RAQUEL SALDANHA CAMPELLO

**REFEIÇÕES RICAS EM CARBOIDRATOS
OU LIPÍDEOS DIMINUEM A SENSIBILIDADE
À INSULINA DUAS HORAS APÓS O
INÍCIO DA INGESTÃO**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para a obtenção do título
de Mestre.

Área de concentração:
Fisiologia Humana

Orientador:
Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado

São Paulo

2009

RESUMO

CAMPELLO, R.S. **Refeições ricas em carboidratos ou lipídeos diminuem a sensibilidade à insulina duas horas após o início da ingestão.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

No presente trabalho, o efeito agudo de refeições compostas predominantemente por carboidratos e lipídeos sobre a sensibilidade à insulina foi avaliado in vivo. Além disso, investigou-se a proteína GLUT4 em músculo esquelético gastrocnêmio (MEG) e tecido adiposo branco epididimal (TAB), tanto o conteúdo como a distribuição subcelular (microsoma e membrana plasmática). Ratos Wistar com dois meses de idade, após jejum de 24 horas, foram realimentados com: refeição balanceada (B, realimentados com ração padrão); refeição rica em carboidrato (C, realimentados com torrada) e refeição rica em lipídeo (L, realimentados com toucinho); e foram avaliados nos tempos 1, 2, 4 ou 6 horas de realimentação. A partir dos valores de glicemia e insulinemia em cada tempo, o índice glicose/insulina revelou que os grupos C e L apresentavam um estado de resistência à insulina 2 horas após o início da ingestão. No teste de tolerância à insulina (ITT), uma redução (~ 47%) na sensibilidade à insulina foi observada no grupo C após 2 e 4 horas de realimentação. Por meio de teste de tolerância à glicose, realizado 2 horas após início da ingestão, a relação entre a área sob a curva da insulinemia e a área sob a curva da glicemia confirmou estado de resistência à insulina nos grupos C e L. Por *Western blotting*, verificou-se que as refeições não alteraram o conteúdo da proteína GLUT4 nas diferentes frações de membrana, tanto em músculo como em tecido adiposo, nos momentos em que se verificou alteração na sensibilidade à insulina. Estes resultados indicam que, em ratos, refeições não balanceadas, seja com alto teor de carboidrato seja com alto teor de lipídeo, induzem menor sensibilidade à insulina 2 horas após início da ingestão, e este fenômeno não envolve alterações no conteúdo de GLUT4 nos tecidos muscular e adiposo.

Palavras-chave: Sensibilidade à insulina; GLUT4; Refeições; Carboidrato; Lipídeo.

ABSTRACT

CAMPELLO, R.S. High carbohydrate or high fat meals decrease insulin sensitivity two hours after the start of ingestion. Master thesis (Human Physiology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

This study evaluated the acute effect of a high carbohydrate meal and a high fat meal on the insulin sensitivity and on the content and distribution of GLUT4 protein (plasma sample membrane and microsomal-enriched fractions) in the gastrocnemius skeletal muscle and white adipose tissues. Male Wistar rats fasted for 24 hours, were refeeding for 1, 2, 4 or 6 hours with one of the three meals: balanced meal (B-group, refeed with standard meal); high carbohydrate meal (C-group, refeed with toast) and high fat meal (L-group, refeed with lard). Both C and L-groups exhibited insulin resistance after 2 hours of refeeding (Glucose/insulin index). In the insulin tolerance test (ITT), a reduction (~47%) in the insulin sensitivity was observed in C group after 2 and 4 hours of refeeding. According to the glucose tolerance test (performed 2 hours after the ingestion) the relation between the area under the curve of plasmatic insulin and the area under the curve of plasmatic glucose, confirmed the insulin resistance in C and L-groups. Through the Western blotting analyses it could be demonstrated that the meals did not alter the GLUT4 content on the different membrane fractions in both skeletal and adipose tissue when insulin sensitivity was diminished. These results suggest that imbalanced meals with high carbohydrate or fat concentration leads to minor insulin sensitivity after 2 hours of ingestion and such phenomena do not involve alteration in GLUT4 content in the muscle and adipose tissues.

Key words: Insulin sensitivity; GLUT4; Meals; Carbohydrate; Fat.

1 INTRODUÇÃO

A glicose é a principal fonte de energia em organismos eucariontes e exerce, portanto, um papel central no metabolismo e homeostasia celular. Entretanto, por ser uma molécula polar e insolúvel à bicamada lipídica da membrana plasmática, a glicose é transportada para o interior da célula através de proteínas carreadoras associadas à membrana, designadas como transportadores de glicose (SCHEEPERS, 2004).

