Denise Aparecida Berti

**Peptídeos Intracelulares na Obesidade e
Resistência à Insulina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro

São Paulo

2010

RESUMO

BERTI, D.A. **Peptídeos intracelulares na obesidade e resistência à insulina**. 192 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A hipótese de que peptídeos gerados como produtos de proteólise intracelular poderiam modular cascatas de sinalização, foi originalmente proposto pelo nosso grupo. Um estudo realizado por Heimann *et al.* (2005) mostrou que camundongos geneticamente modificados e submetidos à dieta hiperlipídica, apresentavam uma diferença no conteúdo intracelular de peptídeos e uma melhora da resistência à insulina. Neste trabalho, investigamos o conteúdo peptídico intracelular do tecido adiposo de animais que desenvolveram obesidade e resistência à insulina, após serem submetidos à *dieta cafeteria*. Duas sequências peptídicas apresentaram 100% de aumento no tecido adiposo de animais submetidos à *dieta cafeteria*, em relação aos controles, tendo sido analisadas por ensaios de cinética enzimática, captação de glicose, Western blot e cromatografia de afinidade. Os resultados obtidos corroboram os dados de Heimann *et al.* (2005) de que peptídeos intracelulares podem estar envolvidos na resistência à insulina, modulando o transporte de glicose no tecido adiposo.

Palavras-chave: Obesidade. Resistência à Insulina. Peptídeos. Tecido Adiposo. Espectrometria de Massas.

ABSTRACT

BERTI, D.A. **Intracellular peptides in obesity and insulin resistance**. 2010. 192 p. Ph.D.Thesis (Biological Science) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The hypothesis that peptides generated as degradation products of intracellular proteolyses could modulate signaling pathways, was originally proposed by our group. A study by Heimann *et al.* (2005) showed that mice genetically modified and fed with high-fat diet, showed a difference in intracellular content of peptides and an improvement of insulin resistance. In this study, we investigated the intracellular peptide content from adipose tissue of animals that developed obesity and insulin resistance after being treated with the Western diet. Two peptide sequences showed 100% increase in adipose tissue of animals submitted to the Western diet compared to controls, and were analyzed by enzymatic assays, glucose uptake, Western blot and affinity chromatography. Altogether, these results corroborate previous suggestions that intracellular peptides may be involved in insulin resistance, modulating glucose transport in adipose tissue.

Keywords: Obesity. Insulin Resistance. Peptides. Adipose Tissue. Mass Spectrometry.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Comunicação celular

As células utilizam diversos sinais para se comunicarem e se adaptarem a um determinado ambiente. Em uma comunicação característica, as células sinalizadoras produzem uma molécula sinal que é detectada pelas células alvo através de proteínas receptoras que reconhecem e respondem especificamente à molécula sinal. Estas moléculas sinalizadoras que transitam entre as células podem ser de diversos tipos, como, proteínas, peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, esteróides, derivados de ácidos graxos e até mesmo gases dissolvidos (ALBERTS, 2008).

A maioria das proteínas receptoras de superfície celular pertence a três grandes famílias: receptores associados a canais iônicos, receptores acoplados a proteína G ou receptores associados à tirosina quinases. Estas famílias diferem na natureza do sinal intracelular que geram após a ligação da molécula sinalizadora extracelular, formando diferentes cascatas de sinalização intracelular. A identificação de receptores específicos e seus segundos mensageiros leva a identificação de uma via clássica de sinalização intracelular que ocorre de forma linear (ALBERTS, 2008). Contudo, este modelo de sinalização não está sendo suficiente para explicar a complexidade da transdução de sinal destas cascatas e o controle integrado das funções celulares (TANIGUCHI *et al.*, 2006). Um dos grandes desafios para se entender a sinalização gerada por qualquer ligante ao seu receptor é a identificação dos seus componentes ou nódulos das grandes redes de interações que se formam no meio intracelular. Outro grande desafio é entender como estas redes de interações fazem com que uma cascata de sinalização se comunique com outras preservando ao mesmo tempo a homeostasia celular (KHOLODENKO, 2006; TANIGUCHI *et al.*, 2006).

Atualmente o entendimento da cascata de sinalização celular gerada pelos receptores associados a enzimas tirosina quinase tem despertado grande interesse científico, devido ao importante papel que estes receptores desempenham na embriogênese, sobrevivência, diferenciação e proliferação celular, apoptose e metabolismo de glicose. Disfunções na sinalização destes receptores levam ao desenvolvimento de doenças severas em humanos, como câncer, síndromes

inflamatórias crônicas e diabetes (GRAY *et al.*, 2003; HUNTER, 2000; KHOLODENKO, 2006; SCHLESSINGER, 2000). Uma vez ativados, os receptores associados à tirosina quinases sofrem dimerização ou transições alostéricas que resultam na ativação de tirosinas quinases intrínsecas que induzem a fosforilação de múltiplos resíduos de tirosina, os quais transmitem o sinal bioquímico a diversos alvos citoplasmáticos (AVRUCH, 1998). A resposta celular resultante desta sinalização ocorre através de um complexo circuito bioquímico de interações proteína-proteína, responsáveis pela formação das complexas cascatas de transdução de sinal (KHOLODENKO, 2006; TANIGUCHI *et al.*, 2006).

A insulina, por exemplo, é um importante hormônio peptídico responsável pela ativação de um tipo de receptor associado à tirosina quinase, denominado receptor de insulina, que promove a transdução de sinal de diversas cascatas de sinalização importantes para a manutenção do metabolismo de glicose, diferenciação e crescimento celular (SALTIEL e KAHN, 2001; SALTIEL e PESSIN, 2002). Disfunções na atividade deste receptor levam ao desenvolvimento de doenças metabólicas e neurodegenerativas, como resistência à insulina, diabetes, obesidade e doença de Alzheimer (KRONER, 2009; SALTIEL e KAHN, 2001; SALTIEL e PESSIN, 2002). Desta forma, o entendimento das interações proteína-proteína que medeiam cascatas de sinalização intracelular, ou a transdução de sinal gerado pela interação ligante-receptor é de grande importância terapêutica, uma vez que o desenvolvimento de novos fármacos que interfiram com interações proteína-proteína poderiam auxiliar no tratamento de diversas doenças.

1.2 Interações proteína-proteína

Um dos resultados mais surpreendentes dos projetos de sequenciamento genômico foi a descoberta de que o número de genes é muito menor do que se havia imaginado. Além disso, verificou-se também que o número de genes é muito similar entre diferentes organismos estudados (GAVIN *et al.*, 2002; LANDER *et al.*, 2001; STUMPF *et al.*, 2008; VENTER *et al.*, 2001). O nematóide *Caenorhabditis elegans*, por exemplo, possui um número de genes muito similar ao de seres humanos, enquanto que alguns vegetais, como arroz e milho, possui um número de genes muito maior que indivíduos humanos (STUMPF *et al.*, 2008).

Diante destes fatos, constatou-se que a complexidade biológica de um organismo não poderia estar relacionada simplesmente ao número de genes, mas sim ao número de interações protéicas que os organismos poderiam formar (GAVIN *et al.*, 2002; STUMPF *et al.*, 2008). Neste sentido, iniciou-se uma nova fase de estudos com o objetivo de se entender o número de interações que os produtos destes genes poderiam formar em um determinado organismo, a qual foi denominada de interactoma (SANCHEZ *et al.*, 1999). Recentes avanços neste sentido mostram que apesar dos seres humanos apresentarem um genoma 50% maior do que o genoma do *C. elegans*, o número de interações que o mesmo pode formar é cerca de 300 % maior (Figura 1; STUMPF *et al.*, 2008). Desta forma, a compilação das redes de interações proteína-proteína passou a ser uma importante ferramenta na descoberta de novas funções protéicas e a continuidade do mapeamento sistemático das interações protéicas em humanos, e em outros organismos, é indispensável para o entendimento da complexidade dos processos celulares.

Figura 1 – Número de interações protéicas em diferentes organismos. O gráfico representa o número de proteínas presente nos diferentes organismos descritos (*S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *C. elegans* e *H. sapiens*) em relação ao número estimado de interações que estas proteínas podem formar conforme estimativas descritas pelos estudos do interactoma. Adaptado de Stumpf *et al.*, 2008.

1.3 Módulos de interações protéicas

As proteínas raramente agem sozinhas. Na maior parte das vezes, elas interagem com outras proteínas, DNA, RNA ou ainda moléculas de outra natureza para orquestrar uma tarefa celular determinada. Estes complexos protéicos representam mais do que a soma das partes, adquirindo muitas vezes uma nova função. Para que a interação entre as proteínas aconteça, os domínios de interação são fundamentais (GAVIN *et al.*, 2002).

A sinalização entre proteínas apresenta tipicamente uma organização em forma de módulos, compostos por domínios com funções catalíticas, intercalados com regiões que servem como sítios de ancoramento, ou por domínios que se apresentam como substratos para outras moléculas. Atualmente, aproximadamente 100 módulos de interações protéicas têm sido identificados como reconhecedores de uma enorme gama de sinais químicos, tais como ubiquitinas, fosforilação e acetilação (SCOTT e PAWSON, 2009).

O domínio de homologia 2 de Src (SH2), por exemplo, é constituído de aproximadamente 100 aminoácidos que se ligam a sítios específicos de tirosinas fosforiladas, sendo que o genoma humano codifica aproximadamente 120 domínios deste tipo, que estão incorporados em uma variedade de proteínas (PAWSON e NASH, 2003; SCOTT e PAWSON, 2009).

Outros domínios podem ligar motivos de forma mais ampla e estarem envolvidos com um maior número de atividades biológicas. Esses últimos incluem os domínios de homologia 3 de Src (SH3) que regulam processos como a transdução de sinal, tráfego de vesículas e proteínas, organização do citoesqueleto, polaridade celular, assim como geração de organelas e vesículas (MAYER, 2001; SCOTT e PAWSON, 2009). Estes domínios de interação podem endereçar proteínas a locais específicos dentro das células (micro-ambientes), proporcionando um mecanismo ideal de reconhecimento de modificações pós-traducionais, e proporcionando a formação de complexos multi-protéicos relacionados à transdução do sinal, bem como de controle da atividade e especificidade enzimática (PAWSON e NASH, 2003; PAWSON e SCOTT, 1997; SCOTT e PAWSON, 2009).

No processo de transdução de sinal, enzimas constantemente geram aminoácidos modificados em seus substratos que são então reconhecidos por

módulos protéicos específicos. Assim, sítios fosforilados em tirosinas pela ação de tirosina quinases, ligam efetores que reconhecem domínios contendo tirosinas fosforiladas, como o domínio de ligação à fosfotirosina (PTB) ou SH2 (YAFFE, 2002; YAFFE SMERDON, 2001). Já os fosfatidilinosítídeos produzidos por quinases de fosfoinosítídeos recrutam domínios do tipo homólogo a pleckstrina (PH), homólogo a Phox (PX) e FYVE, entre outros (CULLEN, 2001).

As células, portanto, utilizam-se de várias combinações entre um grupo limitado de domínios para direcionar as complexas reações necessárias ao funcionamento de seus sistemas regulatórios de sinalização intracelular.

1.4 Uso de peptídeos na regulação de interações proteína-proteína

Estudos demonstram que sequências peptídicas curtas racionalmente criadas são capazes de alterar a interação proteína-proteína, com efeitos significativos em modelos animais. Peptídeos como o Ht31, derivado da proteína associada à quinase de tireóide humana dependente de AMPc (AKAP) têm sido usados para alterar a localização da PKA nas células (ROSENMUND *et al.*, 1994). Da mesma forma, foi demonstrado que a quinase c-Jun N-terminal (JNK), membro do grupo das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), é inibida por um peptídeo derivado da proteína ligadora de JNK (JIP) que impede o acesso da quinase ao seu substrato, o c-Jun N-terminal. Quando uma versão permeável à célula deste peptídeo foi injetada em camundongos, observou-se uma melhora significativa da resistência à insulina e por conseguinte da tolerância à glicose em um modelo de diabetes do tipo 2 (KANETO *et al.*, 2004; STEBBINS *et al.*, 2008). Além disso, Kheifets *et al.* (2006) mostraram que um peptídeo de 8 resíduos de aminoácidos derivado da anexina V era capaz de inibir a translocação da δ PKC após ativação e consequentemente sua ação, como confirmado por seu efeito protetor em um modelo animal de infarto cardíaco (KHEIFETS *et al.*, 2006).

Diante destes e de outros dados, fica claro que peptídeos que mimetizam os sítios de interação entre proteínas são capazes de interferir acentuadamente na sinalização celular (BURNS-HAMURO *et al.*, 2003).

1.5 Peptídeos carreadores TAT

As membranas biológicas formam uma barreira que previne o fluxo de moléculas para dentro e para fora das células (LIPINSKI *et al.*, 2001). Por muitos anos, uma sequência peptídica curta, denominada de domínio de transdução de proteína (PTD) e também conhecida como peptídeos carreadores (do inglês, *cell-penetrating peptides*) tem sido uma importante ferramenta utilizada para internalizar proteínas impermeáveis à membrana plasmática. Este processo de permeabilização de proteínas pela membrana plasmática, através de peptídeos carreadores foi denominado de transdução de proteínas, e desde então, numerosos peptídeos carreadores foram descobertos. O peptídeo carreador presente na proteína transativadora (TAT) do vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi descoberto em 1988 (FRANKEL e PABO, 1988; GREEN e LOEWENSTEIN, 1988) e até o momento, tem sido o mais utilizado e caracterizado (BEGLEY *et al.*, 2004; CUNHA *et al.*, 2008; LINDSAY, 2002; SOUGHAYER *et al.*, 2004; WADIA e DOWDY, 2002). A presença de muitos aminoácidos básicos na sua sequência (RKKRRQRRR) pode ser considerada uma explicação para a sua habilidade em cruzar a membrana plasmática, embora o mecanismo exato pelo qual o peptídeo TAT é internalizado pela célula ainda seja desconhecido (EMBURY *et al.*, 2001; SOUGHAYER *et al.*, 2004). Estudos têm sugerido que o proteoglicano heparan-sulfato apresenta uma importante participação no processo de internalização desses peptídeos (NASCIMENTO *et al.*, 2007; TYAGI *et al.*, 2001; ZIEGLER *et al.*, 2005).

A utilização do peptídeo carreador TAT ligado covalentemente a peptídeos racionalmente desenhados, foi utilizado por muitos estudos de cascatas de sinalização celular, *in vitro*, *ex-vivo* e *in-vivo*, proporcionando um grande avanço nessa área (BEGLEY *et al.*, 2004). Porém, devido à interferência do peptídeo TAT na localização intracelular de alguns destes peptídeos de interesse, novos estudos começaram a utilizar ligações reversíveis, como pontes dissulfeto, para o acoplamento da sequência carreadora TAT aos peptídeos de interesse (SOUGHAYER *et al.*, 2004). Como o meio intracelular é altamente redutor, as pontes dissulfeto são desfeitas no momento em que esses peptídeos entram em contato com o citoplasma, deixando o peptídeo de interesse livre para interagir com o seu alvo intracelular (BEGLEY *et al.*, 2004; SOUGHAYER *et al.*, 2004). De fato, estudos mostram que peptídeos moduladores de PKC, acoplados covalentemente a

sequência carreadora TAT, apresentam menor atividade intracelular, quando comparados ao mesmo peptídeo acoplado a sequência carreadora TAT por pontes dissulfeto (BEGLEY *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2001).

1.6 Peptídeos e a sinalização intracelular

Peptídeos são produzidos pelas células a partir de proteínas sintetizadas especificamente para esta finalidade (pró-proteínas), ou como sub-produtos do metabolismo protéico. No primeiro caso, os produtos formados são conhecidos agentes moduladores da comunicação celular (neuropeptídeos) que agem através da ligação a receptores localizados na membrana plasmática. No segundo caso, peptídeos intermediários são gerados em compartimentos outros que não aqueles especializados em degradação protéica pela digestão limitada de proteínas. Enquanto os neuropeptídeos já foram extensivamente estudados e caracterizados, pouco se sabe a respeito da função biológica dos intermediários peptídicos gerados no meio intracelular.

