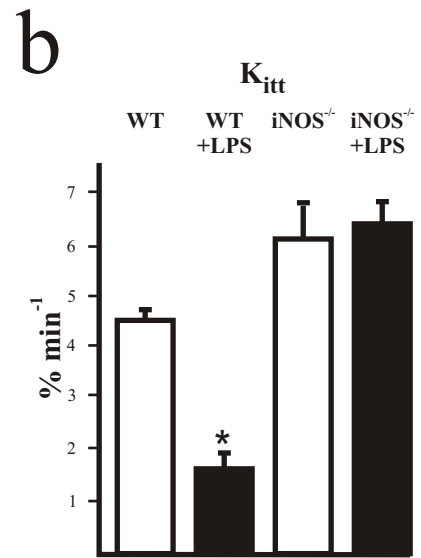
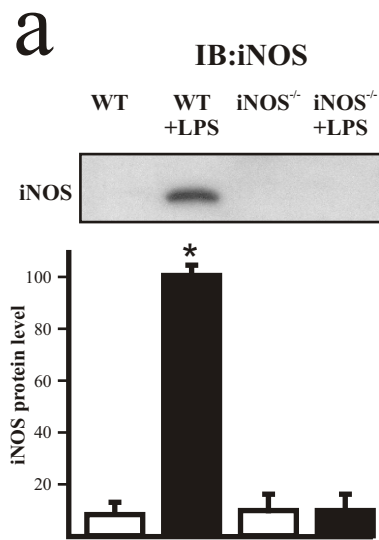
**Figure 3** – Effect of LPS on IRS-1 tyrosine-phosphorylation / S-nitrosation and protein level in the muscle of wild-type (WT) and iNOS<sup>-/-</sup> mice. a: IRS-1 tyrosine phosphorylation after insulin stimulation. c: IRS-1 S-nitrosation as demonstrated by “the biotin switch method”. d: IRS-1 protein level. \*, p<0.05. Bars represent mean ± s.e.from 6-8 experiments.

**Figure 4** – Effect of LPS on Akt serine-kinase activity / serine-phosphorylation / S-nitrosation and protein level in the muscle of wild-type (WT) and iNOS<sup>-/-</sup> mice. a: effect of LPS 10 mg/Kg *in vivo* treatment on *in vitro* Akt serine-kinase activity in the muscle of wild type (WT) and iNOS<sup>-/-</sup> mice, measured by its ability to phosphorylate purified glycogen

synthase-kinase GSK $\alpha/\beta$ . b: Akt serine phosphorylation after insulin stimulation. c: Akt S-nitrosation as demonstrated by “the biotin switch method”. d: Akt protein level. \*, p<0.05.

Bars represent mean  $\pm$  s.e. from 6-8 experiments.