Existem duas classes de proteínas carreadoras de glicose: um sistema de transporte acoplado ao sódio (SGLT- *Sodium Glucose Cotransporters*) e outro, facilitador do transporte de glicose (GLUT- *Glucose Transporters*). Ambos os tipos de transportadores pertencem a uma família de genes carreadores de soluto (SLC – *Solute Carriers*) (SCHEEPERS, 2004; MACHADO, 2006).

Os carreadores que promovem o transporte da glicose acoplado ao sódio, SGLTs (gene SLC5A), estão presentes na membrana apical das células epiteliais do intestino e túbulos renais, sendo importantes para a absorção e reabsorção de glicose, respectivamente. Estas proteínas realizam a captação do monossacarídeo para o meio intracelular contra seu gradiente de concentração, mas a favor de um gradiente eletroquímico de sódio, por um mecanismo de transporte ativo, onde há o transporte simultâneo de íons sódio e moléculas de glicose (WRIGHT *et al.*, 2004).

A outra classe de transportadores de glicose, GLUTs, constituem uma família de 12 isoformas mais um cotransportador de próton/mioinositol (HMIT), os quais podem ser divididos em 3 subclasses de acordo com a similaridade da sequência (JOOST & THORENS, 2001; JOOST *et al.*, 2002). Os membros desta família (gene SLC2A) realizam o transporte bidirecional da glicose (e outras hexoses), permitindo sua difusão facilitada e a favor do gradiente de concentração através da membrana plasmática das células (SCHEEPERS *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2006). Tais transportadores, designados numericamente de 1 a 12 conforme a ordem cronológica em que foram descritos, tiveram sua estrutura proposta por Mueckler e colaboradores (1985).

De acordo com o modelo proposto, estes carreadores possuem 12 segmentos transmembrânicos (S1-S12), hidrofóbicos, cujos aminoácidos apresentam sequências conservadas entre as diferentes isoformas (JOOST e THORENS, 2001). Os segmentos S1-

S12 são ligados por alças de conexão e as terminações NH₂ e COOH localizam-se no espaço intracelular (Figura 1) (SCHEEPERS *et al.*, 2004).

FIGURA 1: Estrutura bidimensional das proteínas transportadoras de glicose (GLUTs). Os círculos azuis representam os aminoácidos conservados nas diferentes isoformas. Adaptado (BRYANT *et al.*, 2002).

Apesar de pertencerem a mesma família, os GLUTs são expressos de forma tecido e célula-específica, sendo que mais de uma isoforma pode ser expressa no mesmo tecido. Além disso, diferem em suas características funcionais, exibindo afinidade por substratos e propriedades cinéticas distintas (MACHADO *et al.*, 2006; WOOD e TRAYHURN, 2003). Tal especificidade é determinada pela diferença das alças que conectam os segmentos transmembrânicos S1-S2 e S6-S7, bem como pelas terminações citoplasmáticas de cada isoforma (ULDRY e THORENS, 2004), assegurando assim que cada transportador exerça um específico papel na captação de glicose, permitindo uma regulação complexa da homeostasia glicêmica corporal sob diferentes condições fisiológicas (KANZAKI e PESSIN, 2001; SCHEEPERS *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2006).

Na década de 80, Cushman e Wardzala propuseram que na presença da insulina havia um aumento na translocação de transportadores de glicose para a membrana plasmática, caracterizando a partir de então o mecanismo de captação de glicose estimulada pela insulina. Este transportador, capaz de translocar para a membrana em resposta ao hormônio foi posteriormente clonado e designado como a isoforma 4 (GLUT4)

(FUKUMOTO *et al.*, 1989), sendo atualmente foco de estudos que buscam caracterizar os fluxos de glicose (MACHADO *et al.*, 2006).

O GLUT4 é caracterizado por sua preferencial expressão em músculo e tecido adiposo, sendo responsável pela captação de glicose estimulada pela insulina, bem como pela contração muscular (ZORZANO *et al.*, 2005; ZHAO e KEATING, 2007; WATSON e PESSIN, 2001; SILVA *et al.*, 2005).

Em células não estimuladas pelo hormônio, a maior proporção do transportador, principalmente em adipócitos, encontra-se no compartimento intracelular, sendo que o estímulo insulínico determina a translocação de vesículas contendo o GLUT4 em direção à membrana plasmática, aumentando agudamente a captação de glicose. Com a redução nos níveis circulantes de insulina, o GLUT4 é rapidamente removido da membrana plasmática e reciclado de volta ao seu compartimento intracelular, ficando estocado em vesículas intracelulares (ISHIKI e KLIP, 2006; MACHADO *et al.*, 2006).