Peptídeos que atuam sobre receptores na membrana plasmática são gerados em compartimentos citoplasmáticos especializados (via secretória), após proteólise limitada de proteínas específicas geralmente denominadas pró-hormônios (SEIDAH e CHRETIEN, 1999; SEIDAH e PRAT, 2002). Em contraste, no citosol e núcleo, peptídeos são formados continuamente no processo de degradação natural de proteínas (GOLDBERG, 2003). Em células eucarióticas, a maioria das proteínas destinadas a degradação são inicialmente marcadas por uma cadeia polipeptídica de ubiquitina em um processo dependente de energia, e posteriormente digeridas a pequenos peptídeos pela ação do proteasoma 26S, um grande complexo proteolítico envolvido na regulação da divisão celular, expressão gênica, e apresentação antigênica, dentre outros (LECKER e GOLDBERG, 2002; ORLOWSKI, 1990). Este complexo multi-catalítico 26S é formado pela associação das subunidades 19S e 20S, que constituem a forma ativa do proteasoma *in vivo*, responsável por grande parte do processo regular de degradação intracelular de proteínas ou *turnover protéico* (Figura 2; GLICKMAN e CIECHANOVER, 2002; GOLDBERG, 2003).

Peptídeos gerados pelo proteasoma no citosol e núcleo (WOJCIK e DEMARTINO, 2003) são rapidamente hidrolisados a aminoácidos que são então

utilizados na síntese de novas proteínas e no metabolismo intermediário (GOLDBERG, 2003; ORLOWSKI, 1993). No entanto, em células de mamíferos, peptídeos intracelulares gerados pelo proteasoma podem escapar da degradação completa sendo apresentados pelo sistema imune em complexo com moléculas de histocompatibilidade de classe I (MHC-I; GOLDBERG *et al.*, 2002; ROCK *et al.*, 2002). É notável que em mamíferos essa rota de escape permita que aproximadamente 10.000 peptídeos estejam presentes em associação com MHC-I na superfície de cada uma de nossas células (RAMMENSEE, 2002). Além do proteasoma 26S, a tripetidil peptidase II, uma aminopeptidase da família das subtilisinas com atividade endoproteolítica, tem sido implicada na geração intracelular de peptídeos apresentados por MHC-I (GEIER *et al.*, 1999; SEIFERT *et al.*, 2003).

Enquanto a apresentação de antígenos por MHC-I é considerada um processo especializado, a degradação de proteínas mediada pelo proteasoma com concomitante formação de peptídeos ocorre em procariontes e eucariontes (GOLDBERG, 2003). Em eucariontes, por exemplo, de 30 a 90% das proteínas recém sintetizadas podem ser degradadas pelo proteasoma em minutos (LECKER e GOLDBERG, 2002; LIPPINCOTT-SCHWARTZ *et al.*, 1988). Portanto, a ação concomitante do proteasoma e de outros sistemas proteolíticos extra-lisossomais (KESSLER *et al.*, 2002; NIEDERMANN *et al.*, 1999), em diferentes ambientes celulares como citosol e núcleo, sugere constante formação e liberação de peptídeos livres dentro das células eucariontes (GOLDBERG, 2003; FERRO *et al.*, 2004; PICKART, 2004).

Figura 2 - Representação esquemática do proteasoma 26S. O proteasoma 26S consiste de uma porção regulatória 19S e um complexo catalítico 20S. Adaptado de Schwechheimer e Deng, 2001.

Tem sido demonstrado em estudos recentes do nosso grupo que peptídeos intracelulares são capazes de modular a sinalização de receptores acoplados a proteína G, em células CHO e HEK 293, por ensaios de transcrição do gene repórter para a enzima luciferase (CUNHA *et al.*, 2008). Estes peptídeos foram isolados do homogenato de cérebro de ratos pela técnica desenvolvida por Rioli *et al.* (2003), que utiliza a olipeptidase EP24.15 inativada por uma mutação pontual no seu sítio catalítico. Além disso, este trabalho também mostrou que a superexpressão da oligopeptidase EP24.15, envolvida no metabolismo de peptídeos intracelulares (BERTI *et al.*, 2009), foi capaz de modular a sinalização de receptores acoplados a proteína G (receptores At1 e β -adrenérgicos) em células CHO e HEK293 (CUNHA *et al.*, 2008).

Dessa maneira, de forma conjunta, os estudos descritos acima indicam que peptídeos gerados pelo proteasoma podem servir como moduladores naturais da sinalização celular, do endereçamento de proteínas, entre outros, competindo com sítios específicos de modificações pós-traducionais (sítios de fosforilação) na proteína adaptadora correspondente, bem como modulando interações específicas e reações enzimáticas (FERRO *et al.*, 2004).

Neste cenário, oligopeptidases intracelulares teriam um papel importante regulando a disponibilidade (vida média) desses substratos peptídicos com potencial para alterar cascatas de fosforilação e conseqüentemente a função celular, uma vez que as mesmas são as candidatas naturais a degradar ou gerar peptídeos no meio intracelular (BERTI *et al.*, 2009; PORTARO *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 1999).

1.7 Oligopeptidases EP24.15 e EP24.16 e o metabolismo intracelular de peptídeos

A oligopeptidase EC3.4.24.15 (EP24.15; também conhecida como thimet-oligopeptidase) e a oligopeptidase EC3.4.24.16 (EP24.16; também conhecida como neurolisina) foram inicialmente detectadas e purificadas do homogenato de cérebro de ratos (CHECLER *et al.*, 1983; ORLOWSKI, 1993). Através de estudos sobre a degradação de peptídeos biologicamente ativos, Orłowski *et al.* (1993), descreveram uma oligopeptidase de citoplasma de cérebro de ratos como sendo uma metalopeptidase semelhante à anteriormente descrita oligopeptidase A (CAMARGO e GRAEFF, 1969; CARVALHO e CAMARGO, 1981).

Durante estudos visando elucidar o mecanismo de degradação da neurotensina nas membranas sinápticas isoladas de cérebros de ratos, Checler *et al.* (1983) purificaram e caracterizaram a neurolisina. Em 1995, Dauch *et al.* (1995), isolaram e sequenciaram o cDNA que codifica a neurolisina de cérebro de ratos, sendo que esta proteína mostrou 80% de similaridade e 63% de identidade com a EP24.15, previamente clonada de testículos de ratos, considerada idêntica à metalopeptidase identificada no cérebro de animais desta mesma espécie (PIEROTTI *et al.*, 1990).

As enzimas EP24.15 e EP24.16 apresentam um motivo característico de metaloproteases, HEXXH, envolvido na coordenação do átomo de zinco. Cummins *et al.* (1999) demonstraram, através de mutações sítio-dirigidas, os resíduos responsáveis pela coordenação do zinco no sítio ativo ($H^{473}ExxH^{477}$) da EP24.15, mostrando ainda que um ácido glutâmico na posição 502 (E^{502}) localizado a 25 resíduos depois deste motivo HExxH, seria o terceiro ligante deste íon.

Os primeiros estudos realizados com o intuito de esclarecer as funções biológicas da EP24.15 e da EP24.16 demonstraram que estas enzimas metabolizam

peptídeos como a bradicinina, a angiotensina e a neurotensina (CHECLER *et al.*, 1995; CHU e ORLOWSKI, 1985; ORLOWSKI *et al.*, 1983). Mais recentemente, (SHRIMPTON *et al.*, 2000), utilizando o inibidor N-[1-(R,S)-carboxi-3-fenilpropil]-Ala-Aib-Tir-p-aminobenzoato (JA2 ; um inibidor potente e estável da EP24.15), verificaram a potenciação da hipotensão induzida pela bradicinina em ratos, confirmando a participação da oligopeptidase EP24.15 no metabolismo da bradicinina. Por isso, acreditou-se por muito tempo que a EP24.15 e a EP24.16 estavam envolvidas unicamente no metabolismo de neuropeptídeos extracelulares (RIOLI *et al.*, 1998).

Entretanto, foi observado que a EP24.15 e EP24.16 encontram-se localizadas predominantemente no interior das células (FONTENELE-NETO *et al.*, 2001) e mais ainda, que são desprovidas de peptídeo sinal para entrada na via secretória (FERRO *et al.*, 1999; RUSSO *et al.*, 2009), sugerindo que, senão a principal, pelo menos uma das funções destas peptidases está relacionada a processos intracelulares (BERTI *et al.*, 2009; FERRO *et al.*, 2004).

Portaro *et al.* (1999) e Silva *et al.* (1999) demonstraram claramente que a EP24.15 tem um importante papel na rota de apresentação de peptídeos antigênicos, e que poderia estar protegendo estes peptídeos no citoplasma, ao invés de degradá-los, como seria esperado por se tratar de uma peptidase. Por outro lado, Saric *et al.*, (1999) sugerem que a função da EP24.15 seria a de degradar e não proteger os peptídeos gerados pelo proteasoma e apresentados pelas MHC I, levando a conclusões paradoxais considerando os dados obtidos anteriormente por Silva *et al.* (1999) e Portaro *et al.* (1999). Contudo, nos experimentos conduzidos por Saric *et al.* (2001), tanto a concentração da enzima recombinante utilizada, como o tempo de incubação, excederam em muito as condições utilizadas por Portaro *et al.* (1999), explicando, pelo menos em parte, as discrepâncias entre os resultados (Figura 3).

Figura 3 – Representação esquemática da participação da EP24.15 na apresentação de antígenos de MHC-I. (1) A degradação de proteínas mediada pelo proteasoma com concomitante formação de peptídeos ocorre em procariontes e eucariontes (Goldberg 2003). (2, 3, 5 e 6) A EP24.15 pode converter alguns produtos do proteasoma em peptídeos antigênicos ao mesmo tempo que pode proteger alguns destes peptídeos, considerados inibidores competitivos com grande afinidade por esta peptidase, contra a degradação para serem apresentados na superfície da célula pelo complexo MHC-I (PORTARO *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 1999). (4) Por outro lado, existem outros trabalhos da literatura sugerindo que a função da EP24.15 seria a de degradar completamente os peptídeos gerados pelo proteasoma (Saric *et al.* 2001). Adaptado de Glucksman *et al.*, 2003.

Desta forma, para identificar novos peptídeos intracelulares e explorar o papel geral das oligopeptidases no metabolismo de peptídeos pós-proteasoma, Rioli *et al.* (2003) desenvolveram um experimento que utiliza formas inativas das oligopeptidases EP24.15 e EP24.16 para capturar peptídeos endógenos naturais, que possuem sequências de aminoácidos correspondentes às proteínas intracelulares. O uso da forma inativa da EP24.15 permitiu o isolamento e identificação de vários peptídeos naturais anteriormente desconhecidos, sendo que a maioria fazia parte das sequências de proteínas intracelulares, e 77% destes apresentavam sítios de modificação pós-traducional. (Figura 4; MACHADO *et al.*, 2006). Machado *et al.* (2006) demonstraram também que modificações pós-traducionais em peptídeos, como fosforilações, poderiam ser um mecanismo de

proteção contra degradação por enzimas citosólicas, o que regularia a participação de peptídeos intracelulares nos processos de interação entre proteínas.

Figura 4 - Distribuição dos peptídeos identificados por Rioli *et al.* (2003) conforme modificações pós-traducionais determinadas por análises bioinformáticas. A análise de todos os peptídeos identificados pela técnica de Rioli *et al.* (2003) mostra que 77% destes possuem sítios de modificações pós traducionais. Estes achados nos proporcionaram fortes indícios de que os peptídeos intracelulares, substratos das oligopeptidases, realmente poderiam regular cascatas de sinalização intracelular. Adaptado de Machado *et al.*, 2006.

Um recente estudo do nosso grupo (BERTI *et al.*, 2009) demonstrou a existência de um novo grupo de 116 peptídeos no meio intracelular de células HEK293, os quais foram caracterizados como substratos, produtos ou peptídeos não degradados pela EP24.15. De fato, estes resultados demonstram de forma contundente que alguns fragmentos de proteínas intracelulares estão normalmente presentes nas células, podendo ser detectados e quantificados (BERTI *et al.*, 2009). Além disso, este estudo também contradiz os trabalhos da literatura que afirmam que após a degradação pelo proteasoma, todos os peptídeos são rapidamente hidrolisados a aminoácidos por peptidases citosólicas (AKOPIAN *et al.*, 1997; REITS *et al.*, 2003; SARIC *et al.*, 2004; YORK *et al.*, 2003). Corroborando nossos resultados sobre a existência de peptídeos intracelulares, (BEREZNIUK *et al.*, 2010) demonstraram a presença de um novo grupo de 168 desses peptídeos no cérebro de camundongos.

1.8 Peptídeos relacionados ao desenvolvimento de obesidade e resistência a insulina

Apesar de estarmos sujeitos a variações diárias no consumo de comida e atividade física, o nosso organismo é capaz de regular precisamente o apetite e o gasto de energia, no intuito de se manter o peso corpóreo constante por um longo período. Este controle é mantido pelo hipotálamo através de peptídeos circulantes no plasma, como a leptina e a insulina, que sinalizam o estado nutricional de jejum ou pós-prandial, assim como as reservas de energia armazenadas no tecido adiposo (WOODS e D'ALESSIO, 2008).

Um grande número de peptídeos denominados orexígenos (relacionados ao aumento do consumo de comida) e anorexígenos (relacionados à diminuição do consumo de comida) têm sido implicados na regulação do apetite e balanço energético coordenado pelo hipotálamo (ARORA e ANUBHUTI, 2006; FRICKER, 2007). A tabela 1 representa uma lista de alguns destes peptídeos.

Deficiências na síntese e na sinalização destes peptídeos levam a desordens metabólicas, como obesidade, resistência a insulina e síndrome metabólica. De fato, estes fenótipos podem ser observados em camundongos *ob/ob* e *db/db*, que apresentam deficiência na produção do peptídeo leptina e de seu receptor, respectivamente, devido a mutação dos genes que os codificam (ANUBHUTI e ARORA, 2008). Estudos com camundongos obesos *Cpe^{fat/fat}*, também apontam que as causas da obesidade desenvolvidas nestes animais, podem estar relacionadas com a falha no processamento de alguns peptídeos, devido à falta da enzima processadora carboxipeptidase E (FRICKER, 2007).

Tabela 1- Peptídeos orexígenos e anorexígenos relacionados ao controle do apetite e com o balanço energético

Orexígenos (aumento do consumo alimentar)	Anorexígenos (diminuição do consumo alimentar)
neuropeptídeo Y (NPY)	hormônio estimulador de alfa melanócito (α -MSH)
peptídeo homólogo a proteína agouti (AgRP)	leptina
galanina	insulina
hormônio concentrador de melanina (MCH)	fator liberador de corticotrofina (CRF)
encefalinas	transcrito regulador de cocaína e anfetamina (CART)
dinorfinas	urocortinas
endorfinas	hormônio liberador de tireotrofina (TRH)
nociceptina/orfanina FQ	neurotensina
orexinas / hipocretinas	glucagon-like peptide-1 (GLP-1)
grelina	colecistocinina (CCK)
	amilina

No entanto, além dos peptídeos orexígenos e anorexígenos já conhecidos, outros estudos mostram que o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina em camundongos transgênicos para o gene da enzima conversora de angiotensina II (ECA), poderia estar relacionado com a presença de peptídeos intracelulares (HEIMANN *et al.*, 2005). Nestes estudos, Heimann *et al.* (2005) demonstraram, que camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e contendo três cópias do gene da ECA, apresentavam um perfil de peptídeos intracelulares de menor peso molecular em relação aos camundongos contendo uma cópia do gene da ECA (Figura 5). Foi observado também que estes animais contendo 3 cópias do gene da ECA apresentavam uma melhor sensibilidade a insulina e uma diminuição

da atividade enzimática das oligopeptidases EP24.15 e EP24.16, em relação aos camundongos com uma cópia do gene da ECA (HEIMANN *et al.*, 2005).

