

Transdução de sinal: um olhar sobre a insulina

Signal transduction: an overview on insulin

RIALA6/1082

Adriana LUCHS^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Seção de Vírus Entéricos. Serviço de Virologia. Divisão de Biologia Médica. Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP 01246-902 – Cerqueira César – São Paulo – SP – Fone: 3068-2909

Recebido: 03/03/2006 – Aceito para publicação: 18/05/2006

RESUMO

Os esforços de muitos laboratórios têm concentrado no desenvolvimento de pesquisas e na descoberta de vias moleculares que atuam na mediação da resposta pleiotrópica da insulina. Os estudos sobre o mecanismo de ação insulínico levaram a descoberta do receptor tirosina quinase e várias proteínas ligantes que são diretamente ativadas por meio de sítios de tirosinas fosforiladas existentes nesses receptores. A família dos substratos do receptor de insulina (IRSs) são as principais proteínas envolvidas na transdução do sinal intracelular desencadeado pela insulina as quais são encontradas em uma grande variedade de células e tecidos. Esse trabalho de revisão versa sobre o tema referente ao complexo do receptor de insulina e a cascata de sinalização induzida por esse hormônio.

Palavras-chave. insulina, receptor insulínico, substrato do receptor insulínico (IRSs), sinalização intracelular, sítios tirosinafosforilados.

ABSTRACT

Several laboratories efforts largely focus on investigating and discovering the molecular pathways that mediate the pleiotropic insulin responses. Studies on the mechanism of insulin action led to the discovery of the insulin receptor tyrosine kinase, the central role of tyrosine phosphorylation during insulin signaling and various signaling binding proteins directly activated by phosphotyrosine motifs occurring in the activated receptors complexes. Insulin receptors substrate family (IRSs) is the main proteins involved in intracellular signaling pathways, and it is found in a large variety of cells and tissues. This paper is a review on insulin receptor complex and the signaling cascades induced by this hormone.

Key words. insulin, insulin receptor, insulin receptor substrates (IRSs), intracellular signaling, phosphotyrosine motifs.

SUMÁRIO

Introdução	158
A Insulina	158
O Receptor de Insulina (IR)	158
Os Domínios SH2 e SH3	159
Os Substratos do Receptor de Insulina (IRSs)	160
Fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)	161
Proteína Homóloga ao Colágeno com Domínio SH2 (Shc)	162
Proteína Ras	162
A Proteína Quinase B/Akt (PKB/Akt)	162
Proteína Tirosina Fosfatase 1D (PTP1D)	162
Proteína Tirosina Fosfatase 1B (PTP1B)	162
Integrinas	162
Referências	163

INTRODUÇÃO

A Insulina

A insulina é uma proteína de pequeno peso molecular formada por duas cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfetos constituídas por 21 e 30 aminoácidos, respectivamente. Essa proteína é sintetizada nas células β pancreáticas como uma longa cadeia de polipeptídeos proveniente de um único gene, recebendo o nome de pró-insulina¹. A pró-insulina é composta por insulina e peptídeo C². Esta molécula é clivada por ação de uma enzima proteolítica após a cadeia protéica dobrar-se em um formato específico. A excisão de parte da cadeia polipeptídica de pró-insulina provoca uma perda irreversível da formação necessária para a proteína dobrar-se espontaneamente em sua conformação normal¹. Desde o seu isolamento, a insulina é o hormônio peptídico mais intensamente estudado quanto a seu mecanismo de ação, refletindo sua importância na biologia humana e medicina. Um entendimento bioquímico claro dos mecanismos insulínicos é de máxima importância³.

Insulina é o agente anabólico mais potente fisiologicamente conhecido⁴. Em nível celular, este hormônio controla o transporte iônico, a captação de glicose e substrato (ex. aminoácidos), bem como a fosforilação e desfosforilação de enzimas, além de afetar o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Os efeitos desse hormônio variam desde respostas rápidas de sistemas de transporte e enzimas (de segundos a minutos) até modulações lentas, como proliferação celular, que pode levar horas para ser expressa. Além dos seus bem conhecidos efeitos metabólicos, há evidências de que exerça ações sobre componentes da estrutura celular como o citoesqueleto. Adicionado à complexidade da ação insulínica, há evidências que sugerem que esse hormônio exerça parte de seus efeitos metabólicos via mudanças no volume celular³. Uma dúvida resta: ainda não está claro se as ações metabólicas e mitogênicas da insulina compartilham uma via comum ou é o resultado de duas ou mais vias divergentes que emanam de seu receptor⁵.

Longe da ativação do receptor, a insulina regula o grau de fosforilação em serina e treonina, paradoxalmente estimulando fosforilação de algumas proteínas e causando desfosforilação em outras⁴. Está claro que algumas, mas não todas desfosforilações são efeitos insulínicos que controlam a elevação de 3', 5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), sendo a redução deste nucleotídeo um dos mecanismos fisiológicos mais importantes da ação insulínica. É bem estabelecido que a insulina ativa uma, e provavelmente mais, AMPc fosfodiesterases responsáveis pela redução dos níveis de AMPc. O hormônio também inibe a produção de AMPc através da inibição da adenilato ciclase. Esse efeito faz com que o AMPc seja um mensageiro secundário da insulina, embora não o principal⁶. Muitas dessas fosforilações em serina/treonina são compartilhadas com outros fatores de crescimento. Em contraste, a desfosforilação de proteínas é uma característica

única da insulina, incluindo muitas enzimas envolvidas no metabolismo de glicose e lipídios, tais como piruvato desidrogenase, glicogênio sintetase e lipase sensível a hormônio. Portanto essas desfosforilações parecem ser críticas para muitos dos efeitos metabólicos do hormônio como síntese de lipídios e carboidratos e inibição de lipólise⁴.