Conforme descrito acima, esta proteína sofre uma dinâmica redistribuição dentro das células adiposa e muscular, alternando entre a membrana plasmática e vesículas intracelulares. Entretanto, para que ocorra a translocação das vesículas contendo o transportador até a superfície celular, se faz necessária a interação do hormônio ao seu receptor.

A insulina, produzida pela ilhota pancreática e estocada em grânulos secretórios, é um hormônio protéico constituído de duas cadeias polipeptídicas A e B ligadas por pontes dissulfeto, e sua secreção é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis pela célula B pancreática, sendo a glicose seu principal secretagogo (HABER *et al.*, 2001; GENUTH, 2004).

Com a elevação na concentração plasmática de glicose, esta é captada e metabolizada pelas células B, o que resulta em aumento na fração ATP/ADP, ocasionando o fechamento dos canais de potássio e a despolarização da membrana plasmática, com conseqüente abertura dos canais de cálcio sensíveis à voltagem. O aumento do influxo de cálcio na célula B favorece o processo exocitótico dos grânulos contendo insulina (HABER *et al.*, 2001, CARVALHEIRA *et al.*, 2002; GENUTH, 2004).

Após a secreção, a ação do hormônio tem início com a sua ligação ao receptor de membrana plasmática, sendo este uma glicoproteína constituída por duas subunidades α e

duas β , unidas por ligações dissulfeto, onde a subunidade α é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina, enquanto que a subunidade β atravessa a membrana celular, sendo responsável pela transmissão do sinal. A interação da insulina ao seu receptor resulta em uma alteração conformacional que retira o efeito inibitório da subunidade α sobre a β , permitindo que esta adquira atividade quinase, ocasionando a fosforilação em resíduos de tirosina do próprio receptor, processo este conhecido como autofosforilação (KASUGA *et al.*, 1982; KAHN, 1985; BJÖRNHOLM e ZIERATH, 2005).

Uma vez ativado, o receptor permite a ligação e fosforilação de vários substratos protéicos em tirosina dentre eles, a família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS (IRS – *insulin receptor substrate*). A fosforilação destas proteínas cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src2 (SH2), dentre estas se destaca a fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), uma serina/treonina quinase (KANZAKI, 2006; BIDDINGER e KAHN, 2006).

A ligação da PI3K ao IRS, permite a ativação do domínio catalítico da quinase, resultando na fosforilação de fosfoinositídeos e conseqüente formação de PIP3 (fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato), que atua na ativação da quinase dependente de fosfoinositídeos-1 (PDK1). Tal proteína está envolvida na fosforilação e ativação de várias quinases, incluindo Akt/PKB (*Protein Kinase B* ou Akt) e isoformas atípicas de proteínas kinases C, importantes para a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática, captação de glicose e síntese de glicogênio (CHANG *et al.*, 2004; KANZAKI, 2006).

Qualquer desordem nestes eventos que culminam com a translocação das vesículas contendo GLUT4 para a membrana pode resultar em resistência à insulina, que é caracterizada por uma reduzida capacidade dos tecidos sensíveis à insulina, no que diz respeito à captação de glicose, em responder a níveis normais do hormônio (SAVAGE *et al.*, 2007). Como consequência da diminuição na captação de glicose pelos tecidos, ocorre um aumento na secreção de insulina pelas células B pancreáticas, com o objetivo de manter os níveis de glicose circulantes normais. Entretanto, se esta hiperinsulinemia perdurar por muito tempo, pode evoluir para a falência das células B, resultando no estabelecimento do diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (DE FRONZO, 2004).

Inúmeros fatores ambientais podem levar ao desenvolvimento da resistência à insulina, dentre os quais, a elevada concentração plasmática de ácidos graxos livres (MARCHAND-BRUSTEL *et al.*, 2003; HOLLAND *et al.*, 2007). Entretanto, o mecanismo pelo qual se verifica tal alteração parece depender de vários fatores, tais como o acúmulo de metabólitos gerados (ceramida, acil-CoA, diacilglicerol e triacilglicerol), a composição fosfolipídica da membrana plasmática, além do tipo de ácido graxo predominante e o tempo de exposição (SAVAGE *et al.*, 2007).

Diante disto, vários estudos têm sido realizados para esclarecer como os ácidos graxos agem na sinalização da insulina nas células-alvo, buscando caracterizar seus efeitos agudos e crônicos.

