ROSANA CRISTINA TIEKO MORI

GLIMEPIRIDA MELHORA A SENSIBILIDADE À INSULINA EM RATOS OBESOS (MSG) SEM EXACERBAR A OBESIDADE. MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NOS TECIDOS MUSCULAR, ADIPOSO E HEPÁTICO

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo

2007

ROSANA CRISTINA TIEKO MORI

GLIMEPIRIDA MELHORA A SENSIBILIDADE À INSULINA EM RATOS OBESOS (MSG) SEM EXACERBAR A OBESIDADE. MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NOS TECIDOS MUSCULAR, ADIPOSO E HEPÁTICO

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Ubiratan Fabres Machado

São Paulo

2007

Dedico este trabalho àqueles que mais amo

e que são meus exemplos de vida...

Meus pais, Jorge e Emilia

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado, pela oportunidade que me concedeu. Obrigada, professor, pela confiança, pelos ensinamentos sem preço, e por ser para cada um de nós, mais que orientador, um grande amigo, a quem admiro profundamente, por seu intelecto, sua dedicação, sua personalidade e sua maestria em reconhecer e valorizar as qualidades de cada um.

Às amigas Maristela Mitiko Okamoto e Helayne Soares de Freitas, pela amizade leal, por tudo quanto me ensinaram e por serem exemplos de capacidade, dedicação e caráter.

Aos amigos do laboratório: Ana Bárbara Teixeira, Ana Cláudia Poletto, Dani Furuya, Guilherme Lima, Paulo Alexandre, Raquel Campello e Robinson Sabino, pela colaboração, pelo convívio alegre e pelas trocas de idéias que tanto me ensinam.

Aos colegas mais novos: Aline, Bruno, Dani Carioca, Henri, Márcia, Paulinha, por trazer renovação e novas alegrias ao laboratório. E aos que seguiram seus caminhos, mas deixaram boas lembranças: Alessandra, Fernanda, José Luciano, Luciana, Mary, Melissa, Monalisa, Patrícia, Rodrigo, Sarah.

Aos meus irmãos Ricardo e Renata e meu cunhado Marcelo Masuda, pelo apoio, amizade, por compartilharem comigo suas experiências de vida, por tornarem a minha vida mais feliz. Amo vocês.

Ao companheiro de todas as horas, Marcio Gabriel, que me apóia em tudo que faço, sem medir esforços para me ver feliz. Te amo muito.

Ao colega Sandro Hirabara, pela atenção e auxílio nos ensaios de captação e à querida amiga Emiko Hirata, pelo carinho e amizade de tantos anos, e também pelo auxílio na quantificação da p-GSK3.

A todos os professores do ICB, especialmente Dra. Carla Carvalho, Dra. Maria Tereza Nunes, Dra. Silvana Bordin, Dr. Rui Curi, Dr.Fábio Bessa Lima, Dr. Ângelo Carpinelli, por disponibilizarem seus laboratórios e conhecimentos.

A todos os colegas dos demais laboratórios, pela atenção e colaboração.

A todos os funcionários do ICB, principalmente do biotério, secretaria e biblioteca, por toda a colaboração e convívio agradável. Ao José Maria e Itamar, pela disposição em ajudar sempre. E a todos os demais que também nos prestam serviços com atenção e gentileza, facilitando nosso dia-a dia.

A todos aqueles que possam ter sido, involuntariamente, esquecidos de serem citados, mas que também contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro

"Do mesmo modo que o metal enferruja com a ociosidade

e a água parada perde sua pureza,

assim a inércia esgota a energia da mente".

(Leonardo Da Vinci)

RESUMO

Mori, R.C.T. **Glimepirida melhora a sensibilidade à insulina em ratos obesos (MSG) sem exacerbar a obesidade. Mecanismos moleculares envolvidos nos tecidos muscular, adiposo e hepático**, 2007. 110f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A glimepirida é um anti-hiperglicemiante do grupo das sulfoniluréias, que são secretagogos de insulina utilizados no tratamento do DM2. Comparada a outras sulfoniluréias, tem baixa afinidade pelos receptores das células B, mas seu efeito sobre o controle glicêmico se mantém, sugerindo uma alta capacidade de melhorar a sensibilidade à insulina. Agudamente, a glimepirida estimula a translocação do GLUT4 *in vitro*, aumentando a captação de glicose. Entretanto, os mecanismos moleculares acionados por ação extra-pancreática da glimepirida *in vivo* ainda não são totalmente conhecidos. O presente estudo buscou identificar respostas extra-pancreáticas que explicassem a melhora da sensibilidade sistêmica à insulina pelo tratamento com a glimepirida. Foram avaliados os seus efeitos sobre: 1) a sensibilidade à insulina e expressão do GLUT4 em tecidos insulino-sensíveis, 2) a captação de glicose e síntese de glicogênio nos músculos esqueléticos oxidativos e 3) a glicogeniogênese hepática. Nestas análises, foi utilizada a obesidade hipotalâmica induzida pelo glutamato monossódico (MSG), um modelo experimental de resistência insulínica em que há alterações na expressão de GLUT4 no tecido adiposo e músculos. A resistência à insulina foi induzida em ratos Wistar por tratamento neonatal com MSG (4mg/g/dia, s.c.). Aos três meses de idade, parte dos animais adultos recebeu glimepirida (0,1mg/kg/dia, na água de beber) por 4 semanas, constituindo-se, assim, 4 grupos: controles e obesos, não tratados (C e MSG) e tratados (CG e MSG/G) com glimepirida. Os animais foram submetidos a: 1) testes de tolerância à insulina (ITT), 2) análise do conteúdo de GLUT4 e seu mRNA no tecido adiposo, músculos esqueléticos glicolíticos (EDL) e oxidativos (sóleo) e músculo cardíaco, 3) ensaios de translocação do GLUT4 no sóleo *in vivo*, 4) ensaios de captação de glicose e incorporação ao glicogênio, no sóleo *in vitro*, 5) dosagem do glicogênio hepático e 6) análise do conteúdo de p-GSK3

(glicogênio sintase quinase 3 fosforilada) no fígado. Os ratos MSG foram mais resistentes à insulina, apresentando constante de decaimento da glicose após sobrecarga insulínica significativamente menor (3,26%/min $p<0,05$ vs C: 4,67%/min; CG: 4,68%/min e MSG/G: 4,53%/min). Este resultado foi acompanhado de alterações tecido-específicas da expressão do GLUT4, que foram mais importantes no tecido adiposo e no sóleo. No tecido adiposo, tanto mRNA quanto a proteína GLUT4 estiveram significativamente elevados nos animais obesos (30% e 100%, respectivamente, $p<0,05$ vs. C), características estas abolidas pelo tratamento com a glimepirida. Este efeito deve ser importante para que não se agrave a obesidade, mesmo com a elevação da insulinemia pelo efeito secretagogo do medicamento. No sóleo, observou-se um aumento de 30% do mRNA do GLUT4 nos ratos MSG ($p<0.05$ vs. C), mas a expressão da proteína foi semelhante a C ($p>0,05$). A glimepirida aumentou significativamente a proteína GLUT4 em cerca de 50% (MSG/G vs. MSG, $p<0,05$). Nos ensaios de translocação, os conteúdos de GLUT4 em membranas plasmáticas dos MSG e CG não se alteraram após estímulo insulínico, mas nos ratos C e MSG/G, aumentaram 43% e 74%, respectivamente ($p<0,05$ vs. Basal). Avaliado funcionalmente, o sóleo dos MSG apresentou menor captação de glicose estimulada pela insulina que os demais grupos ($p<0,01$ vs. C, CG e MSG/G); e menor incorporação de [U-^{14}C]-D-glicose ao glicogênio muscular ($p<0,05$ vs. C, CG e MSG/G). Semelhantemente, no fígado, apresentaram menos glicogênio hepático ($p<0,05$ vs. C, CG e MSG/G) e menor conteúdo de p-GSK3 ($p<0,01$ vs. C, CG e MSG/G). Assim, concluímos que a glimepirida aumentou a expressão de GLUT4 e melhorou a capacidade de translocação de GLUT4 em resposta à insulina, nas fibras musculares oxidativas de animais resistentes à insulina. Funcionalmente, isto refletiu em melhora na captação de glicose e aumento da síntese de glicogênio nestas fibras. Estes efeitos, somados ao aumento de glicogeniogênese observada no fígado, conferem à glimepirida sua ação sensibilizadora à insulina, uma vez que os territórios muscular e hepático são os principais sítios de utilização da glicose sob estímulo insulínico. Adicionalmente, a redução do GLUT4 no tecido adiposo dos ratos MSG tratados com a glimepirida impediu a exacerbação da obesidade.

Palavras-chave: Resistência à insulina, glimepirida, obesidade, GLUT4, GSK-3

ABSTRACT

Mori, R.C.T. **Glimepiride improves insulin sensitivity in MSG obese rats without aggravating the obesity. Molecular mechanisms involved in muscular, adipose and hepatic tissues**, 2007. 110 pages. PhD thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Glimepiride is an anti-hyperglycemic compound belonging to the group of the sulfonyurea drugs, which are insulin secretagogues used in the treatment of DM2. Compared to other sulfonylureas, glimepiride presents low affinity to the specific receptors in the B cells, but its effect on glycemic control is maintained, indicating a higher efficacy in ameliorating insulin sensitivity. *In vitro,* the glimepiride drug acutely stimulates GLUT4 translocation and increases glucose uptake. Notwithstanding, the molecular mechanisms activated *in vivo* by the extra-pancreatic actions of the glimepiride are yet to be clarified. The present study was aimed to identify extra-pancreatic responses to the glimepiride treatment which could explain the increase in the whole body insulin sensitivity. The glimepiride effects were evaluated on: 1) the insulin sensitivity and GLUT4 expression in insulin sensitive tissues, 2) the glucose uptake and glycogen synthesis in the oxidative skeletal muscle fibres, and 3) the glycogen synthesis in the liver. For these analyses, we used the monosodium glutamate (MSG)-induced hypothlamic obesity, an experimental model of insulin resistance in which altered GLUT4 expression is observed in adipose and muscular tissues. Insulin resistance was induced in male Wistar rats by neonatal treatment with MSG (4mg/g/day, s.c.). At the age of three months, half the control and obese animals received glimepiride (0.1mg/kg/day, in the drinkig water) for 4 weeks, resulting in four experimental groups: control and obese rats, non-treated (C and MSG) and treated (CG and MSG/G) with glimepiride. Animals were then submitted to: 1) insulin tolerance tests (ITT), 2) GLUT4 mRNA and protein analyses in adipose tissue, glycolytic (EDL) and oxidative (soleus) skeletal muscles, and cardiac muscle, 3) *in vivo* GLUT4 translocation assays in soleus muscle, 4) glucose uptake/ incorporation to glycogen assays in soleus *in vitro*, 5) hepatic glycogen content analysis and 6) hepatic p-GSK3 (phospho- glycogen sinthase

kinase 3) content analysis. MSG rats were resistant to insulin, showing significantly slower glucose decay constant after an insulin overload (3,26%/min, $p<0,05$ vs. C: 4,67%/min; CG: 4,68%/min and MSG/G: 4,53%/min). This result was accompanied by tissue-specific alterations in the GLUT4 expression, which were especially important in the adipose tissue and soleus skeletal muscle. In the adipose tissue, both GLUT4 mRNA and protein contents were significantly higher in the obese animals (30% and 100% increases, $p<0,05$ vs. C, respectively), and these features were completely abolished by the glimepiride treatment. This effect must have been important to avoid the exacerbation of the obesity, in spite of the elevated insulinemia due to the secretagogue effect of the drug. In soleus muscle, a 30% increase in GLUT4 mRNA level was observed in MSG obese rats ($p<0.05$ vs. C), but the protein expression was similar to C ($p>0,05$). The glimepiride drug significantly elevated the GLUT4 protein in 50% (MSG/G vs. MSG, $p<0,05$). In the GLUT4 translocation experiments, the GLUT4 content in plasma membranes in MSG and CG rats did not alter after insulin injection, but in C and MSG/G rats there were increases of 43% and 74%, respectively ($p<0,05$ vs. Basal). When functionally evaluated, the MSG soleus presented lower insulin-stimulated glucose uptake ($p<0,01$) and lower [U-^{14}C]-D-glucose incorporation to glycogen ($p<0,05$) as compared to the other groups. Similarly, in the liver, MSG rats had lower glycogen content ($p<0,05$ vs. C, CG and MSG/G) and lower p-GSK3 content ($p<0,01$ vs. C, CG and MSG/G). Thus, we could conclude that the glimepiride drug increased the GLUT4 expression and improved the insulin-stimulated GLUT4 translocation in the oxidative muscle fibres of the insulin resistant animals. Functionally, this effect was reflected in an ameliorated insulin-stimulated glucose uptake and glycogen synthesis in these fibres. These effects, added to the increased glycogenesis observed in the liver, provide the glimepiride drug its insulin sensitizer effect, since the hepatic and muscular tissues are the most important insulin-stimulated glucose disposal sites. Additionally, the reduced GLUT4 content in adipose tissue of the glimepiride-treated MSG rats avoided the aggravation of the obesity.