Figura 5 – Peptídeos intracelulares identificados por LC/MS/MS em camundongos geneticamente modificados para o gene da ECA. Peptídeos foram extraídos do tecido adiposo de camundongos com uma ou três cópias do gene da ECA e foram incubados com a forma inativa da EP24.15 conforme a metodologia de Rioli *et al.* (2003) e analisados por LC/MS/MS. (A) Número de peptídeos identificados no tecido adiposo de camundongos contendo uma ou três cópias do gene da ECA. (B) Distribuição de massas dos peptídeos identificados em camundongos contendo uma ou três cópias do gene da ECA. Adaptado de Heimann *et al.*, 2005.

Estes e outros fatos levaram nosso grupo a formular a hipótese de que peptídeos intracelulares gerados pelo proteassomo 26S durante o turnover protéico, poderiam regular interações entre proteínas dentro das células, modulando cascatas de sinalização, como a da insulina, em modelos de animais obesos e resistentes à insulina (FERRO *et al.*, 2004, HEIMANN *et al.*, 2005).

Nesse sentido, animais com resistência à insulina causada por *dieta cafeteria*, (PRADA *et al.*, 2005), parecem compreender um modelo apropriado para o estudo do papel dos peptídeos intracelulares e das oligopeptidases EP24.15 e EP24.15 nessas enfermidades.

1.9 Sinalização celular da insulina

A insulina é um potente hormônio peptídico, essencial para a manutenção do metabolismo de glicose e para o desenvolvimento e crescimento celular. Este hormônio é secretado pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições (PESSIN e SALTIEL, 2000). A insulina regula o metabolismo de glicose reduzindo a produção de glicose hepática (através da inibição da glicogenólise e gliconeogênese) e aumentando a captação de glicose, primeiramente no músculo estriado e tecido adiposo (SALTIEL e KAHN, 2001). A absorção de glicose no músculo estriado e no tecido adiposo é realizada através da proteína transportadora de glicose 4 (GLUT 4) (WATSON e PESSIN, 2001). O GLUT4 pertence a uma família de facilitadores de transporte compreendendo 12 diferentes tipos, sendo que o GLUT4 é o único transportador desta família predominantemente localizado em compartimentos intracelulares (KANZAKI, 2006). A ligação da insulina ao seu receptor induz a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática, envolvendo um aumento da exocitose de vesículas contendo este transportador e consequentemente um aumento na absorção de glicose nos tecidos alvos. Quando o estímulo da insulina é finalizado, o GLUT4 é rapidamente internalizado por endocitose dependente de clatrina, e redirecionado a compartimentos intracelulares de armazenamento (KANZAKI, 2006; WATSON e PESSIN, 2001). A via de sinalização precisa responsável por este transporte ainda é desconhecida, contudo já se sabe que a ativação da via de sinalização PI3K/AKT é essencial para o metabolismo da glicose regulado pela insulina (BOURA-HALFON e ZICK, 2009; CANTLEY, 2002).

A insulina é sintetizada pelas células β das ilhotas pancreáticas como um pré-pró-hormônio (TAGER *et al.*, 1979). Sua ação nas células é iniciada com a ligação específica ao seu receptor, uma grande lipoproteína de membrana formada por duas subunidades α e duas subunidades β , que formam um heterotetrâmero (JACOBS e CUATRECASAS, 1981).

A subunidade β do receptor de insulina possui atividade tirosina quinase (KASUGA *et al.*, 1982; ROTH e CASSELL, 1983). O evento inicial após a ligação da insulina é a fosforilação de uma das subunidades β por um domínio proteína tirosina

quinase específico, presente na outra subunidade β do mesmo heterotetramero, uma reação que tem sido denominada de auto-fosforilação (FRATTALI *et al.*, 1992), o que acelera a atividade tirosina quinase e a concomitante fosforilação de outros resíduos de tirosina dentro do mesmo receptor, bem como de outros substratos, por exemplo, os substratos do receptor de insulina (IRS1-6), proteína Shc, Cbl, p60dok, APS, e Gab-1 (BOURA-HALFON e ZICK, 2009; ROSEN, 1987; SALTIEL e KAHN, 2001; TANIGUCHI *et al.*, 2006). Os resíduos de tirosina fosforilados nestes substratos servem como sítios de ancoramento para outras proteínas contendo domínios de interação SH2, como a subunidade regulatória da enzima fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K), Nck, Fyn, Grb2 e SHP2 os quais regulam as diversas ações da insulina (BOURA-HALFON e ZICK, 2009; SALTIEL e KAHN, 2001).

O receptor de insulina também pode ser regulado negativamente por uma classe de proteínas chamadas de tirosinas fosfatases, sendo que as mais estudadas são as proteínas tirosina fosfatases 1B (PTP1B), que interagem diretamente com o receptor de insulina e retira os fosfatos de importantes sítios de fosforilação, reduzindo a atividade do mesmo (YOUNGREN, 2007). Outras proteínas também estão envolvidas com a inibição do receptor de insulina como as proteínas supressoras da sinalização de citocina-1(SOCS-1) e SOCS-3 (EMANUELLI *et al.*, 2001; TANIGUCHI *et al.*, 2006; UEKI *et al.*, 2004).

1.9.1 Vias relacionadas ao transporte de glicose

1.9.1.1 A via de sinalização celular PI3K /AKT

A via de sinalização celular PI3K/AKT (Figura 6) é uma das mais aceitas e caracterizadas em relação ao metabolismo de glicose (CANTLEY, 2002; PESSIN e SALTIEL, 2000; TANIGUCHI *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 1999), embora existam estudos mostrando falta de linearidade entre a ativação da via PI3K/AKT e o transporte de glicose (HOEHN *et al.*, 2008).

A ativação da via PI3K/AKT se inicia com a fosforilação dos substratos do receptor de insulina IRS1 e IRS2 pelo receptor de insulina. Estes sítios fosforilados

em tirosinas específicas servem como locais de ancoramento para a subunidade regulatória p85 da enzima PI3K, através do seu domínio de ligação SH2 (SALTIEL e PESSIN, 2002). Esta enzima possui também uma subunidade catalítica p110 que catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos (PI) na posição 3 do anel de inositol, produzindo o segundo mensageiro fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PI(3,4,5)P3), o qual recruta a proteína quinase-1 dependente de fosfoinosítídeos (PDK1) para as proximidades da membrana plasmática. A PDK1 é responsável pela fosforilação da treonina 308 da proteína quinase B (PKB; também conhecida como AKT) e ativação de isoformas atípicas de PKC (PKC ξ / λ) (BAYASCAS, 2008; CHOU *et al.*, 1998; LE GOOD *et al.*, 1998; NEWTON, 2003). Entretanto, PKB/AKT ainda necessitam de uma segunda fosforilação no resíduo de serina 473 para sua completa ativação, o que é realizado pelo complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC2; SARBASSOV *et al.*, 2005; TANIGUCHI *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2009). Desta forma, a ativação desta via leva ao transporte de glicose e síntese de glicogênio (TANIGUCHI *et al.*, 2006).

A via PI3K/AKT pode ser regulada negativamente por fosfatases como a homóloga da fosfatase e tensina deletada no cromossomo 10 (PTEN) que inibe o segundo mensageiro (PI(3,4,5)P3 através da retirada do fosfato na posição 3 do anel de inositol (MAEHAMA e DIXON, 1999; WIJESEKARA *et al.*, 2005). A ativação de c-Jun N-terminal quinase (JNK) por citocinas inflamatórias também promove a regulação negativa desta via através da fosforilação na serina 307 do IRS-1. (AGUIRRE *et al.*, 2002; HIROSUMI *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2003).

1.9.1.2 A via de sinalização celular CAP/Cbl

Outra via relacionada com o transporte de glicose induzido por insulina, envolve a fosforilação em resíduos de tirosina do proto-oncogene Cbl (Figura 6; BAUMANN *et al.*, 2000; SALTIEL e KAHN, 2001). Cbl está associado com a proteína adaptadora CAP (proteínas associadas à Cbl) através do seu domínio SH3 na região carboxi-terminal. A fosforilação do complexo Cbl-CAP pelo receptor de insulina ocorre em microdomínios da membrana plasmática (*lipid rafts*), devido à interação de CAP com a proteína flotilina, presente nestes domínios (KANZAKI, 2006). A proteína Cbl fosforilada recruta o complexo de proteínas sinalizadoras formado por

CrkII e C3G para os domínio de *lipid rafts* da membrana. Uma vez translocada, a C3G catalisa a troca de GDP por GTP da proteína G TC10. A ativação de TC10 estimulada por insulina, via o complexo CAP-Cbl-CrkII-C3G forma uma segunda via envolvida com o transporte de glicose em paralelo com a via PI3K/AKT. (BAUMANN *et al.*, 2000; KANZAKI, 2006; SALTIEL e KAHN, 2001).

Figura 6 - Sinalização da insulina no transporte de glicose. A ligação da insulina às subunidades α do receptor de insulina promove uma mudança conformacional que leva a autofosforilação das subunidades β . Uma vez ativado, o receptor induz a fosforilação em tirosinas nos substratos do receptor de insulina, como IRS e Cbl, os quais interagem com outras moléculas sinalizadoras através de seus domínios SH2. Estas cascatas de interações entre proteínas regulam uma série de vias de sinalização como as vias PI3K/AKT e CAP/Cbl/TC10 que regulam o transporte de glicose, além de promoverem também a síntese de proteínas e o metabolismo de glicogênio e lipídeos. Adaptado de Kanzaki *et al.*, 2006.

1.9.2 Na regulação do metabolismo de glicose e lipídeos

Em condições anabólicas, a insulina promove o armazenamento de glicose na forma de glicogênio no músculo, fígado e adipócitos, através do aumento do transporte de glicose e da ativação da via de síntese de glicogênio (glicogênese) (CROSS *et al.*, 1995; SALTIEL e KAHN, 2001). Esta via é regulada pela enzima glicogênio sintetase que permanece no estado inativo quando fosforilada por quinases como, PKA, PKC, e GSK-3. A insulina torna esta via ativa, inibindo a atividade destas quinases, e ativando serina/treonina fosfatases, particularmente a proteína fosfatase 1 (PP1; BRADY *et al.*, 1997). Desta forma, a enzima glicogênio sintetase se mantém na sua forma ativa (defosforilada), que resulta na produção de glicogênio (NEWGARD *et al.*, 2000; SALTIEL e KAHN, 2001).

Ainda em condições anabólicas, a insulina inibe a produção de glicose pelo fígado através do bloqueio das vias da gliconeogênese e da glicogenólise. A insulina controla diretamente a atividade das enzimas envolvidas neste processo através de fosforilação e defosforilação, além de regular a expressão de genes que codificam as enzimas hepáticas da gliconeogênese e glicogenólise. Estas ações da insulina levam a inibição da transcrição do gene que codifica a enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), a qual realiza uma das reações limitantes da neoglicogênese (PILKIS e GRANNER, 1992; SALTIEL e KAHN, 2001; SUTHERLAND *et al.*, 1996). A insulina também diminui a transcrição do gene que codifica a frutose-1,6-bifosfatase e a glicose 6 fosfatase, além de aumentar a transcrição de genes das enzimas glicolíticas como a glicoquinase e a piruvato quinase. As vias de regulação e de transcrição destes genes permanecem desconhecidas, mas envolvem AKT e fatores de transcrição da família *forkhead* e o coativador do PPAR γ , PGC-1 (SALTIEL e KAHN, 2001; YOON *et al.*, 2001). A liberação de ácidos graxos pelo tecido adiposo visceral também estimula a produção de glicose pelo fígado, sendo considerado um sinal de modulação da sensibilidade à insulina neste órgão (BERGMAN, 1997; SALTIEL e KAHN, 2001).

Assim como no caso do metabolismo de glicose, a insulina também promove a síntese e degradação de lipídeos. Estudos mostram que muitas destas mudanças são reguladas por uma família de fatores de transcrição designada SREBP (proteína

ligadora do elemento regulado por esteróis). Estas proteínas regulam a expressão de mais de 30 genes envolvidos com o metabolismo do colesterol, ácido graxo, triglicérides e fosfolípidos (BROWN e GOLDSTEIN, 1997; MCPHERSON e GAUTHIER, 2004). A família do SREBP é composta de dois membros: o SREBP-1 e o SREBP-2. Contudo, existem duas isoformas do SREBP-1 (SREBP-1a e SREBP-1c), derivadas a partir de *splicing* alternativo do primeiro éxon do transcrito primário. Os SREBPs 1a e 1c são controlados independentemente por regiões regulatórias que parecem responder diferentemente a fatores orgânicos e metabólicos específicos (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007). No fígado, SREBP- 1c aumenta preferencialmente a transcrição de genes envolvidos na síntese de ácido graxo, entre eles a acetil CoA carboxilase, que converte a acetil CoA em malonil CoA e a ácido graxo sintetase, que converte a malonil CoA em palmitato. No período de jejum, em que a secreção de insulina está reduzida, ocorre uma redução da proteína SREBP-1c no fígado, sendo que após a alimentação esta proteína apresenta seus níveis aumentados (HORTON *et al.*, 1998; MCPHERSON e GAUTHIER, 2004). A sinalização responsável pelas mudanças na expressão de SREBP-1c em resposta ao estímulo de insulina ou a outras mudanças metabólicas são pouco conhecidas, mas já se sabe que a via PI3K está envolvida na regulação da expressão de SREBP através da ativação de atípicas proteínas quinase C (PKC λ ; MCPHERSON e GAUTHIER, 2004).

Em adipócitos, a glicose é estocada primeiramente na forma de triglicerídeos em resposta ao aumento da captação de glicose e ativação de enzimas envolvidas com a síntese de lipídeos, como a piruvato desidrogenase, ácido graxo sintetase, e acetil CoA carboxiquinase. A insulina atua neste processo através da inibição da enzima lipase hormônio sensível (HSL), a qual é ativada por fosforilação dependente de PKA (SALTIEL e KAHN, 2001).

1.9.3 Regulação do crescimento, diferenciação celular e síntese de proteínas

Semelhante a outros fatores de crescimento, a insulina também é responsável pelo crescimento e diferenciação celular, através do estímulo da ativação da MAPK. Essa via inicia-se com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a proteína ligadora de receptor do fator de crescimento 2 (Grb2), que está

constitutivamente associada à proteína trocadora de nucleotídeos (SOS). SOS promove a troca GDP por GTP da proteína Ras que é ativada com a participação da fosfatase 2 homóloga ao Src (SHP2). Uma vez ativada, Ras estimula a fosforilação em serina da cascata da MAPK que leva à proliferação e diferenciação celular (SALTIEL e KAHN, 2001). O bloqueio farmacológico dessa via previne a ação da insulina no crescimento celular, mas não tem efeito nas ações metabólicas do hormônio (LAZAR *et al.*, 1995; SALTIEL e KAHN, 2001).