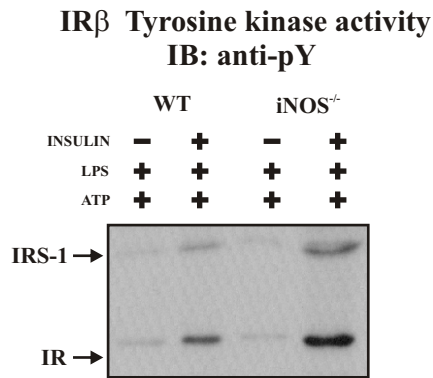
# Figure 1



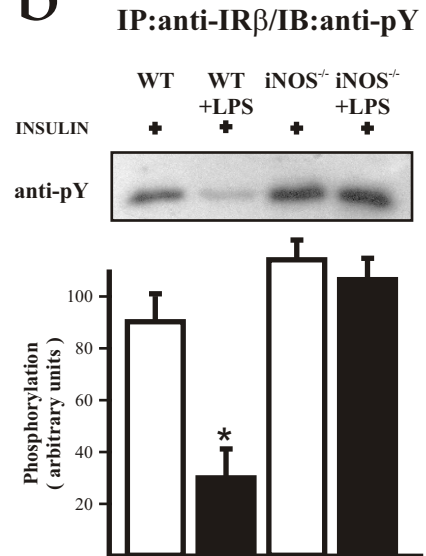


# Figure 2

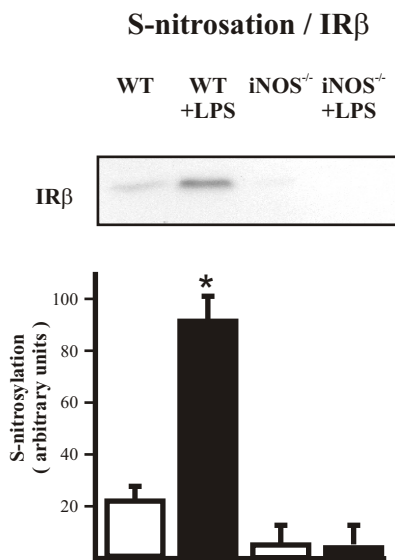
**a**



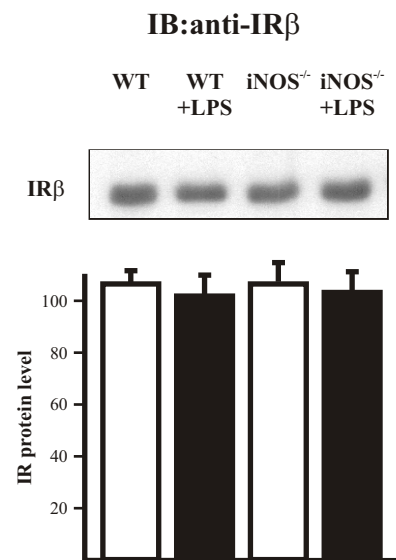
**b**



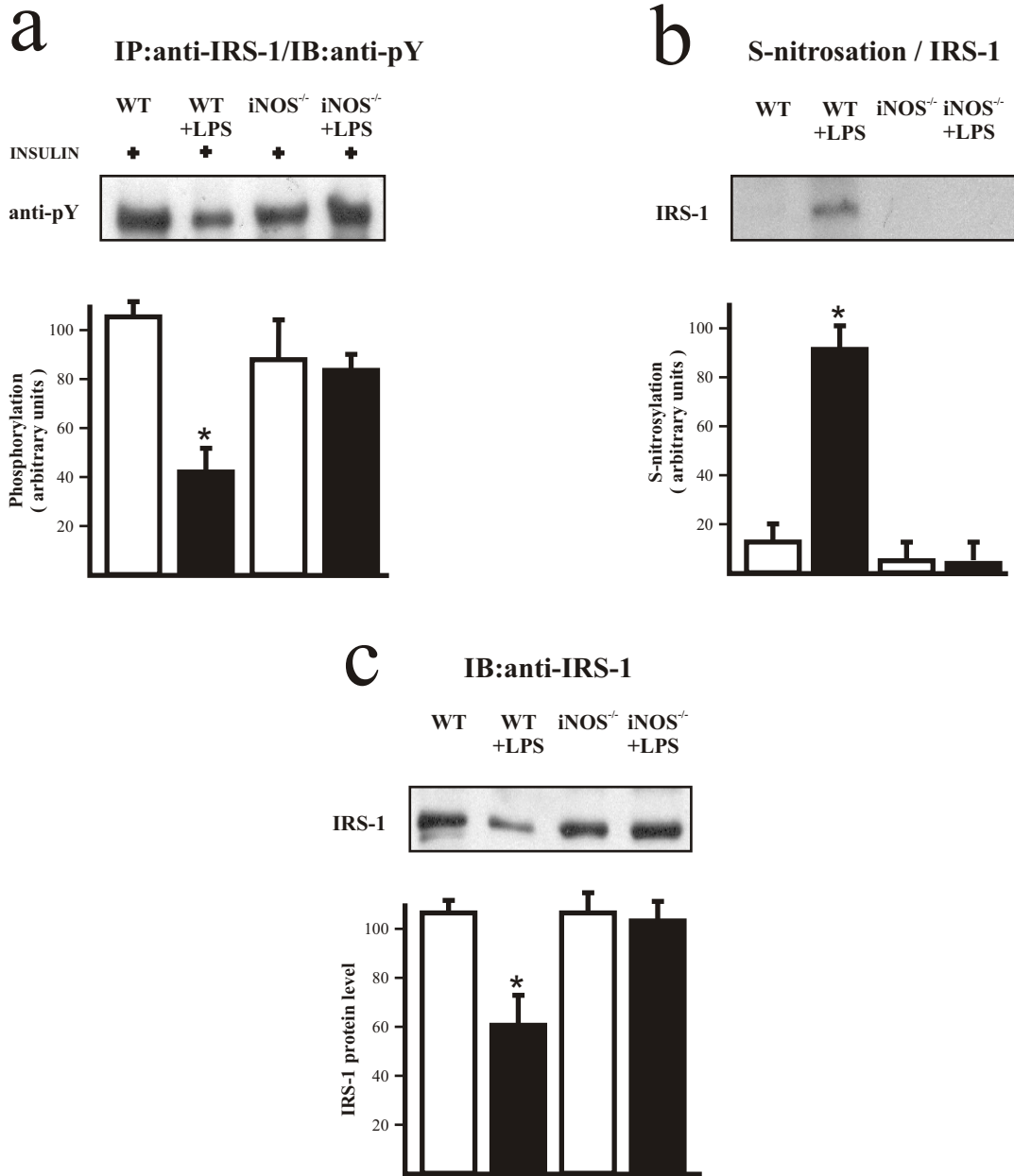
**c**



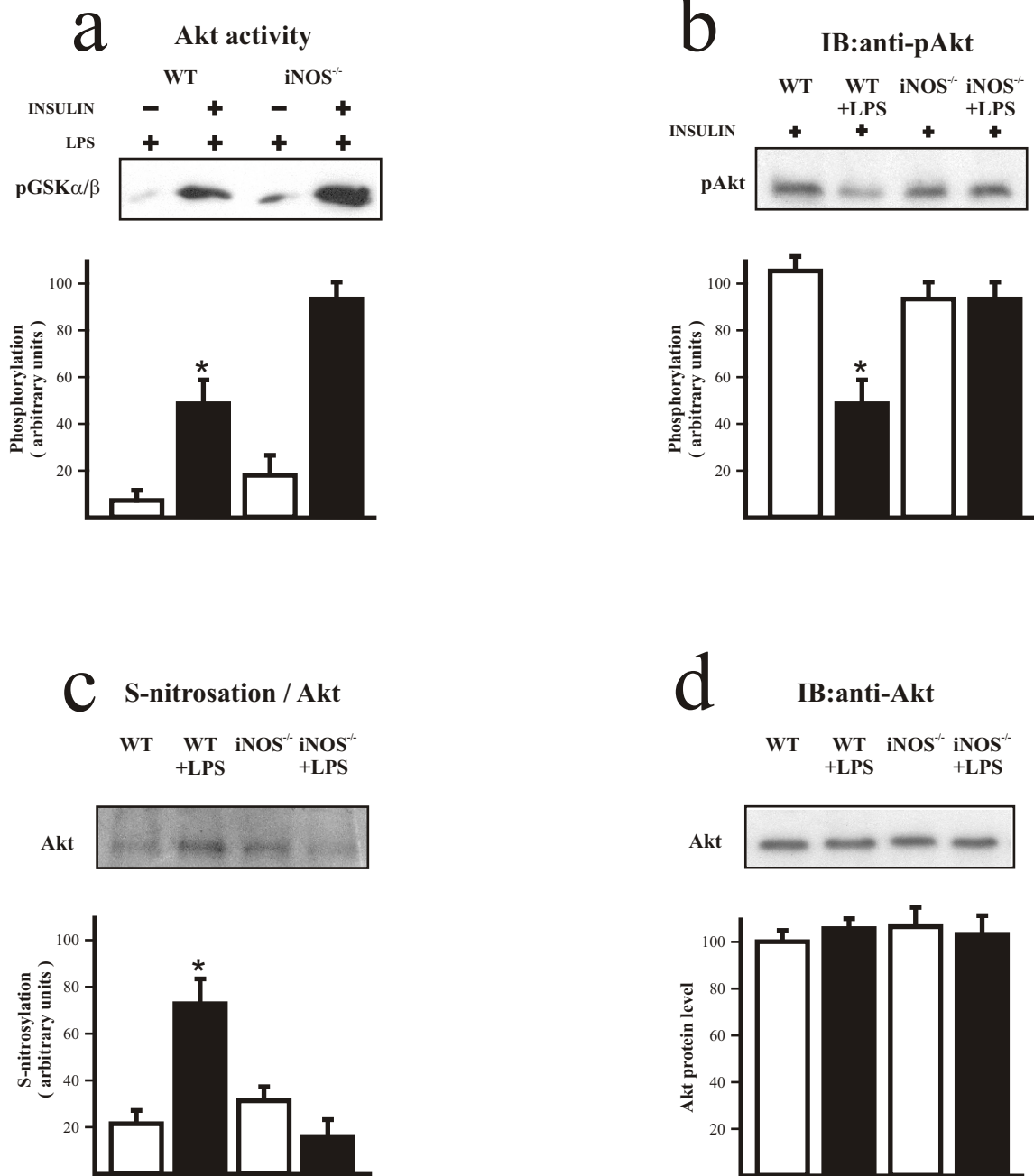
**d**



# Figure 3



# Figure 4



## *5- DISCUSSÃO*

Os dados a respeito dos efeitos da produção de NO sobre a sinalização insulínica são ainda controversos. O tratamento de animais com inibidores inespecíficos das 3 isoformas da NO sintase pode levar a menor captação basal de glicose, assim como menor captação de glicose induzida por insulina, em tecido muscular (BARON, ZHU et al. 1995). Não há consenso se este efeito ocorre diretamente sobre a via de sinalização insulínica, se envolve um mecanismo de captação de glicose independente de insulina, ou se é secundário a alterações do fluxo sanguíneo para o tecido muscular.

Animais geneticamente modificados que não expressam a eNOS apresentam hipertensão arterial e resistência à insulina em tecido muscular. Esta resistência ocorre mesmo em músculo isolado, o que sugere um efeito direto sobre as vias de sinalização insulínica. Efeito este, independente da resistência ao efeito vasodilatador da insulina, que poderia mediar a captação de glicose, e é dependente da ativação da eNOS. No entanto, este animal tem níveis séricos elevados de triglicérides e ácidos graxos livres, que podem per si, levar a resistência à insulina. É possível que a resistência à insulina, neste modelo, seja secundária a um defeito no metabolismo de lipídeos (DUPLAIN, BURCELIN et al. 2001).

De forma semelhante, camundongos geneticamente modificados que não expressam a nNOS também desenvolvem resistência à insulina, em nível menos intenso do que o camundongo que não expressa a eNOS, mas sem apresentar dislipidemia (SHANKAR, WU et al. 2000).