Key words: Insulin resistance, glimepiride, obesity, GLUT4, GSK-3

ÍNDICE

1 - Introdução..... 01

1.1 – Insulina..... 02

1.2 - Transportadores de glicose..... 04

1.3 - Captação de glicose estimulada pela insulina..... 07

1.4 - Resistência periférica à insulina..... 08

1.5 – Obesidade e resistência à insulina..... 08

1.6 - Obesidade induzida pelo glutamato monossódico..... 10

1.7 - Anti-hiperglicemiantes orais..... 12

1.8 – Glimepirida..... 15

2 – Objetivos..... 17

3 - Material e Métodos..... 18

3.1 - Acasalamentos..... 18

3.2. - Indução de obesidade pelo glutamato monossódico..... 18

3.3 - Tratamento crônico com glimepirida..... 19

3.4 - Teste de Tolerância à Insulina..... 19

3.5 - Coleta de tecidos..... 20

3.6 - Determinação das concentrações de glicose, insulina e frutosamina..... 20

3.7 - Northern Blotting..... 21

3.7.1 - Extração de RNA total..... 21

3.7.2 - Eletroforese em gel de agarose..... 21

3.7.3 - Transferência 22

3.7.4 - Hibridação..... 22

3.7.4.1 - Construção das sondas de GLUT4 ou □-actina.... 22

3.7.4.2 – Pré-hibridação e Hibridação..... 23

3.7.5 - Autorradiografia e densitometria óptica..... 23

3.8 - Western Blotting..... 24

3.8.1 - Extração protéica fracionada..... 24

3.8.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)..... 25

3.8.3 - Transferência eletroforética..... 25

3.8.4 - Detecção por quimioluminescência..... 25

3.9 - Translocação do GLUT4 sob estímulo insulínico..... 26

3.10 - Captação de 2-deoxi-[2,6-^{3}H] – D-glicose e Incorporação de [U-^{14}C]-D-glicose..... 27

3.11 - Conteúdo de glicogênio hepático..... 27

3.12 - Quantificação da p-GSK-3 no fígado..... 28

3.12.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida..... 28

3.12.2 – Transferência eletroforética..... 28

3.12.3 – Detecção por quimioluminescência..... 29

3.13 - Análise estatística..... 29

4 – Resultados..... 30

Parâmetros morfométricos e verificação da presença de obesidade..... 30

Consumo de água e alimento..... 34

Avaliação da sensibilidade à insulina..... 36

Expressão do gene do GLUT4 e distribuição subcelular da proteína..... 39

Músculo cardíaco..... 39

Músculos esqueléticos..... 40

Tecido adiposo branco..... 41

Translocação do GLUT4 sob estímulo insulínico..... 52

Captação de 2-deoxi-[2,6-^{3}H] – D-glicose *in vitro*..... 57

Incorporação de [U-^{14}C]-D-glicose ao glicogênio muscular *in vitro*..... 59

Glicogênio hepático..... 61

Conteúdo hepático da p-GSK-3..... 61

5 – Discussão..... 64

Obesidade induzida pelo glutamato monossódico..... 64

Tratamento com glimepirida..... 66

Análise da expressão do GLUT4..... 68

Músculo cardíaco..... 69

Músculos esqueléticos..... 71

Tecido adiposo..... 74

Translocação do GLUT4..... 77

Dosagem da atividade específica da 5'nucleotidase..... 78

Captação de 2-deoxi-[2,6-^{3}H] – D-glicose e Incorporação de [U-^{14}C]-D-Glicose ao glicogênio em músculo sóleo *in vitro*..... 83

Conteúdo de glicogênio hepático..... 85

Conteúdo de phospho-GSK3α/β (p-GSK3) no fígado..... 86

6 - Sumário..... 89

7 – Conclusão..... 90

8 – Referências Bibliográficas..... 91

9 – Anexos.....101

Anexo 1: mRNA do GLUT4 e proteína GLUT4 no músculo cardíaco.....101

Anexo 2: mRNA do GLUT4 e proteína GLUT4 no músculo EDL.....102

Anexo 3: mRNA do GLUT4 e proteína GLUT4 no músculo sóleo.....103

Anexo 4: mRNA do GLUT4 e proteína GLUT4 no tecido adiposo branco.....104

Anexo 5A: Atividade de 5´nucleotidase no músculo cardíaco.....105

Anexo 5B: Atividade de 5´nucleotidase no músculo EDL.....106

Anexo 5C: Atividade de 5´nucleotidase no músculo sóleo.....107

Anexo 6 A: Glicemias dos Ensaios de translocação do GLUT4.....108

Anexo 6B: Proteína em PM e M nos Ensaios de translocação do GLUT4.....109

Anexo 7: Conteúdo de p-GSK3 no fígado.....110

Anexo 8: Manuscrito em preparação.....111

INTRODUÇÃO

Com base em estimativas e projeções internacionais, calcula-se que até o ano de 2030, mais de 366 milhões de pessoas em todo o mundo terão sido acometidas pelo diabetes mellitus (WILD *et al.*, 2004). Esta doença, que decorre de deficiente secreção ou ação da insulina, caracterizando-se primariamente por hiperglicemia inadequada, pode ser classificada em dois tipos principais, denominados diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

No DM1, ocorre destruição auto-imune das células B, e os pacientes têm tendência à cetoacidose, necessitando de tratamento com insulina. O DM2 é a forma mais prevalente (90% ou mais dos casos de DM), e sua manifestação, bastante heterogênea, normalmente está associada a resistência à ação da insulina. Esta insuficiência relativa ou absoluta de insulina acarreta alterações no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, com redução da entrada de glicose nos diversos tecidos periféricos, que resulta em excesso de glicose extracelular. (MASHARANI; KARAM, 2002; UNGER; FOSTER, 1992).

Os sintomas do DM2 desenvolvem-se lenta e gradualmente, de forma que a doença pode permanecer não diagnosticada por anos, vindo a ser tratada apenas quando já acompanhada de complicações macrovasculares, renais, ou retinianas. Considerando-se que antes mesmo da instalação de um quadro de franco diabetes, a sensibilidade à insulina já se encontra diminuída, desvendar os mecanismos que levam à instalação da resistência à ação deste hormônio, bem como investigar intervenções que atenuem ou revertam esta resistência, são de fundamental interesse para a prevenção e/ou tratamento de diversas doenças, pois esta alteração metabólica se correlaciona não apenas ao diabetes, mas a outras doenças graves, como hipertensão arterial, aterosclerose e obesidade (DAVIS, 2004; DEFRONZO; FERRANINI, 1991).

Além disso, os defeitos primários que levam a essas doenças são desconhecidos e uma combinação de fatores genéticos e ambientais tem se mostrado importante para o seu desenvolvimento. Neste contexto, a resistência à insulina é um ponto chave, sofrendo influências destes fatores e reiterando a importância de investigações acerca das suas origens e mecanismos.

Insulina

Para bem compreender a regulação da homeostasia glicêmica, é importante conhecer os mecanismos fisiológicos de secreção e ação da insulina.

A insulina estimula a utilização de glicose nos músculos e tecido adiposo, onde estimula a glicogeniogênese e lipogênese, respectivamente. Além disso, estimula a glicogeniogênese no fígado, glicólise e proteogênese na maioria dos tipos celulares. Em contrapartida, inibe a neoglicogênese, glicogenólise, lipólise e proteólise (UNGER; FOSTER, 1992).

A ilhota pancreática produz a insulina em forma de pró-insulina que, no complexo de Golgi sofre ação de convertases que geram quantidades equimolares de peptídeo C e insulina, a qual é constituída por cadeias A e B, ligadas por duas pontes dissulfeto. Cerca de 80% da ilhota é constituída por células B, secretoras de insulina, localizadas centralmente, em ilhotas de ratos. As células A e D, produtoras de glucagon e somatostatina, respectivamente, são periféricas, o que possibilita um efeito parácrino da insulina na própria ilhota (MASHARANI; KARAM, 2002).

A insulina fica estocada em grânulos na célula B, sendo a glicose seu principal secretagogo. Assim que se eleva a concentração de glicose circulante, esta é captada pelas células B, onde o seu metabolismo eleva a relação ATP/ADP. Cessa-se então o efluxo de K^+, o que despolariza a célula, possibilitando o aumento de Ca^{++} intracelular, o que provoca modificações do citoesqueleto e conseqüente liberação dos grânulos de insulina (BUSE et al, 2003; MASHARANI; KARAM, 2002).

O receptor da insulina pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento. É uma glicoproteína de membrana composta por duas sub-unidades α e duas sub-unidades β, ligadas por pontes dissulfeto. A insulina liga-se à sub-unidade α, extracelular, levando a uma alteração conformacional que retira a ação inibitória da unidade α sobre a unidade β, que se autofosforila em resíduos de tirosina. Uma vez ativa, a sub-unidade β fosforila substratos do receptor de insulina (IRS), que contêm múltiplos sítios de fosforilação em tirosina. Pelo menos 12 substratos para o IR já foram identificados (IRS1 a 6, Gab-1, Shc 1 a 3, p62, APS), sendo IRS-1 e IRS-2 os mais diretamente relacionados à resistência à insulina. Animais *knock out* para IRS-1 são resistentes à insulina e têm prejuízo do crescimento. O *knock out* de IRS-2 gera animais diabéticos, com aumento de adiposidade e resistência insulínica em fígado e músculos esqueléticos (BJÖRNHOLM; ZIERATH, 2005).

Os IRSs fosforilados associam-se a PI3K (fosfatidil inositol -3 quinase), uma proteína heterodimérica, que participa de forma importante na translocação do transportador de glicose (GLUT4) para a superfície da célula. A PI3K é formada por uma subunidade regulatória, fosforilada pelos IRS, e uma subunidade catalítica, que fosforila fosfatidil-inositóis (PI) de membrana, formando fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfato (PIP_3), que faz regulação alostérica de PDK (kinase dependente de fosfoinositídio). Esta, por sua vez, fosforila PKC (proteína kinase C atípica) e PKB (proteína kinase B ou Akt), embora estas também possam interagir diretamente com IRS-1. (KOISTINEN; ZIERATH, 2002; BJÖRNHOLM; ZIERATH, 2005). Todas estas proteínas são importantes no transporte de glicose estimulado pela insulina, por participarem no mecanismo da translocação das vesículas de GLUT4.