É interessante notar que pró-insulina, insulina e fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) são peptídeos intimamente relacionados quanto a sua seqüência de aminoácidos, estrutura tridimensional e atividades biológicas. Enquanto a insulina age conhecidamente como um hormônio endócrino, o fator de crescimento relacionado à insulina 1 (IGF-1) é classicamente considerado como um regulador parácrino de crescimento e diferenciação celular. Ambos os peptídeos se ligam com alta afinidade a distintos receptores de membrana, os quais compartilham grande homologia. A pró-insulina é capaz de se ligar ao receptor de insulina com 10% menos afinidade que o hormônio original e promove ativação da sinalização, mas provavelmente com efeitos biológicos diferentes. Em fibroblastos de embrião de frangos a pró-insulina é descrita como mais efetiva que a insulina em estimular crescimento celular².

O Receptor de Insulina (IR)

O receptor de insulina (IR) está presente virtualmente em todos os tecidos dos vertebrados, embora sua concentração varie de 40 receptores em eritrócitos circulantes a 200 em adipócitos e hepatócitos⁷.

O gene do receptor humano está localizado no braço curto do cromossomo 19, sendo constituído por mais de 150 quilobases (Kb) e 22 éxons, codificando um cDNA de 4,2 Kb. Este receptor migra com peso molecular de 300-400 kDa em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)⁷. O IR é sintetizado como pró-receptor e sofre uma série de mudanças pós-transdacionais, incluindo ligação covalente, pontes dissulfeto, dimerização e clivagem proteolítica para formar o tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ ⁸. O IR consiste num heterotetrâmero composto por duas cadeias externas α ⁹, as quais estão localizadas totalmente fora da membrana e possuem os sítios de ligação à insulina⁷ e duas cadeias transmembrânicas β , as quais possuem o domínio intracelular tirosina quinase^{9,10} (Figura 1). A N-glicosilação ligada a aspargina presente no receptor é uma modificação necessária para a dimerização do mesmo, transporte intracelular e aquisição da capacidade de ligar-se a insulina. Na subunidade β , a glicosilação está envolvida com transmissão transmembrânica do sinal, enquanto na subunidade α parece promover o processamento do pró-receptor e seu transporte a partir do retículo endoplasmático. Pró-receptores retidos no retículo possuem domínios quinásicos ativos *in vitro*, mas são praticamente insensíveis às estimulações insulínicas⁸.

Uma ou duas moléculas de insulina podem se ligar ao receptor e os sítios de ligação exibem um comportamento cooperativo negativo⁷. Esta ligação promove mudanças conformacionais, movendo os domínios quinásicos para perto,

permitindo a fosforilação cruzada da tirosina 1.162 e tirosinas adjacentes presentes na alça de ativação. Depois da fosforilação, a tirosina 1.162 é deslocada do sítio ativo e presume-se que irá estabilizar a nova conformação. Essas mudanças permitem a ligação do adenosina trifosfato (ATP) e estimulam intensamente a atividade catalítica do receptor⁹.

A ativação da tirosina quinase presente na subunidade β do receptor resulta numa imediata autofosforilação de seis resíduos de tirosina, onde a mutação em um dos três resíduos do domínio quinásico do receptor causa redução na magnitude do sinal insulínico e mutação nos três sítios inativa completamente o receptor. Carel et al¹¹ relatou em fibroblastos Rat-1 que a deleção de 43 aminoácidos do domínio C-terminal do receptor resulta na dissociação entre efeitos metabólicos e mitogênicos da insulina.

Proteínas quinases são enzimas que catalisam a transferência de grupos fosfatos para resíduos de aminoácidos das proteínas. No caso do receptor de insulina há uma reação de autofosforilação, levando a incorporação de grupos fosfatos dentro da subunidade β do receptor. A insulina estimula a fosforilação do receptor em 3-5 resíduos de tirosina, sendo que esse efeito é máximo em 1 minuto. A quinase uma vez ativada parece manter o estado fosforilado mesmo na ausência da insulina³. O receptor de insulina fosforila diretamente inúmeras proteínas, incluindo a família dos substratos do receptor de insulina (IRSs), proteína homóloga ao colágeno com domínio SH2 (Shc) e proteína ligante de fator de crescimento 2 (Grb-2)¹² (Figura 1).

Uma vez ativado, o receptor não sofre desfosforilação ou desativações espontâneas, sendo necessário um processo catalisado por uma proteína tirosina fosfatase celular para reverter os receptores ao seu nível basal, ou seja, no estado de quinase inativa. A principal tirosina fosfatase do IR é uma proteína integral de membrana chamada LAR (proteína integral de membrana relacionada a antígeno de leucócito)¹³.