Em compensação, o bloqueio mais específico da iNOS, com aminoguanidina, atenua a resistência à insulina associada a indução desta enzima, tanto em modelos animais de obesidade, quanto de endotoxemia (BEDARD, MARCOTTE et al. 1997; SHIMABUKURO, OHNEDA et al. 1997; PIERCY, TOSELAND et al. 1998).

Além disso, altas doses de drogas doadoras de NO diminuem a captação de glicose e síntese de glicogênio induzidas por insulina em tecido muscular (KAPUR, BEDARD et al. 1997).

O camundongo geneticamente modificado que não expressa a iNOS não desenvolve resistência à insulina em tecido muscular, quando submetido ao tratamento com dieta hiperlipídica, apresentando maior fosforilação e ativação de IR e Akt após estímulo

com insulina, quando comparado com animais controle tratados com a mesma dieta (PERREAULT and MARETTE et al. 2001).

Hoje, sabemos que a biologia do NO é complexa, e envolve mecanismos diferentes de sinalização. Cada isoforma da NO tem alvos intra-celulares próprios cuja especificidade já foi discutida na introdução deste estudo. Estas diferentes observações do efeito do NO podem ser secundárias a efeitos diferentes de cada isoforma de NO sintase. É importante ressaltar, que as isoformas endotelial e neuronal produzem NO em menor quantidade levando a modificações protéicas específicas, principalmente mediadas pela nitrosilação de metais de transição. Esta reação acontece com concentrações menores de NO, pois é independente da auto-oxidação desta molécula. Já a isoforma induzível tem maior capacidade de produção de NO, e provoca maior estresse nitrosativo, levando a outros mecanismos de modulação da função protéica, como, por exemplo, a S-nitrosação (DAVIS, MARTIN et al. 2001; LANE, HAO et al. 2001; FOSTER, MCMAHON et al. 2003; MARTINEZ-RUIZ and LAMAS et al. 2004; HESS, MATSUMOTO et al. 2005).

S-nitrosação é um mecanismo de modulação da função protéica associado à produção de NO, e recentemente vários processos celulares controlados por S-nitrosação foram identificados.

Acontece pela adição de um grupamento NO a um radical tiol (S-H) de um resíduo de cisteína. Pode ocorrer, ou por ação direta do NO, ou a partir da oxidação do NO a  $N_2O_3$ , ou ainda por trans-nitrosação.

São exemplos de processos controlados ou modulados por S-nitrosação: tráfico de proteínas no ambiente intra-celular, secreção de insulina, modulação de fatores de transcrição como NF $\kappa$ B e p21<sup>ras</sup> (LANE, HAO et al. 2001; STAMLER, LAMAS et al. 2001; MANNICK and SCHONHOFF et al. 2002; MARTINEZ-RUIZ and LAMAS et al. 2004; HESS, MATSUMOTO et al. 2005).

Neste estudo, demonstramos que proteínas envolvidas com a transmissão do sinal de insulina são passíveis de S-nitrosação, e sofrem modulação negativa, sugerindo um possível mecanismo para explicar a resistência à insulina associada à indução da iNOS.

A ação insulínica no tecido muscular através da via IRSs/PI3K/Akt desencadeia a captação de glicose mediada pela translocação do transportador de glicose GLUT 4 para a superfície celular, que é um facilitador da difusão da glicose. Além disso, a insulina leva a uma maior síntese de glicogênio pela ativação da glicogênio sintase muscular. Classicamente, estados de resistência à insulina provocam diminuição da sinalização de insulina por esta via, com menor translocação do GLUT 4, e redução da captação de glicose e da síntese de glicogênio induzidas por insulina.

Inicialmente estudamos a captação de glicose e síntese de glicogênio tanto em músculo isolado quanto em animais intactos após a infusão de duas drogas doadoras de NO, nitrosotiois, a saber: nitrosoglutationa (GSNO) e nitrosocisteína (CISNO). Essas drogas foram capazes de induzir resistência à insulina, diminuindo de forma dose-dependente tanto a captação de glicose quanto a síntese de glicogênio em músculo isolado.

Em animais intactos a sensibilidade à insulina é experimentalmente aferida a partir da avaliação da curva de decaimento da glicemia após infusão de insulina. Tanto maior é a sensibilidade à insulina, quanto maior é a inclinação da curva de queda da glicemia em função do tempo, após infusão de sobrecarga de insulina. A razão obtida a partir da inclinação desta curva define uma constante chamada  $K_{itt}$  (BONORA, MOGHETTI et al. 1989). Nos animais tratados com droga doadora de NO houve redução no  $K_{itt}$ , refletindo estado de resistência à insulina.

Esta resistência à insulina mostrou-se associada a S-nitrosação do receptor de insulina, que foi identificada por três métodos diferentes, fluorimetria, biotinilação e imunoprecipitação com anticorpo anti-SNO.

Uma vez S-nitrosado, o IR apresentou-se resistente à fosforilação e ativação induzidas por insulina. Para investigar se este efeito não era secundário a uma menor ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  do seu receptor, realizamos estudos de auto fosforilação e atividade quinase, com estímulo de insulina *in vivo*, e tratamento com droga doadora de NO *in vitro*. Nestes estudos, observamos que além de S-nitrosado o IR apresentou, após o tratamento com droga doadora, auto-fosforilação e atividade tirosina-quinase reduzidas.

Especulamos então que a S-nitrosação do receptor de insulina pode ser um dos mecanismos de resistência nestes modelos.

O IRS-1 é importante substrato do receptor de insulina, transmitindo a ativação do IR até a ativação da PI 3 quinase. Esta via é fundamental para os efeitos metabólicos da insulina, notadamente aumento da captação de glicose, síntese de glicogênio e protéica e inibição da gliconeogênese. Estudos em camundongos geneticamente modificados mostram que animais que não expressam IRS-1, são resistentes à insulina. Em estudos com restrição tecido-específica da expressão de IRS-1 e IRS-2, observamos que o IRS-1 é o principal mediador da ação metabólica da insulina em tecido muscular.

Estas drogas foram também capazes de induzir S-nitrosação do IRS-1. Agudamente observamos menor fosforilação em tirosina do IRS-1 após estímulo insulínico, que pode ser secundária a menor ativação do IR. Mas quando submetemos o animal ao tratamento crônico com GSNO, esta S-nitrosação do IRS-1 foi acompanhada por diminuição dos níveis teciduais desta proteína. Recentemente demonstrou-se que drogas doadoras de NO, como o GSNO, e o aumento da expressão de iNOS em tecido muscular, são capazes de diminuir os níveis teciduais desta proteína, sem modificar seus níveis de RNA mensageiro, através da ativação de sua degradação protéica (SUGITA, FUJIMOTO et al. 2005). Identificamos então, um novo sítio para resistência à insulina desencadeada por S-nitrosação.

Vários indícios sugerem um papel importante da redução dos níveis teciduais de IRS-1 no desenvolvimento de resistência à insulina. Em modelos animais de resistência à insulina, como no camundongo ob/ob (SAAD, ARAKI et al. 1992), ou na obesidade induzida por dieta hiperlipídica (KIM, NAKAJIMA et al. 1996), observamos níveis teciduais diminuídos de IRS-1 em músculo. Também em pacientes diabéticos observamos menor nível tecidual de IRS-1 em tecidos muscular e adiposo (RONDINONE, WANG et al. 1997; CARVALHO, JANSSON et al. 2001; CATALANO, NIZIELSKI et al. 2002; BROZINICK, ROBERTS et al. 2003). E uma menor expressão tecidual de IRS-1 em músculo mostrou-se fator de risco isolado para o desenvolvimento de DM tipo 2 (CARVALHO, JANSSON et al. 2001; JANSSON, PELLME et al. 2003). Portanto, a



S-nitrosação do IRS-1 aparece como importante sítio de desenvolvimento de resistência à insulina induzida por NO.