A insulina regula a síntese de proteínas através da ativação do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR; SALTIEL e KAHN, 2001). O mTOR é uma proteína serina treonina quinase, altamente conservada ao longo da evolução, que atua na regulação do ciclo e crescimento celular (LIAN *et al.*, 2008). Existem duas vias de sinalização bem caracterizadas na literatura que envolve o controle da transcrição de RNAs mensageiros através de ativação do mTOR. Estas vias são reguladas pela proteína ribossomal 70-kDa S6 quinase 1 (p70^{S6K1} ou S6K1) e pela proteína 1 ligadora do fator inicial de transcrição 4E eucariótica (4E-BP1, também conhecida como PHAS-I; FINGAR *et al.*, 2004; LIAN *et al.*, 2008). A sinalização dependente de mTOR, em cooperação com PI3K, fosforila e ativa S6K1 ao mesmo tempo de fosforila e inativa 4E-BP1 (FINGAR *et al.*, 2004; GINGRAS *et al.*, 2001; MARTIN e BLENIS, 2002). A proteína S6K1 diretamente fosforila a proteína S6 ribossomal 40S, que aumenta a transcrição do RNA mensageiro contendo oligopirimidina 5' terminal (5' TOP). Em função das proteínas ribossomais e dos fatores de alongamento de transcrição serem codificados pelos RNA mensageiro 5' TOP, a sinalização através de S6K1 promove um aumento da biogênese ribossomal e portanto um aumento da síntese protéica (FINGAR *et al.*, 2004; STOLOVICH *et al.*, 2002). No estado não fosforilado a proteína 4E-BP1 inibe o fator inicial de transcrição 4E eucariótico (eIF4E), que se liga a *cap* (m-GpppN) na posição 5'terminal do RNA mensageiro responsável pela transcrição dependente de *cap*. O mTOR fosforila a proteína 4E-BP1 que libera o fator eIF4E para interagir com outros fatores de transcrição responsáveis pela transcrição dependente de *cap*, aumentando a síntese de proteínas associadas com respostas de proliferação (FINGAR *et al.*, 2004; LIAN *et al.*, 2008).

1.9.4 No cérebro

Há alguns anos atrás, o cérebro era considerado um órgão independente de insulina, porém, o surgimento de evidências mostrando a presença de insulina e de seus receptores no sistema nervoso central começaram a mudar estas definições (CRAFT e WATSON, 2004; GEROZISSIS, 2008; LARON, 2009). A insulina atravessa a barreira hematoencefálica através de um sistema de transporte ativo mediado por receptor (GEROZISSIS, 2008; LARON, 2009). O aumento das concentrações da insulina periférica leva ao aumento das concentrações deste hormônio no cérebro e no líquido cefalorraquidiano, sendo que a presença prolongada de hiperinsulinemia reduz o transporte de insulina para o cérebro (CRAFT e WATSON, 2004). Contudo existem trabalhos mostrando que a insulina pode ser sintetizada localmente pelo cérebro em pequenas proporções (BANKS, 2004; GEROZISSIS, 2008; LARON, 2009).

Os receptores de insulina estão localizados em sinapses de ambos astrócitos e neurônios (ABBOTT *et al.*, 1999). Em roedores, a presença de insulina é detectada no bulbo olfatório, córtex cerebral, hipocampo e hipotálamo e amígdala (CRAFT e WATSON, 2004). Atualmente tem sido estabelecido que a atuação da insulina juntamente com outros peptídeos regulatórios e neurotransmissores pode ativar processos relacionados com o consumo de comida, comportamento, aprendizado e memória, além de estar potencialmente envolvida na comunicação entre estruturas do cérebro, como o hipotálamo e o sistema límbico (GEROZISSIS, 2008).

A regulação central do consumo de comida e gasto energético, em resposta a um grande número de fatores ambientais, metabólicos e hormonais ocorre principalmente no hipotálamo. Assim como nos tecidos periféricos, a insulina age no cérebro através de seu receptor tirosina quinase, ativando diversas cascatas de sinalização como as vias de sinalização IRS/PI3K e MAPK (NISWENDER *et al.*, 2003; PLUM *et al.*, 2006). No hipotálamo, a interação da sinalização intracelular dos receptores de insulina e leptina são de grande importância para a regulação do consumo de comida, uma vez que, tanto a insulina como a leptina podem ativar a via de sinalização da IRS/PI3K que está diretamente relacionada à homeostase energética (GEROZISSIS, 2008; NISWENDER *et al.*, 2004). O bloqueio da ativação

da via de sinalização da PI3K por administração de LY294002 via intra-cérebro ventricular, inibe a anorexia induzida pela insulina e leptina em ratos, indicando que esta via de sinalização desempenha um importante papel no controle do consumo alimentar (NISWENDER *et al.*, 2004; NISWENDER *et al.*, 2003; NISWENDER e SCHWARTZ, 2003). Estudos também mostram que a deficiência de insulina é acompanhada por uma hiperfagia bastante significativa (SIPOLS *et al.*, 1995), sendo que defeitos na sua sinalização são considerados um dos principais elementos ligados a obesidade e diabetes (GEROZISSIS, 2008; LIN *et al.*, 2004; OBICI *et al.*, 2002).

Tem sido demonstrado que a deficiência de insulina contribui para as complicações neurológicas e psiquiátricas na diabetes. Além disso, estudos também mostram que a administração de insulina via nasal aumenta os níveis de insulina no líquido cefalorraquidiano, e este aumento está correlacionado com uma melhora da memória em ratos e humanos (BENEDICT *et al.*, 2007; 2008).

Em 2005, o termo diabetes tipo 3 passou a ser utilizado por algum grupos, para designar os indivíduos com doença de Alzheimer que apresentavam características observadas na diabetes tipo 1 e tipo 2, como a diminuição da produção de insulina e diminuição da sinalização dos receptores de insulina (KRONER, 2009). Estudos mostram que a administração de insulina no tratamento da doença de Alzheimer, tem apresentado uma melhora de memória e da performance cognitiva dos indivíduos portadores desta doença. Os mecanismos pelos quais a insulina afeta funções cognitivas como aprendizado e memória, ainda não estão completamente estabelecidos (DE LA MONTE, 2009; KRONER, 2009; LARON, 2009).

1.10 Resistência à insulina e obesidade

A resistência à insulina é clinicamente definida quando os níveis normais de insulina não são suficientes para a absorção da glicose plasmática pelas células alvos (adipócitos, músculo estriado e fígado) (BUSE, 2006). O estudo dos fatores que desencadeiam resistência à insulina tem sido um grande desafio para a ciência, em parte devido aos diversos fatores de risco ligados a esta condição, incluindo obesidade, sedentarismo, gravidez, hepatite C, síndrome do ovário policístico,

terapia de inibição de protease no HIV e tratamento com corticosteróides (HOEHN *et al.*, 2009).

A resistência à insulina induz um processo crônico de hiperglicemia e hiperinsulinemia, os quais contribuem para hipertensão, diabetes do tipo II, doenças renais e cardiovasculares (BUSE, 2006; HOEHN *et al.*, 2009; KOPELMAN, 2000). Em 2000, a prevalência de diabetes era de 151 milhões de pessoas e estima-se para 2010 que este número irá subir para 285 milhões, representando 6,6% da população mundial de adultos. A *Federação Internacional de Diabetes* também estima que o gasto mundial com diabetes para 2010 será de U\$ 376 bilhões, sendo que para 2030 esta estimativa excede os U\$ 490 bilhões (IDF, 2009).

A obesidade é considerada um dos fatores principais para o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes do tipo II (KOPELMAN, 2000; WING, 2008). O tecido adiposo regula o metabolismo corpóreo liberando ácidos graxos livres e adipocinas, como leptina, adiponectina, resistina, vistadina e citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucina 6 (IL-6; KAHN *et al.*, 2006). Na obesidade a produção destes metabólitos está alterada, associada a um quadro crônico de inflamação de baixo grau, que leva a um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e de produtos adicionais de macrófagos infiltrados no tecido adiposo de indivíduos obesos (KARALIS *et al.*, 2009). O aumento da citocina pró-inflamatória IL6 em adipócitos 3T3-L1 está associado à diminuição da expressão do receptor de insulina, IRS-1 e GLUT4 (ROTTER *et al.*, 2003). Já o aumento de TNF α provoca uma diminuição na fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1, diminuindo a transdução de sinal pela insulina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996).

1.10.1 Ácidos graxos e a hipertrofia do tecido adiposo

Tem sido proposto que o aumento das concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres e triglicerídeos está relacionado ao desenvolvimento de resistência à insulina, obesidade e diabetes do tipo II em animais e humanos (BHATTACHARYA *et al.*, 2007; CAHOVA *et al.*, 2007; GUILHERME *et al.*, 2008; KAHN *et al.*, 2006; KRAEGER *et al.*, 2008; QUEIROZ *et al.*, 2009; SALTIEL e KAHN, 2001). Por outro lado, a diminuição aguda de ácidos graxos com drogas antilipolíticas aumenta a

ação da insulina na captação de glicose periférica (SANTOMAURO *et al.*, 1999). Além disso, tem sido demonstrado que o armazenamento de ácidos graxos em tecidos periféricos como fígado e músculo, deve contribuir para o desenvolvimento de resistência à insulina observado na obesidade (KRAEGEN *et al.*, 2008; TAUBES, 2009).

O papel do tecido adiposo no armazenamento dos ácidos graxos é de grande importância para o controle do metabolismo corpóreo, uma vez que a ausência do tecido adiposo resulta na elevação das concentrações plasmáticas de ácidos graxos e triglicerídeos, promovendo o desenvolvimento de resistência à insulina em camundongos e humanos (LAUSTSEN *et al.*, 2002; SHIMOMURA *et al.*, 1998; SOVIK *et al.*, 1996). A presença do tecido adiposo também é fundamental para a secreção de adipocinas, como a leptina e adiponectina, que atuam na regulação do balanço energético (ROSEN e SPIEGELMAN, 2006). Um estudo realizado por Kim *et al.* (2007), mostra que a superexpressão de adiponectina em camundongos *ob/ob* leva a uma melhora significativa da resistência à insulina sem interferir com o ganho de peso destes animais. Uma observação importante destes estudos foi que a superexpressão da adiponectina proporcionou uma maior expansão do tecido adiposo (hiperplasia) sem causar a hipertrofia do mesmo. Além disso, estes animais também continuavam gerando novas células adiposas, proporcionando ao organismo adipócitos "saudáveis" para o armazenamento de grandes quantidades de triglicerídeos, preservando o músculo e o fígado livres do acúmulo de lipídeos (KIM *et al.*, 2007). Estes resultados indicam que a sensibilidade à insulina, assim como a homeostase metabólica da glicose, requerem que o tecido adiposo se apresente em condições normais de funcionamento e em proporções adequadas para o organismo (KRAEGEN *et al.*, 2008; TAUBES, 2009).

O tecido adiposo possui uma grande capacidade de sintetizar e estocar triglicerídeos durante o período pós-prandial, assim como de hidrolisar e liberar triglicerídeos na forma de ácidos graxos e glicerol no período de jejum (ROSEN e SPIEGELMAN, 2006). Em indivíduos saudáveis, a sensibilidade à insulina e a captação de glicose permanecem normais no músculo e nos adipócitos (Figura 7-A), sendo que nos estágios iniciais de desenvolvimento da obesidade, em que o indivíduo começa a apresentar sobrepeso, os adipócitos sofrem hiperplasia e continuam a aumentar ativamente os seus estoques de triglicerídeos, mantendo a

sua atividade lipolítica normal durante o jejum. O músculo esquelético, por sua vez, também se mantém altamente sensível a insulina, mesmo com a presença de pequenos aumentos nos níveis de ácidos graxos nesta fase (Figura 7-B) (GUILHERME *et al.*, 2008; KRAEGEN *et al.*, 2008).

A constante hiperplasia dos adipócitos ocasiona a hipertrofia destas células afetando a sua habilidade endócrina, que acarreta em uma alteração na secreção de adipocinas, como a leptina e a adiponectina, levando a um descontrole da regulação do balanço energético do organismo (QUEIROZ *et al.*, 2009). Além disso, os adipócitos hipertrofiados começam a secretar grandes quantidades da proteína de monócito quimioatraente (MCP-1), que promovem o aumento no recrutamento de macrófagos, os quais se infiltram no tecido adiposo contribuindo para o estado pró-inflamatório observado em camundongo e humanos obesos (Figura 7-C) (GUILHERME *et al.*, 2008; KRAEGEN *et al.*, 2008; TAUBES, 2009).

Os adipócitos e os macrófagos continuam a secretar MCP-1, assim como grandes quantidade de TNF α e outras citocinas como interleucina 1 β (IL1 β) e IL6. O desenvolvimento do estado inflamatório no tecido adiposo está associado com uma deficiência na metabolização dos ácidos graxos pelos adipócitos, aumentando a sua disponibilidade no plasma (GUILHERME *et al.*, 2008). A ineficiência do tecido adiposo em metabolizar os ácidos graxos faz com que estes compostos sejam metabolizados pelo músculo e fígado, ocorrendo o aparecimento de gordura ectópica depositada nestes órgãos. O músculo e o fígado passam a apresentar então um desequilíbrio no conteúdo intracelular de metabólitos de ácidos graxos, como diacilglicerol (DAG), acetilcoenzima A (Acil-CoA) e ceramidas. Estes metabólitos podem ativar uma cascata de quinases envolvidas com a fosforilação de sítios de serina/treonina dos IRS-1 e 2, reduzindo a ativação de PI3K, e consequentemente o transporte de glicose gerando o quadro de resistência à insulina (CAHOVA *et al.*, 2007; KAHN *et al.*, 2006) (Figura 7-D).

Desta forma, podemos dizer que a hiperplasia dos adipócitos e a ausência de hipertrofia destas células, durante períodos de alta ingestão calórica, diminuem o quadro inflamatório do tecido adiposo promovendo proteção contra a resistência à insulina no músculo e no fígado (GUILHERME *et al.*, 2008; TAUBES, 2009).

Figura 7 – Ilustração esquemática da inflamação crônica do tecido adiposo e o desenvolvimento de resistência à insulina no músculo. (A) Em condições normais os adipócitos eficientemente estocam ácidos graxos na forma de triglicerídeos, os quais podem ser mobilizados e utilizados na geração de ATP através da via de β -oxidação mitocondrial no músculo, durante os períodos de necessidade calórica. A captação de glicose estimulada por insulina nestas condições é normal. (B) O excesso de ingestão de calorias promove uma sobrecarga metabólica, aumentando os estoques de ácidos graxos na forma de triglicerídeos, que acarreta a hiperplasia dos adipócitos. Desta forma, em indivíduos não diabéticos que apresentam sobrepeso, o estoque de triglicerídeos pelo tecido adiposo e a β -oxidação no músculo podem ser constantemente mantidos, prevenindo o aparecimento de resistência à insulina. (C) Futuras sobrecargas no armazenamento de triglicerídeos, acarretam a maior hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos que começam a secretar a proteína MCP-1, recrutando adicionais macrófagos. (D) A presença de macrófagos no tecido adiposo obeso, resulta no desenvolvimento do estado pró-inflamatório deste tecido. Os macrófagos infiltrados por sua vez secretam grandes quantidades de $\text{TNF}\alpha$, que resulta em um estado crônico de inflamação com uma deficiência no armazenamento de triglicerídeos e aumento da lipólise. O excesso de ácidos graxos e triglicerídeos circulantes resulta na acumulação atípica de gordura ectópica no músculo (pontos amarelos) levando a um descontrole nos processos de oxidação e fosforilação mitocondrial e do transporte de glicose estimulado por insulina, promovendo o desenvolvimento de resistência à insulina neste tecido. Adaptado de Guilherme *et al.*, 2008.

Estudos mostram também que receptores relacionados com a imunidade inata, como os receptores de *toll-like* (TLR) 4 e TLR2 são expressos no tecido adiposo de indivíduos obesos (GHANIM *et al.*, 2008; KARALIS *et al.*, 2009; VITSEVA *et al.*, 2008). A ligação de ácidos graxos aos receptores de TLR4 leva a indução de uma cascata de eventos que resulta na ativação do sistema IKK/NF κ B e JNK e a subsequente indução de citocinas pró-inflamatórias como $\text{TNF}\alpha$ e IL6 relacionados com o quadro de resistência a insulina. (KARALIS *et al.*, 2009). Tem

sido demonstrado que o tratamento da linhagem de adipócitos 3T3-L1 com ácidos graxos de cadeia saturada, como o palmitato, é capaz de promover a diminuição da captação de glicose nestas células, além de promover a expressão de citocinas inflamatórias (DAVIS *et al.*, 2009; FUNAKI, 2009; HOEHN *et al.*, 2009).