Entre as tirosinas quinases específicas, o grande grupo dos receptores quinásicos ocupa um lugar especial devido a sua natureza transmembrânica, pois são capazes de interpretar diretamente o sinal extracelular e iniciar a cascata de sinalização dentro da célula¹⁴. Embora, saiba-se que esses receptores possuam um papel decisivo na tumorigênese, é importante enfatizar que eles também são reguladores cruciais do desenvolvimento, crescimento e diferenciação tanto no adulto quanto no embrião⁹. Análises moleculares de tumores humanos mostram que algumas malignidades estão associadas ao aumento da expressão ou amplificação de certos protooncogenes de receptores tirosina quinase. Para esses tumores nota-se uma forte relação estatística entre amplificação/superexpressão e o prognóstico clínico. Esses dados suportam a hipótese de que esses genes estão envolvidos, pelo menos, em estágios tardios do processo de transformação maligna, com a progressão tumoral e metástase. O gene humano codificador para o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) é encontrado amplificado em células de carcinoma de cabeça e pescoço e

em 40% dos gliomas malignos. Rearranjos do DNA nesse gene amplificado levam a deleções no domínio extracelular do receptor. Esses receptores truncados não se acoplam ao ligante extracelular, mas exibem uma atividade de fosforilação constante. Como a formação tumoral é geralmente considerada um processo constituído de múltiplos passos é difícil avaliar em tumores humanos qual o papel dessas alterações na expressão de protooncogenes ou estruturas que poderiam estar envolvidos na iniciação do tumor, progressão e metástase, ou seja, qual seria a consequência bioquímica e fisiológica e como poderiam contribuir para o fenótipo neoplásico. Um exemplo de superexpressão gênica de receptor tirosina quinase como responsável na formação de um tumor é fornecido pelo modelo de gênese de melanoma em peixe, onde o agente transformador identificado foi um novo membro da subclasse I (receptores relacionados ao fator de crescimento epidérmico-EGF) dos receptores tirosina quinásicos, o Xmrk (receptor tirosina quinase do peixe *Xiphophorus* semelhante ao receptor de fator epidérmico)¹⁴.

O IR é intimamente relacionado com o receptor do fator de crescimento 1 relacionado à insulina (IGFR-1)¹⁵, chegando a exibir 70% de homologia. Sabe-se que concentrações supra-fisiológicas de insulina ligam-se ao IGFR-1, o qual regula a proliferação das células *in vivo* e *in vitro*, através de três mecanismos diferentes: mitogênese, estabilização e manutenção do fenótipo transformado e proteção das células contra apoptose¹⁶. O mecanismo de autofosforilação quinásico é similar ao que ocorre com receptores tirosina quinase monoméricos de fatores de crescimento, como os receptores para fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGFR) e de fator de crescimento fibroblástico (FGFR) e EGFR¹⁵. A interação dos ligantes com receptores tirosina quinase geralmente faz com que receptores monoméricos se oligomerizem no plano da membrana e se autofosforilem através de uma reação intermolecular. Autofosforilação nos resíduos de tirosina dentro do domínio catalítico está associada com ativação enzimática, enquanto fosforilações em regiões não catalíticas do domínio citoplasmático providenciam sítios de ligação para proteínas sinalizadoras⁹. A transfosforilação de receptores monoméricos gera sítios que reconhecem proteínas efetoras detentoras de domínios SH2, as quais se associam diretamente com os respectivos receptores. Já a autofosforilação de receptor de insulina geralmente causa a ativação do seu substrato, o qual funciona como uma proteína de ancoragem para outras moléculas SH2¹⁵.

O IR também é fosforilado em resíduos de serina e treonina no estado basal e em resposta a estimulação das células por ésteres de forbol, análogos do AMPc e pela própria insulina. Algumas fosforilações em serina diminuem a atividade tirosina quinásica estimulada pela insulina⁷.

Os Domínios SH2 e SH3

Vários componentes da via de transdução do sinal intracelular contêm regiões conhecidas como SH2 e SH3. Os

domínios SH2 e -3 são regiões homólogas aos sítios não catalíticos da família de tirosina quinase Src e, portanto, respectivamente denominados: homólogo 2 a Src (SH2) e homólogo 3 a Src (SH3). Os domínios SH2 são formados por uma cadeia lateral de arginina que interage com grupos fosfotirosina dos receptores tirosina quinásicos e outras proteínas citoplasmáticas. Os domínios SH3, por sua vez, apresentam grande afinidade por resíduos de prolina¹⁷ e são encontrados em várias proteínas que se associam ao citoesqueleto e a membrana. As proteínas do citoesqueleto não possuem SH2, indicando que esses dois domínios não são obrigatoriamente inseparáveis. O papel dos domínios SH3 parece estar envolvido com localização subcelular. Sugere-se então que os domínios SH2 e -3, quando combinados, confirmam aos complexos multiproteicos, localização subcelular apropriada para a ativação de vias de transdução do sinal específicas¹⁸.

Os Substratos do Receptor de Insulina (IRSs)

O substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), foi originalmente descoberto em células de hepatoma Fao como sendo uma ampla banda que surgiu durante a eletroforese em SDS-PAGE com uma massa molecular de aproximadamente 185 kDa, sendo chamada pp185. Foi subsequentemente identificado em várias outras células e tecidos estimulados pela insulina com peso variando de 160 a 190 kDa, sugerindo que sua fosforilação pode variar ou ser uma mistura de várias fosfoproteínas diferentes. O IRS-1 é imediatamente fosforilado após estimulação insulínica, indicando que exerça um papel importante nos passos iniciais da transdução do sinal pós-receptor¹⁹ (Figura 1).