Outro possível mecanismo de resistência à insulina induzido pela S-nitrosação do IRS-1, seria a inibição da capacidade tirosina-quinase do receptor de insulina pelo IRS-1 S-nitrosado, de forma semelhante ao que ocorre com a fosforilação em serina do IRS-1. Novos estudos são necessários para testar esta hipótese.

Além de estudar o IRS-1, testamos outras proteínas da via de sinalização insulínica. Não observamos S-nitrosação do IRS-2, nem da PI 3 quinase após tratamento com droga doadora de NO.

A Akt é uma serina/treonina quinase que modula diversas ações de crescimento e metabólicas da insulina, incluindo transporte de glicose, síntese protéica e de glicogênio (UEKI, YAMAMOTO-HONDA et al. 1998; VAN WEEREN, DE BRUYN et al. 1998; JIANG, ZHOU et al. 2003). Existe em três isoformas (1,2 e 3). Sua ativação pela insulina é mediada pela formação de fosfatidil inositol a partir da ativação da PI 3 quinase pelo IRS-1 ou IRS-2. Vários estudos implicam a Akt como proteína importante para a translocação de GLUT 4 para superfície celular (BROZINICK, ROBERTS et al. 2003).

Células musculares ou adiposas que super-expressam mutantes permanentemente ativos desta enzima possuem maior quantidade de GLUT 4 na superfície da membrana (KOHN, SUMMERS et al. 1996; HAJDUCH, ALESSI et al. 1998). De forma antagônica, o bloqueio desta enzima impede translocação de GLUT 4 nestas células (HILL, CLARK et al. 1999). O bloqueio da Akt diminui a síntese de glicogênio induzida por insulina (TAKATA, OGAWA et al. 1999). No fígado, a insulina bloqueia a produção de glicose a partir da inibição de enzimas específicas, como, por exemplo, a Fosfoenolpiruvato carboxi-quinase (PEPCK) e a glicose-6-fosfatase. Esta inibição parece estar diretamente relacionada à ativação da Akt (CICHY, UDDIN et al. 1998).

No entanto, parece que as isoformas de Akt sinalizam em diferentes sentidos. A Akt 1 em direção ao crescimento celular e a Akt 2 em direção a translocação do GLUT 4. A super-expressão da Akt 1 em modelos animais leva a hipertrofia cardíaca, enquanto a super-expressão de um mutante inibido leva ao bloqueio do desenvolvimento de miócitos induzido pela PI 3 quinase constitutivamente ativa (SHIOI, MCMULLEN et al. 2002). Em

modelos genéticos que não expressam Akt 1, observamos retardo do crescimento, e suas células tem maior tendência a apoptose. Estes animais não apresentam hiperglicemia ou resistência aos efeitos metabólicos da insulina (CHEN, XU et al. 2001; CHO, MU et al. 2001; CHO, THORVALDSEN et al. 2001). Estes achados são compatíveis com os encontrados no bloqueio da expressão do IRS-1, e mostram a importância da via IRS-1/PI 3 quinase/Akt1 na modulação do crescimento realizada por insulina e IGF-1.

Camundongos modificados que não expressam a Akt 2 desenvolvem hiperinsulinemia, hiperglicemia e intolerância à glicose. Este achado reflete a importância da via IRS-1/PI 3 quinase/Akt2 para efetuação dos efeitos metabólicos da insulina (CHO, MU et al. 2001).

O TTO do músculo isolado e do animal intacto com droga doadora de NO (GSNO e CISNO) levou a S-nitrosação da Akt, em tecido muscular. Para estudar os efeitos da S-nitrosação sobre a Akt, realizamos um ensaio quinase, medindo a capacidade da Akt de fosforilar em serina um dos seus substratos, o GSK $\alpha/\beta$ . Para garantir que a redução da atividade-quinase da Akt não era secundária a uma menor ativação da via de sinalização da insulina a partir do IR/IRS-1/PI 3 quinase, realizamos este ensaio quinase da Akt, com a adição da droga doadora de NO *in vitro*, após o estímulo com insulina *in vivo*, num animal controle, não resistente. Ou seja, a via IR/IRS-1/PI 3 quinase foi ativada pela insulina antes do tratamento com GSNO. Observamos menor capacidade serina-quinase da Akt tanto basal quanto após estímulo insulínico, após tratamento com GSNO.

Recentemente demonstrou-se que uma mutação pontual na cisteína 224 da Akt torna esta enzima resistente à modulação negativa por S-nitrosação, sendo esta cisteína o provável sítio modificado pelo NO (YASUKAWA, TOKUNAGA et al. 2005).

Desta forma, identificamos pelo menos três pontos em que poderia estar havendo modulação negativa da via de sinalização insulínica por S-nitrosação. No entanto, restava estudar se estas modificações poderiam estar acontecendo em modelos animais de resistência à insulina, para definir o significado fisiopatológico da S-nitrosação destas preteínas.

Para investigar esta questão, escolhemos modelos de resistência à insulina associados ao aumento da expressão da iNOS, provável fonte do NO indutor desta S-nitrosação *in vivo*.

O tratamento de ratos ou camundongos com dieta hiperlipídica leva a ganho de peso excessivo, obesidade, e apesar destes animais apresentarem glicemia de jejum normal, apresentam hiperinsulinemia, intolerância a glicose e menor sensibilidade à insulina, aferida pelo teste de tolerância à insulina ou por estudos de clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico, sendo um bom modelo de síndrome metabólica. Recentemente, descreveu-se que este tratamento é capaz de levar a um aumento da expressão tecidual de iNOS tanto em tecido muscular, quanto em tecido adiposo (PERREAULT and MARETTE et al. 2001).

Após 20 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica observamos os efeitos metabólicos previamente descritos, inclusive uma maior expressão de iNOS em tecido muscular.

A resistência à insulina foi documentada pelo menor  $K_{itt}$  observado nestes animais. Esta resistência foi, ao menos em parte, secundária a menor ativação mediada por insulina de IR, IRS-1 e Akt em tecido muscular.

Quando investigamos o estado de S-nitrosação destas proteínas, identificamos que este estava aumentado tanto no IR, quanto no IRS-1 e na Akt. Além disso, o nível tecidual de IRS-1 estava significativamente diminuído. Estes achados sugerem uma mediação de resistência à insulina por S-nitrosação destas proteínas, neste tecido.

Para investigar o papel da iNOS nesta S-nitrosação, procuramos bloquear sua expressão. O gene da iNOS sofre modulação positiva a partir de estímulos desencadeados por LPS e interferon  $\gamma$ . Mas pode ser também negativamente modulado a partir da ativação de um receptor nuclear chamado PPAR $\gamma$  (LI, PASCUAL et al. 2000). As tiazolidinedionas são ativadores do PPAR $\gamma$ , e, portanto, capazes de inibir o aumento da expressão tecidual da iNOS associado a obesidade e endotoxemia. A rosiglitazona é uma droga membro da família das tiazolidinedionas e tem conhecido efeito anti-diabético por promover melhora da sensibilidade à insulina (SALTIEL and OLEFSKY et al. 1996).