Principalmente no fígado e músculos, a Akt fosforila e inativa a glicogênio sintase kinase 3 (GSK-3, enzima responsável pela fosforilação e inativação da glicogênio sintase), promovendo

assim retirada da inibição da síntese, o que resulta em aumento da glicogeniogênese (CROSS et al., 1995).

Transportadores de glicose

A glicose é o principal substrato energético em todos os tipos celulares de mamíferos, e atravessa a bicamada lipídica através de moléculas carreadoras específicas, uma vez que a membrana plasmática é impermeável à molécula polar da glicose. Existem duas classes de proteínas carreadoras de glicose: os SGLTs (*Sodium Glucose Cotransporters*) e os GLUTs (*Glucose Transporters*) (BELL et al, 1990).

Na membrana apical das células epiteliais do intestino e dos túbulos renais, ocorre transporte acoplado de Na^+ e glicose através dos SGLTs, que transportam glicose contra o seu gradiente de concentração, mas a favor do gradiente eletroquímico do Na^+. Os SGLTs são importantes para a absorção e reabsorção de glicose, respectivamente no intestino e rim, transportando-a do lúmen para o meio intracelular, de onde se difunde, pela membrana basolateral, para o interstício, através do GLUT2. Os SGLTs pertencem a uma superfamília de genes (SLC5) codificadores de proteínas que fazem transporte acoplado de solutos com íons (WRIGHT et al, 2004).

Os GLUTs fazem transporte bidirecional de glicose, sempre a favor de seu gradiente de concentração por difusão facilitada, constituindo uma outra família de transportadores (MACHADO,1998). Em meados dos anos oitenta, foi clonada a primeira proteína transportadora de glicose (MUECKLER et al, 1985). Desde então, várias isoformas vêm sendo caracterizadas em diferentes tecidos e, atualmente, segundo as últimas revisões sobre a nomenclatura dos GLUTs, são conhecidas 12 diferentes isoformas destes transportadores, denominadas de GLUT1 a GLUT12, e mais um transportador de próton mioinositol (HMIT), que são codificados por uma

mesma família de genes de proteínas facilitadoras do transporte de solutos, SLC2A (*Solute Carriers 2A*) (JOOST et al., 2002; ULDRY; THORENS, 2004).

Na tabela 1, estão apresentados os principais sítios de expressão dessas proteínas, que se constituem basicamente de uma cadeia polipeptídica com doze domínios transmembrânicos (Figura 1), altamente conservados nas diferentes isoformas, sugerindo serem estas regiões responsáveis por uma característica comum a todas elas, ou seja, o transporte de glicose (BELL et al, 1990). Estes domínios hidrofóbicos são conectados por domínios hidrofílicos intra e extracelulares. As terminações NH_2 e COOH são citoplasmáticas e apresentam baixa homologia, bem como as alças que conectam os segmentos transmembrânicos M1-M2 e M6-M7, sugerindo que estes domínios se relacionam à especificidade de cada isoforma, como suas características cinéticas, localização celular e imunogenicidade (KASANICKI; PILCH, 1990).

Das isoformas mais recentemente descobertas, os GLUTs 6, 8 e 11 têm capacidade de transporte de glicose (JOOST et al., 2002) e poderiam ter papel fisiológico importante. De fato, seus mRNAs já foram encontrados em músculo esquelético humano, embora apenas a proteína GLUT11 tenha sido detectada, expressando-se especificamente em fibras de contração lenta (GASTER et al., 2004). No entanto, pouco foi possível definir a respeito de sua importância fisiológica, permanecendo, até o presente momento, as isoformas clássicas (GLUTs 1 a 4) como os transportadores de glicose de maior relevância funcional.

TABELA 1 – Transportadores de glicose e seus principais sítios de expressão

PROTEÍ	GENE	PRINCIPAIS SÍTIOS DE EXPRESSÃO
GLUT1	SLC2A1	Eritrócitos, cérebro, rins, **transporte basal** de glicose em todas as células
GLUT2	SLC2A2	Fígado, pâncreas
GLUT3	SLC2A3	Neurônios
GLUT4	SLC2A4	**Músculos esqueléticos e cardíaco, tecido adiposo branco e marrom**
GLUT5	SLC2A5	Intestinos, rins, testículos; **transportador de frutose**
GLUT6	SLC2A6	Baço, leucócitos, cérebro
GLUT7	SLC2A7	Desconhecido
GLUT8	SLC2A8	Testículos, cérebro, blastocistos
GLUT9	SLC2A9	Fígado, rins
GLUT10	SLC2A10	Figado, pâncreas
GLUT11	SLC2A11	Músculo cardíaco e esquelético
GLUT12	SLC2A12	Músculo cardíaco e próstata
HMIT	SLC2A13	Cérebro

Adaptado de JOOST et al., 2002

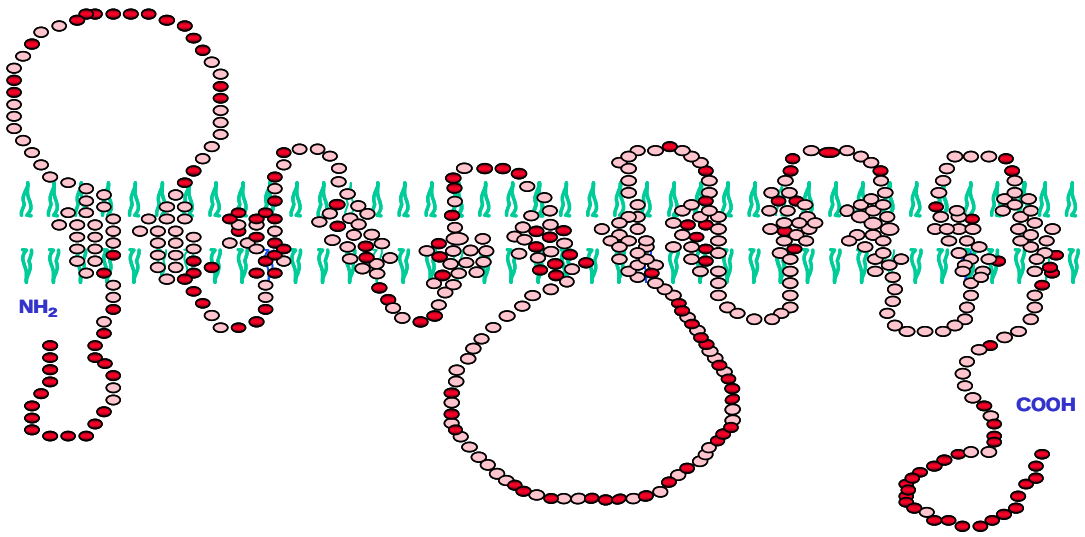


Figura 1 – Estrutura bidimensional dos GLUTs. Estão representadas a bicamada lipídica, os 12 segmentos transmembrânicos e as terminações NH_2 e COOH citoplasmáticas. Os círculos claros representam os aminoácidos conservados nas diferentes isoformas.

Captação de glicose estimulada pela insulina

O GLUT4, isoforma sensível à ação da insulina, é encontrado tanto na membrana plasmática quanto em vesículas intracelulares (MACHADO, 1998; KAHN, 1996). A ligação da insulina ao seu receptor aciona a transdução do sinal insulínico através do qual este hormônio exerce seus efeitos biológicos nas células, incluindo o deslocamento destas vesículas para a superfície celular, aumentando a quantidade de GLUT4 na membrana plasmática. Este mecanismo de translocação participa de forma importante no aumento de captação de glicose no período pós prandial. Quando decaem os níveis insulinêmicos, há internalização do GLUT4, reduzindo novamente o índice de transporte de glicose nos tecidos (SLOT et al, 1991).

O GLUT4 é expresso em grande quantidade no tecido adiposo branco e marrom, e nos músculos cardíaco e esquelético. Outras isoformas também se expressam nestes tecidos, mas é o GLUT4, cujo Km para glicose é de aproximadamente 5mM, que faz o transporte de glicose estimulado pela insulina, pois aumentando sua concentração na membrana, permite aumentar abruptamente a capacidade destes tecidos em captar glicose. Em camundongos transgênicos que superexpressam GLUT4 no tecido adiposo, já se observou melhora da sensibilidade à insulina, aliviando o quadro de diabetes, o que demonstra a importância desta proteína na homeostase glicêmica (TOZZO et al., 1997).

A regulação do gene do GLUT4 *in vivo* é complexa, envolvendo fatores metabólicos, hormonais, neurais, além de variações tecido-específicas. Sabe-se, por exemplo, que a atividade contrátil aumenta a expressão e a translocação do GLUT4 no tecido muscular (HOST et. al., 1998; PLOUG et al., 1998; ZORZANO et al, 2005), enquanto em condições de deficiência insulínica, como é o caso do diabetes induzido por estreptozotocina, há diminuição do GLUT4 nas fibras musculares (RICHARDSON et. al., 1991). Em contrapartida, diminuição desta

proteína também se associa a níveis elevados de insulinemia, como já foi obsevado em adipócitos de pacientes diabéticos tipo 2 (GARVEY et al., 1991).

Resistência periférica à insulina

Quando tecidos sensíveis à ação da insulina, quanto ao transporte de glicose, têm a capacidade de captar glicose reduzida, caracteriza-se o estado de resistência à insulina. Esta desordem metabólica contribui no estabelecimento de quadros de hipertensão, dislipidemia e doença cardiovascular aterosclerótica, que associados à obesidade e/ou DM2 compõem a Síndrome X (REAVEN, 1988) ou Síndrome Metabólica. A resistência à insulina pode estar associada a um defeito no sistema de transporte de glicose em si, ou no sistema de transdução do sinal insulínico, responsável por desencadear a translocação do GLUT4. No DM2, por exemplo, embora os conteúdos de IRS-1 e PI3K sejam normais, a fosforilação estimulada pela insulina está prejudicada em músculos esqueléticos (BJÖRNHOLM; ZIERATH, 2005). Por outro lado, há diminuição da proteína GLUT4 em músculos de ratos diabéticos por estreptozotocina e adipócitos de pacientes diabéticos tipo 2 (RICHARDSON et. al., 1991 GARVEY et al., 1991).

Qualquer que seja o mecanismo que gere a resistência à insulina, as células B do pâncreas tendem a responder com um aumento de sua secreção, de modo a evitar a hiperglicemia. Porém, esta hipersinsulinemia compensatória não pode perdurar indefinidamente e, após algum tempo, instala-se grave intolerância à glicose, que evolui para o estabelecimento do DM2 (DEFRONZO & FERRANNINI, 1991).

Obesidade e resistência insulínica

Na obesidade, encontra-se resistência à ação da insulina em nível de transporte de glicose, tanto em músculo esquelético quanto em tecido adiposo. Em camundongos com obesidade

hipotalâmica, esta resistência é acompanhada de redução da expressão da proteína GLUT4 nestes tecidos (PAPA; SERAPHIM; MACHADO, 1997). Semelhantemente, em adipócitos isolados de mulheres obesas, Björnholm et al. (2002) encontraram níveis reduzidos deste transportador, bem como da atividade da PI3K. Também em fibras musculares isoladas de indivíduos obesos, há diminuição do transporte de glicose estimulado pela insulina, associado a menor expressão de GLUT4 (DOHM et al., 1991).

Em geral, é o aumento excessivo de gordura que conduz ao estado de resistência à insulina, muitas vezes desencadeando um quadro de DM2. Isto ocorre porque, no indivíduo obeso, o tecido adiposo, principalmente o visceral, apresenta uma taxa metabólica muito elevada, com atividades de lipoproteína lipase, e atividade lipogênica elevadas, favorecendo o acúmulo de gordura. Com o aumento da massa adiposa, sinais hormonais e inflamatórios próprios do adipócito diminuem a ação da insulina, o que favorece o aumento da atividade da lipase hormônio sensível. Conseqüentemente, a lipólise aumenta, elevando o *turnover* lipídico deste tecido, o que gera um aumento dos ácidos graxos livres (AGL) (TRIPATHI;SRIVASTAVA, 2006).