6 CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta como principais conclusões:

- a) O tecido adiposo epididimal de ratos que desenvolveram obesidade e resistência à insulina após serem submetidos à *dieta cafeteria*, apresenta uma concentração relativa de peptídeos intracelulares diferente do tecido adiposo dos animais tratados com dieta controle.

- b) Os peptídeos intracelulares testados em nossos estudos foram capazes de modular a captação de glicose induzida pela insulina. Assim, é possível sugerir que peptídeos intracelulares sejam novas moléculas biologicamente ativas, com capacidade de modular a sinalização de receptores com atividade de tirosina quinases.

REFERÊNCIAS *

ABBOTT, M. A.; WELLS, D. G.; FALLON, J. R. The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. **J. Neurosci.**, v.19, n.17, p.7300-8, 1999.

AGUIRRE, V.; WERNER, E. D.; GIRAUD, J.; LEE, Y. H.; SHOELSON, S. E.; WHITE, M. F. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.2, p.1531-7, 2002.

AKOPIAN, T. N.; KISSELEV, A. F.; GOLDBERG, A. L. Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.3, p.1791-8, 1997.

ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell** 5th ed. New York: Garland Science, 2008.

ANUBHUTI; ARORA, S. Leptin and its metabolic interactions: an update. **Diabetes Obes. Metab.**, v.10, n.11, p.973-93, 2008.

ARORA, S.; ANUBHUTI. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. **Neuropeptides**, v.40, n.6, p.375-401, 2006.

AVOGARO, A.; VICINI, P.; VALERIO, A.; CAUMO, A.; COBELLI, C. The hot but not the cold minimal model allows precise assessment of insulin sensitivity in NIDDM subjects. **Am. J. Physiol.**, v.270, n.3 Pt 1, p.E532-40, 1996.

AVRUCH, J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. **Mol. Cell Biochem.**, v.182, n.1-2, p.31-48, 1998.

BANKS, W. A. The source of cerebral insulin. **Eur. J. Pharmacol.**, v.490, n.1-3, p.5-12, 2004.

BAUMANN, C. A.; RIBON, V.; KANZAKI, M.; THURMOND, D. C.; MORA, S.; SHIGEMATSU, S.; BICKEL, P. E.; PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. **Nature**, v.407, n.6801, p.202-7, 2000.

* De Acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BAYASCAS, J. R. Dissecting the role of the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) signalling pathways. **Cell Cycle**, v.7, n.19, p.2978-82, 2008.

BAYNES, C.; HENDERSON, A. D.; HUGHES, C. L.; RICHMOND, W.; JOHNSTON, D. G.; ELKELES, R. S. Determinants of mild fasting hypertriglyceridaemia in non-insulin-dependent diabetes. **J. Intern. Med.**, v.229, n.3, p.267-73, 1991.

BEGLEY, R.; LIRON, T.; BARYZA, J.; MOCHLY-ROSEN, D. Biodistribution of intracellularly acting peptides conjugated reversibly to Tat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.318, n.4, p.949-54, 2004.

BENEDICT, C.; HALLSCHMID, M.; SCHMITZ, K.; SCHULTES, B.; RATTER, F.; FEHM, H. L.; BORN, J.; KERN, W. Intranasal insulin improves memory in humans: superiority of insulin aspart. **Neuropsychopharmacology**, v.32, n.1, p.239-43, 2007.

BENEDICT, C.; KERN, W.; SCHULTES, B.; BORN, J.; HALLSCHMID, M. Differential sensitivity of men and women to anorexigenic and memory-improving effects of intranasal insulin. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.93, n.4, p.1339-44, 2008.

BEREZNIUK, I.; SIRONI, J.; CALLAWAY, M. B.; CASTRO, L. M.; HIRATA, I. Y.; FERRO, E. S.; FRICKER, L. D. CCP1/Nna1 functions in protein turnover in mouse brain: Implications for cell death in Purkinje cell degeneration mice. **FASEB J.**, 2010.

BERGMAN, R. N. New concepts in extracellular signaling for insulin action: the single gateway hypothesis. **Recent. Prog. Horm. Res.**, v.52, p.359-87, 1997.

BERTI, D. A.; MORANO, C.; RUSSO, L. C.; CASTRO, L. M.; CUNHA, F. M.; ZHANG, X.; SIRONI, J.; KLITZKE, C. F.; FERRO, E. S.; FRICKER, L. D. Analysis of intracellular substrates and products of thimet oligopeptidase in human embryonic kidney 293 cells. **J. Biol. Chem.**, v.284, n.21, p.14105-16, 2009.

BHATTACHARYA, S.; DEY, D.; ROY, S. S. Molecular mechanism of insulin resistance. **J. Biosci.**, v.32, n.2, p.405-13, 2007.

BJORNTORP, P. Metabolic implications of body fat distribution. **Diabetes Care**, v.14, n.12, p.1132-43, 1991.

BJORNTORP, P. Obesity and adipose tissue distribution as risk factors for the development of disease. A review. **Infusionstherapie**, v.17, n.1, p.24-7, 1990.

BLACKARD, W. G.; GUZELIAN, P. S.; SMALL, E. E. Down regulation of insulin receptors. **Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.**, v.90, p.94-101, 1979.

BLACKARD, W. G.; GUZELIAN, P. S.; SMALL, M. E. Down regulation of insulin receptors in primary cultures of adult rat hepatocytes in monolayer. **Endocrinology**, v.103, n.2, p.548-53, 1978.

BOURA-HALFON, S.; ZICK, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.296, n.4, p.E581-91, 2009.

BOWEN, L.; STEIN, P. P.; STEVENSON, R.; SHULMAN, G. I. The effect of CP 68,722, a thiozolidinedione derivative, on insulin sensitivity in lean and obese Zucker rats. **Metabolism**, v.40, n.10, p.1025-30, 1991.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-54, 1976.

BRADY, M. J.; NAIRN, A. C.; SALTIEL, A. R. The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.47, p.29698-703, 1997.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**, v.89, n.3, p.331-40, 1997.

BURNS-HAMURO, L. L.; MA, Y.; KAMMERER, S.; REINEKE, U.; SELF, C.; COOK, C.; OLSON, G. L.; CANTOR, C. R.; BRAUN, A.; TAYLOR, S. S. Designing isoform-specific peptide disruptors of protein kinase A localization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, n.7, p.4072-7, 2003.

BURTON, M.; ROSE, T. M.; FAERGEMAN, N. J.; KNUDSEN, J. Evolution of the acyl-CoA binding protein (ACBP). **Biochem J.**, v.392, n.Pt 2, p.299-307, 2005.

BUSE, M. G. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.290, n.1, p.E1-E8, 2006.

CAHOVA, M.; VAVRINKOVA, H.; KAZDOVA, L. Glucose-fatty acid interaction in skeletal muscle and adipose tissue in insulin resistance. **Physiol. Res.**, v.56, n.1, p.1-15, 2007.

CAMARGO, A. C.; GRAEFF, F. G. Subcellular distribution and properties of the bradykinin inactivation system in rabbit brain homogenates. **Biochem. Pharmacol.**, v.18, n.2, p.548-9, 1969.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v.296, n.5573, p.1655-7, 2002.

CARRENO, F. R.; GONI, C. N.; CASTRO, L. M.; FERRO, E. S. 14-3-3 epsilon modulates the stimulated secretion of endopeptidase 24.15. **J. Neurochem.**, v.93, n.1, p.10-25, 2005.

CARVALHO, K. M.; CAMARGO, A. C. Purification of rabbit brain endooligopeptidases and preparation of anti-enzyme antibodies. **Biochemistry**, v.20, n.25, p.7082-8, 1981.

CHE, F. Y.; BISWAS, R.; FRICKER, L. D. Relative quantitation of peptides in wild-type and Cpe(fat/fat) mouse pituitary using stable isotopic tags and mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v.40, n.2, p.227-37, 2005a.

CHE, F. Y.; LIM, J.; PAN, H.; BISWAS, R.; FRICKER, L. D. Quantitative neuropeptidomics of microwave-irradiated mouse brain and pituitary. **Mol. Cell Proteomics**, v.4, n.9, p.1391-405, 2005b.

CHE, F. Y.; VATHY, I.; FRICKER, L. D. Quantitative peptidomics in mice: effect of cocaine treatment. **J. Mol. Neurosci.**, v.28, n.3, p.265-75, 2006.

CHE, F. Y.; ZHANG, X.; BEREZNIUK, I.; CALLAWAY, M.; LIM, J.; FRICKER, L. D. Optimization of neuropeptide extraction from the mouse hypothalamus. **J. Proteome Res.**, v.6, n.12, p.4667-76, 2007.

CHECLER, F.; BARELLI, H.; DAUCH, P.; DIVE, V.; VINCENT, B.; VINCENT, J. P. Neurolysin: purification and assays. **Meth. Enzymol.**, v.248, p.593-614, 1995.

CHECLER, F.; VINCENT, J. P.; KITABGI, P. Degradation of neurotensin by rat brain synaptic membranes: involvement of a thermolysin-like metalloendopeptidase (enkephalinase), angiotensin-converting enzyme, and other unidentified peptidases. **J. Neurochem.**, v.41, n.2, p.375-84, 1983.

CHEN, L.; WRIGHT, L. R.; CHEN, C. H.; OLIVER, S. F.; WENDER, P. A.; MOCHLY-ROSEN, D. Molecular transporters for peptides: delivery of a cardioprotective epsilonPKC agonist peptide into cells and intact ischemic heart using a transport system, R(7). **Chem. Biol.**, v.8, n.12, p.1123-9, 2001.

CHOPRA, M.; GALBRAITH, S.; DARNTON-HILL, I. A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition. **Bull World Health Organ.**, v.80, n.12, p.952-8, 2002.

CHOU, M. M.; HOU, W.; JOHNSON, J.; GRAHAM, L. K.; LEE, M. H.; CHEN, C. S.; NEWTON, A. C.; SCHAFFHAUSEN, B. S.; TOKER, A. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. **Curr. Biol.**, v.8, n.19, p.1069-77, 1998.

CHU, T. G.; ORLOWSKI, M. Soluble metalloendopeptidase from rat brain: action on enkephalin-containing peptides and other bioactive peptides. **Endocrinology**, v.116, n.4, p.1418-25, 1985.

COSTA, E.; GUIDOTTI, A. Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions. **Life Sci.**, v.49, n.5, p.325-44, 1991.

COTTRELL, J. S. Protein identification by peptide mass fingerprinting. **Pept. Res.**, v.7, n.3, p.115-24, 1994.

CRAFT, S.; WATSON, G. S. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. **Lancet Neurol.**, v.3, n.3, p.169-78, 2004.

CROSS, D. A.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMINGS, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v.378, n.6559, p.785-9, 1995.

CUATRECASAS, P.; HOLLENBERG, M. D.; CHANG, K. J.; BENNETT, V. Hormone receptor complexes and their modulation of membrane function. **Recent Prog. Horm. Res.**, v.31, p.37-94, 1975.

CULLEN, P. J. Ras effectors: buying shares in Ras plc. **Curr. Biol.**, v.11, n.9, p.R342-4, 2001.

CUMMINS, P. M.; PABON, A.; MARGULIES, E. H.; GLUCKSMAN, M. J. Zinc coordination and substrate catalysis within the neuropeptide processing enzyme endopeptidase EC 3.4.24.15. Identification of active site histidine and glutamate residues. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.23, p.16003-9, 1999.

CUNHA, F. M.; BERTI, D. A.; FERREIRA, Z. S.; KLITZKE, C. F.; MARKUS, R. P.; FERRO, E. S. Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. **J. Biol. Chem.**, v.283, n.36, p.24448-59, 2008.

DAUCH, P.; VINCENT, J. P.; CHECLER, F. Molecular cloning and expression of rat brain endopeptidase 3.4.24.16. **J. Biol. Chem.**, v.270, n.45, p.27266-71, 1995.

DAVIS, J. E.; GABLER, N. K.; WALKER-DANIELS, J.; SPURLOCK, M. E. The c-Jun N-terminal kinase mediates the induction of oxidative stress and insulin resistance by palmitate and toll-like receptor 2 and 4 ligands in 3T3-L1 adipocytes. **Horm. Metab. Res.**, v.41, n.7, p.523-30, 2009.

DE LA MONTE, S. M. Insulin resistance and Alzheimer's disease. **BMB Rep.**, v.42, n.8, p.475-81, 2009.

DI GIROLAMO, M.; MENDLINGER, S.; FERTIG, J. W. A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. **Am. J. Physiol.**, v.221, n.3, p.850-8, 1971.

ELHOLM, M.; GARRAS, A.; NEVE, S.; TORNEHAVE, D.; LUND, T. B.; SKORVE, J.; FLATMARK, T.; KRISTIANSEN, K.; BERGE, R. K. Long-chain acyl-CoA esters and acyl-CoA binding protein are present in the nucleus of rat liver cells. **J. Lipid Res.**, v.41, n.4, p.538-45, 2000.

EMANUELLI, B.; PERALDI, P.; FILLOUX, C.; CHAVEY, C.; FREIDINGER, K.; HILTON, D. J.; HOTAMISLIGIL, G. S.; VAN OBBERGHEN, E. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.51, p.47944-9, 2001.

EMBURY, J.; KLEIN, D.; PILEGGI, A.; RIBEIRO, M.; JAYARAMAN, S.; MOLANO, R. D.; FRAKER, C.; KENYON, N.; RICORDI, C.; INVERARDI, L.; PASTORI, R. L. Proteins linked to a protein transduction domain efficiently transduce pancreatic islets. **Diabetes**, v.50, n.8, p.1706-13, 2001.

FAERGEMAN, N. J.; FEDDERSEN, S.; CHRISTIANSEN, J. K.; LARSEN, M. K.; SCHNEITER, R.; UNGERMANN, C.; MUTENDA, K.; ROEPSTORFF, P.; KNUDSEN, J. Acyl-CoA-binding protein, Acb1p, is required for normal vacuole function and ceramide synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem J.**, v.380, n.Pt 3, p.907-18, 2004.

FERRERO, P.; COSTA, E.; CONTI-TRONCONI, B.; GUIDOTTI, A. A diazepam binding inhibitor (DBI)-like neuropeptide is detected in human brain. **Brain Res.**, v.399, n.1, p.136-42, 1986a.

FERRERO, P.; SANTI, M. R.; CONTI-TRONCONI, B.; COSTA, E.; GUIDOTTI, A. Study of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor (DBI): biological activity and presence in rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.83, n.3, p.827-31, 1986b.

FERRO, E. S.; HYSLOP, S.; CAMARGO, A. C. Intracellular peptides as putative natural regulators of protein interactions. **J. Neurochem.**, v.91, n.4, p.769-77, 2004.

FERRO, E. S.; TULLAI, J. W.; GLUCKSMAN, M. J.; ROBERTS, J. L. Secretion of metalloendopeptidase 24.15 (EC 3.4.24.15). **DNA Cell Biol.**, v.18, n.10, p.781-9, 1999.

FINGAR, D. C.; RICHARDSON, C. J.; TEE, A. R.; CHEATHAM, L.; TSOU, C.; BLENIS, J. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. **Mol. Cell Biol.**, v.24, n.1, p.200-16, 2004.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I.; LIMA, F. B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v.83, n.5 Supl, p.S192-203, 2007.

FONTENELE-NETO, J. D.; MASSARELLI, E. E.; GURGEL GARRIDO, P. A.; BEAUDET, A.; FERRO, E. S. Comparative fine structural distribution of endopeptidase 24.15 (EC3.4.24.15) and 24.16 (EC3.4.24.16) in rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v.438, n.4, p.399-410, 2001.

FRANCH, J.; KNUDSEN, J.; ELLIS, B. A.; PEDERSEN, P. K.; COONEY, G. J.; JENSEN, J. Acyl-CoA binding protein expression is fiber type- specific and elevated in muscles from the obese insulin-resistant Zucker rat. **Diabetes**, v.51, n.2, p.449-54, 2002.