A partir de células mielóides foi descoberta e clonada uma proteína chamada 4PS, a qual exibia grande semelhança com o IRS-1, sendo posteriormente identificada como substrato 2 do receptor de insulina (IRS-2) e principalmente expressa no músculo, pulmão, cérebro, fígado, rins, coração e baço²⁰ (Figura 1).

Em adipócitos de ratos a insulina induz a fosforilação de uma proteína de 60 kDa, chamada pp60, a qual pode se associar a Fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)²¹. Posteriormente, essa proteína ficou conhecida como substrato 3 do receptor de insulina (IRS-3)²² (Figura 1).

O substrato 4 do receptor de insulina (IRS-4) foi identificado por Lavan et al²³ sob a denominação de PY160. Esse novo membro da família das proteínas IRSs sofria fosforilação em tirosina após estímulo com insulina e IGF-1 em células HEK293, mas era imunologicamente distinta do IRS-1¹² (Figura 1).

As proteínas IRSs são compostas por um domínio terminal NH₂ de homologia pleckstrin (PH) e um domínio ligante a fosfotirosina (PTB), seguido por uma cauda terminal COOH contendo múltiplas regiões fosforiladas em tirosina. Os domínios PH e PTB são bem conservados em cada uma das proteínas IRSs e possuem uma estrutura quaternária comum, mas funcionam de maneira diferente quando acoplados ao IR. Estudos indicam que o domínio PH se ligue a fosfolipídios de

membrana ou regiões ácidas de várias proteínas^{10,24} e embora não interajam diretamente com os receptores, esses domínios aparentemente são necessários para uma eficiente fosforilação em tirosina promovida pelo receptor¹². O domínio PTB interage com regiões NPEY (N = asparagina; P = prolina; E = glutamato; Y = tirosina) fosforiladas na região de justamembrana da subunidade β do IR²⁴. Os domínios PH e PTB do IRS-1 e -2 possuem uma similaridade de 69 e 75%, respectivamente²³. O domínio PH do IRS-4 exibe um alto grau de homologia com o domínio presente no IRS-1, -2 e -3, sendo de 49, 50 e 43%, respectivamente. Por sua vez, o domínio PTB do IRS-4 também exibe um alto grau de homologia com o mesmo domínio dos IRS-1, -2 e -3, sendo 66, 62 e 43%, respectivamente²³. A porção C-terminal dos domínios PH e PTB recebe o nome de domínios SAIN também conhecido por ligante NPXY (N = asparagina; P = prolina; X = qualquer aminoácido; Y = tirosina) de Shc e IRS-1, sendo que o IRS-1 possui um e o IRS-2 dois. Os domínios SAIN, também chamados domínios não-PTB, são importantes para a interação com o receptor e estão pouco conservados entre as diferentes moléculas de IRSs¹². Esses resíduos são as regiões que se ligam às proteínas contendo domínios SH2, incluindo as subunidades regulatórias da PI3K (p85 α , p55 α , p50 α , p83 β e p55^{PIK}), Grb-2, proteína multiadaptadora com estrutura de domínios SH3-SH3-SH3-SH2 (Nck), proteína tirosina quinase citoplasmática (c-fyn), fosfatase 2 que contem domínios de homologia SH2 (SH-PTP2 ou PTP1 D)²⁴ e fosfolipase C γ (Plc γ)¹² (Figura 1).

Portanto, os IRSs podem ser vistos como proteínas com múltiplos sítios, os quais após a fosforilação em tirosina ativam várias vias sinalizadoras através da interação com proteínas contendo domínios SH2. Conseqüentemente, vários efeitos biológicos da insulina poderiam ser separados na altura da fosforilação desses substratos, e mesmo por diferentes sítios presentes nos IRSs. Alternativamente, o tempo de duração e magnitude do sinal poderia ser um importante fator de discriminação entre respostas biológicas diferentes⁵.

A ocorrência de quatro IRSs levanta uma questão que versa sobre a regra fisiológica de cada uma dessas proteínas. Apesar de similares, as IRSs possuem estruturas, padrões de fosforilação em tirosina pelo IR (e outros receptores) e associação com proteínas contendo domínios SH2 distintos, inclusive diferenças em relação a sua localização dentro da célula, onde o IRS-1/2 estão comumente associados a estruturas intracelulares, enquanto o IRS-3/4 estão associados à membrana plasmática²⁵. Muitos estudos sugerem que o IRS-1 medeia preferencialmente os efeitos mitogênicos da insulina e do IGF-1, enquanto o IRS-2 parece estar mais envolvido com a geração da resposta metabólica da insulina²⁶. Outros dados indicam que *in vivo* o IRS-1 talvez seja responsável pela sinalização do receptor de IGF-1 e o IRS-2 pela sinalização do receptor de insulina¹². Dados evidenciam que IRS-1/2 compartilham efeitos biológicos, uma vez que no decorrer da estimulação insulínica o IRS-1 e -2 medeiam antiapoptose e síntese de DNA²⁴, mas exercem papéis tecido-específicos, onde o IRS-1 poderia

exercer um papel proeminente no músculo esquelético, enquanto o IRS-2 poderia ser dominante no fígado²⁶.