A elevação dos AGL estimula a neoglicogênese, aumentando a produção hepática de glicose, além de prejudicar a captação de glicose nos músculos esqueléticos (PETERSEN; SHULMAN, 2002). Esses efeitos, em conjunto, resultam em aumento da glicemia. Conseqüentemente, o pâncreas tende a responder secretando mais insulina, mas conforme a função das células B evolui para a exaustão, a insulinemia tende a decair, e o indivíduo obeso passa a necessitar de tratamento para o diabetes.

Obesidade induzida pelo Glutamato Monossódico (MSG)

Diversos modelos experimentais de obesidade são utilizados para estudo das alterações presentes neste quadro metabólico complexo. Um destes modelos é a obesidade hipotalâmica induzida por glutamato monossódico (MSG), na qual se observa hiperglicemia, hiperinsulinemia e razão glicose/insulina reduzida, caracterizando o estado de resistência à insulina (MACHADO et al, 1994; MACHADO & SAITO, 1995). De fato, Hirata e colaboradores (1997) demonstraram, através de teste de tolerância à glicose i.v. e *clamp* euglicêmico/hiperinsulinêmico, que ratos MSG são intolerantes à glicose e resistentes à insulina.

O glutamato é um aminoácido neuroexcitatório que, em altas doses, torna-se tóxico ao sistema nervoso central por aumentar, de forma persistente, a condutância iônica da membrana, alterando o potencial de repouso normal. Na tentativa de restauração dos gradientes iônico e osmótico, há exaustão dos estoques energéticos e morte celular (COYLE et. al., 1981). Animais recém-nascidos, cuja barreira hemato-encefálica ainda não se encontra totalmente formada, são muito sensíveis a esta ação neurotóxica e, a administração subcutânea de MSG, em altas doses, a estes animais, lesa várias estruturas na região circunventricular, principalmente o núcleo arqueado (KIZER et. al., 1978), que tem participação importante nos mecanismos de integração neuro-endócrina.

A lesão hipotalâmica pode destruir os corpos celulares dos neurônios produtores de GHRH (*Growth Hormone – Releasing Hormone*), o que acarreta diminuição do conteúdo de mRNA do GH hipofisário e baixos níveis de GH circulante (KOVACS et al., 2000). Assim, animais MSG apresentam prejuízo do crescimento, normalmente acompanhado de diminuição do peso corpóreo.

As atividades lipogênicas do fígado e tecido adiposo encontram-se elevadas, bem como a atividade da lipase lipoprotéica dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal

(NASCIMENTO CURI et al; 1991). Embora os animais MSG sejam normo ou hipofágicos, têm grande quantidade de gordura depositada, o que pode estar associado à atividade simpática e resposta termogênica reduzidas no tecido adiposo marrom, com menor gasto de energia, a qual se estoca sob a forma de gordura (BRAY, 1987; MORRIS et al., 1998). Este aumento de deposição de gordura no tecido adiposo branco está associado ao aumento no tamanho dos adipócitos, segundo Macho e colaboradores (2000), caracterizando uma obesidade hipertrófica.

Estes animais apresentam também altos níveis séricos de leptina, o que está associado à elevada quantidade de gordura, pois este hormônio, que atua de forma importante no controle da homeostase energética, diminuindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto de energia, é produzido pelos adipócitos, sendo tanto maiores as taxas de leptina circulante, quanto maior a adiposidade (AHIMA & FLIER, 2000).

Em adipócitos isolados de ratos MSG, MACHO et al (2000) demonstraram que a captação basal de glicose é mais baixa que em adipócitos de ratos controle. A insulina estimula esta captação de maneira dose-dependente nas células controle, mas tem pouco efeito sobre os adipócitos dos animais MSG. Por outro lado, a incorporação basal de glicose a lipídios é significativamente elevada nos MSG e o estímulo insulínico age dose - dependentemente sobre este fenômeno, tanto em adipócitos controle quanto MSG. Estes mesmos autores verificaram, em ratos MSG, diminuição da ligação da insulina ao seu receptor nos seus tecidos alvos.

Ratos jovens tratados com MSG têm elevada taxa de translocação de GLUT4 e maior sensibilidade à insulina no tecido adiposo, alterando a utilização de glicose e favorecendo o acúmulo de gordura (DOLNIKOFF et al, 2001). Em camundongos jovens, já foi demonstrado aumento do conteúdo de GLUT4 no tecido adiposo, durante a fase de ganho de peso acelerado (PAPA et al, 2002). Entretanto, quando a resistência à insulina está instalada, a expressão da proteína GLUT4 está diminuída no tecido adiposo e músculos de camundongos obesos pelo

MSG, embora a capacidade de translocação do transportador em resposta à insulina esteja relativamente preservada (PAPA et al, 2002; MACHADO et al, 1994).

Estes dados sugerem que a expressão do GLUT4 correlaciona-se com estágio de desenvolvimento da obesidade e com o grau de sensibilidade à insulina. De fato, a perda de peso, que sabidamente melhora a sensibilidade insulínica, restaura o conteúdo de GLUT4 em camundongos obesos pelo MSG (PAPA et al, 1997).

Uma vez que as variações de conteúdo da proteína GLUT4 estão bem caracterizadas na resistência insulínica da obsesidade pelo MSG, esses animais tornam-se um importante modelo experimental para se aprofundar investigações sobre a regulação da expressão do gene do GLUT4, cuja proteína desempenha papel chave na captação de glicose pós- prandial.

Anti-hiperglicemiantes orais

No tratamento do DM2, diversos tipos de medicamentos podem ser utilizados, em monoterapia ou em combinação com a insulina, para controlar a glicemia quando a combinação de dieta e prática de atividade física se torna insuficiente para normalizar os níveis glicêmicos. Existem drogas que retardam a absorção da glicose, como a acarbose (inibidor competitivo da α-glicosidase, enzima responsável pela digestão de polissacarídios complexos a monossacarídios), outras que reduzem a produção hepática de glicose ou aumentam a sensibilidade periférica à insulina, como metformina e tiazolidinedionas (TZD), ou ainda aquelas que estimulam a secreção de insulina, como as sulfoniluréias e glinidas (KECSKEMETI et al., 2002; TRIPATHI;SRIVASTAVA, 2006).

A metformina diminui a oxidação de ácidos graxos, além de aumentar a fosforilação do receptor de insulina no fígado e músculos esqueléticos e diminuir a produção hepática de glicose (TRIPATHI;SRIVASTAVA, 2006). Já as TZDs são ligantes do PPAR-γ (*peroxissome*

proliferator-activated receptor γ), o qual forma heterodímeros com RXR (*retinoid X receptor*). A ligação das TZDs promove alterações conformacionais tais que, retiram complexos co-repressores e favorecem a ligação do complexo PPAR-γ-RXR a elementos responsivos ao PPAR-γ (PPRE), alterando a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas com o metabolismo lipídico e de carboidratos, tais como a lipoproteína lipase, glicoquinase e GLUT4, diminuindo assim, a resistência à insulina em tecido adiposo, músculo e fígado (HAUNER, 2002).

No presente estudo, utilizamos a glimepirida, uma droga do grupo das sulfoniluréias, que são secretagogos de insulina e, por isso, indicados apenas para pacientes que tenham reserva pancreática do hormônio. As sulfoniluréias (Figura 2) recebem esta denominação por apresentarem na sua estrutura química, um grupamento composto por ácido sulfônico e uréia (KECSKEMETI et al., 2002). Por seu potente efeito sobre a secreção de insulina, induzem aumento da insulinemia e, algumas vezes, hipoglicemia prolongada (RAPTIS & DIMITRIADIS, 2001). As drogas mais antigas, como a tolbutamida, têm cadeias laterais mais simples, enquanto as mais modernas, como a glibenclamida, glipizida, gliclazida e glimepirida foram desenvolvidas com cadeias mais complexas, que melhoram a interação com os seus receptores específicos (KECSKEMETI et al., 2002).

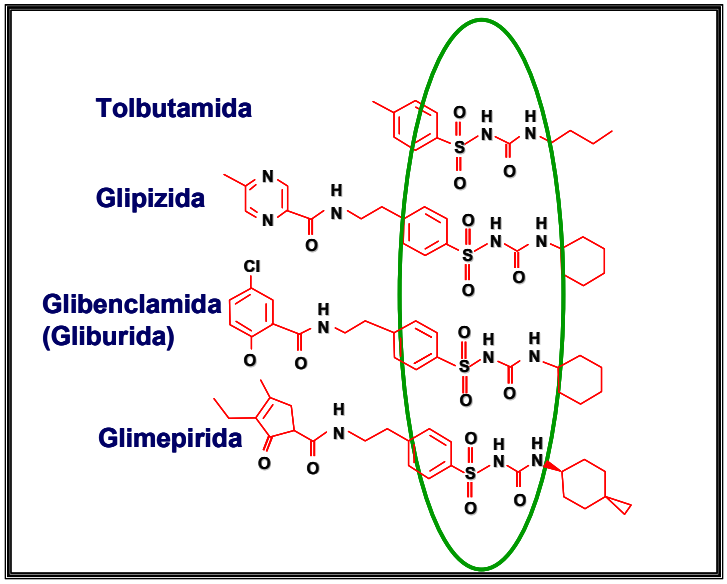


Figura 2 – Estrutura química de algumas sulfoniluréias.

Os receptores das sulfoniluréias são parte integrante da estrutura dos canais de K+ dependentes de ATP (K_{ATP}). Estes canais são octâmeros compostos por 4 subunidades regulatórias, onde se ligam as sulfoniluréias e por isso são denominadas SUR (*sulfonilurea receptors*) e 4 subunidades Kir (*potassium inwardly rectifiers*), que formam os poros por onde o potássio passa para o meio extracelular (GRIBBLE; ASHCROFT, 2000). Dois genes distintos codificam duas diferentes isoformas das subunidades SUR, denominadas SUR1 e SUR2, ocorrendo nesta última, um splicing alternativo que produz dois subtipos: SUR2A e SUR2B. Para a subunidade Kir também há dois genes que codificam Kir6.1 e Kir6.2 (GRIBBLE; REIMANN, 2003).

Nos diferentes tecidos, essas subunidades se combinam de formas variáveis, formando os canais específicos de cada tecido. Assim, no coração e músculos esqueléticos os canais K_{ATP} são

compostos por Kir6.2/ SUR2A. Na musculatura lisa vascular, Kir6.2/ SUR2B ou Kir6.1/ SUR2B; no cérebro, Kir6.2/ SUR2B e Kir6.2/ SUR1 e, na célula B, Kir6.2/ SUR1 (PROKS et al., 2002).

Nas células B, a ligação da sulfoniluréia ao seu receptor tem o mesmo efeito do aumento do metabolismo celular, fechando os canais de potássio, o que resulta em despolarização da célula e conseqüente influxo de cálcio através de canais voltagem dependente. O aumento de cálcio intracelular provoca a secreção das vesículas de insulina (KRAMER et al.,1996).