O tratamento dos animais obesos com rosiglitazona melhorou a sinalização de insulina através da via IR/IRS-1/Akt em músculo, promovendo reversão parcial da resistência à insulina observada no animal. Este efeito aconteceu em paralelo ao bloqueio da expressão da iNOS, e à diminuição dos níveis de S-nitrosação das três proteínas. Também, houve restauração parcial dos níveis teciduais de IRS-1.

Estes achados sugerem que a S-nitrosação de IR/IRS-1 e Akt é mediada pelo aumento da produção de NO secundário a maior expressão de iNOS. Sugerem ainda, um possível mecanismo para os efeitos hipoglicemiantes das tiazolidinedionas.

Outro modelo de obesidade e de DM tipo 2 estudado foi o camundongo ob/ob. Este animal apresenta obesidade geneticamente determinada com padrão de herança mendeliano autossômico recessivo. Acontece secundariamente a uma mutação pontual no gene da leptina que ocorreu espontaneamente em colônia dos laboratórios Jackson. Nestes animais o mRNA resultante não leva a transcrição de leptina, causando sua deficiência (INGALLS, DICKIE et al. 1950; ZHANG, PROENCA et al. 1994).

Estes animais apresentam obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina, inclusive no nível molecular. Desenvolvem ainda dislipidemia, esteatoepatite, e são inférteis.

Recentemente demonstrou-se aumento da expressão tecidual de iNOS nestes animais, além de um estado pró-inflamatório, com aumento das interleucinas circulantes. O tratamento com aminoguanidina, inibidor da iNOS, melhorou a sensibilidade à insulina nestes animais (BEDARD, MARCOTTE et al. 1997; SHIMABUKURO, OHNEDA et al. 1997; PIERCY, TOSELAND et al. 1998).

Nossos resultados mostraram que, de forma semelhante à observada na obesidade induzida por dieta, a obesidade geneticamente determinada também veio acompanhada da maior expressão tecidual de iNOS em tecido muscular, associada à S-nitrosação das proteínas da via de sinalização insulínica, também com níveis teciduais diminuídos de IRS-1 em músculo. De forma impressionante, após bloqueio da transcrição gênica com anti-sense para iNOS, houve reversão praticamente completa da resistência muscular deste animal à ação da insulina, em paralelo com diminuição dos níveis teciduais de iNOS, e da S-nitrosação das proteínas citadas. Novamente, neste modelo, observamos

modulação negativa da iNOS sobre a via insulínica através de S-nitrosação de IR/IRS-1 e Akt

Recentemente demonstrou-se que o camundongo geneticamente modificado que constitutivamente não expressa a iNOS, apesar de ganhar peso após o tratamento com dieta hiperlipídica, não desenvolve resistência à insulina. Esta manutenção da sensibilidade à insulina está relacionada a uma maior ativação do IR e da Akt em tecido muscular destes animais quando comparados com os camundongos obesos controles (PERREAULT and MARETTE et al. 2001).

A endotoxemia induzida pela infusão de LPS é um outro modelo de resistência à insulina, também associado a um aumento da expressão tecidual de iNOS, e a uma menor ativação da via de sinalização insulínica.

Neste estudo, utilizamos o animal que não expressa a iNOS para estudar os efeitos do LPS sobre a sinalização insulínica. A infusão de LPS em animais controle reproduziu os achados da literatura, provocando resistência à insulina, refletida pela diminuição do Kitt, secundária a menor sinalização pela via IR/IRS-1/Akt em tecido muscular. Aparentemente esta resistência está associada ao aumento da S-nitrosação destas proteínas observada após o tratamento com LPS.

No entanto, o LPS não induziu resistência à insulina no animal geneticamente modificado que não expressa a iNOS, estando a via IR/IRS-1/Akt plenamente ativa. Os níveis teciduais de IRS-1 também não estavam diminuídos em tecido muscular dos animais que não expressavam iNOS. Esta preservação da sinalização insulínica por esta via parece associada à ausência de S-nitrosação de IR/IRS-1/Akt nestes animais.

Em síntese, a resistência à insulina induzida pelo aumento da expressão da iNOS em tecido muscular está, ao menos parcialmente, relacionada a sua capacidade de induzir S-nitrosação de proteínas envolvidas na sinalização insulínica, IR, IRS-1 e Akt.

Estes achados são compatíveis com a idéia geral de que as vias de sinalização pró-inflamatórias são capazes de exercer efeito regulador negativo nas vias de sinalização metabólica.

A iNOS é uma enzima importante no controle de infecções, notadamente bloqueia o metabolismo de patógenos intra-celulares quando infestam macrófagos. Faz também alça de retro-alimentação positiva em direção ao aumento da expressão de citocinas inflamatórias, modulando, por exemplo, a ativação de certos promotores como o NFκB, e participa também do controle da apoptose (BOGDAN et al. 2001). Nossos dados sugerem um possível mecanismo molecular pelo qual o aumento da expressão de iNOS induz resistência à insulina.

Acreditamos, que este não é o único mecanismo de resistência à insulina relacionado tanto à obesidade quanto à ação do LPS. Sabemos que a atividade de certas fosfatases, como, por exemplo, a PTP1B está aumentada na obesidade e bloqueia a transmissão do sinal de insulina no nível do receptor (ELCHEBLY, PAYETTE et al. 1999).

Sabemos ainda que a via inflamatória ativa algumas serina-quinases, como, por exemplo, a Jnk2 e o complexo do IKK, e ambos são capazes de fosforilar o IRS-1 em serina, diminuindo sua capacidade de ser fosforilado em tirosina pelo IR e retrogradamente bloqueando a própria capacidade tirosina-quinase deste receptor (HOTAMISLIGIL, PERALDI et al. 1996; KIM, KIM et al. 2001; YUAN, KONSTANTOPOULOS et al. 2001; GAO, HWANG et al. 2002; HIROSUMI, TUNCMAN et al. 2002).

Em compensação, como já demonstrado para outros mecanismos de resistência à insulina, o bloqueio de um dos aspectos do corolário indutor de resistência, pelo menos experimentalmente, é capaz de diminuir sobremaneira a resistência observada (YUAN, KONSTANTOPOULOS et al. 2001; HIROSUMI, TUNCMAN et al. 2002). Desta forma, o bloqueio da via da iNOS, genético, ou farmacológico, diminuiu a S-nitrosação de IR, IRS-1 e Akt, e, conseqüentemente, a resistência à insulina nos diversos modelos estudados.

Consideramos que a via da iNOS em particular, e as vias da resposta imune inata em geral, podem ser futuros alvos para terapêutica farmacológica tanto da obesidade, quanto da resistência à insulina e do DM tipo2, o que justifica a somatória de esforços para identificar os possíveis pontos de intersecção entre inflamação e metabologia.

***6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

(2001). "Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)." *Jama* **285**(19): 2486-97.

AGUIRRE, V., T. UCHIDA, et al. (2000). "The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307)." *J Biol Chem* **275**(12): 9047-54.

AGUIRRE, V., E. D. WERNER, et al. (2002). "Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action." *J Biol Chem* **277**(2): 1531-7.

AGWUNOBI, A. O., C. REID, et al. (2000). "Insulin resistance and substrate utilization in human endotoxemia." *J Clin Endocrinol Metab* **85**(10): 3770-8.