O mecanismo responsável pela diminuição da captação de glicose induzida por ácidos graxos foi primeiramente proposto por Randle e colaboradores os quais, a partir de experimentos em músculos cardíaco e diafragmático isolados, introduziram o conceito do ciclo glicose-ácido graxo (ciclo de Randle), no qual os ácidos graxos competem com a glicose como substrato para oxidação. Através deste mecanismo, o aumento na oxidação dos ácidos graxos resulta em inibição das enzimas piruvato desidrogenase (PDH) e fosfofrutoquinase, ocasionando uma elevação nos níveis intracelulares de glicose 6 fosfato, que por sua vez exerce efeito inibitório sobre a hexoquinase, a primeira enzima da via glicolítica, com redução na captação e fosforilação da glicose (RANDLE *et al.*, 1963).

Entretanto, estudos posteriores têm demonstrado que na vigência de altas concentrações de ácidos graxos circulantes, o conteúdo intracelular de glicose 6 fosfato diminui, contradizendo a teoria proposta inicialmente por Randle (DRESNER *et al.*, 1999; YU *et al.*, 2002; CHAVEZ *et al.*, 2005). De acordo com estes autores, a resistência à insulina induzida por ácidos graxos ocorre principalmente no transporte de glicose, especialmente nos eventos da cascata de sinalização da insulina que culminam com a translocação das vesículas contendo GLUT4 para a membrana. Além disso, sugere-se que a alteração na sinalização do hormônio por ácidos graxos ocorra através de duas vias independentes, que resultam na inibição do IRS-1 ou da proteína Akt/PKB (CHAVEZ *et al.*, 2005).

Sabe-se que o acúmulo intracelular de DAG (diacilglicerol), um dos metabólitos gerados a partir dos ácidos graxos, está relacionado com a ativação de PKC (especialmente

a isoforma θ), enzima capaz de induzir a fosforilação do IRS-1 em serina/treonina, com conseqüente diminuição da fosforilação do substrato em tirosina. Diante disso, ocorre uma diminuição da associação IRS com PI3K, culminando em alteração nas etapas seguintes da via de sinalização da insulina, diminuindo assim a captação de glicose estimulada pelo hormônio (KIM *et al.*, 2004; SHULMAN, 2000; TIMMERS *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2002).

A outra via de inibição da resposta à insulina na presença de ácidos graxos ocorre graças ao acúmulo intracelular de ceramidas, um esfingolípídeo derivado da esfingomielina (fosfolípídeo presente na membrana celular), gerado a partir da ação de esfingomielinases, podendo também ser sintetizado endogenamente, tendo o palmitoilCoA como precursor (CORCORAN *et al.*, 2007). Tal esfingolípídeo é capaz de inibir tanto a captação de glicose em resposta à insulina, quanto a síntese de glicogênio (CHAVEZ *et al.*, 2003; CHAVEZ *et al.*, 2005; HOLLAND *et al.*, 2007; STRACZKOWSKI *et al.*, 2007). Estes efeitos parecem ser atribuídos à habilidade da ceramida em bloquear a ativação de Akt/PKB em resposta ao estímulo hormonal, sendo pela ativação da proteína fosfatase 2A (PP2A), que catalisa a desfosforilação de Akt/PKB, ou através da ativação de PKC zeta (PKC ζ), capaz de impedir a ativação e translocação de Akt/PKB para a membrana plasmática (CHAVEZ *et al.*, 2003; FOX *et al.*, 2007; HOLLAND *et al.*, 2008; POWELL *et al.*, 2003; STRATFORD *et al.*, 2004).

Sendo a glicose o principal secretagogo da insulina, a ingestão de carboidratos também exerce um importante papel nos mecanismos envolvidos na homeostasia glicêmica. Estudos demonstram que uma dieta rica em carboidratos pode resultar em hiperinsulinemia e resistência à insulina (KIM *et al.*, 1999; PAGLIASSOTTI, 2002; HUANG *et al.*, 2004), sendo que, em músculo e tecido adiposo, os mecanismos envolvidos parecem decorrer do aumento na concentração plasmática de triglicérides (PAGLIASSOTTI *et al.*, 1996). Além disso, sugere-se que a resistência à insulina na presença de altas concentrações de glicose pode ser mediada pelo aumento do influxo de glicose na via de biossíntese das hexosaminas, gerando metabólitos responsáveis pela diminuição da captação de glicose em resposta à insulina. (BARON *et al.*, 1995; HRESKO *et al.*, 1998; MARSHALL *et al.*, 1991). Entretanto, outros autores sugerem que a resistência à insulina na presença de glicose envolva mecanismos distintos da via de

biossíntese das hexosaminas, podendo resultar em menor ativação de Akt/PKB pela insulina (HAN *et al.*, 2003; NELSON *et al.*, 2002).