Glimepirida

A glimepirida difere das demais sulfoniluréias por apresentar uma menor afinidade pelo receptor SUR da célula B (KRAMER et al, 1996). No entanto, seu efeito anti-hiperglicemiante se mantém, podendo ser até maior (MULLER; GEISEN, 1996; MULLER; SATOH; GEISEN, 1995), o que sugere um melhor efeito sensibilizador à insulina, quando comparada a outras sulfoniluréias. No entanto, ao contrário de outros sensibilizadores, como as tiazolidinedionas, ou da própria insulina e até mesmo das demais sulfoniluréias, que promovem ganho de peso acentuado (TRIPATHI; SRIVASTAVA, 2006), o tratamento com a glimepirida não aumenta o peso corpóreo podendo, inclusive, resultar em perda de peso (WEITGASSER et al, 2003). Além disso, a glimepirida apresenta as vantagens de menor risco de hipoglicemias comparativamente a outras sulfonuluréias, e de baixa interação com canais K_{ATP} na fibra cardíaca (HOLSTEIN; PLASCHKE; EGBERTS, 2001; RAPTIS & DIMITRIADIS, 2001).

Dados da literatura já demonstraram que, de fato, além de estimular a secreção de insulina, esta droga pode apresentar efeitos extra-pancreáticos importantes, levando a um aumento da sensibilidade à insulina, pois foi capaz de elevar a captação de glicose e aumentar a taxa de translocação do GLUT4 *in vitro* (MÜLLER; WIED,1993; MÜLLER et al, 1994; MÜLLER; GEISEN, 1996). Em cardiomiócitos em cultura, a glimepirida aumentou a expressão

da proteína GLUT4 (BAHR et al, 1995). Entretanto, nada se conhece sobre os mecanismos que possam estar participando neste efeito da glimepirida *in vivo*.

Assim, no presente estudo, utilizando o modelo de resistência à insulina induzida pelo MSG, investigamos o efeito crônico da glimepirida sobre a expressão do gene do GLUT4 e/ou utilização de glicose nos tecidos insulino-sensíveis, buscando avaliar *in vivo* os efeitos extra-pancreáticos desta sulfoniluréia.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

O presente projeto teve como objetivo geral investigar o efeito da glimepirida sobre a sensibilidade à insulina e possíveis mecanismos moleculares envolvidos, avaliando funcionalmente os territórios onde se observem alterações na expressão do GLUT4 que contribuam para uma melhor sensibilidade à insulina, procurando esclarecer os mecanismos através dos quais a glimepirida promoveu este efeito.

Adicionalmente, tornou-se importante averiguar também a participação do território hepático, uma vez que o fígado é um órgão chave na regulação da homeostase glicêmica.

Objetivos específicos

1-) Demonstrar a efetividade do tratamento crônico com glimepirida na melhora da sensibilidade insulínica dos animais obesos.

2-) Investigar as alterações na expressão do gene do GLUT4 (mRNA e proteína) nos tecidos insulino – sensíveis.

3-) Avaliar a importância funcional das alterações promovidas pela glimepirida no sentido de melhorar a sensibilidade insulínica, através de ensaios de translocação do GLUT4 *in vivo* e ensaios de captação de 2-deoxi-[2,6-^{3}H]-D–glicose e incorporação de glicose ao glicogênio *in vitro*, nas fibras musculares vermelhas.

4-) Investigar a participação do fígado no efeito sensibilizador da glimepirida, avaliando-se o conteúdo de glicogênio hepático.

5) Avaliar a glicogeniogênese hepática, pelo conteúdo da glicogênio sintase kinase 3 (GSK-3) fosforilada, após o tratamento crônico com a glimepirida.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Acasalamentos

Os experimentos foram realizados em ratos da linhagem Wistar.

Ratos Wistar de três a cinco meses de idade, obtidos do biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, foram acasalados no biotério do laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Departamento de Biofísica e Fisiologia desta mesma universidade. As fêmeas prenhes foram mantidas em gaiolas individuais do 15º~17º dia de gestação até o desmame das ninhadas.

2. Indução de obesidade pelo glutamato monossódico

Do 2º ao 8º dia de vida, metade dos filhotes machos recebeu injeção subcutânea de glutamato monossódico (Sigma-Aldrich Chemicals, Steinhein, Germany), na dose de 4,0mg/g/dia, enquanto a outra metade recebeu volume equivalente de salina 0,9%. Após o desmame, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com livre acesso a água e alimento, em ambiente com ciclo de luz controlado de 12 horas claro/ 12horas escuro e temperatura constante de 23 ± 2ºC. Aos 3 meses de idade, foram divididos em grupos experimentais conforme descritos a seguir:

1. Controle (C)
2. Controle tratado com glimepirida (CG)
3. Obeso por tratamento com glutamato monossódico (MSG)
4. Obeso por MSG, tratado com glimepirida (MSG/G)

A presença de obesidade foi verificada através da análise das características morfométricas e pelo cálculo do índice de Lee ([$\sqrt[3]{}$ peso (g)÷comprimento naso-anal (cm)] X

100), um parâmetro semelhante ao índice massa corpórea, utilizado para expressar o grau de obesidade em animais.

3. Tratamento crônico com glimepirida

Animais controles e obesos foram tratados por quatro semanas com glimepirida (Amaryl®, Aventis Pharma , Scoppito, Italy) na dose de 0,1mg/kg de peso corpóreo/ dia, misturada à água de beber. Esta dose, conforme dados da literatura, seria a mínima necessária para inibir a elevação da glicose plasmática após uma sobrecarga oral de glicose (EL-REYANI et al., 1999).

Na semana anterior ao início do tratamento, foi medida a ingestão hídrica média diária de cada grupo, para calcular a quantidade da droga a ser diluída na água, conforme o volume ingerido. A ingestão ao longo das quatro semanas de tratamento foi acompanhada, assegurando a preservação da dose de 0,1mg/kg/dia, durante todo o período. A quantidade de alimento ingerida pelos diferentes grupos durante o tratamento também foi medida.

Ao final do tratamento, os animais foram utilizados para as avaliações descritas a seguir.

4. Teste de Tolerância à Insulina Intravenoso (ITT)

Amostras de sangue foram obtidas por punção caudal dos animais anestesiados (pentobarbital sódico, 60mg/Kg de peso corpóreo), entre 8 e 9 horas da manhã. As coletas foram realizadas antes e aos 4, 8, 12 e 16 minutos após a sobrecarga intravenosa de insulina regular humana (Biobrás), 0,75 U/Kg de peso corpóreo, pela veia peniana. Para determinação da glicemia, utilizou-se um glicosímetro (Precision Q.I.R ®, Medisense, São Paulo, Brasil). A constante de decaimento da glicose (kITT) foi calculada à partir da regressão linear do logaritmo neperiano dos valores glicêmicos obtidos no teste.

5. Coleta de tecidos

Os tecidos foram retirados entre 8 e 10 horas, sob anestesia.

Os músculos esqueléticos escolhidos para análise foram: sóleo (SOL -músculo de fibras vermelhas, oxidativas) e extensor digital longo (EDL -fibras brancas, glicolíticas). Como modelo de gordura abdominal, foi retirado o tecido adiposo branco periepididimal (TAB). O último tecido a ser retirado foi o coração (COR), que teve separadas as massas ventriculares esquerda e direita, sendo a primeira coletada como amostra de músculo cardíaco.

Todos os tecidos, após retirada e pesagem, foram fracionados em amostras para extração de proteínas totais ou de RNA total, as quais foram utilizadas, respectivamente, em *Western* e *Northern Blotting*.

6. Determinação das concentrações de glicose, insulina e frutosamina

Amostras de sangue foram coletadas da veia cava inferior quando da retirada dos tecidos. O plasma, separado por centrifugação a 1500 rpm, foi estocado a –20ºC, em alíquotas para dosagem de glicemia, insulinemia e frutosamina .

A concentração de glicose plasmática foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico de glicose–oxidase (kit *glicose E enzimática*, CELM, São Paulo, Brasil). A insulina plasmática foi determinada por radioimunoensaio (RIE) de fase sólida (kit *Coat - a - Count*® *Insulin*, DPC®, Los Angeles, USA). A concentração de frutosamina foi determinada por método colorimétrico (kit *Fructosamina AA*, Wiener lab., Rosario, Argentina)

7. Northern Blotting

O conteúdo de mRNA do GLUT4 foi avaliado conforme SAMBROOK; MANIATIS (1989).

7.1. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Músculo cardíaco e esquelético:

Foi utilizado 1,0ml de TRIZOL Reagent® (LIFE TECHNOLOGIES – GIBCO BRL, Gaithersburg, USA) para homogeneização de 0,1g de tecido. Após incubação de 5 minutos em temperatura ambiente (T_A), e centrifugação a 10.000 *g* (15 min, 4ºC), clorofórmio foi adicionado ao sobrenadante. Após 10 minutos (T_A), a amostra foi centrifugada a 10.000 *g*, (15 minutos, 4ºC) e a fase superior, acrescida de isopropanol, foi incubada (10 min., T_A) e centrifugada a 10.000 *g* (15 min., 4ºC). O precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 10.000 *g* (15 min., 4ºC). Removido o sobrenadante, secou-se o precipitado, que foi solubilizado em água DEPC (dietil pirocarbonato), a 65ºC (10 min.).

Tecido adiposo branco:

Por apresentar rendimento mais baixo que os demais tecidos, foram homogeneizados 0,6g de tecido em 5,0ml de TRIZOL Reagent®l. Com uma centrifugação a 1400 *g*, por 10 minutos a 4ºC, separou-se o extrato rico em gordura da fase aquosa, à qual se adicionou clorofórmio para incubação a T_A. As etapas posteriores da extração foram semelhantes às descritas acima para o tecido muscular.

As concentrações de RNA total foram determinadas por leitura em 260nm, em espectrofotômetro (Gene Quant II, PHARMACIA BIOTECH – Biochrom, Cambridge, UK).

7.2. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Vinte µg de RNA total de músculo (ou 30 µg de RNA total de tecido adiposo) foram precipitados por centrifugação a vácuo. Tampão de corrida concentrado 10x (MOPS 0,2M, EDTA 10mM, NaOAc 50mM; pH 7,0); formaldeído e formamida foram adicionados ao RNA

total e incubados a 65ºC, durante 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se o tampão de aplicação (glicerol 30%, *bromophenol blue* 0,25%, em H_2O DEPC) e brometo de etídio (diluído 1/20).

A eletroforese para a separação do RNA total foi realizada sob corrente constante de 400mA, 100V, em gel analítico de agarose 1,3%, durante aproximadamente 3 horas, em um sistema de eletroforese horizontal, submersa em tampão de corrida.

7.3. TRANSFERÊNCIA

As amostras foram transferidas por capilaridade para uma membrana de nylon Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK), utilizando-se um sistema de ponte com papel de filtro, em cuba de vidro contendo SSC 20X concentrado (NaCl 3M Tri-sódio citrato 0,3M, pH 7,0). Durante aproximadamente18 horas, as amostras se transferiram do gel para a membrana de nylon. Em seguida, o RNA foi fixado à membrana através de exposição à radiação ultravioleta, por 3 minutos.

7.4. HIBRIDAÇÃO

A hibridação e pré hibridação foram realizadas a 65ºC, em forno de hibridação AMERSHAM Pharmacia Biotech, RPN2511.

7.4.1 - Construção das sondas de GLUT4 ou β-actina

Aproximadamente 25 ng dos cDNAs de GLUT4 ou de β-actina, foram processados com α-^{32}P dCTP (25 μCi), para obtenção de fitas complementares radioativas, utilizando-se *kit* Random Primers DNA Labeling System (InvitrogenTM Life Technologies, Gaitherburg, USA).

7.4.2 – Pré-hibridação e Hibridação

Para bloqueio de ligações inespecíficas, a membrana foi pré - incubada com tampão de hibridação (NaH_2PO_4. H_2O 0,5M; $Na_2HPO_4.7H_2O$ 0,5M; SDS 10%; EDTA 0,5M pH 8,0; 1%BSA) acrescido de cDNA de esperma de salmão, por pelo menos 3 horas. Posteriormente, adicionou-se a sonda radioativa ao tampão para hibridação por 16 a 18 horas, a 65ºC.