FRANKEL, A. D.; PABO, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. **Cell**, v.55, n.6, p.1189-93, 1988.

FRATTALI, A. L.; TREADWAY, J. L.; PESSIN, J. E. Transmembrane signaling by the human insulin receptor kinase. Relationship between intramolecular beta subunit trans- and cis-autophosphorylation and substrate kinase activation. **J. Biol. Chem.**, v.267, n.27, p.19521-8, 1992.

FRICKER, L. D. Neuropeptidomics to study peptide processing in animal models of obesity. **Endocrinology**, v.148, n.9, p.4185-90, 2007.

FUNAKI, M. Saturated fatty acids and insulin resistance. **J. Med. Invest.**, v.56, n.3-4, p.88-92, 2009.

GAIGG, B.; NEERGAARD, T. B.; SCHNEITER, R.; HANSEN, J. K.; FAERGEMAN, N. J.; JENSEN, N. A.; ANDERSEN, J. R.; FRIIS, J.; SANDHOFF, R.; SCHRODER, H. D.; KNUDSEN, J. Depletion of acyl-coenzyme A-binding protein affects sphingolipid synthesis and causes vesicle accumulation and membrane defects in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Biol. Cell**, v.12, n.4, p.1147-60, 2001.

GARVEY, W. T.; OLEFSKY, J. M.; MARSHALL, S. Insulin induces progressive insulin resistance in cultured rat adipocytes. Sequential effects at receptor and multiple postreceptor sites. **Diabetes**, v.35, n.3, p.258-67, 1986.

GAVIN, J. R.; ROTH, J.; NEVILLE, D. M., JR.; DE MEYTS, P.; BUELL, D. N. Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.71, n.1, p.84-8, 1974.

GAVIN, A. C.; BOSCHE, M.; KRAUSE, R.; GRANDI, P.; MARZIOCH, M.; BAUER, A.; SCHULTZ, J.; RICK, J. M.; MICHON, A. M.; CRUCIAT, C. M.; REMOR, M.; HOFERT, C.; SCHEIDER, M.; BRAJENOVIC, M.; RUFFNER, H.; MERINO, A.; KLEIN, K.; HUDAK, M.; DICKSON, D.; RUDI, T.; GNAU, V.; BAUCH, A.; BASTUCK, S.; HUHSE, B.; LEUTWEIN, C.; HEURTIER, M. A.; COPLEY, R. R.; EDELMANN, A.; QUERFURTH, E.; RYBIN, V.; DREWES, G.; RAID, M.; BOUWMEESTER, T.; BORK, P.; SERAPHIN, B.; KUSTER, B.; NEUBAUER, G.; SUPERTI-FURGA, G. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. **Nature**, v.415, n.6868, p.141-7, 2002.

GEIER, E.; PFEIFER, G.; WILM, M.; LUCCHIARI-HARTZ, M.; BAUMEISTER, W.; EICHMANN, K.; NIEDERMANN, G. A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. **Science**, v.283, n.5404, p.978-81, 1999.

GEROZISSIS, K. Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. **Eur. J. Pharmacol.**, v.585, n.1, p.38-49, 2008.

GHANIM, H.; MOHANTY, P.; DEOPURKAR, R.; SIA, C. L.; KORZENIEWSKI, K.; ABUAYSHEH, S.; CHAUDHURI, A.; DANDONA, P. Acute modulation of toll-like receptors by insulin. **Diabetes Care**, v.31, n.9, p.1827-31, 2008.

GINGRAS, A. C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. **Genes Dev.**, v.15, n.7, p.807-26, 2001.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiol. Rev.**, v.82, n.2, p.373-428, 2002.

GOLDBERG, A. L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature**, v.426, n.6968, p.895-9, 2003.

GOLDBERG, A. L.; CASCIO, P.; SARIC, T.; ROCK, K. L. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. **Mol. Immunol.**, v.39, n.3-4, p.147-64, 2002.

GRAY, S. G.; STENFELDT MATHIASSEN, I.; DE MEYTS, P. The insulin-like growth factors and insulin-signalling systems: an appealing target for breast cancer therapy? **Horm. Metab. Res.**, v.35, n.11-12, p.857-71, 2003.

GREEN, H.; MEUTH, M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. **Cell**, v.3, n.2, p.127-33, 1974.

GREEN, M.; LOEWENSTEIN, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. **Cell**, v.55, n.6, p.1179-88, 1988.

GUILHERME, A.; VIRBASIS, J. V.; PURI, V.; CZECH, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat. Rev. Mol .Cell Biol.**, v.9, n.5, p.367-77, 2008.

HEIMANN, A. S.; FAVARATO, M. H.; GOZZO, F. C.; RIOLI, V.; CARRENO, F. R.; EBERLIN, M. N.; FERRO, E. S.; KREGGE, J. H.; KRIEGER, J. E. ACE gene titration in mice uncovers a new mechanism for ACE on the control of body weight. **Physiol. Genomics**, v.20, n.2, p.173-82, 2005.

HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L.; GORGUN, C. Z.; UYSAL, K. T.; MAEDA, K.; KARIN, M.; HOTAMISLIGIL, G. S. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v.420, n.6913, p.333-6, 2002.

HOEHN, K. L.; HOHNEN-BEHRENS, C.; CEDERBERG, A.; WU, L. E.; TURNER, N.; YUASA, T.; EBINA, Y.; JAMES, D. E. IRS1-independent defects define major nodes of insulin resistance. **Cell Metab.**, v.7, n.5, p.421-33, 2008.

HOEHN, K. L.; SALMON, A. B.; HOHNEN-BEHRENS, C.; TURNER, N.; HOY, A. J.; MAGHZAL, G. J.; STOCKER, R.; VAN REMMEN, H.; KRAEGER, E. W.; COONEY, G. J.; RICHARDSON, A. R.; JAMES, D. E. Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.106, n.42, p.17787-92, 2009.

HORTON, J. D.; BASHMAKOV, Y.; SHIMOMURA, I.; SHIMANO, H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, n.11, p.5987-92, 1998.

HORUK, R.; OLEFSKY, J. M. Post-binding events in insulin action. **Mol. Cell Endocrinol.**, v.42, n.1, p.1-20, 1985.

HOTAMISLIGIL, G. S. The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. **J. Intern. Med.**, v.245, n.6, p.621-5, 1999.

HOTAMISLIGIL, G. S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A.; ELLIS, R.; WHITE, M. F.; SPIEGELMAN, B. M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v.271, n.5249, p.665-8, 1996.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v.259, n.5091, p.87-91, 1993.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SPIEGELMAN, B. M. Tumor necrosis factor α : a key component of the obesity-diabetes link. **Diabetes**, v.43, n.11, p.1271-8, 1994.

HUNTER, T. Signaling--2000 and beyond. **Cell**, v.100, n.1, p.113-27, 2000.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes atlas. 4. ed. 2009.** Disponível em <<http://www.diabetesatlas.org/content/economic-impacts-diabetes>>. Acesso em: 22 jan. 2010.

JACOBS, S.; CUATRECASAS, P. Insulin receptor: structure and function. **Endocr. Rev.**, v.2, n.3, p.251-63, 1981.

JORDAN, B. A.; GOMES, I.; RIOS, C.; FILIPOVSKA, J.; DEVI, L. A. Functional interactions between μ opioid and α 2A-adrenergic receptors. **Mol. Pharmacol.**, v.64, n.6, p.1317-24, 2003.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v.444, n.7121, p.840-6, 2006.

KANETO, H.; NAKATANI, Y.; MIYATSUKA, T.; KAWAMORI, D.; MATSUOKA, T. A.; MATSUHISA, M.; KAJIMOTO, Y.; ICHIJO, H.; YAMASAKI, Y.; HORI, M. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. **Nat. Med.**, v.10, n.10, p.1128-32, 2004.

KANZAKI, M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. **Endocr. J.**, v.53, n.3, p.267-93, 2006.

KARALIS, K. P.; GIANNOGONAS, P.; KODELA, E.; KOUTMANI, Y.; ZOUMAKIS, M.; TELI, T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. **FEBS J.**, v.276, n.20, p.5747-54, 2009.

KASUGA, M.; KARLSSON, F. A.; KAHN, C. R. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science**, v.215, n.4529, p.185-7, 1982.

KESSLER, B. M.; GLAS, R.; PLOEGH, H. L. MHC class I antigen processing regulated by cytosolic proteolysis-short cuts that alter peptide generation. **Mol. Immunol.**, v.39, n.3-4, p.171-9, 2002.

KHEIFETS, V.; BRIGHT, R.; INAGAKI, K.; SCHECHTMAN, D.; MOCHLY-ROSEN, D. Protein kinase C delta (deltaPKC)-annexin V interaction: a required step in deltaPKC translocation and function. **J. Biol. Chem.**, v.281, n.32, p.23218-26, 2006.

KHOLODENKO, B. N. Cell-signalling dynamics in time and space. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.7, n.3, p.165-76, 2006.

KIM, J. K.; KIM, Y. J.; FILLMORE, J. J.; CHEN, Y.; MOORE, I.; LEE, J.; YUAN, M.; LI, Z. W.; KARIN, M.; PERRET, P.; SHOELSON, S. E.; SHULMAN, G. I. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. **J. Clin. Invest.**, v.108, n.3, p.437-46, 2001.

KIM, J. Y.; VAN DE WALL, E.; LAPLANTE, M.; AZZARA, A.; TRUJILLO, M. E.; HOFMANN, S. M.; SCHRAW, T.; DURAND, J. L.; LI, H.; LI, G.; JELICKS, L. A.; MEHLER, M. F.; HUI, D. Y.; DESHAIES, Y.; SHULMAN, G. I.; SCHWARTZ, G. J.; SCHERER, P. E. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. **J. Clin. Invest.**, v.117, n.9, p.2621-37, 2007.

KOLTERMAN, O. G.; INSEL, J.; SAEKOW, M.; OLEFSKY, J. M. Mechanisms of insulin resistance in human obesity: evidence for receptor and postreceptor defects. **J. Clin. Invest.**, v.65, n.6, p.1272-84, 1980.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v.404, n.6778, p.635-43, 2000.

KRAEGEN, E. W.; COONEY, G. J.; TURNER, N. Muscle insulin resistance: a case of fat overconsumption, not mitochondrial dysfunction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.105, n.22, p.7627-8, 2008.

KRONER, Z. The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? **Altern. Med. Rev.**, v.14, n.4, p.373-9, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-5, 1970.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M. C.; BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZHUGH, W.; FUNKE, R.; GAGE, D.; HARRIS, K.; HEAFORD, A.; HOWLAND, J.; KANN, L.; LEHOCZKY, J.; LEVINE, R.; MCEWAN, P.; MCKERNAN, K.; MELDRIM, J.; MESIROV, J. P.; MIRANDA, C.; MORRIS, W.; NAYLOR, J.; RAYMOND, C.; ROSETTI, M.; SANTOS, R.; SHERIDAN, A.; SOUGNEZ, C.; STANGE-THOMANN, N.; STOJANOVIC, N.; SUBRAMANIAN, A.; WYMAN, D.; ROGERS, J.; SULSTON, J.; AINSCOUGH, R.; BECK, S.; BENTLEY, D.; BURTON, J.; CLEE, C.; CARTER, N.; COULSON, A.; DEADMAN, R.; DELOUKAS, P.; DUNHAM, A.; DUNHAM, I.; DURBIN, R.; FRENCH, L.; GRAFHAM, D.; GREGORY, S.; HUBBARD, T.; HUMPHRAY, S.; HUNT, A.; JONES, M.; LLOYD, C.; MCMURRAY, A.; MATTHEWS, L.; MERCER, S.; MILNE, S.; MULLIKIN, J. C.; MUNGALL, A.; PLUMB, R.; ROSS, M.; SHOWNKEEN, R.; SIMS, S.; WATERSTON, R. H.; WILSON, R. K.; HILLIER, L. W.; MCPHERSON, J. D.; MARRA, M. A.; MARDIS, E. R.; FULTON, L. A.; CHINWALLA, A. T.; PEPIN, K. H.; GISH, W. R.; CHISSOE, S. L.; WENDL, M. C.; DELEHAUNTY, K. D.; MINER, T. L.; DELEHAUNTY, A.; KRAMER, J. B.; COOK, L. L.; FULTON, R. S.; JOHNSON, D. L.; MINX, P. J.; CLIFTON, S. W.; HAWKINS, T.; BRANSCOMB, E.; PREDKI, P.; RICHARDSON, P.; WENNING, S.; SLEZAK, T.; DOGGETT, N.; CHENG, J. F.; OLSEN, A.; LUCAS, S.; ELKIN, C.; UBERBACHER, E.; FRAZIER, M.; GIBBS, R. A.; MUZNY, D. M.; SCHERER, S. E.; BOUCK, J. B.; SODERGREN, E. J.; WORLEY, K. C.; RIVES, C. M.; GORRELL, J. H.; METZKER, M. L.; NAYLOR, S. L.; KUCHERLAPATI, R. S.; NELSON, D. L.; WEINSTOCK, G. M.; SAKAKI, Y.; FUJIYAMA, A.; HATTORI, M.; YADA, T.; TOYODA, A.; ITOH, T.; KAWAGOE, C.; WATANABE, H.; TOTOKI, Y.; TAYLOR, T.; WEISSENBAACH, J.; HEILIG, R.; SAURIN, W.; ARTIGUENAVE, F.; BROTTIER, P.; BRULS, T.; PELLETIER, E.; ROBERT, C.; WINCKER, P.; SMITH, D. R.; DOUCETTE-STAMM, L.; RUBENFIELD, M.; WEINSTOCK, K.; LEE, H. M.; DUBOIS, J.; ROSENTHAL, A.; PLATZER, M.; NYAKATURA, G.; TAUDIEN, S.; RUMP, A.; YANG, H.; YU, J.; WANG, J.; HUANG, G.; GU, J.; HOOD, L.; ROWEN, L.; MADAN, A.; QIN, S.; DAVIS, R. W.; FEDERSPIEL, N. A.; ABOLA, A. P.; PROCTOR, M. J.; MYERS, R. M.; SCHMUTZ, J.; DICKSON, M.; GRIMWOOD, J.; COX, D. R.; OLSON, M. V.; KAUL, R.; SHIMIZU, N.; KAWASAKI, K.; MINOSHIMA, S.; EVANS, G. A.; ATHANASIOU, M.; SCHULTZ, R.; ROE, B. A.; CHEN, F.; PAN, H.; RAMSER, J.; LEHRACH, H.; REINHARDT, R.; MCCOMBIE, W. R.; DE LA BASTIDE, M.; DEDHIA, N.; BLOCKER, H.; HORNISCHER, K.; NORDSIEK, G.; AGARWALA, R.; ARAVIND, L.; BAILEY, J. A.; BATEMAN, A.; BATZOGLOU, S.; BIRNEY, E.; BORK, P.; BROWN, D. G.; BURGE, C. B.; CERUTTI, L.; CHEN, H. C.; CHURCH, D.; CLAMP, M.; COPLEY, R. R.; DOERKS, T.; EDDY, S. R.; EICHLER, E. E.; FUREY, T. S.; GALAGAN, J.; GILBERT, J. G.; HARMON, C.; HAYASHIZAKI, Y.; HAUSSLER, D.; HERMJAKOB, H.; HOKAMP, K.; JANG, W.; JOHNSON, L. S.; JONES, T. A.; KASIF, S.; KASPRYZK, A.; KENNEDY, S.; KENT, W. J.; KITTS, P.; KOONIN, E. V.; KORF, I.; KULP, D.; LANCET, D.; LOWE, T. M.; MCLYSAGHT, A.; MIKKELSEN, T.; MORAN, J. V.; MULDER, N.; POLLARA, V. J.; PONTING, C. P.; SCHULER, G.; SCHULTZ, J.; SLATER, G.; SMIT, A. F.; STUPKA, E.; SZUSTAKOWSKI, J.; THIERRY-MIEG, D.; THIERRY-MIEG, J.; WAGNER, L.; WALLIS, J.; WHEELER, R.; WILLIAMS, A.; WOLF, Y. I.; WOLFE, K. H.; YANG, S. P.; YEH, R. F.; COLLINS, F.; GUYER, M. S.;

PETERSON, J.; FELSENFELD, A.; WETTERSTRAND, K. A.; PATRINOS, A.; MORGAN, M. J.; DE JONG, P.; CATANESE, J. J.; OSOEGAWA, K.; SHIZUYA, H.; CHOI, S.; CHEN, Y. J. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v.409, n.6822, p.860-921, 2001.