Conforme descrito anteriormente, a glicose é o principal secretagogo da insulina, sendo que a sua metabolização pelas células B ocasiona a liberação de cálcio intracelular, processo essencial para a exocitose dos grânulos contendo o hormônio. No que diz respeito à modulação da função da célula B pelos ácidos graxos, alguns autores relatam que os lipídeos exercem um importante papel na secreção de insulina basal no jejum, bem como na potencialização da secreção estimulada pela glicose (DOBBINS *et al.*, 1998; STEIN *et al.*, 1996). O mecanismo responsável pela secreção do hormônio na presença de ácidos graxos parece envolver, tanto a sua metabolização, quanto a formação de acilCoA, que é responsável pela acilação de proteínas que participam na regulação da atividade de canais iônicos e da exocitose (CORKEY *et al.*, 2000). Sugere-se ainda, que os ácidos graxos atuem na célula B pancreática através da sua ligação a GPR40 (receptores acoplados a proteína G), que são receptores de membrana presentes nas células do pâncreas. Schnell e colaboradores (2007) demonstraram que a ativação deste receptor por ácidos graxos resultou em aumento intracelular de cálcio, indicando uma possível participação na secreção do hormônio.

Com relação à estrutura dos ácidos graxos, sabe-se que sua capacidade de potencializar a secreção de insulina estimulada pela glicose aumenta com o tamanho da cadeia e o grau de saturação (DOBBINS *et al.*, 2002; GRAVENA *et al.*, 2002; MANCO *et al.*, 2004). Além disso, o tempo de exposição também influencia o padrão de secreção do hormônio, no qual, agudamente, os ácidos graxos aumentam a secreção de insulina (GRAVENA *et al.*, 2002), porém quando a exposição é prolongada, ocorre uma diminuição da sua liberação (CARPENTIER *et al.*, 2002).

Muito se tem investigado sobre a função dos ácidos graxos e dos carboidratos na secreção e ação da insulina, tanto aguda, quanto cronicamente. Porém, a grande maioria dos estudos relacionando os efeitos da manipulação de dietas sobre o controle glicêmico refere-se a efeitos crônicos, tornando de fundamental importância a análise da regulação aguda da homeostasia glicêmica em resposta a uma única refeição de diferente composição.

5 DISCUSSÃO

Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a composição da refeição oferecida durante a realimentação pós-jejum induz diferentes respostas na insulinemia, glicemia, concentração plasmática de ácidos graxos livres e conteúdo hepático de glicogênio. Nesta regulação, observa-se que refeições compostas preferencialmente por carboidratos ou lipídeos, quando comparadas com a refeição balanceada, ocasionam redução na sensibilidade à insulina 2 horas após o início da ingestão, e este efeito não envolve alteração de conteúdo ou capacidade de translocação do GLUT4.

REFERÊNCIAS*

ARMSTRONG R.B.; PHELPS, R.O. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. **Am. J. Anat.**, v.3, n.171, p. 259-272, 1984.

BARON, A.D.; ZHU, J.S.; ZHU, J.H.; WELDON, H.; MAIANU, L.; GARVEY, W.T. Glucosamine induces insulin resistance in vivo by affecting GLUT4 translocation in skeletal muscle. Implications for glucose toxicity. **J. Clin. Invest.**, v. 96, n.6, p. 2792–2801, 1995.

BESSESEN, D.H. The role of carbohydrates in insulin resistance. **J. Nutr.**, v. 131, n.10, p. 2782-2786, 2001.

BEZERRA, R.M.; UENO, M.; SILVA, M.S.; TAVARES, D.Q.; CORVALHO, C.O.; SAAD, M.J. A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. **J. Nutr.**, v. 130, n.6, p. 1531-1535, 2000.

BIDDINGER, S.B.; KAHN, C.R. From mice to men: Insights into the insulin resistance syndromes. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 68, p.123-158, 2006.

BIZEAU, M.E.; THRESHER, J.S.; PAGLIASSOTTI, M.J. Sucrose diets increase glucose-6-phosphatase and glucose release and decrease glucokinase in hepatocytes. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, n.5, p. 2041-2046, 2001.

BJÖRNHOLM, M.; ZIERATH, J.R. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, n.2, p. 354-357, 2005.

BODEN, G.; LEBED, B.; SCHATZ, M.; HOMKO, C.; LEMIEUX, S. Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. **Diabetes**, v. 50, n.7, p. 1612-1617, 2001.

BRYANT, N.J.; GOVERS, R.; JAMES, D.E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 3, n.4, p. 267-277, 2002.

CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J. Vias de sinalização da insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n.4, p. 419-425, 2002.

* De acordo com:

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

CARPENTIER, A.; MITTELMAN, S.; BERGMAN, R. Prolonged elevation of plasma free acids impairs pancreatic B-cell function in obese nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 49, n.3, p. 399-408, 2002.

CHANG, L.; CHIANG, S.; SALTIEL, AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. **Mol. Med.**, v. 10, n. 7-12, p. 65-71, 2004.

CHAVEZ, J.A.; KNOTTS, T.A.; WANG, L.; LI, G.; DOBROWSKY, R.T.; FLORANT, G.L.; SUMMERS, S.A. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n.12, p. 10297-10303, 2003.

CHAVEZ, J.A.; HOLLAND W.L.; BÄR J.; SANDHOFF, K.; SUMMERS, S.A. Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 20, p. 20148-20153, 2005.

CHROMY, V.; GERGEL, J.; VOZNICEK, J. Assay of serum free fatty acids by extraction-photometric procedure. **Clin. Chim. Acta**, v. 80, n. 2, p. 327-332, 1977.

CORCORAN, M.P.; LAMON-FAVA, S.; FIELDING, R.A. Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 85, n.3, p. 662-677, 2007.

CORKEY, B.E.; DEENEY, J.T.; YANEY, G.C.; TORNHEIM, K.; PRENTKI, M. The role of long-chain fatty acyl-coa esters in B-cell signal transduction. **J. Nutr.**, v. 130, n.2, p. 209-304, 2000.

CUSHMAN, S.; WARDZALA, L.J. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. **J. Biol. Chem.**, v. 255, n.10, p. 4758-4762, 1980.

DAUGAARD, J.R.; RICHTER, E.A. Relationship between muscle fibre composition, glucose transporter protein 4 and exercise training: possible consequences in non-insulin dependent diabetes mellitus. **Acta Physiol. Scand.**, v.171, n.3, p. 267-276, 2001.

DE CARVALHO, P.; VARGAS, A.M.; SILVA, J.L; NUNES, M.T.; MACHADO, U.F. GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. **Life Sci.**, v. 71, n.16, p. 1917-1928, 2002.

DEFRONZO, R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Med. Clin. North Am.**, v. 88, n.4, p. 787-835, 2004.

DOBBINS, R.; CHESTER, M.; DANIELS, M. Circulating fatty acids are essential for efficient glucose-stimulated insulin secretion after prolonged fasting in humans. **Diabetes**, v. 47, n.10, p. 1613-1618, 1998.

DOBBINS, R.; SZCZEPANIAK, L.; MYHILL, J. The composition of dietary fat directly influences glucose-stimulated insulin secretion in rats. **Diabetes**, v. 51, n.6, p. 1825-1833, 2002.

DRESNER, A.; LAURENT, D.; MARCUCCI, M.; GRIFFIN, M.; DUFOUR, S.; CLINE, G.W.; SLEZAK, L.A.; ANDERSEN, D.K.; HUNDAL, R.S.; ROTHMAN, D.L.; PETERSEN, K.F.; SHULMAN, G.I. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. **J. Clin. Invest.**, v. 103, n.2, p. 253-259, 1999.

FOX, T.E.; HOUCK, K.L.; O'NEILL, S.M.; NAGARAJAN, M.; STOVER, T.C.; POMIANOWSKI, P.T.; UNAL, O.; YUN, J.K.; NAIDES, S.J.; KESTER, M. Ceramide recruits and activates protein kinase C ζ (PKC ζ) within structured membrane microdomains. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n.17, p. 12450-12457, 2007.

FUKUMOTO, H.; KAYANOL, T.; BUSEL, J.B.; EDWARDS, Y.; PILCH, P.F.; BELL, G.I.; SEINO, S. Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n.14, p. 7776-7779, 1989.

GENUTH, S.M. O Sistema Endócrino. In: BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. (5ª edição). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p.765-1041.

GRAVENA, C.; MATHIAS, P.; ASHCROFT, S. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. **J. Endocrinol.**, v. 173, n.1, p. 73-80, 2002.

HABER, E. P.; CURI, R.; CARVALHO, C. R. O.; CARPINELLI, A. R. Secreção da insulina: Efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 45, n.3, p. 219-226, 2001.

HAN, D.; CHEN, M.M.; HOLLOSKY, J.O. Glucosamine and glucose induce insulin resistance by different mechanisms in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.285, n.6, p. E1267–E1272, 2003.

HIRABARA, S.M.; CARVALHO, C.O.; MENDONÇA, J.R.; HABER, E.P.; FERNANDES, L.C.; CURI, R. Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolism (Randle cycle). **FEBS Lett.**, v. 541, p. 109-114, 2003.