Enquanto IRS-1 e -2 são expressos ubiquamente, a expressão de IRS-4 é praticamente restrita à glândula pituitária e ao cérebro²⁴, principalmente telencéfalo e mesencéfalo. O hipotálamo regula o comportamento de fome, acasalamento, nutrição, crescimento e controla respostas desencadeadas pelo baixo nível de glicose no sangue. Essa região do cérebro contém receptores de insulina, bem como outros receptores que podem potencialmente requerer o IRS-4 para a transdução do seu sinal²⁵. O IRS-4 é expresso em células humanas, enquanto sua expressão em tecidos de camundongos está abaixo do nível de detecção¹².

Fantim et al²⁵ trabalhando com camundongos demonstrou que animais desprovidos de IRS-1 são menores do que os controles e são levemente resistentes à insulina, exibem altos níveis plasmáticos desse hormônio e fraca tolerância a testes de glicose e insulina. Entretanto, seus níveis sanguíneos de glicose são normais no estado alimentado e não alimentado. Em contraponto, camundongos carentes em IRS-2 apresentam um tamanho semelhante aos seus respectivos controles, mas desenvolvem diabetes devido a uma combinação de resistência à insulina e incapacidade de proliferação das células β pancreáticas. Camundongos sem IRS-3 não apresentam defeitos no crescimento e nem na homeostase de glicose. Por fim, camundongos deficientes em IRS-4 não exibem resistência à insulina e apresentam tamanho ligeiramente menor. Por esses dados, pode-se inferir que o IRS-1 exerce um papel importante no crescimento, enquanto o IRS-2 desempenha uma função admirável na proliferação das células β pancreáticas e ambos cumprem ação na responsividade a insulina dos tecidos mais importantes. Por outro lado, IRS-3 e -4 parecem não ter um papel muito importante em nenhum desses processos. A falta do IRS-3 pode ser suprida pela presença de IRS-1 e -2. A ausência de um fenótipo marcante devido à falta de IRS-4 não é surpresa, visto que sua expressão é baixa em camundongos¹².

Sabe-se que o IRS-4 interage com proteínas contendo domínios SH2 como a PI3K, Grb-2, proteína adaptadora II (Crk-II) e a proteína adaptadora semelhante a Crk (CrkL)¹², além disso, observações feitas em células 32D em relação às diferenças na transdução do sinal mostraram que o IRS-1 e -4 se ligam fortemente a Grb-2 e aumentam a ativação de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) durante a estimulação insulínica. O IRS-4 não possui os sítios de ligação SH2 na terminação COOH, portanto esta proteína promove uma fraca ativação da PI3K devido à inabilidade do receptor de insulina em fosforilar suas regiões YXXM (Y = tirosina; X = qualquer aminoácido; M = metionina). Entretanto, os sinais mediados pelo IRS-4 são suficientes para estimular a atividade da PI3K e ativar a proteína quinase B/Akt (PKB/Akt), mas falham em promover a ativação da proteína quinase de fração ribossomal S6 (p70^{s6k}). Na presença de interleucina 3 (IL-3), o IRS-4 promove apoptose através de um mecanismo

não conhecido. Esse dado é uma demonstração clara da diferente capacidade sinalizadora do IRS-4 quando comparado a IRS-1 e -2²⁴.

Os IRS-1 e -2 foram encontrados como componentes da via de sinalização de outros receptores como o hormônio de crescimento (GH), interleucina-9 (IL-9), interferon α (INF α), interferon γ (INF γ) e o fator inibidor de leucemia (LIF). Esses receptores de citocinas utilizam vários componentes da família da Janus quinase (JK) para mediar a fosforilação de IRS-1 e -2¹⁵. Os outros fatores de crescimento podem ativar os mesmos intermediários sinalizadores (geralmente em um grau maior que a insulina), mas não são capazes de mimetizar os aspectos metabólicos da ação insulínica²⁷.

A via de sinalização regulada pelo IRS-1 que inibe a apoptose durante estimulação insulínica talvez seja independente da PI3K. Há ainda estudos que sugerem que os produtos da PI3K amplificam o sinal antiapoptótico independente da fosfotirosina através do recrutamento de elementos essenciais para a membrana plasmática²⁴.

Fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)

Fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) é um efetor da via de sinalização usada por vários receptores tirosina quinase, incluindo o IR e o IGF-IR²⁸ (Figura 1).

A PI3K é uma enzima heterodimérica sinalizadora composta por uma subunidade catalítica (p110) associada a uma subunidade regulatória (p85)²⁴. A p85 é formada por um domínio SH3, domínio que contém homologia à região de quebra (BCR), flanqueada por duas seqüências ricas em prolina, dois domínios SH2 e uma região inter-SH2 que contém o sítio de ligação com a subunidade catalítica p110. A interação dos domínios SH2 da subunidade reguladora da PI3K com regiões específicas YXXM (Y = tirosina; X = qualquer aminoácido; M = metionina) fosforiladas em tirosina presentes nos próprios receptores e nas proteínas sinalizadoras intermediárias, tais como IRS-1 e IRS-2, induz a atividade enzimática da subunidade catalítica, p110²⁸. Os produtos lipídicos da PI3K medeiam a ativação de várias serina/treonina quinases, incluindo a quinase 1 e 2 dependentes de fosfolipídio (PDK1/PDK2), PKB/Akt, proteína quinase C ξ (PKC ξ), proteína quinase C λ (PKC λ), p70^{s6k}, entre outras. Essas serina/treonina quinases desempenham funções na regulação de várias respostas biológicas decorrentes da ativação de PI3K, incluindo ativação do transporte de glicose, síntese de glicogênio, síntese de proteínas, lipogênese, antilipólise, mitogênese e antiapoptose²⁴.