ARAKI, E., M. A. LIPES, et al. (1994). "Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene." *Nature* **372**(6502): 186-90.

ARNELLE, D. R. and J. S. STAMLER (1995). "NO+, NO, and NO- donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation." *Arch Biochem Biophys* **318**(2): 279-85.

BALLETSHOFFER, B. M., K. RITTIG, et al. (2000). "Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance." *Circulation* **101**(15): 1780-4.

BARON, A. D., J. S. ZHU, et al. (1995). "Insulin resistance after hypertension induced by the nitric oxide synthesis inhibitor L-NMMA in rats." *Am J Physiol* **269**(4 Pt 1): E709-15.

BEDARD, S., B. MARCOTTE, et al. (1997). "Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase." *Biochem J* **325** ( Pt 2): 487-93.

BEUTLER, B., D. GREENWALD, et al. (1985). "Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin." *Nature* **316**(6028): 552-4.

BLACKBURN, G. L. (2001). "Pasteur's Quadrant and malnutrition." *Nature* **409**(6818): 397-401.

BOGDAN, C. (2001). "Nitric oxide and the immune response." *Nat Immunol* **2**(10): 907-16.



- BONORA, E., P. MOGHETTI, et al. (1989). "Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies." *J Clin Endocrinol Metab* **68**(2): 374-8.
- BROZINICK, J. T., JR., B. R. ROBERTS, et al. (2003). "Defective signaling through Akt-2 and -3 but not Akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: potential role in insulin resistance." *Diabetes* **52**(4): 935-41.
- BRUNE, B. and J. ZHOU (2003). "The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha)." *Curr Med Chem* **10**(10): 845-55.
- CALLE, E. E., C. RODRIGUEZ, et al. (2003). "Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults." *N Engl J Med* **348**(17): 1625-38.
- CARVALHEIRA, J. B., E. B. RIBEIRO, et al. (2003). "Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats." *Diabetologia* **46**(12): 1629-40.
- CARVALHO, E., P. A. JANSSON, et al. (2001). "Insulin resistance with low cellular IRS-1 expression is also associated with low GLUT4 expression and impaired insulin-stimulated glucose transport." *Faseb J* **15**(6): 1101-3.
- CATALANO, P. M., S. E. NIZIELSKI, et al. (2002). "Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(3): E522-33.
- CHANDRA, R. K. (1996). "Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14304-7.
- CHEN, W. S., P. Z. XU, et al. (2001). "Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene." *Genes Dev* **15**(17): 2203-8.
- CHO, H., J. MU, et al. (2001). "Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)." *Science* **292**(5522): 1728-31.
- CHO, H., J. L. THORVALDSEN, et al. (2001). "Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice." *J Biol Chem* **276**(42): 38349-52.

- CICHY, S. B., S. UDDIN, et al. (1998). "Protein kinase B/Akt mediates effects of insulin on hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression through a conserved insulin response sequence." *J Biol Chem* **273**(11): 6482-7.
- CLELAND, S. J., J. R. PETRIE, et al. (2000). "Insulin action is associated with endothelial function in hypertension and type 2 diabetes." *Hypertension* **35**(1 Pt 2): 507-11.
- CLEMENT, K., C. VAISSE, et al. (1998). "A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction." *Nature* **392**(6674): 398-401.
- COLDITZ, G. A., W. C. WILLETT, et al. (1990). "Weight as a risk factor for clinical diabetes in women." *Am J Epidemiol* **132**(3): 501-13.
- COOPER, C. E. (1999). "Nitric oxide and iron proteins." *Biochim Biophys Acta* **1411**(2-3): 290-309.
- CZECH, M. P. and S. CORVERA (1999). "Signaling mechanisms that regulate glucose transport." *J Biol Chem* **274**(4): 1865-8.
- DAVIS, K. L., E. MARTIN, et al. (2001). "Novel effects of nitric oxide." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 203-36.
- DEFRONZO, R. A. (1988). "Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM." *Diabetes* **37**(6): 667-87.
- DUNAIF, A. (1997). "Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis." *Endocr Rev* **18**(6): 774-800.
- DUPLAIN, H., R. BURCELIN, et al. (2001). "Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase." *Circulation* **104**(3): 342-5.
- ELCHEBLY, M., P. PAYETTE, et al. (1999). "Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene." *Science* **283**(5407): 1544-8.
- FACCHINI, F. S., N. HUA, et al. (2001). "Insulin resistance as a predictor of age-related diseases." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(8): 3574-8.
- FEINSTEIN, R., H. KANETY, et al. (1993). "Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates." *J Biol Chem* **268**(35): 26055-8.

- FOSTER, M. W., T. J. MCMAHON, et al. (2003). "S-nitrosylation in health and disease." *Trends Mol Med* **9**(4): 160-8.
- GAO, Z., D. HWANG, et al. (2002). "Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex." *J Biol Chem* **277**(50): 48115-21.
- GASTON, B. (1999). "Nitric oxide and thiol groups." *Biochim Biophys Acta* **1411**(2-3): 323-33.
- GOLAY, A., L. ZECH, et al. (1987). "High density lipoprotein (HDL) metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus: measurement of HDL turnover using tritiated HDL." *J Clin Endocrinol Metab* **65**(3): 512-8.
- GOLDSTEIN, B. J. (2003). "Insulin resistance: from benign to type 2 diabetes mellitus." *Rev Cardiovasc Med* **4 Suppl 6**: S3-10.
- GOW, A. J., Q. CHEN, et al. (2002). "Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues." *J Biol Chem* **277**(12): 9637-40.
- GOW, A. J., C. R. FARKOUH, et al. (2004). "Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**(2): L262-8.
- GOW, A. J., B. P. LUCHSINGER, et al. (1999). "The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9027-32.
- GRAY, P. W., B. B. AGGARWAL, et al. (1984). "Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity." *Nature* **312**(5996): 721-4.
- GU, Z., M. KAUL, et al. (2002). "S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death." *Science* **297**(5584): 1186-90.
- HAJDUCH, E., D. R. ALESSI, et al. (1998). "Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells." *Diabetes* **47**(7): 1006-13.
- HAMMAN, R. (2002). *Prevention of type 2 diabetes mellitus. The evidence base for diabetes care.* T. J. Williams RL, Herman WH, eds. London, John Wiley & Sons.
- HELLER, R. A. and M. KRONKE (1994). "Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways." *J Cell Biol* **126**(1): 5-9.

- HESS, D. T., A. MATSUMOTO, et al. (2005). "Protein S-nitrosylation: purview and parameters." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(2): 150-66.
- HILL, M. M., S. F. CLARK, et al. (1999). "A role for protein kinase Bbeta/Akt2 in insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes." *Mol Cell Biol* **19**(11): 7771-81.
- HIMSWORTH, H. P. (1951). "The university and medicine." *Lancet* **2**(17): 743-5.
- HIROSUMI, J., G. TUNCMAN, et al. (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." *Nature* **420**(6913): 333-6.
- HOGG, N. (1999). "The kinetics of S-transnitrosation--a reversible second-order reaction." *Anal Biochem* **272**(2): 257-62.
- HOGG, N. (2002). "The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 585-600.
- HOTAMISLIGIL, G. S., P. ARNER, et al. (1995). "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance." *J Clin Invest* **95**(5): 2409-15.
- HOTAMISLIGIL, G. S., R. S. JOHNSON, et al. (1996). "Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein." *Science* **274**(5291): 1377-9.
- HOTAMISLIGIL, G. S., D. L. MURRAY, et al. (1994). "Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 4854-8.
- HOTAMISLIGIL, G. S., P. PERALDI, et al. (1996). "IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance." *Science* **271**(5249): 665-8.
- HOTAMISLIGIL, G. S., N. S. SHARGILL, et al. (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." *Science* **259**(5091): 87-91.
- INGALLS, A. M., M. M. DICKIE, et al. (1950). "Obese, a new mutation in the house mouse." *J Hered* **41**(12): 317-8.
- JAFFREY, S. R. and S. H. SNYDER (2001). "The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins." *Sci STKE* **2001**(86): PL1.