LARON, Z. Insulin and the brain. **Arch. Physiol. Biochem.**, v.115, n.2, p.112-6, 2009.

LAUSTSEN, P. G.; MICHAEL, M. D.; CRUTE, B. E.; COHEN, S. E.; UEKI, K.; KULKARNI, R. N.; KELLER, S. R.; LIENHARD, G. E.; KAHN, C. R. Lipoatrophic diabetes in *Irs1(-)/Irs3(-)* double knockout mice. **Genes Dev.**, v.16, n.24, p.3213-22, 2002.

LAZAR, D. F.; WIESE, R. J.; BRADY, M. J.; MASTICK, C. C.; WATERS, S. B.; YAMAUCHI, K.; PESSIN, J. E.; CUATRECASAS, P.; SALTIEL, A. R. Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. **J. Biol. Chem.**, v.270, n.35, p.20801-7, 1995.

LE GOOD, J. A.; ZIEGLER, W. H.; PAREKH, D. B.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; PARKER, P. J. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. **Science**, v.281, n.5385, p.2042-5, 1998.

LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L. Slowing muscle atrophy: putting the brakes on protein breakdown. **J. Physiol.**, v.545, n.Pt 3, p.729, 2002.

LEE, Y. H.; GIRAUD, J.; DAVIS, R. J.; WHITE, M. F. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.5, p.2896-902, 2003.

LIAN, J.; YAN, X. H.; PENG, J.; JIANG, S. W. The mammalian target of rapamycin pathway and its role in molecular nutrition regulation. **Mol. Nutr. Food Res.**, v.52, n.4, p.393-9, 2008.

LIMA, F. B.; BAO, S.; GARVEY, W. T. Biological actions of insulin are differentially regulated by glucose and insulin in primary cultured adipocytes. Chronic ability to increase glycogen synthase activity. **Diabetes**, v.43, n.1, p.53-62, 1994.

LIN, X.; TAGUCHI, A.; PARK, S.; KUSHNER, J. A.; LI, F.; LI, Y.; WHITE, M. F. Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in beta cells and brain causes obesity and diabetes. **J. Clin. Invest.**, v.114, n.7, p.908-16, 2004.

LIN, Y.; BERG, A. H.; IYENGAR, P.; LAM, T. K.; GIACCA, A.; COMBS, T. P.; RAJALA, M. W.; DU, X.; ROLLMAN, B.; LI, W.; HAWKINS, M.; BARZILAI, N.; RHODES, C. J.; FANTUS, I. G.; BROWNLEE, M.; SCHERER, P. E. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. **J. Biol. Chem.**, v.280, n.6, p.4617-26, 2005.

LINDSAY, M. A. Peptide-mediated cell delivery: application in protein target validation. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v.2, n.5, p.587-94, 2002.

LINK, A. J.; LABAER, J. In-gel trypsin digest of gel-fractionated proteins. **CSH Protoc.**, v.2009, n.2, p.pdb prot5110, 2009.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v.46, n.1-3, p.3-26, 2001.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; BONIFACINO, J. S.; YUAN, L. C.; KLAUSNER, R. D. Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins. **Cell**, v.54, n.2, p.209-20, 1988.

MACHADO, M. F.; CUNHA, F. M.; BERTI, D. A.; HEIMANN, A. S.; KLITZKE, C. F.; RIOLI, V.; OLIVEIRA, V.; FERRO, E. S. Substrate phosphorylation affects degradation and interaction to endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.339, n.2, p.520-5, 2006.

MAEGAWA, H.; OLEFSKY, J. M.; THIES, S.; BOYD, D.; ULLRICH, A.; MCCLAIN, D. A. Insulin receptors with defective tyrosine kinase inhibit normal receptor function at the level of substrate phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v.263, n.25, p.12629-37, 1988.

MAEHAMA, T.; DIXON, J. E. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. **Trends Cell Biol.**, v.9, n.4, p.125-8, 1999.

MARSHALL, S.; OLEFSKY, J. M. Effects of insulin incubation on insulin binding, glucose transport, and insulin degradation by isolated rat adipocytes. Evidence for hormone-induced desensitization at the receptor and postreceptor level. **J. Clin. Invest.**, v.66, n.4, p.763-72, 1980.

MARTIN, K. A.; BLENIS, J. Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways. **Adv. Cancer Res.**, v.86, p.1-39, 2002.

MATSUDA, K.; WADA, K.; MIURA, T.; MARUYAMA, K.; SHIMAKURA, S. I.; UCHIYAMA, M.; LEPRINCE, J.; TONON, M. C.; VAUDRY, H. Effect of the diazepam-binding inhibitor-derived peptide, octadecaneuropeptide, on food intake in goldfish. **Neuroscience**, v.150, n.2, p.425-32, 2007.

MAYER, B. J. SH3 domains: complexity in moderation. **J. Cell Sci.**, v.114, n.Pt 7, p.1253-63, 2001.

MCPHERSON, R.; GAUTHIER, A. Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. **Biochem. Cell Biol.**, v.82, n.1, p.201-11, 2004.

MIESEL, A.; MULLER, H.; THERMANN, M.; HEIDBREDER, M.; DOMINIAK, P.; RAASCH, W. Overfeeding-Induced Obesity in Spontaneously Hypertensive Rats: An Animal Model of the Human Metabolic Syndrome. **Ann. Nutr. Metab.**, v.56, n.2, p.127-142, 2010.

NASCIMENTO, F. D.; HAYASHI, M. A.; KERKIS, A.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E. B.; RADIS-BAPTISTA, G.; NADER, H. B.; YAMANE, T.; TERSARIOL, I. L.; KERKIS, I. Crotonamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. **J. Biol. Chem.**, v.282, n.29, p.21349-60, 2007.

NEWGARD, C. B.; BRADY, M. J.; O'DOHERTY, R. M.; SALTIEL, A. R. Organizing glucose disposal: emerging roles of the glycogen targeting subunits of protein phosphatase-1. **Diabetes**, v.49, n.12, p.1967-77, 2000.

NEWTON, A. C. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. **Biochem. J.**, v.370, n.Pt 2, p.361-71, 2003.

NIEDERMANN, G.; GEIER, E.; LUCCHIARI-HARTZ, M.; HITZIGER, N.; RAMSPERGER, A.; EICHMANN, K. The specificity of proteasomes: impact on MHC class I processing and presentation of antigens. **Immunol. Rev.**, v.172, p.29-48, 1999.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Image J**. Disponível em <<http://rsbweb.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 26 jan. 2009

NISWENDER, K. D.; BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. W. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. **Trends Endocrinol. Metab.**, v.15, n.8, p.362-9, 2004.

NISWENDER, K. D.; MORRISON, C. D.; CLEGG, D. J.; OLSON, R.; BASKIN, D. G.; MYERS, M. G., JR.; SEELEY, R. J.; SCHWARTZ, M. W. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. **Diabetes**, v.52, n.2, p.227-31, 2003.

NISWENDER, K. D.; SCHWARTZ, M. W. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. **Front. Neuroendocrinol.**, v.24, n.1, p.1-10, 2003.

OBICI, S.; ZHANG, B. B.; KARKANIAS, G.; ROSSETTI, L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. **Nat. Med.**, v.8, n.12, p.1376-82, 2002.

OLEFSKY, J. M.; GARVEY, W. T.; HENRY, R. R.; BRILLON, D.; MATTHAEI, S.; FREIDENBERG, G. R. Cellular mechanisms of insulin resistance in non-insulin-dependent (type II) diabetes. **Am. J. Med.**, v.85, n.5A, p.86-105, 1988.

ORLOWSKI, M. The multicatalytic proteinase complex (proteasome) and intracellular protein degradation: diverse functions of an intracellular particle. **J. Lab. Clin. Med.**, v.121, n.2, p.187-9, 1993.

ORLOWSKI, M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. **Biochemistry**, v.29, n.45, p.10289-97, 1990.

ORLOWSKI, M.; MICHAUD, C.; CHU, T. G. A soluble metalloendopeptidase from rat brain. Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. **Eur. J. Biochem.**, v.135, n.1, p.81-8, 1983.

PAWSON, T.; NASH, P. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. **Science**, v.300, n.5618, p.445-52, 2003.

PAWSON, T.; SCOTT, J. D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. **Science**, v.278, n.5346, p.2075-80, 1997.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v.106, n.2, p.165-9, 2000.

PETRESCU, A. D.; PAYNE, H. R.; BOEDECKER, A.; CHAO, H.; HERTZ, R.; BARTANA, J.; SCHROEDER, F.; KIER, A. B. Physical and functional interaction of Acyl-CoA-binding protein with hepatocyte nuclear factor-4 alpha. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.51, p.51813-24, 2003.

PICKART, C. M. Back to the future with ubiquitin. **Cell**, v.116, n.2, p.181-90, 2004.

PIEROTTI, A.; DONG, K. W.; GLUCKSMAN, M. J.; ORLOWSKI, M.; ROBERTS, J. L. Molecular cloning and primary structure of rat testes metalloendopeptidase EC 3.4.24.15. **Biochemistry**, v.29, n.45, p.10323-9, 1990.

PILKIS, S. J.; GRANNER, D. K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annu. Rev. Physiol.**, v.54, p.885-909, 1992.

PLUM, L.; BELGARDT, B. F.; BRUNING, J. C. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. **J. Clin. Invest.**, v.116, n.7, p.1761-6, 2006.

PORTARO, F. C.; GOMES, M. D.; CABRERA, A.; FERNANDES, B. L.; SILVA, C. L.; FERRO, E. S.; JULIANO, L.; DE CAMARGO, A. C. Thimet oligopeptidase and the stability of MHC class I epitopes in macrophage cytosol. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.255, n.3, p.596-601, 1999.

PRADA, P. O.; ZECCHIN, H. G.; GASPARETTI, A. L.; TORSONI, M. A.; UENO, M.; HIRATA, A. E.; COREZOLA DO AMARAL, M. E.; HOER, N. F.; BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. J. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**, v.146, n.3, p.1576-87, 2005.

QUEIROZ, J. C. F.; ALONSO-VALE, M. I. C.; CURI, R.; LIMA, F. B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.53, n.5, p.582-594, 2009.

QUINONES, Q. J.; DE RIDDER, G. G.; PIZZO, S. V. GRP78: a chaperone with diverse roles beyond the endoplasmic reticulum. **Histol. Histopathol.**, v.23, n.11, p.1409-16, 2008.

RAMMENSEE, H. G. Survival of the fitters. **Nature**, v.419, n.6906, p.443-5, 2002.

REITS, E.; GRIEKSPoor, A.; NEIJSEN, J.; GROOTHUIS, T.; JALINK, K.; VAN VEELEN, P.; JANSSEN, H.; CALAFAT, J.; DRIJFHOUT, J. W.; NEEFJES, J. Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. **Immunity**, v.18, n.1, p.97-108, 2003.

RIOLI, V.; GOZZO, F. C.; HEIMANN, A. S.; LINARDI, A.; KRIEGER, J. E.; SHIDA, C. S.; ALMEIDA, P. C.; HYSLOP, S.; EBERLIN, M. N.; FERRO, E. S. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.10, p.8547-55, 2003.

RIOLI, V.; KATO, A.; PORTARO, F. C.; CURY, G. K.; TE KAAT, K.; VINCENT, B.; CHECLER, F.; CAMARGO, A. C.; GLUCKSMAN, M. J.; ROBERTS, J. L.; HIROSE, S.; FERRO, E. S. Neuropeptide specificity and inhibition of recombinant isoforms of the endopeptidase 3.4.24.16 family: comparison with the related recombinant endopeptidase 3.4.24.15. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.250, n.1, p.5-11, 1998.

RIOS, C.; GOMES, I.; DEVI, L. A. mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. **Br. J. Pharmacol.**, v.148, n.4, p.387-95, 2006.

ROCK, K. L.; YORK, I. A.; SARIC, T.; GOLDBERG, A. L. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. **Adv. Immunol.**, v.80, p.1-70, 2002.

RODBELL, M. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. **J. Biol. Chem.**, v.239, p.375-80, 1964.

RODEN, M.; PRICE, T. B.; PERSEGHIN, G.; PETERSEN, K. F.; ROTHMAN, D. L.; CLINE, G. W.; SHULMAN, G. I. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. **J. Clin. Invest.**, v.97, n.12, p.2859-65, 1996.

ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; PRADA, P.; CINTRA, D. E.; ROCHA, G. Z.; MORAES, J. C.; FREDERICO, M. J.; DA LUZ, G.; PINHO, R. A.; CARVALHEIRA, J. B.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. A.; DE SOUZA, C. T. Inhibition of hypothalamic Foxo1 expression reduced food intake in diet-induced obesity rats. **J. Physiol.**, v.587, n.Pt 10, p.2341-51, 2009.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**, v.444, n.7121, p.847-53, 2006.
ROSEN, O. M. After insulin binds. **Science**, v.237, n.4821, p.1452-8, 1987.

ROSENMUND, C.; CARR, D. W.; BERGESON, S. E.; NILAVER, G.; SCOTT, J. D.; WESTBROOK, G. L. Anchoring of protein kinase A is required for modulation of AMPA/kainate receptors on hippocampal neurons. **Nature.**, v.368, n.6474, p.853-6, 1994.

ROTH, R. A.; CASSELL, D. J. Insulin receptor: evidence that it is a protein kinase. **Science**, v.219, n.4582, p.299-301, 1983.

ROTTER, V.; NAGAEV, I.; SMITH, U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.46, p.45777-84, 2003.

RUSSO, L. C.; GONI, C. N.; CASTRO, L. M.; ASEGA, A. F.; CAMARGO, A. C.; TRUJILLO, C. A.; ULRICH, H.; GLUCKSMAN, M. J.; SCAVONE, C.; FERRO, E. S. Interaction with calmodulin is important for the secretion of thimet oligopeptidase following stimulation. **FEBS J.**, v.276, n.16, p.4358-71, 2009.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, n.6865, p.799-806, 2001.

SALTIEL, A. R.; PESSIN, J. E. Insulin signaling pathways in time and space. **Trends Cell. Biol.**, v.12, n.2, p.65-71, 2002.

SANCHEZ, C.; LACHAIZE, C.; JANODY, F.; BELLON, B.; RODER, L.; EUZENAT, J.; RECHENMANN, F.; JACQ, B. Grasping at molecular interactions and genetic networks in *Drosophila melanogaster* using FlyNets, an Internet database. **Nucleic. Acids. Res.**, v.27, n.1, p.89-94, 1999.

SANTOMAURO, A. T.; BODEN, G.; SILVA, M. E.; ROCHA, D. M.; SANTOS, R. F.; URSICH, M. J.; STRASSMANN, P. G.; WAJCHENBERG, B. L. Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects. **Diabetes**, v.48, n.9, p.1836-41, 1999.

SARBASSOV, D. D.; GUERTIN, D. A.; ALI, S. M.; SABATINI, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v.307, n.5712, p.1098-101, 2005.

SARIC, T.; GRAEF, C. I.; GOLDBERG, A. L. Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.45, p.46723-32, 2004.

SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v.103, n.2, p.211-25, 2000.

SCHWECHHEIMER, C.; DENG, X. W. COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. **Trends Cell. Biol.**, v.11, n.10, p.420-6, 2001.