Sabe-se que IR e IGF-1R ativados podem se associar diretamente com a subunidade p85 da PI3K, a qual interage com a região C-terminal dos receptores, portanto, deve existir um mecanismo de ativação da PI3K independente dos IRSs. Embora ambos os receptores sejam capazes de interagir a subunidade p85, isso ocorre de uma maneira distinta, onde o IR é mais eficiente nessa interação, resultando em respostas diferentes²⁸.

Proteína Homóloga ao Colágeno com Domínio SH2 (Shc)

A proteína Shc recebeu esse nome devido à presença do domínio SH2 e sua homologia ao colágeno (Fig. 1). Existem múltiplas proteínas Shc, as quais são implicadas na sinalização mitogênica de vários receptores tirosinas quinases, incluindo PDGFR e EGFR, interleucina-2 (IL-2), interleucina-3 (IL-3), fator estimulador de colônia em macrófago e granulócito (GM-CSF) e insulina²⁹.

Proteína Ras

A fosforilação em tirosina dos IRSs ou proteínas Shc pelo receptor tirosina quinase induz sua associação com o domínio SH2 da pequena proteína adaptadora Grb-2⁴. O domínio SH2 da Grb-2 é flanqueado por dois domínios SH3, os quais medeiam a sua ligação com o SOS (“Son of Sevenless”). A estimulação de células com agentes como insulina e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), resultam na fosforilação em serina/treonina de SOS e sua dissociação do complexo Grb2-SOS (Fig. 1). O SOS é responsável pela troca de guanosina difosfato (GDP) por guanosina trifosfato (GTP) na proteína Ras (codificada pelo proto-oncogene *ras*). Uma vez ligada o estado ligado ao GTP, a Ras se associa com membros da família de proteínas quinase Raf (uma quinase de serina/treonina), ativando esta última³⁰. A Raf ativada pode fosforilar a proteína quinase quinase ativada por mitógeno (MAPKK ou MEK), uma quinase específica de ação dupla que catalisa a fosforilação em treonina e tirosina da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK ou ERK), promovendo sua ativação. A MAPK por sua vez fosforila inúmeros fatores de transcrição nucleares e proteínas citoplasmáticas envolvidas na regulação de síntese macromolecular e mitogênese, tais como fosfolipase A₂ (PLA₂), p70^{S6K} e a quinase S6 ribossomal p90 (p90^{Rsk})⁴ (Figura 1). Dessa forma, Ras funciona como uma molécula chave na conversão de sinais antecedentes para eventos posteriores envolvendo fosforilações de serina/treonina quinases³⁰. Há evidências que indicam que as proteínas IRSs aparentemente não estão envolvidas com a ativação da Ras, pois tal ativação ocorre em células desprovidas de IRSs ou expressando um mutante, portanto, a ativação da Ras deve ser mediada pela fosforilação exclusiva de Shc. Entretanto, a ativação de Ras é insuficiente para desencadear a mitogênese em células deficientes em IRSs, indicando que este também deve ser responsável pelo acoplamento de outra via independente de Ras, mas importante para a mitogênese dependente de estimulação insulínica¹⁵.

A Proteína Quinase B/Akt (PKB/Akt)

A regulação da proteína quinase B (PKB/Akt) envolve o recrutamento de várias quinases para a membrana plasmática (Fig. 1). O domínio PH da PKB/Akt interage com os produtos da PI3K, recrutando a PKB/Akt para a membrana plasmática e expondo-a para quinases dependentes de fosfolípidios associadas à membrana. A PDK1 também se associa à

membrana plasmática através da interação com o domínio PH dos produtos da PI3K, catalizando a fosforilação da PKB/Akt³⁰.

Proteína Tirosina Fosfatase 1D (PTP1D)

Proteína tirosina fosfatase 1D (PTP1D), também conhecida como SH-PTP2, SH-PTP3, PTP2C e Syp, é uma enzima citoplasmática com dois domínios Src (domínios de tirosina fosforilas) de homologia 2 (SH2), sendo expressa numa grande variedade de tipos celulares (Figura 1). Após estimulação das células com vários fatores de crescimento distintos, PTP1D torna-se fosforilada em tirosina e associa-se com receptores ativados ou tirosina quissas citoplasmáticas via seus domínios SH2. Estudos demonstraram que a PTP1D é necessária para a transdução do sinal gerado pela ativação do receptor de PDGF e de insulina, sendo capaz de ligar-se ao IRS-1 (Figura 1). Em contraste com o que ocorre com a via do receptor de PDGF, a ativação do receptor de insulina não resulta na fosforilação em tirosina dos resíduos do PTP1D, impedindo sua ligação ao complexo Grb2-SOS, indicando que o efeito positivo dessa fosfatase na sinalização insulínica deve ser mediado por outro mecanismo. Sabe-se que seu envolvimento crítico na sinalização da insulina esta relacionada com a regulação da captação de glicose³¹.