- JANSSON, P. A., F. PELLME, et al. (2003). "A novel cellular marker of insulin resistance and early atherosclerosis in humans is related to impaired fat cell differentiation and low adiponectin." *Faseb J* **17**(11): 1434-40.
- JIANG, Z. Y., Q. L. ZHOU, et al. (2003). "Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7569-74.
- KAHN, C. R. (1994). "Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes." *Diabetes* **43**(8): 1066-84.
- KAHN, C. R., J. S. FLIER, et al. (1976). "The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. Insulin-receptor disorders in man." *N Engl J Med* **294**(14): 739-45.
- KAPUR, S., S. BEDARD, et al. (1997). "Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action." *Diabetes* **46**(11): 1691-700.
- KATSUKI, A., Y. SUMIDA, et al. (1998). "Serum levels of tumor necrosis factor-alpha are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus." *J Clin Endocrinol Metab* **83**(3): 859-62.
- KHOVIDHUNKIT, W., M. S. KIM, et al. (2004). "Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host." *J Lipid Res* **45**(7): 1169-96.
- KIM, J. K., Y. J. KIM, et al. (2001). "Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate." *J Clin Invest* **108**(3): 437-46.
- KIM, Y. B., R. NAKAJIMA, et al. (1996). "Gene expression of insulin signal-transduction pathway intermediates is lower in rats fed a beef tallow diet than in rats fed a safflower oil diet." *Metabolism* **45**(9): 1080-8.
- KOHN, A. D., S. A. SUMMERS, et al. (1996). "Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation." *J Biol Chem* **271**(49): 31372-8.
- KOLTERMAN, O. G., J. INSEL, et al. (1980). "Mechanisms of insulin resistance in human obesity: evidence for receptor and postreceptor defects." *J Clin Invest* **65**(6): 1272-84.
- KOPELMAN, P. G. (2000). "Obesity as a medical problem." *Nature* **404**(6778): 635-43.

- KRONCKE, K. D. and C. CARLBERG (2000). "Inactivation of zinc finger transcription factors provides a mechanism for a gene regulatory role of nitric oxide." *Faseb J* **14**(1): 166-73.
- KURREK, M. M., W. M. ZAPOL, et al. (1995). "In vivo lipopolysaccharide pretreatment inhibits cGMP release from the isolated-perfused rat lung." *Am J Physiol* **269**(5 Pt 1): L618-24.
- LANE, P., G. HAO, et al. (2001). "S-nitrosylation is emerging as a specific and fundamental posttranslational protein modification: head-to-head comparison with O-phosphorylation." *Sci STKE* **2001**(86): RE1.
- LANG, C. H., C. DOBRESCU, et al. (1992). "Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output." *Endocrinology* **130**(1): 43-52.
- LEVY, J., A. B. ATKINSON, et al. (1998). "Beta-cell deterioration determines the onset and rate of progression of secondary dietary failure in type 2 diabetes mellitus: the 10-year follow-up of the Belfast Diet Study." *Diabet Med* **15**(4): 290-6.
- LI, M., G. PASCUAL, et al. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene." *Mol Cell Biol* **20**(13): 4699-707.
- LIU, X., M. J. MILLER, et al. (1998). "Accelerated reaction of nitric oxide with O<sub>2</sub> within the hydrophobic interior of biological membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2175-9.
- LIU, Z., M. A. RUDD, et al. (1998). "S-Transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide." *J Pharmacol Exp Ther* **284**(2): 526-34.
- LUCHSINGER, B. P., E. N. RICH, et al. (2003). "Routes to S-nitroso-hemoglobin formation with heme redox and preferential reactivity in the beta subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2): 461-6.
- LUYCKX, F. H., P. J. LEFEBVRE, et al. (2000). "Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss." *Diabetes Metab* **26**(2): 98-106.

- MACMILLAN-CROW, L. A., J. P. CROW, et al. (1996). "Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11853-8.
- MANNICK, J. B. and C. M. SCHONHOFF (2002). "Nitrosylation: the next phosphorylation?" *Arch Biochem Biophys* **408**(1): 1-6.
- MARSHALL, H. E. and J. S. STAMLER (2001). "Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation." *Biochemistry* **40**(6): 1688-93.
- MARTINEZ-RUIZ, A. and S. LAMAS (2004). "S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction." *Cardiovasc Res* **62**(1): 43-52.
- MATTHEWS, D. R., C. A. CULL, et al. (1998). "UKPDS 26: Sulphonylurea failure in non-insulin-dependent diabetic patients over six years. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group." *Diabet Med* **15**(4): 297-303.
- MILES, A. M., D. A. WINK, et al. (1996). "Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy." *Methods Enzymol* **268**: 105-20.
- MONTAGUE, C. T., I. S. FAROOQI, et al. (1997). "Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans." *Nature* **387**(6636): 903-8.
- MULLER, M. J. (1987). "Insulin receptor binding to blood cells: an outdated concept for clinical studies on insulin resistance?" *Klin Wochenschr* **65**(20): 949-54.
- NATHAN, C. and M. U. SHILOH (2000). "Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 8841-8.
- NEDOSPASOV, A., R. RAFIKOV, et al. (2000). "An autocatalytic mechanism of protein nitrosylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13543-8.
- OHLSON, L. O., B. LARSSON, et al. (1985). "The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913." *Diabetes* **34**(10): 1055-8.
- OLEFSKY, J., J. W. FARQUHAR, et al. (1973). "Relationship between fasting plasma insulin level and resistance to insulin-mediated glucose uptake in normal and diabetic subjects." *Diabetes* **22**(7): 507-13.

- PARK, H. S., S. H. HUH, et al. (2000). "Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14382-7.
- PARK, H. S., E. PARK, et al. (2000). "Selenite inhibits the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) through a thiol redox mechanism." *J Biol Chem* **275**(4): 2527-31.
- PAZ, K., R. HEMI, et al. (1997). "A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem* **272**(47): 29911-8.
- PENNICA, D., G. E. NEDWIN, et al. (1984). "Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin." *Nature* **312**(5996): 724-9.
- PERREAULT, M. and A. MARETTE (2001). "Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle." *Nat Med* **7**(10): 1138-43.
- PICKUP, J. C. (2004). "Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes." *Diabetes Care* **27**(3): 813-23.
- PIERCY, V., C. D. TOSELAND, et al. (1998). "Potential benefit of inhibitors of advanced glycation end products in the progression of type II diabetes: a study with aminoguanidine in C57/BLKsJ diabetic mice." *Metabolism* **47**(12): 1477-80.
- POLONSKY, K. S., B. D. GIVEN, et al. (1988). "Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects." *J Clin Invest* **81**(2): 435-41.
- RADI, R. (1996). "Reactions of nitric oxide with metalloproteins." *Chem Res Toxicol* **9**(5): 828-35.
- REAVEN, G. M. (1988). "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." *Diabetes* **37**(12): 1595-607.
- REAVEN, G. M., R. L. LERNER, et al. (1967). "Role of insulin in endogenous hypertriglyceridemia." *J Clin Invest* **46**(11): 1756-67.
- REDDY, S. S. and C. R. KAHN (1988). "Insulin resistance: a look at the role of insulin receptor kinase." *Diabet Med* **5**(7): 621-9.