HOLLAND, W.L.; BROZINICK, J.T.; WANG, L.; HAWKINS, E.D.; SARGENT, K.M.; LIU, Y.; NARRA, K.; HOEHN, K.L.; KNOTTS, T.A.; SIESKY, A.; NELSON, D.H.; KARATHANASIS, S.K.; FONTENOT, G.K.; BIRNBAUM, M.J.; SUMMERS, S.A. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid, saturated fat, and obesity-induced insulin resistance. **Cell. Metab.**, v. 5, n.3, p. 167-179, 2007.

HOLLAND, W.L.; SUMMERS, S.A. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: New insights from *in vivo* manipulation of sphingolipid metabolism. **Endocr. Rev.**, v. 29, n.4, p. 381-402, 2008.

HRESKO, R.C.; HEIMBERG, H.; CHI, M.M; MUECKLER, M. Glucosamine-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is caused by depletion of intracellular ATP. **J. Biol. Chem.**, v.273, n. 32, p. 20658–20668, 1998.

HUANG, B.; CHIANG, M.; YAO, H.; CHIANG, W. The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 6, n.2, p. 120-126, 2004.

ISHIKI M.; KLIP A. Minireview: Recent Developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: New signals, locations, and partners. **Endocrinology**, v.146, n.12, p. 5071-5078, 2006.

JESSEN, N.; GOODYEAR, L.J. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 99, n.1, p. 330-337, 2005.

JOOST, H.; THORENS, B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (Review). **Mol. Membr. Biol.**, v. 18, p. 247-256, 2001.

JOOST H.; BELL G.; BEST J.; BIRNBAUM M.; CHARRON M.; CHEN Y.; DOEGE H.; JAMES D.; LODISH H.; MOLEY K.; MOLEY J.; MUECKLER M.; ROGERS S.; SCHÜRMANN A.; SEINO S.; THORRENS B. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol facilitators. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 282, p. E974-E976, 2002.

KAHN, C.R. The molecular mechanism of insulin action. **Annu Rev. Med.**, v. 36, p. 429-451, 1985.

KANZAKI, M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. **Endocr. J.**, v. 53, n.3, p. 267-293, 2006.

KANZAKI, M.; PESSIN, J.E. Signal integration and the specificity of insulin action. **Cell. Biochem. Biophys.**, v. 35, n.2, p. 191-209, 2001.

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. 185-187, 1982.

KIM, J.; NOLTE, L.; HAN, D.; KAWANAKA, K. Insulin resistance of muscle glucose transport in male and female rats fed a high-sucrose diet. **Am. Physiol. Soc.**, v. 276, n.3, p. 665-672, 1999.

KIM, J.K.; FILLMORE, J.J.; SUNSHINE, M.J.; ALBRECHT, B.; HIGASHIMORI, T.; KIM, D.W.; LIU, Z.X.; SOOS, T.J.; CLINE, G.W.; O'BRIEN, W.R. PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n.6, p. 823-827, 2004.

KOTANI, K.; PERONI, O.D.; MINOKOSHI, Y.; BOSS, O.; KAHN, B. GLUT4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral lipid utilization. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n.11, p. 1666-1675, 2004.

LOWRY O.H.; ROSEBROUGH N.J.; FARR A.L.; RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n.1, p. 265-275, 1951.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D; SERAPHIM, P. M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, n.2, p. 177-189, 2006.

MANCO, M.; CALVANI, M.; MINGRONE, G. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 6, n.6, p. 402-413, 2004.

MARCHAND-BRUSTEL, L.; GUAL, P.; GRÉMEAUX, T. Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signaling. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, n.6, p. 1152-1156, 2003.

MARSHALL, S.; BACOTE, V.; TRAXINGER, R.R. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n.8, p. 4706-4712, 1991.

MUECKLER, M.; CARUSO, C.; BALDWIN, S.A.; PANICO, M.; BLENCH, M.; MORRIS, H.R.; ALLARD, W.J.; LIENHARD, G.E.; LODISH, H.F. Sequence and structure of a human glucose transporter. **Science**, v. 299, p. 941-945, 1985.

NELSON, B.A.; ROBINSON, K.A.; BUSE, M.G. Defective Akt activation is associated with glucose- but not glucosamine-induced insulin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 282, n.3, p. E497-E506, 2002.

PAGLIASSOTTI, M.J.; PRACH, P.A.; KOPPENHAFFER, T.A.; PAN, D.A. Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 271, n.5, p. 1319-1326, 1996.