Proteína Tirosina Fosfatase 1B (PTP1B)

A proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) esta predominantemente localizada na superfície citossólica do retículo endoplasmático. Essa tirosina fosfatase exerce o principal papel na regulação da atividade do IR³², sendo considerada um regulador negativo da sinalização insulínica, após sua fosforilação direta por esse receptor³³ (Figura 1). A PTP1B não somente desfosforila o IR ativado pela ligação com a insulina, mas também regula o percussor do IR durante a sua biossíntese³². Esse fato é bem evidenciado em camundongos “knockout”, pois mostra que a falta de PTP1B esta associada a um aumento na sensibilidade insulínica, como também na resistência à obesidade. Esses estudos mostram que a inibição da PTP1B prove uma via atrativa para a utilização desse processo como uma terapia contra o diabetes tipo 2 e a obesidade³⁴.

Integrinas

Estudos prévios demonstraram a existência de uma ligação entre as vias de sinalização utilizadas pelas integrinas e aquelas empregadas pelos fatores de crescimento. Acredita-se que adesão seja necessária para que os fatores de crescimento induzam completamente seus efeitos intracelulares. Por exemplo: integrinas $\alpha_5\beta_1$ exercem sinergia com o sinal insulínico em células ovarianas de hamster chinês. Esses efeitos podem ser mediados através do aumento da fosforilação em tirosina do receptor e de seus substratos, pois as integrinas podem potencializar a via de sinalização da insulina e do IGF-1, através da regulação da expressão de IRS-1 (Figura 1). Uma falha na adesão induz uma rápida diminuição do RNAm do IRS-1. Sabe-se que as integrinas induzem o recrutamento e

ativação de tirosina quinases como a proteína quinase ativadora de c-jun (JNK), proteína quinase de adesão local (FAK), Src e a via das MAPK. Além disso, há evidências de que as integrinas podem regular a transcrição do gene que codifica para IRS-1 (Figura 1) via ativação de JNK mediada pela FAK. Também foi demonstrado que FAK interage diretamente com o IRS-1, levando a fosforilação em tirosina deste último e sua conseqüente interação com proteínas que possuem o domínio SH2, tais como p85, Grb-2 e PTP1 D, além de ativar a PI3K²⁶.

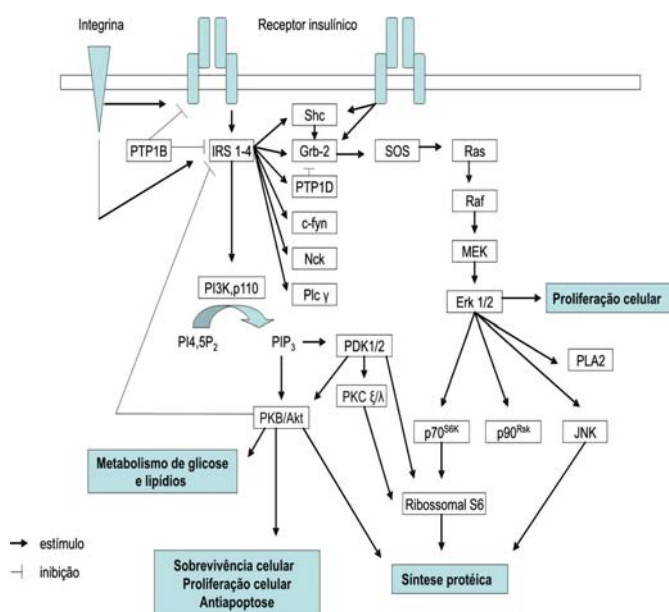


Figura 1. Insulina atua via receptores do tipo tirosina quinase presentes na membrana celular, estimulando a fosforilação dos substratos do receptor insulínico (IRSs). A fosforilação das proteínas IRS(s) em seus resíduos de tirosina inicia uma complexa cascata de transdução de sinal, envolvendo a captação de glicose, metabolismo, síntese de proteínas e sobrevivência celular.

REFERÊNCIAS

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. 3th ed. New York & London: Garland Publishing, Inc., 1994. 1294pp.
2. Jehle PM, Lutz MP, Fussgaenger RD. High affinity binding sites for proinsulin in human IM-9 lymphoblasts. *Diabetologia* 1996; 39(4): 421-32.
3. al-Habori M. Mecanism of insulin actin, role of ions and the cytoskeleton. *Int J Biochem* 1993; 25(8): 1087-99.
4. Lazar DF, Wiese RJ, Brady MJ, Mastick CC, Waters SB, Yamauchi K, et al. Mitogen-activated protein kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. *J Biol Chem* 1995; 270(35): 20801-7.
5. Hansen BF, Danielsen GM, Drejer K, Sorensen AR, Wiberg FC, Klein HH, et al. Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increase mitogenic potency. *Biochem J* 1996; 315 (Pt 1): 271-9.