Em seguida, a membrana foi lavada em baixa estringência (SSC 2x + SDS 0,1%, 20 min.,T_A), e alta estringência (SSC 0,1X e SDS 0,1%, 2,5 min., 65ºC), e seca à temperatura ambiente.

7.5. AUTORRADIOGRAFIA E DENSITOMETRIA ÓPTICA:

Um filme hipersensível (Hyperfilm - Amersham, Buckinghamshire, UK) foi exposto à membrana a -70ºC, por aproximadamente três dias, e revelado com solução reveladora/ reforçadora GBX e solução fixadora/ reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, BR). A intensidade dos *blots* foi avaliada por densitometria óptica, utilizando o *software* Image Master 1D Prime (Pharmacia Biotech, Uppsala, SW).

Os resultados numéricos obtidos à partir da densidade óptica foram chamados de unidades arbitrárias (UA). Os valores em UA correspondentes ao mRNA de GLUT4 foram corrigidos pelas respectivas UA de β-actina, obtidas pela hibridação subseqüente das mesmas membranas. O valor médio do grupo controle em cada membrana foi considerado como 100 e cada valor individual foi normalizado a uma porcentagem deste valor.

8. Western blotting

O conteúdo da proteína GLUT4 foi avaliado conforme as etapas a seguir:

8.1. EXTRAÇÃO PROTEICA FRACIONADA

As amostras de tecidos musculares foram processadas conforme Mitsumoto e Klip (1992). Após homogeneização em Polytron PT 3000 KINEMATICA ® (BRINKMAN) a 20.000 rpm, em tampão de homogeneização (Tris HCl 10mM; EDTA l,0mM; sacarose 250mM) numa proporção de 1:6 (peso: volume), as amostras foram centrifugadas a 760 *g* (10 min., 4ºC). O sobrenadante foi separado e centrifugado a 31.000 *g* (60 min., 4ºC), sendo o *pellet*, ressuspenso em tampão de homogeneização, correspondente à fração de membrana plasmática (PM). O sobrenadante, após ultracentrifugação a 190.000 *g* (60 min., 4ºC), produziu o *pellet* correspondente à fração microssomal (M). A eficiência deste fracionamento foi testada pela atividade da enzima 5´nucleotidase, um marcador específico de membranas plasmáticas, e cuja atividade específica foi dosada em PM e M, conforme Avruch & Wallach (1971) e corrigida por grama de tecido (resultados expressos nos anexos 5A a 5C).

O tecido adiposo branco foi homogeneizado em Polytron, a 20.000 rpm em tampão de homogeneização, na proporção de 1:4, e processado conforme Machado et al. (1994). O homogenato foi centrifugado a 1000 *g*, (15 min., 4ºC); a gordura sobrenadante e o precipitado foram desprezados. O volume restante (extrato livre de gordura - FFE) foi centrifugado a 22.000 *g* (15 min. 4ºC) e o sedimento (fração de membrana plasmática - PM), ressuspenso e estocado a –20ºC. O sobrenadante foi centrifugado a 28.000 *g* (15 min., 4ºC) e o *pellet*, rico em microssoma de alta densidade, foi descartado, e o sobrenadante foi ultracentrifugado a 146.000 *g* (75 min., 4ºC), para obter a fração microssomal de baixa densidade (M), contida no sedimento da ultracentrifugação, que foi ressuspenso e estocado. Este fracionamento, já bem padronizado em nosso laboratório, dispensou verificação da atividade do marcador específico, que inclusive já foi demonstrada por Machado et al., 1995.

8.2. SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*):

Após a determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), as amostras foram submetidas a separação eletroforética em gel de poliacrilamida 10%.

Foi utlizado o método desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin (1990), que envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos para o empacotamento (*stacking gel*) e separação (*resolving gel)* das amostras, que foram acrescidas de glicerol 15%, Tris 0,05M, *bromofenol blue* 0,05%, SDS 9%, com 6% de 2-mercaptoetanol, 1:1, e fervidas por 3 minutos.

A eletroforese foi realizada em tampão Tris HCl 25mM, glicina 190mM, SDS 0,1%, EDTA 2mM, pH8,3, com voltagem constante para o gel de empacotamento (75 mV) e corrente constante para o gel de separação (60 mA).

8.3 TRANSFERÊNCIA ELETROFORÉTICA:

A transferência eletroforética para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (Amersham, Buckinghahmshire, UK), foi realizada sob corrente constante de 40mA, durante 16 horas, a 4ºC, em tampão Tris HCl 12,5 mM, glicina 95 mM, metanol 20%, pH 8,3.

8.4. DETECÇÃO POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA

A membrana de nitrocelulose foi submetida a imunodetecção de proteínas específicas, seguido de quantificação por quimioluminescência, segundo especificações do kit ECL^{TM} Western Blotting Analysis System, RPN 2108 (Amersham International, Buckinghamshire, UK). Bloquearam-se as reações inespecíficas com PBS acrescido de leite em pó desnatado (8%). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo específico (rabbit anti-GLUT4 polyclonal,antibody, Chemicon International, Inc) em PBS/BSA 8% (1:3000), por 3 horas, a 37

ºC, lavada com PBS-T (PBS 1X + Tween 20, 0,1%) e incubada por 1 hora a temperatura ambiente, em PBS/BSA 1% contendo anticorpo secundário (anti-Ig de coelho), ligado à HRP (*horseradish peroxidase*) (Amersham International Buckinghamshire, UK).

Após incubação com os reagentes de detecção do kit ECL^{TM}, a membrana foi imediatamente exposta a filme de RX (Hyperfilm - Amersham, Buckinghamshire, UK), durante 1 a 15 minutos. O filme foi revelado com solução reveladora e reforçadora GBX e solução fixadora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, BR).

A intensidade dos *blots* foi avaliada por densitometria óptica (software Image Master 1D Prime, Pharmacia Biotech, Uppsala, SW) e o resultado numérico foi expresso em unidades arbitrárias (UA). A média do grupo controle de cada membrana foi considerada como 100 e cada valor individual foi normalizado a uma porcentagem deste controle. O conteúdo de GLUT4, calculado com base nestes valores e na recuperação protéica total de cada grama do tecido, foi expresso em unidades arbitrárias por grama de tecido(UA/g).

9. Translocação do GLUT4 sob estímulo insulínico

Após jejum de 10 horas, os animais foram anestesiados e injetados com 4U de insulina regular humana (Biolin, Biobras), na veia peniana. Antes da injeção, foram coletados: 1) sangue, por punção caudal, para registro da glicemia e 2) sóleo direito, para determinação do conteúdo de GLUT4 no estado basal. Dez minutos após a injeção, foi coletado o sóleo esquerdo, que representou o conteúdo da proteína após a sobrecarga insulínica, e registrada a glicemia pós – estímulo (MACHADO et al., 1994).

As amostras de tecido foram submetidas aos mesmos procedimentos para quantificação da proteína GLUT4 por *Western Blotting*.

10- Captação de 2-deoxi-[2,6-^{3}H]–D-glicose e incorporação de [U-^{14}C]-D-glicose, no músculo sóleo, *in vitro*

O alimento foi retirado cinco horas antes do início dos experimentos de captação de glicose, os quais foram realizados sempre às 11:00h da manhã.

O músculo sóleo foi incubado conforme descrito por CHALLISS et al. (1983). Após sacrifício dos animais por deslocamento cevical, o sóleo foi rapidamente isolado e cuidadosamente dividido longitudinalmente em pedaços de 25-35g. Uma pré-incubação foi realizada em tampão bicarbonato de Krebs-Ringer pH 7,4 contendo 5,6mM de glicose, por 30 minutos, a 37ºC, 95%O_2 e 5% CO_2, sob agitação contínua de 120rpm. Em seguida, os músculos foram transferidos para recipientes contendo o mesmo tampão, acrescidos de 0,2µCi/ml de 2-deoxi-[2,6-^{3}H]-D-glicose e 0,3µCi/ml de [U-^{14}C]-D-glicose.

Os músculos foram incubados por 1 hora, na ausência ou presença de 10mU/ml de insulina. A gaseificação foi mantida nos primeiros 15 minutos de incubação. Ao final da incubação, os músculos foram lavados em salina 0,9%, 4ºC e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, foi medida a captação de 2-deoxi-[2,6-^{3}H]-D-glicose, e a incorporação de [U-^{14}C]-D-glicose ao glicogênio muscular precipitado e extraído, segundo os métodos descritos por CHALLIS et al.(1986) e CRETTAZ et al.,(1980).

11- Conteúdo de glicogênio hepático

O glicogênio foi extraído segundo GEARY et al. (1981). Amostras de fígado de 100mg e uma curva padrão de glicogênio foram incubadas por 1hora a 95ºC em KOH 30%. Para precipitação do glicogênio, foram adicionados Na_2SO_4 saturado e etanol absoluto, seguindo-se centrifugação a 1500 rpm por 15 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em água quente (80ºC) e centrifugado por mais duas vezes com etanol para purificar o precipitado que, em seguida, foi

seco e hidrolisado em HCl 4N, por 2 horas, a 95 ºC. Após neutralização com NaOH 4N, dosou-se a quantidade de glicose gerada pela hidrólise do glicogênio, utilizando-se o *kit* glicose E enzimática (CELM, São Paulo, Brasil).

12- Quantificação da p-GSK3 (glicogênio sintase quinase fosforilada) no fígado

Os animais foram privados de alimento por 10 horas. Amostras de fígado foram coletadas no estado basal e 10 minutos após injeção de 4U de insulina regular humana (Biohulin, Biobrás, Brasil), na v. porta. Os tecidos, retirados entre 8:00 e 10:00 horas da manhã, foram imediatamente homogeneizados em tampão (Tris 100mM, EDTA 10mM, PSMF 2mM, fluoreto de sódio 100mM, ortovanadato de sódio 10mM, pirofosfato de sódio, 10mM, aprotinina 0,01mg/ml, triton 100X 10%) para impedir a ação das fosfatases, utilizando-se Polytron PT 3000 KINEMATICA ® (BRINKMAN) a 20.000 rpm.

12.1- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As amostras, após determinação da concentração de proteínas totais (LOWRY et al., 1951), foram adicionadas de azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 0,05M, glicerol 50% e SDS 10%, fervidas e aplicadas ao gel de poliacrilamida a 10%. A eletroforese foi realizada com voltagens fixas de 40V para o gel de empacotamento e 60V para o gel de separação. O tampão de corrida foi composto de Tris 50mM, Glicina 0,38M, EDTA 1,80mM, SDS 0,1%.

12.2- TRANSFERÊNCIA ELETROFORÉTICA

A transferência eletroforética para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (Amersham, Buckinghahmshire, UK), foi realizada sob corrente constante de 40mA, durante 16 horas, a 4ºC, em tampão de transferência Tris 25mM, Glicina 192mM, metanol 20%, SDS 0,02%

12.3- DETECÇÃO POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA

A imunodetecção da proteína específica e quantificação por quimioluminescência seguiram as especificações do anticorpo anti-fosfo-GSK-3α/β (Ser 21/9) (Cell Signaling Technology, Inc.) e do kit ECL™ Western Blotting Analysis System, RPN 2108 (Amersham, Buckinghahmshire, UK).

Reações inespecíficas foram bloqueadas com PBS pH 7,2, acrescido de leite em pó desnatado (8%). Em seguida, a membrana foi incubada a 4ºC, sob agitação constante, por 16 horas, com o anticorpo primário anti-fosfo-GSK-3α/β, Ser 21/9, em diluição 1/1000 em TBS 0,1% Tween 20, BSA 5%.

A incubação com Ac secundário, detecção por quimioluminescência e avaliação densitometria óptica seguiram o mesmo protocolo descrito acima, no item 8.4. O resultado numérico foi expresso em unidades arbitrárias (UA).