- RF, H. (2002). Prevention of type 2 diabetes mellitus. The evidence base for diabetes care. T. J. Willians RL, Herman WH, eds. London, John Wiley & Sons.
- RIBIERE, C., A. M. JAUBERT, et al. (1996). "White adipose tissue nitric oxide synthase: a potential source for NO production." *Biochem Biophys Res Commun* **222**(3): 706-12.
- ROMEO, A. A., J. A. CAPOBIANCO, et al. (2003). "Superoxide dismutase targets NO from GSNO to Cysbeta93 of oxyhemoglobin in concentrated but not dilute solutions of the protein." *J Am Chem Soc* **125**(47): 14370-8.
- RONDINONE, C. M., L. M. WANG, et al. (1997). "Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8): 4171-5.
- RUI, L., V. AGUIRRE, et al. (2001). "Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways." *J Clin Invest* **107**(2): 181-9.
- SAAD, M. J., E. ARAKI, et al. (1992). "Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance." *J Clin Invest* **90**(5): 1839-49.
- SAAD, M. J., F. FOLLI, et al. (1993). "Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats." *J Clin Invest* **92**(4): 2065-72.
- SAGHIZADEH, M., J. M. Ong, et al. (1996). "The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance." *J Clin Invest* **97**(4): 1111-6.
- SALTIEL, A. R. and J. M. OLEFSKY (1996). "Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes." *Diabetes* **45**(12): 1661-9.
- SHANKAR, R. R., Y. WU, et al. (2000). "Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance." *Diabetes* **49**(5): 684-7.
- SHIMABUKURO, M., M. OHNEDA, et al. (1997). "Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease." *J Clin Invest* **100**(2): 290-5.
- SHIOI, T., J. R. MCMULLEN, et al. (2002). "Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice." *Mol Cell Biol* **22**(8): 2799-809.

- SPITZER, J. J., G. J. BAGBY, et al. (1989). "Altered control of carbohydrate metabolism in endotoxemia." *Prog Clin Biol Res* **286**: 145-65.
- STAMLER, J. S., S. LAMAS, et al. (2001). "Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism." *Cell* **106**(6): 675-83.
- STAMLER, J. S., D. I. SIMON, et al. (1992). "S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(1): 444-8.
- STEINBERG, H. O., H. CHAKER, et al. (1996). "Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance." *J Clin Invest* **97**(11): 2601-10.
- STONE, J. R. and M. A. MARLETTA (1994). "Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states." *Biochemistry* **33**(18): 5636-40.
- SUGITA, H., M. FUJIMOTO, et al. (2005). "Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells." *J Biol Chem* **280**(14): 14203-11.
- SWINBURN, B. A., B. L. NYOMBA, et al. (1991). "Insulin resistance associated with lower rates of weight gain in Pima Indians." *J Clin Invest* **88**(1): 168-73.
- TAK, P. P. and G. S. FIRESTEIN (2001). "NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases." *J Clin Invest* **107**(1): 7-11.
- TAKATA, M., W. OGAWA, et al. (1999). "Requirement for Akt (protein kinase B) in insulin-induced activation of glycogen synthase and phosphorylation of 4E-BP1 (PHAS-1)." *J Biol Chem* **274**(29): 20611-8.
- TRUGLIA, J. A., J. N. LIVINGSTON, et al. (1985). "Insulin resistance: receptor and post-binding defects in human obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus." *Am J Med* **79**(2B): 13-22.
- UEKI, K., R. YAMAMOTO-HONDA, et al. (1998). "Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis." *J Biol Chem* **273**(9): 5315-22.

- UYSAL, K. T., S. M. WIESBROCK, et al. (1997). "Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function." *Nature* **389**(6651): 610-4.
- VAN DER POLL, T., J. A. ROMIJN, et al. (1991). "Tumor necrosis factor mimics the metabolic response to acute infection in healthy humans." *Am J Physiol* **261**(4 Pt 1): E457-65.
- VAN WEEREN, P. C., K. M. DE BRUYN, et al. (1998). "Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB." *J Biol Chem* **273**(21): 13150-6.
- VENTRE, J., T. DOEBBER, et al. (1997). "Targeted disruption of the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice." *Diabetes* **46**(9): 1526-31.
- VIRKAMAKI, A., I. PUHAKAINEN, et al. (1992). "Mechanisms of hepatic and peripheral insulin resistance during acute infections in humans." *J Clin Endocrinol Metab* **74**(3): 673-9.
- VIRKAMAKI, A. and H. YKI-JARVINEN (1994). "Mechanisms of insulin resistance during acute endotoxemia." *Endocrinology* **134**(5): 2072-8.
- WANNAMETHEE, S. G. and A. G. SHAPER (1999). "Weight change and duration of overweight and obesity in the incidence of type 2 diabetes." *Diabetes Care* **22**(8): 1266-72.
- WELLEN, K. E. and G. S. HOTAMISLIGIL (2005). "Inflammation, stress, and diabetes." *J Clin Invest* **115**(5): 1111-9.
- WILLIAMS, J. G., K. PAPPU, et al. (2003). "Structural and biochemical studies of p21Ras S-nitrosylation and nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11): 6376-81.
- WINK, D. A., J. F. DARBYSHIRE, et al. (1993). "Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction." *Chem Res Toxicol* **6**(1): 23-7.

- WINK, D. A., R. W. NIMS, et al. (1994). "Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction." *Chem Res Toxicol* **7**(4): 519-25.
- WINK, D. A., Y. OSAWA, et al. (1993). "Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent." *Arch Biochem Biophys* **300**(1): 115-23.
- WINKLER, G., F. SALAMON, et al. (1998). "Elevated serum tumour necrosis factor-alpha levels can contribute to the insulin resistance in Type II (non-insulin-dependent) diabetes and in obesity." *Diabetologia* **41**(7): 860-1.
- WITHERS, D. J., J. S. GUTIERREZ, et al. (1998). "Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice." *Nature* **391**(6670): 900-4.
- YALOW, R. S. and S. A. BERSON (1960). "Plasma insulin concentrations in nondiabetic and early diabetic subjects. Determinations by a new sensitive immuno-assay technic." *Diabetes* **9**: 254-60.
- YASUKAWA, T., E. TOKUNAGA, et al. (2005). "S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance." *J Biol Chem* **280**(9): 7511-8.
- YUAN, M., N. KONSTANTOPOULOS, et al. (2001). "Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta." *Science* **293**(5535): 1673-7.
- ZECCHIN, H. G., R. M. BEZERRA, et al. (2003). "Insulin signalling pathways in aorta and muscle from two animal models of insulin resistance--the obese middle-aged and the spontaneously hypertensive rats." *Diabetologia* **46**(4): 479-91.
- ZHANG, Y., R. PROENCA, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* **372**(6505): 425-32.
- ZIOLO, M. T. and D. M. BERS (2003). "The real estate of NOS signaling: location, location, location." *Circ Res* **92**(12): 1279-81.
- ZOU, M. H., M. LEIST, et al. (1999). "Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine coronary arteries." *Am J Pathol* **154**(5): 1359-65.