6. Stralfors P. Insulin second messengers. *Bioessays* 1997; 19(4): 327-35.
7. White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem* 1994; 269(1): 1-4.
8. Wiese RJ, Herrera R, Lockwood DH. Glycosylation sites encoded by exon 2 of the human insulin receptor gene are not required for the oligomerization, ligand binding, or kinase activity of the insulin receptor. *Receptor* 1995; 5 (1): 71-80. Erratum in: *Receptor* 1995 Summer; 5(2): 143.
9. Pawson T. Signal transduction. Look at a tyrosine kinase. *Nature* 1994; 372(6508): 726-7.
10. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 1995; 16(2): 117-42.
11. Carel K, DePaolo D, Reusch JE, Leitner JW, Draznin B. Reduced phosphorylation of mitogen-activated protein kinase kinase in response to insulin in cells with truncated C-terminal domain of insulin receptor. *Endocrinology* 1996; 137(6): 2362-6.
12. Qu BH, Karas M, Koval A, LeRoith D. Insulin receptor substrate-4 enhances insulin-like growth factor-1-induced cell proliferation. *J Biol Chem* 1999; 274(44): 31179-84.
13. Zhang WR, Li PM, Oswald MA, Goldstein BJ. Modulation of insulin signal transduction by eutopic overexpression of the receptor-type protein-tyrosine phosphatase LAR. *Mol Endocrinol* 1996; 10(5): 575-84.
14. Malitschek B, Fornzler D, Schartl M. Melanoma formation in *Xiphophorus*: a model system for the role of receptor tyrosine kinase in tumorigenesis. *Bioessays* 1995; 17(12): 1017-23.
15. Waters SB, Pessin JE. Insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS1 and IRS2): what a tangled web we weave. *Trends Cell Biol* 1996; 6(1): 1-4.
16. D'Ambrosio C, Ferber A, Resnicoff M, Baserga R. A soluble insulin-like growth factor I receptor that induces apoptosis of tumor cells *in vivo* and inhibits tumorigenesis. *Cancer Res* 1996; 56(17): 4013-20.
17. Triana BEG, Bernabeu AS, Pinheiro JCG, Milián MB. NADPH-oxidase fagocítica: componentes, ensamblaje y mecanismo de acción. *Rev Cubana Invest Biomed* 2001; 20(1): 59-63.
18. Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signalling proteins. *Science* 1991; 252(5006): 668-74.
19. Miralpeix M, Sun XJ, Backer JM, Myers MG Jr, Araki E, White MF. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of multiple high molecular weight substrates in Fao hepatome cells. *Biochemistry* 1992; 31(37): 9031-9.
20. Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG Jr, Glasheen E, et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 1995; 377(6545): 173-7.
21. Lavan BE, Lienhard GE. The insulin-elicited 60-kDa phosphotyrosine protein in rat adipocytes is associated with phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1993; 268(8): 5921-8.

22. Anai M, Ono H, Funaki M, Fukushima Y, Inukai K, Ogihara T, et al. Different subcellular distribution and regulation of expression of insulin receptor substrate (IRS)-3 those of IRS-1 and IRS-2. *J Biol Chem* 1998; 273(45): 29686-92.
23. Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *Amer Soc Biochem Mol Biol* 1997; 272(34): 21403-7.
24. Uchida T, Myers MG Jr, White MF. IRS-4 mediates protein kinase B signaling during insulin stimulation without promoting antiapoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; 20(1): 126-38.
25. Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278(1): E127-33.
26. Lebrum P, Baron V, Hauck CR, Schlaepfer DD, Van Obberghen EV. Cell adhesion kinase regulate insulin receptor substrate-1 expression. *J Biol Chem* 2000; 275(49): 38371-7.
27. Draznin B. Insulin signaling network—waiting for Copernicus. *Endocrinology* 1996; 137(7): 2647-8.
28. Tartare-Deckert S, Murdaca J, Sawka-Verhelle D, Holt DH, Pessin JE, Van Obberghen E. Interaction of the molecular weight 85K regulatory subunit of the phosphatidylinositol 3-kinase with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Comparative study using the yeast two-hybrid system. *Endocrinology* 1996; 137(3): 1019-24.
29. Gustafson TA, He W, Craparo A, Schaub CD, O'Neill TJ. Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Mol Cell Biol* 1995; 15(5): 2500-8.
30. Holt KH, Kasson BG, Pessin JE. Insulin stimulation of a MEK-dependent but ERK-independent SOS protein kinase. *Mol Cell Biol* 1996; 16(2): 577-83.
31. Kharitonkov A, Schnekenburger J, Chen Z, Knyazev P, Ali S, Zwick E, et al. Adapter function of protein-tyrosine phosphatase 1D in insulin receptor/insulin receptor substrate-1 interaction. *J Biol Chem* 1995; 270(49): 29189-93.
32. Issad T, Boute N, Boubekeur S, Lacasa D. Interaction of PTPB with the insulin receptor precursor during its biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Biochimie* 2005; 87(1): 111-6.
33. Pasquali C, Curchod ML, Walchli S, Espanel X, Guerrier M, Arigoni F, et al. Identification of protein tyrosine phosphatases with specificity for the ligand-activated growth hormone receptor. *Mol Endocrinol* 2003; 17(11): 2228-39.
34. Ukkola O, Santaniemi M. Protein tyrosine phosphatase 1B: a new target for the treatment of obesity and associated co-morbidities. *J Intern Med* 2002; 251(6): 467-75.