SCOTT, J. D.; PAWSON, T. Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. **Science**, v.326, n.5957, p.1220-4, 2009.

SEIDAH, N. G.; CHRETIEN, M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. **Brain. Res.**, v.848, n.1-2, p.45-62, 1999.

SEIDAH, N. G.; PRAT, A. Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. **Essays Biochem.**, v.38, p.79-94, 2002.

SEIFERT, U.; MARANON, C.; SHMUELI, A.; DESOUTTER, J. F.; WESOLOSKI, L.; JANEK, K.; HENKLEIN, P.; DIESCHER, S.; ANDRIEU, M.; DE LA SALLE, H.; WEINSCHENK, T.; SCHILD, H.; LADERACH, D.; GALY, A.; HAAS, G.; KLOETZEL, P. M.; REISS, Y.; HOSMALIN, A. An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. **Nat. Immunol.**, v.4, n.4, p.375-9, 2003.

SHI, J.; KANDROR, K. V. Study of glucose uptake in adipose cells. **Methods Mol. Biol.**, v.456, p.307-15, 2008.

SHIMOMURA, I.; HAMMER, R. E.; RICHARDSON, J. A.; IKEMOTO, S.; BASHMAKOV, Y.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. **Genes Dev.**, v.12, n.20, p.3182-94, 1998.

SHRIMPTON, C. N.; ABBENANTE, G.; LEW, R. A.; SMITH, I. Development and characterization of novel potent and stable inhibitors of endopeptidase EC 3.4.24.15. **Biochem. J.**, v.345 Pt 2, p.351-6, 2000.

SHRIMPTON, C. N.; GLUCKSMAN, M. J.; LEW, R. A.; TULLAI, J. W.; MARGULIES, E. H.; ROBERTS, J. L.; SMITH, A. I. Thiol activation of endopeptidase EC 3.4.24.15. A novel mechanism for the regulation of catalytic activity. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.28, p.17395-9, 1997.

SILVA, C. L.; PORTARO, F. C.; BONATO, V. L.; DE CAMARGO, A. C.; FERRO, E. S. Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15), a novel protein on the route of MHC class I antigen presentation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.255, n.3, p.591-5, 1999.

SIPOLS, A. J.; BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. W. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. **Diabetes**, v.44, n.2, p.147-51, 1995.

SOUGHAYER, J. S.; WANG, Y.; LI, H.; CHEUNG, S. H.; ROSSI, F. M.; STANBRIDGE, E. J.; SIMS, C. E.; ALLBRITTON, N. L. Characterization of TAT-mediated transport of detachable kinase substrates. **Biochemistry**, v.43, n.26, p.8528-40, 2004.

SOVIK, O.; VESTERGAARD, H.; TRYGSTAD, O.; PEDERSEN, O. Studies of insulin resistance in congenital generalized lipodystrophy. **Acta. Paediatr. Suppl.**, v.413, p.29-37, 1996.

STEBBINS, J. L.; DE, S. K.; MACHLEIDT, T.; BECATTINI, B.; VAZQUEZ, J.; KUNTZEN, C.; CHEN, L. H.; CELLITTI, J. F.; RIEL-MEHAN, M.; EMDADI, A.; SOLINAS, G.; KARIN, M.; PELLECCIA, M. Identification of a new JNK inhibitor targeting the JNK-JIP interaction site. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.105, n.43, p.16809-13, 2008.

STOLOVICH, M.; TANG, H.; HORNSTEIN, E.; LEVY, G.; COHEN, R.; BAE, S. S.; BIRNBAUM, M. J.; MEYUHAS, O. Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation. **Mol. Cell. Biol.**, v.22, n.23, p.8101-13, 2002.

STUDENT, A. K.; HSU, R. Y.; LANE, M. D. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. **J. Biol. Chem.**, v.255, n.10, p.4745-50, 1980.

STUMPF, M. P.; THORNE, T.; DE SILVA, E.; STEWART, R.; AN, H. J.; LAPPE, M.; WIUF, C. Estimating the size of the human interactome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.105, n.19, p.6959-64, 2008.

SUTHERLAND, C.; O'BRIEN, R. M.; GRANNER, D. K. New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v.351, n.1336, p.191-9, 1996.

SWEET, I. R.; MATSCHINSKY, F. M. Mathematical model of beta-cell glucose metabolism and insulin release. I. Glucokinase as glucosensor hypothesis. **Am. J. Physiol.**, v.268, n.4 Pt 1, p.E775-88, 1995.

TAGER, H.; GIVEN, B.; BALDWIN, D.; MAKU, M.; MARKESE, J.; RUBENSTEIN, A.; OLEFSKY, J.; KOBAYASHI, M.; KOLTERMAN, O.; POUCHER, R. A structurally abnormal insulin causing human diabetes. **Nature**, v.281, n.5727, p.122-5, 1979.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nat. Rev Mol. Cell. Biol.**, v.7, n.2, p.85-96, 2006.

TAUBES, G. Insulin resistance. Prosperity's plague. **Science**, v.325, n.5938, p.256-60, 2009.

TYAGI, M.; RUSNATI, M.; PRESTA, M.; GIACCA, M. Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.5, p.3254-61, 2001.

UEKI, K.; KONDO, T.; KAHN, C. R. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. **Mol. Cell. Biol.**, v.24, n.12, p.5434-46, 2004.

VAN DE LOOSDRECHT, A. A.; NENNIE, E.; OSSENKOPPELE, G. J.; BEELEN, R. H.; LANGENHUIJSEN, M. M. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **J. Immunol. Methods**, v.141, n.1, p.15-22, 1991.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; SMITH, H. O.; YANDELL, M.; EVANS, C. A.; HOLT, R. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P.; BALLEW, R. M.; HUSON, D. H.; WORTMAN, J. R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C. D.; ZHENG, X. H.; CHEN, L.; SKUPSKI, M.; SUBRAMANIAN, G.; THOMAS, P. D.; ZHANG, J.; GABOR MIKLOS, G. L.; NELSON, C.; BRODER, S.; CLARK, A. G.; NADEAU, J.; MCKUSICK, V. A.; ZINDER, N.; LEVINE, A. J.; ROBERTS, R. J.; SIMON, M.; SLAYMAN, C.; HUNKAPILLER, M.; BOLANOS, R.; DELCHER, A.; DEW, I.; FASULO, D.; FLANIGAN, M.; FLOREA, L.; HALPERN, A.; HANNENHALLI, S.; KRAVITZ, S.; LEVY, S.; MOBARRY, C.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; ABU-THREIDEH, J.; BEASLEY, E.; BIDDICK, K.; BONAZZI, V.; BRANDON, R.; CARGILL, M.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHARLAB, R.; CHATURVEDI, K.; DENG, Z.; DI FRANCESCO, V.; DUNN, P.; EILBECK, K.; EVANGELISTA, C.; GABRIELIAN, A. E.; GAN, W.; GE, W.; GONG, F.; GU, Z.; GUAN, P.; HEIMAN, T. J.; HIGGINS, M. E.; JI, R. R.; KE, Z.; KETCHUM, K. A.; LAI, Z.; LEI, Y.; LI, Z.; LI, J.; LIANG, Y.; LIN, X.; LU, F.; MERKULOV, G. V.; MILSHINA, N.; MOORE, H. M.; NAIK, A. K.; NARAYAN, V. A.; NEELAM, B.; NUSSKERN, D.; RUSCH, D. B.; SALZBERG, S.; SHAO, W.; SHUE, B.; SUN, J.; WANG, Z.; WANG, A.; WANG, X.; WANG, J.; WEI, M.; WIDES, R.; XIAO, C.; YAN, C.; YAO, A.; YE, J.; ZHAN, M.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHONG, F.; ZHONG, W.; ZHU, S.; ZHAO, S.; GILBERT, D.; BAUMHUETER, S.; SPIER, G.; CARTER, C.; CRAVCHIK, A.; WOODAGE, T.; ALI, F.; AN, H.; AWE, A.; BALDWIN, D.; BADEN, H.; BARNSTEAD, M.; BARROW, I.; BEESON, K.; BUSAM, D.; CARVER, A.; CENTER, A.; CHENG, M. L.; CURRY, L.; DANAHER, S.; DAVENPORT, L.; DESILETS, R.; DIETZ, S.; DODSON, K.; DOUP, L.; FERRIERA, S.; GARG, N.; GLUECKSMANN, A.; HART, B.; HAYNES, J.; HAYNES, C.; HEINER, C.; HLADUN, S.; HOSTIN, D.; HOUCK, J.; HOWLAND, T.; IBEGWAM, C.; JOHNSON, J.; KALUSH, F.; KLINE, L.; KODURU, S.; LOVE, A.; MANN, F.; MAY, D.; MCCAWLEY, S.; MCINTOSH, T.; MCMULLEN, I.; MOY, M.; MOY, L.; MURPHY, B.; NELSON, K.; PFANNKUCH, C.; PRATTS, E.; PURI, V.; QURESHI, H.; REARDON, M.; RODRIGUEZ, R.; ROGERS, Y. H.; ROMBLAD, D.; RUHFEL, B.; SCOTT, R.; SITTER, C.; SMALLWOOD, M.; STEWART, E.; STRONG, R.; SUH, E.; THOMAS, R.; TINT, N. N.; TSE, S.; VECH, C.; WANG, G.; WETTER, J.; WILLIAMS, S.; WILLIAMS, M.; WINDSOR, S.; WINN-DEEN, E.; WOLFE, K.; ZAVERI, J.; ZAVERI, K.; ABRIL, J. F.; GUIGO, R.; CAMPBELL, M. J.; SJOLANDER, K. V.; KARLAK, B.;

KEJARIWAL, A.; MI, H.; LAZAREVA, B.; HATTON, T.; NARECHANIA, A.; DIEMER, K.; MURUGANUJAN, A.; GUO, N.; SATO, S.; BAFNA, V.; ISTRAIL, S.; LIPPERT, R.; SCHWARTZ, R.; WALENZ, B.; YOOSEPH, S.; ALLEN, D.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BLICK, L.; CAMINHA, M.; CARNES-STINE, J.; CAULK, P.; CHIANG, Y. H.; COYNE, M.; DAHLKE, C.; MAYS, A.; DOMBROSKI, M.; DONNELLY, M.; ELY, D.; ESPARHAM, S.; FOSLER, C.; GIRE, H.; GLANOWSKI, S.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GOROKHOV, M.; GRAHAM, K.; GROPMAN, B.; HARRIS, M.; HEIL, J.; HENDERSON, S.; HOOVER, J.; JENNINGS, D.; JORDAN, C.; JORDAN, J.; KASHA, J.; KAGAN, L.; KRAFT, C.; LEVITSKY, A.; LEWIS, M.; LIU, X.; LOPEZ, J.; MA, D.; MAJOROS, W.; MCDANIEL, J.; MURPHY, S.; NEWMAN, M.; NGUYEN, T.; NGUYEN, N.; NODELL, M.; PAN, S.; PECK, J.; PETERSON, M.; ROWE, W.; SANDERS, R.; SCOTT, J.; SIMPSON, M.; SMITH, T.; SPRAGUE, A.; STOCKWELL, T.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, M.; WEN, M.; WU, D.; WU, M.; XIA, A.; ZANDIEH, A.; ZHU, X. The sequence of the human genome. **Science**, v.291, n.5507, p.1304-51, 2001.

VICINI, P.; CAUMO, A.; COBELLI, C. The hot IVGTT two-compartment minimal model: indexes of glucose effectiveness and insulin sensitivity. **Am. J. Physiol.**, v.273, n.5 Pt 1, p.E1024-32, 1997.

VITSEVA, O. I.; TANRIVERDI, K.; TCHKONIA, T. T.; KIRKLAND, J. L.; MCDONNELL, M. E.; APOVIAN, C. M.; FREEDMAN, J.; GOKCE, N. Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue. **Obesity (Silver Spring)**, v.16, n.5, p.932-7, 2008.

WADIA, J. S.; DOWDY, S. F. Protein transduction technology. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.13, n.1, p.52-6, 2002.

WANG, Q.; SOMWAR, R.; BILAN, P. J.; LIU, Z.; JIN, J.; WOODGETT, J. R.; KLIP, A. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. **Mol. Cell. Biol.**, v.19, n.6, p.4008-18, 1999.

WATSON, R. T.; PESSIN, J. E. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. **Recent. Prog. Horm. Res.**, v.56, p.175-93, 2001.

WIDEN, E.; EKSTRAND, A.; SALORANTA, C.; FRANSSILA-KALLUNKI, A.; ERIKSSON, J.; SCHALIN-JANTTI, C.; GROOP, L. Insulin resistance in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients with hypertriglyceridaemia. **Diabetologia**, v.35, n.12, p.1140-5, 1992.

WIJESEKARA, N.; KONRAD, D.; EWEIDA, M.; JEFFERIES, C.; LIADIS, N.; GIACCA, A.; CRACKOWER, M.; SUZUKI, A.; MAK, T. W.; KAHN, C. R.; KLIP, A.; WOO, M. Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes. **Mol. Cell. Biol.**, v.25, n.3, p.1135-45, 2005.

WING, S. S. The UPS in diabetes and obesity. **BMC Biochem.**, v.9, p.S6, 2008. Suplemento 1.

WOJCIK, C.; DEMARTINO, G. N. Intracellular localization of proteasomes. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.35, n.5, p.579-89, 2003.

WOODS, S. C.; D'ALESSIO, D. A. Central control of body weight and appetite. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.93, n.11 Suppl 1, p.S37-50, 2008.

YAFFE, M. B. The p47phox PX domain: two heads are better than one! **Structure**, v.10, n.10, p.1288-90, 2002.

YAFFE, M. B.; SMERDON, S. J. PhosphoSerine/threonine binding domains: you can't pSERious? **Structure**, v.9, n.3, p.R33-8, 2001.

YATES, J. R., 3RD; ENG, J. K.; MCCORMACK, A. L.; SCHIELTZ, D. Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. **Anal. Chem.**, v.67, n.8, p.1426-36, 1995.

YOON, J. C.; PUIGSERVER, P.; CHEN, G.; DONOVAN, J.; WU, Z.; RHEE, J.; ADELMANT, G.; STAFFORD, J.; KAHN, C. R.; GRANNER, D. K.; NEWGARD, C. B.; SPIEGELMAN, B. M. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. **Nature**, v.413, n.6852, p.131-8, 2001.

YANG, Y.; MA, J.; SONG, Z.; WU, M. HIV-1 TAT-mediated protein transduction and subcellular localization using novel expression vectors. **FEBS Lett.**, v.532, n.1-2, p.36-44, 2002.

YORK, I. A.; MO, A. X.; LEMERISE, K.; ZENG, W.; SHEN, Y.; ABRAHAM, C. R.; SARIC, T.; GOLDBERG, A. L.; ROCK, K. L. The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. **Immunity**, v.18, n.3, p.429-40, 2003.

YOUNGREN, J. F. Regulation of insulin receptor function. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v.64, n.7-8, p.873-91, 2007.

YUAN, M.; KONSTANTOPOULOS, N.; LEE, J.; HANSEN, L.; LI, Z. W.; KARIN, M.; SHOELSON, S. E. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. **Science**, v.293, n.5535, p.1673-7, 2001.

ZHANG, H. H.; HUANG, J.; DUVEL, K.; BOBACK, B.; WU, S.; SQUILLACE, R. M.; WU, C. L.; MANNING, B. D. Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. **PLoS One**, v.4, n.7, p.e6189, 2009.

ZIEGLER, A.; NERVI, P.; DURRENBERGER, M.; SEELIG, J. The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence. **Biochemistry**, v.44, n.1, p.138-48, 2005.

ZUNIGA-GUARJARDO, S.; STEINER, G.; SHUMAK, S.; ZINMAN, B. Insulin resistance and action in hypertriglyceridemia. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v.14, n.1, p.55-61, 1991.