13. Análise estatística

Os resultados numéricos estão apresentados como média ± E.P.M. As médias dos conteúdos de mRNA do GLUT4, proteína GLUT4 e glicogênio hepático dos diversos grupos experimentais foram confrontados por análises de variância de uma via para dados independentes, seguidas pelo teste de Student-Newman-Kewls.

As médias dos grupos submetidos aos experimentos envolvendo estímulo insulínico foram confrontadas por ANOVA de duas vias para dados relacionados, seguida do teste de *Bonferroni*.

O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

Parâmetros morfométricos e verificação da presença de obesidade

As tabelas 2 e 3 mostram os parâmetros morfométricos dos animais controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida. Nota-se que os animais obesos apresentaram um aumento de cerca de 50% ($P< 0,05$) no peso da gordura periepididimal (MSG: 5,21 ± 0,25g; MSG/G: 5,50 ± 0,75g) em relação aos controles (C: 3,62 ± 0,23g; CG: 3,34 ± 0,29g). Também apresentaram pesos absolutos do coração e dos músculos esqueléticos sóleo (SOL) e extensor digital longo (EDL) significativamente menores (tabela 2A).

Analisando-se o peso destes tecidos relativamente ao peso corpóreo, observamos que o aumento da massa adiposa foi ainda mais acentuado (73%), confirmando o aumento de adiposidade nestes animais (MSG: 1791 ±87mg e MSG/G: 1787 ± 223mg, $P< 0,01$ vs. C: 1116 ± 123mg e CG: 956 ± 184mg). Por outro lado, o peso relativo dos músculos (COR, SOL, EDL) não foi diferente entre ratos controles e obesos, demonstrando que o menor peso absoluto dos músculos dos obesos foi devido ao prejuízo no crescimento, sendo mantida a proporção de massa magra relativamente ao peso (tabela 2B).

De fato, os animais obesos tiveram menor peso corpóreo (MSG: 291 ± 9g e MSG/G: 288 ± 7g, $P<0,001$ vs. C: 350 ± 11g e CG: 350 ± 10g), associado à diminuição do comprimento naso-anal (MSG: 20,9 ± 0,2cm e MSG/G: 21 ± 0,2, $P< 0,001$ vs. C: 22,7 ± 0,2cm e CG: 23 ±0,2cm), como se observa na tabela 3.

Assim, além do excesso de deposição de gordura, a obesidade confirmou-se pelo índice de Lee, que demonstrou que os animais MSG (31,61 ± 0,12$g^{1/3}$/cm) e MSG/G (31,45 ± 0,14 $g^{1/3}$/cm) apresentaram maior peso em relação ao comprimento que seus respectivos controles, C

(31,00 ± 0,12 $g^{1/3}$/cm) e CG (30,60 ± 0,23 $g^{1/3}$/cm), embora o peso corpóreo absoluto dos obesos tenha sido menor (tabela 3).

O tratamento com a glimepirida não afetou nenhuma das características morfométricas analisadas, como pode ser observado pela ausência de diferenças entre os grupos C e CG e entre os grupos MSG e MSG/G (tabelas 2 e 3).

TABELA 2A: Peso absoluto dos tecidos de animais controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas.

Tecido / Grupo	TAB (g)	SOL (mg)	EDL (mg)	COR (mg)
C (n=10)	3,62 ± 0,23	130 ± 6	150 ± 7	960 ± 30
CG (n=7)	3,34 ± 0,29	130 ± 8	140 ± 5	930 ± 50
MSG (n=13)	5,21 ± 0,25* †	100 ± 2***†††	120 ± 6 *** †	780 ± 20 *** ††
MSG/G (n=10)	5,50 ± 0,75* †	100 ± 4*** †††	130 ± 6 *	780 ± 30 *** ††

TAB= Tecido Adiposo Branco; SOL = músculo sóleo; EDL = músculo Extensor Digital Longo; COR = músculo cardíaco.
Valores expressos como média ± EPM e comparados por análise de variância de 1 via, para dados indepentes.
* $p < 0.05$ vs. C* * * $p < 0.001$ vs. C;
† $p < 0,05$ vs. CG †† $p < 0,01$ vs. CG † † † $p < 0,01$vs. CG

TABELA 2B: Peso relativo a 100 gramas de peso corpóreo dos tecidos de animais controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas.

Tecido / Grupo	TAB (mg/100g)	SOL (mg/100g)	EDL (mg/100g)	COR (mg/100g)
C (n=10)	1116 ± 123	38 ± 2	43 ± 2	274 ± 9
CG (n=7)	956 ±84	37 ± 2	41 ± 3	267 ± 14
MSG (n=13)	1791 ± 87 **††	32 ± 1	39 ± 2	266 ± 6
MSG/G (n=10)	1787 ± 223**††	32 ± 2	43 ± 2	268 ± 10

TAB= Tecido Adiposo Branco; SOL = músculo sóleo; EDL = músculo Extensor Digital Longo; COR = músculo cardíaco.
Valores expressos como média ± EPM e comparados por análise de variância de 1 via, para dados indepentes.
** $p < 0.01$ vs. C
†† $p < 0,01$ vs. CG

TABELA 3: Índice de Lee, peso corpóreo e comprimento naso-anal de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida durante quatro semanas.

Grupo	Peso (g)	Comprimento (cm)	Índice de Lee ($g^{1/3}$/cm)
C (n = 17)	350,3 ± 10,8	22,7 ± ,21	31,00 ± 0,14
CG (n = 13)	350,1 ± 10,4	23,0 ± 0,17	30,60 ± 0,23
MSG (n = 18)	291,3 ± 8,7 * * * †††	20,9 ± 0,19 * * * †††	31,61± 0,12 * †††
MSG/G (n= 18)	287,9 ± 7,4 * * * †††	21,0 ± 0,21 * * * †††	31,45± 0,14 * ††

ÍNDICE DE LEE = ($\sqrt[3]{}$ **peso ÷ comprimento naso-anal**) X 100

Valores expressos como média ± EPM, comparados por Análise de variância de 1 via, para dados independentes

* $p < 0,05$ vs. C * * * $p < 0,001$ vs. C

†† $p < 0,01$ vs. CG ††† $p < 0,001$ vs. CG

Consumo de água e alimento

Os consumos de água e ração dos diferentes grupos experimentais foram medidos antes e durante as 4 semanas de tratamento com glimepirida, pelo menos 2 vezes por semana.

As tabelas 4A e 4B mostram, respectivamente, o consumo médio de ração e de água, antes do início da administração da glimepirida e ao final do período de tratamento. Durante este período, os consumos tanto de alimento como de água se mantiveram constantes dentro de cada grupo, não havendo diferença significativa entre o consumo inicial e consumo final, após 4 semanas.

Comparados aos animais controles, os obesos (tratados ou não com glimepirida) apresentaram consumo absoluto significativamente mais baixo, tanto de alimento quanto de água. A glimepirida não alterou o consumo, pois os grupos CG e MSG/G apresentaram ingestão semelhante aos grupos C e MSG, respectivamente. É interessante ressaltar que as diferenças de consumo entre controle e MSG foram devidas às diferenças de tamanho dos animais apenas, pois embora os grupos obesos apresentassem menor ingestão em valores absolutos, estes valores igualaram-se quando normalizados por 100g de peso corpóreo, demonstrando a normofagia dos animais MSG.

TABELA 4 -A: Consumo alimentar de diário de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida, expresso em valores absolutos (g) e relativos a 100g de peso corpóreo (g/100g).

Grupo	Consumo alimentar			
	Absoluto		Relativo	
	Inicial (g)	Final (g)	Inicial (g/100g)	Final (g/100g)
C (5)	23,30 ± 0,18	23,15 ± 0,16	7,27 ± 0,30	6,41 ± 0,26
CG (6)	23,50 ± 0,10	23,60 ± 0,20	7,29 ± 0,22	6,47 ± 0,11
MSG (6)	20,93 ± 0,22***†††	21,05 ± 0,20***†††	7,66 ± 0,23	6,73 ± 0,22
MSG/G (6)	20,60 ± 0,20***†††	20,80 ± 0,15***†††	7,51 ± 0,10	6,70 ± 0,14

Inicial = média de dois dias anteriores ao início do tratamento com glimepirida; Final = dois últimos dias antes do sacrifício. Resultados expressos como média ± EPM, calculada a partir do consumo médio de 5 ou 6 gaiolas coletivas, contendo 3-4 animais.

*** $p < 0.001$ vs. C; ††† $p < 0,001$ vs. CG

TABELA 4 -B: Consumo hídrico diário de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida, expresso em valores absolutos (ml) e relativos a 100g de peso corpóreo (ml/100g).

Grupo	Consumo hídrico			
	Absoluto		Relativo	
	Inicial (ml)	Final (ml)	Inicial (ml/100g)	Final (ml/100g)
C (7)	31,00 ± 1,36	32,00 ± 1,03	10,08 ± 0,33	9,40 ± 0,30
CG (5)	30,48 ± 1,24	31,26 ± 1,28	10,35 ± 0,31	9,41 ± 0,33
MSG (7)	25,19 ± 1,52* †	25,66 ± 0,49 * †	9,88 ± 0,59	8,77 ± 0,29
MSG/G (7)	25,49 ± 1,34* †	25,23 ± 1,65* †	9,76 ± 0,57	8,38 ± 0,45

Inicial = média de dois dias anteriores ao início do tratamento com glimepirida; Final = dois últimos dias antes do sacrifício. Resultados expressos como média ± EPM, calculada a partir do consumo médio de 5 ou 7 gaiolas coletivas, contendo 4-5 animais.

* $p < 0.05$ vs. C; † $p < 0,05$ vs. CG

Avaliação da sensibilidade à insulina

Na tabela 5, observa-se que a glimepirida não alterou os níveis glicêmicos (ANOVA, $p>0,05$), embora tenha elevado a insulinemia, tanto nos ratos controles ($p<0,05$) quanto nos obesos ($p<0,001$). Mesmo com as insulinemias elevadas, os animais tratados não apresentaram indícios de variações glicêmicas importantes durante o período de tratamento, pois as concentrações de frutosamina foram semelhantes entre todos os grupos ($p>0,05$). Comparando-se C e MSG, não houve diferença significativa entre as insulinemias, embora os obesos tendessem a apresentar uma elevação, o que indica que estes animais foram avaliados numa fase do desenvolvimento em que as alterações metabólicas da sua obesidade ainda não se encontravam totalmente estabelecidas.

Assim, para confirmar a presença de resistência insulínica, utilizamos o teste de tolerância à insulina, onde avaliamos se houve diferença na resposta aguda a este hormônio entre os diferentes grupos. A figura 3 mostra, em valores percentuais por minuto, as constantes de decaimento da glicose (kITT) obtidas à partir dos valores de glicemia de 0 a 16 minutos após sobrecarga venosa de insulina. O grupo MSG (kITT = 3,26 ± 0,30 % por minuto) apresentou decaimento da glicose significativamente mais lento que os grupos C (4,67 ± 0,39 % por minuto), CG (4,68 ± 0,34 % por minuto) e MSG/G (4,53 ± 0,28 % por minuto).

Os valores de glicemia basal, registrados antes da sobrecarga hormonal, foram semelhantes entre os grupos C (120,4±3,0 mg/dl), CG (115,3±1,6 mg/dl), MSG (106,4±2,6 mg/dl) e MSG/G (115,9±4,9 mg/dl). Observe-se que estes valores foram significativamente mais baixos que as glicemias obtidas nos ensaios de glicose oxidase (tabela 5), pois foram medidos em amostras de sangue total da cauda, coletado por punção caudal, enquanto as dosagens foram em

plasma, isolado do sangue obtido da veia cava inferior. No entanto, também nestas amostras não se observaram diferença significativas entre os grupos

TABELA 5 – Parâmetros metabólicos de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida, durante quatro semanas.