PAGLIASSOTTI, M.J.; KANG, J.; THRESHER, J.S.; SUNG, C.K.; BIZEAU, M.E. Elevated basal PI3-kinase activity and reduced insulin signaling in sucrose-induced hepatic insulin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 282, n.1, p. 170-176, 2000.

POWELL, D.J.; HAJDUCH, E.; KULAR, G.; HUNDAL, H.S. Ceramide disables 3-Phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKC ζ dependent mechanism. **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, n.21, p. 7794-7808, 2003.

PRADA, P.O.; ZECCHIN, H.G.; GASPARETTI, A.L.; TORSONI, M.A.; UENO, M.; HIRATA, A.E.; AMARAL, M.C.; HÖER, N.F.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**, v. 146, n.3, p. 1576-1587, 2005.

RANDLE, P.J.; HALES, C.N.; GARLAND, P.B.; NEWSHOLME, E.A. The glucose fatty acid cycle. It's role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v. 1, p. 785-789, 1963.

RYDER, J. W.; CHIBALIN, A. V.; ZIERATH, J. R. Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle. **Acta Physiol. Scand.**, v. 171, n.3, p. 249-257, 2001.

SAVAGE, D.B.; PETERSEN, K.F.; SHULMAN, G.I. Disordered lipid metabolism and pathogenesis of insulin resistance. **Physiol. Rev.**, v. 87, n.2, p. 507-520, 2007.

SCHEEPERS, A.; JOOST, H.; SCHÜRMANN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: Molecular basis of normal and aberrant function. **J. Parenter. Enteral Nutr.**, v.28, n.5, p. 364-371, 2004.

SCHNELL, S.; SCHAEFER, M.; SCHÖFL, C. Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from B-cells through activation of GPR40. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 263, p. 173-180, 2007.

SHULMAN, G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 106, n.2, p. 171-176, 2000.

SILVA J.L.T.; GIANNOCO, G.; FURUYA, D.T.; LIMA, G.A.; MORAES, P.; NACHEF, S.; BORDIN, S.; BRITTO, L.R.; NUNES, M.T., MACHADO, U.F. NF-KB, MEF2A, MEF2D and HIF1- α involvement on insulin and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 240, p. 82-93, 2005.

STEIN, D.; ESSER, V.; STEVENSON, B. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. **J. Clin. Invest.**, v.97, n.12, p. 2728-2735, 1996.

STRACZKOWSKI, M.; KOWALSKA, I.; BARANOWSKI, M.; NIKOLAJUK, A.; OTZIOMEK, E.; ZABIELSKI, P.; ADAMSKA, A.; BLACHNIO, A.; GORSKI, J.; GORSKA, M. Increased skeletal muscle ceramide level in men at risk of developing type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, n.11, p. 2366-2373, 2007.

STRATFORD, S.; HOEHN, K.L.; LIU, F.; SUMMERS, S.A. Regulation of insulin action by ceramide: Dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/Protein kinase B. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n.35, p. 36608-36615, 2004.

TREMBLAY, F.; LAVIGNE, C.; JACQUES, H.; MARETTE, A. Defective insulin-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle of high fat-fed rats is associated with alterations in both Akt/protein kinase B and atypical protein kinase C (zeta/lambda) activities. **Diabetes**, v. 50, n.8, p. 1901-1910, 2001.

ULDRY M.; THORENS B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. **Eur. J. Physiol.**, v. 447, n.5, p. 480-489, 2004.

WATSON R.; PESSIN J. Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, Glut4. **Exp. Cell. Res.**, v. 271, n.1, p. 75-83, 2001.

WOOD I.; TRAYHURN P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **Br. J. Nutr.**, v.89, n.1, p. 3-9, 2003.

WRIGHT, E.M.; LOO, D.D.; HIRAYAMA, B.A.; TURK, E. Surprising versatility of Na⁺ - Glucose cotransporters: SLC5. **Physiology**, v. 19, p. 370-376, 2004.

YU, C.; CHEN, Y.; CLINE, G.W.; ZHANG, D.; ZONG, H.; WANG, Y.; BERGERON, R.; KIM, J.K.; CUSHMAN, S.W.; COONEY, G.J.; ATCHESON, B.; WHITE, M.F.; KRAEGEN, E.W.; SHULMAN, G.I. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-Kinase activity in muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n.52, p. 50230-50236, 2002.

ZHAO F.; KEATING A. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. **Curr. Genomics**, v.8, n.2, p. 113-128, 2007.

ZORZANO, A.; PALACIN, M.; GUMÁ, A. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. **Acta Physiol. Scand.**, v. 183, n.1, p. 43-58, 2005.