GRUPO	GLICEMIA (mg/dl)	INSULINEMIA (µU/ml)	FRUTOSAMINA (µmol/l)
C	137,75 ± 3,10 (n=16)	16,95 ± 2,09 (n= 15)	132,30± 7,69 (n=8)
CG	142,58 ± 2,49 (n=11)	27,51 ± 3,90 (n=12) *	125,4 ± 7,85 (n=8)
MSG	144,22 ± 3,98 (n=17)	20,87 ± 1,58 (n=18)	137,7 ± 6,11 (n=7)
MSG/G	146,18 ± 4,54 (n=14)	34,73 ± 3,07 ***### (n=12)	135,3 ± 7,53 (n=7)

Amostras coletadas sem restrição alimentar prévia. Resultados expressos como média ± EPM, comparados por Análise de Variância de 1 via, para dados independentes; * p<0,05 vs. C, ***p<0,001 vs. C; ### p<0,001 vs. MSG

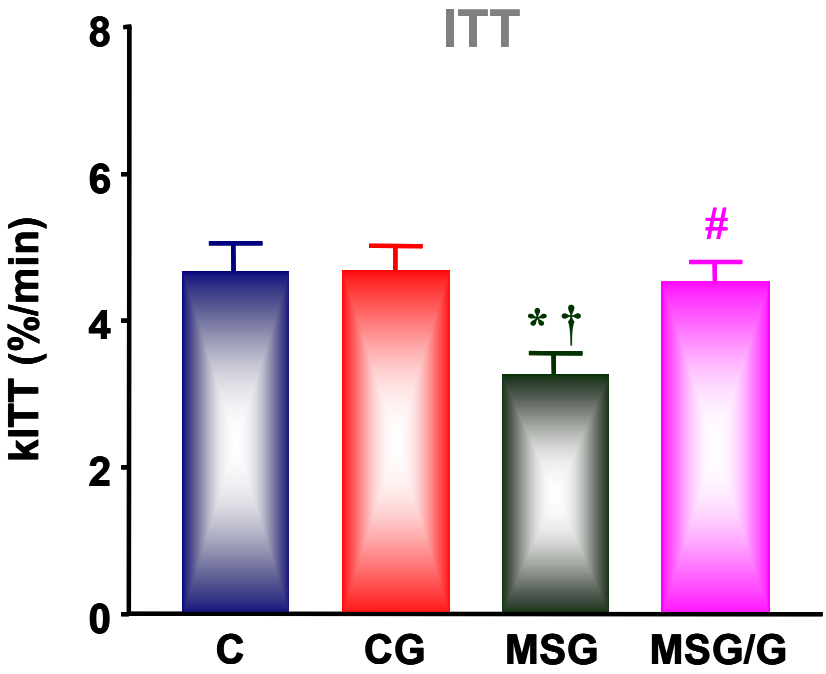


FIGURA 3: Constante de decaimento da glicose (kITT) de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. Os resultados foram obtidos em 7-8 animais por grupo, sendo as médias comparadas por análise de variância de 1 via para dados independentes, seguida do teste de Student Newman-Kewls (SNK).

* $p < 0,05$ vs. C † $p < 0,05$ vs. CG # $p < 0,05$ vs. MSG

Análise da expressão do gene do GLUT4 e distribuição subcelular da proteína

Na tabela 6, estão demonstrados os valores de recuperação protéica total para os diferentes tecidos estudados. Em cada fração (PM, M ou FFE), nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

As figuras de 4 a 11 referem-se aos resultados obtidos nos experimentos de *Northern* e *Western Blotting* quanto à expressão do mRNA de GLUT4 e proteína GLUT4 total, respectivamente (figuras 4, 6, 8 e 10) e aos resultados de *Western Blotting* quanto à distribuição sub-celular da proteína GLUT4, nos diversos tecidos estudados (figuras 5, 7, 9 e 11).

Músculo cardíaco

Como se observa nas figuras 4 e 5, cujos valores numéricos e número de animais em cada grupo encontram-se expressos no anexo 1, não houve efeito do MSG ou da glimepirida sobre a expressão do mRNA do GLUT4 ($p > 0,05$), ou da proteína GLUT4 ($p > 0,05$).

Apenas nas frações microssomais houve uma tendência à diminuição do conteúdo de GLUT4 nos grupos tratados com a glimepirida ($p>0,05$). No entanto, a quase totalidade do GLUT4 recuperado nas frações esteve presente em PM, de modo que eventuais variações em M não se refletiriam no conteúdo total.

Para verificar se as frações PM, não só do músculo cardíaco, mas também dos músculos esqueléticos, encontraram-se de fato enriquecidas em proteínas de membranas plasmáticas, foi dosada a atividade enzimática de um marcador específico, a 5´nucleotidase. Os resultados destes ensaios encontram-se expressos nos anexos 5A a 5C, onde é possível verificar que 75% a 95% do total da atividade de 5´nucleotidase recuperada estiveram de fato presentes nas frações de membranas plasmáticas.

Músculos esqueléticos

EDL

Os resultados obtidos neste tecido estão representados nas figuras 6 e 7, cujos valores numéricos encontram-se expressos no anexo 2.

Neste músculo, constituído predominantemente de fibras brancas, glicolíticas, a glimepirida reduziu em cerca de 33% o conteúdo de mRNA do GLUT4 dos ratos controles (CG vs. C, $p<0,01$). Esta redução refletiu-se apenas na fração microssomal (figura 7), sendo insuficiente para reduzir significativamente o conteúdo total (PM+M), onde todos os grupos apresentaram conteúdos semelhantes da proteína.

As mesmas alterações foram provocadas pelo MSG, que reduziu o mRNA do GLUT4 em 25% (MSG vs. C, $p<0,01$) e proteína apenas na fração microssomal. A glimepirida restaurou o conteúdo de mRNA, que se elevou em 23% em relação ao grupo MSG ($p<0,05$ vs. MSG), bem como a proteína dos estoques intracelulares, que foram semelhantes aos do grupo C.

Quanto à distribuição subcelular neste tecido (figura 7), 90% do GLUT4 total foi encontrado na fração de membranas plasmáticas, onde também foi recuperado mais de 75% da atividade de 5´nucleotidase, como pode ser observado no anexo 5B.

SÓLEO

Neste tipo de músculo esquelético, constituído predominantemente de fibras vermelhas, oxidativas (figuras 8 e 9, e valores numéricos no anexo 3), a glimepirida promoveu aumento da expressão de GLUT4, tanto nos animais controles quanto nos obesos.

No grupo controle, a glimepirida aumentou o conteúdo de mRNA em cerca de 34% (CG, $p<0,05$ vs. C), que foi acompanhado de um aumento de quase 60% na proteína GLUT4 ($p<0,05$).

Por outro lado, o MSG não alterou o conteúdo de proteína ($p>0,05$ vs. C), embora tenha elevado o mRNA em 31% ($p < 0,01$ vs. C). Assim, os animais obesos mantiveram o mesmo conteúdo da proteína que os animais controles, mas apenas às custas de um aumento significativo do mRNA. Vale ressaltar que este mesmo aumento, nos animais CG, foi suficiente para elevar significativamente o conteúdo da proteína. Esta deficiência relativa da proteína GLUT4 nos obesos foi corrigida pelo tratamento com a glimepirida, que não alterou a expressão do mRNA (MSG/G vs. MSG, $p>0,05$), mas elevou em 85% o conteúdo total da proteína GLUT4 (MSG/G vs. MSG, $p<0,001$).

Em todos os grupos, 80% ou mais do conteúdo total de GLUT4 encontrou-se na fração de membranas plasmáticas. Tanto em PM quanto em M, a glimepirida elevou significativamente o conteúdo desta proteína em relação aos respectivos grupos não tratados, demonstrando um efeito muito evidente da glimepirida no sentido de elevar a expressão deste transportador de glicose neste tecido.

Quanto à atividade de 5´nucleotidase, mais de 75% da atividade recuperada esteve presente na fração PM, demonstrando seu enriquecimento em proteínas de membranas plasmáticas (anexo 5C).

Tecido adiposo branco

Na figura 10A (anexo 4), observa-se que o grupo MSG apresentou conteúdo de mRNA do GLUT4 elevado em 30% (MSG vs. C, $p<0,05$), efeito este revertido pelo tratamento com a glimepirida (MSG/G vs. C, $p>0,05$). Nos animais controles, a glimepirida não provocou aumento significativo do mRNA do GLUT4 (CG vs. C, $p > 0,05$).

As variações do conteúdo da proteína GLUT4 (figura 10B, anexo 4) refletiram o mesmo padrão dos resultados do *Northern Blotting*, pois o aumento significativo observado no grupo

MSG ($p<0,01$ vs. C) foi igualmente revertido pelo tratamento com a glimepirida, apresentando o grupo MSG/G quantidade de GLUT4/g tecido semelhante ao grupo C. Novamente, nos animais controles, a glimepirida não chegou a promover alteração significativa (CG, $p>0,05$ vs. C).

As figuras 11A e 11B demonstram que a elevação do GLUT4 total decorreu de maior conteúdo de GLUT4 na fração de membranas plasmáticas (PM), a despeito do fato de mais de 50% do GLUT4 total recuperado nas frações subcelulares estar localizado nos estoques intracelulares (M). Nestes, não se observaram diferenças significativas no conteúdo de GLUT4, embora seja interessante ressaltar que nos grupos tratados com a glimepirida houve uma tendência à diminuição do conteúdo intracelular ($p>0,05$).

TABELA 6 - Recuperação protéica total por grama de tecido nas diferentes frações dos tecidos de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida, por 4 semanas.

TAB	**C (n = 5)**	**CG (n = 5)**	**MSG (n = 5)**	**MSG/G (n = 5)**
PM (mg/g)	0,45 ± 0,075	0,66 ± 0,12	0,45 ± 0,04	0,54 ± 0,08
M (mg/g)	0,33 ± 0,047	0,32 ± 0,061	0,26 ± 0,055	0,33 ± 0,05
FFE (mg/g)	8,78 ± 1,27	10,11 ± 1,48	7,79 ± 0,68	8,67 ± 1,41
SÓLEO	**C (n = 6)**	**CG (n = 5)**	**MSG (n = 6)**	**MSG/G (n = 5)**
PM (mg/g)	5,09 ± 0,36	4,74 ± 0,47	4,49 ± 0,65	5,20 ± 0,58
M (mg/g)	1,84 ± 0,12	2,02 ± 0,23	1,87 ± 0,14	1,74 ± 0,81
EDL	**C (n = 6)**	**CG (n = 6)**	**MSG (n = 6)**	**MSG/G (n = 6)**
PM (mg/g)	5,59 ± 0,75	5,12 ± 0,83	7,90± 1,179	8,86 ± 2,08
M (mg/g)	2,42 ± 0,27	2,33 ± 0,32	1,80 ± 0,27	2,98 ± 0,34
COR	**C (n = 7)**	**CG (n = 5)**	**MSG (n = 6)**	**MSG/G (n =5)**
PM (mg/g)	31,65 ± 5,28	27,80 ± 3,73	35,07 ± 6,22	33,91 ± 7,82
M (mg/g)	2,45 ± 0,60	1,98 ± 0,43	3,15 ± 0,82	2,93 ± 0,98

TAB, tecido adiposo branco; EDL, músculo Extensor Digital Longo; COR, músculo cardíaco; PM, fração de membranas plasmáticas; M, fração de membranas microssomais; FFE, fração livre de gorduras. Resultados expressos como média ± EPM e comparações estatísticas apenas entre os grupos, para uma mesma fração de cada tecido (ANOVA de 1 via, para dados independentes)

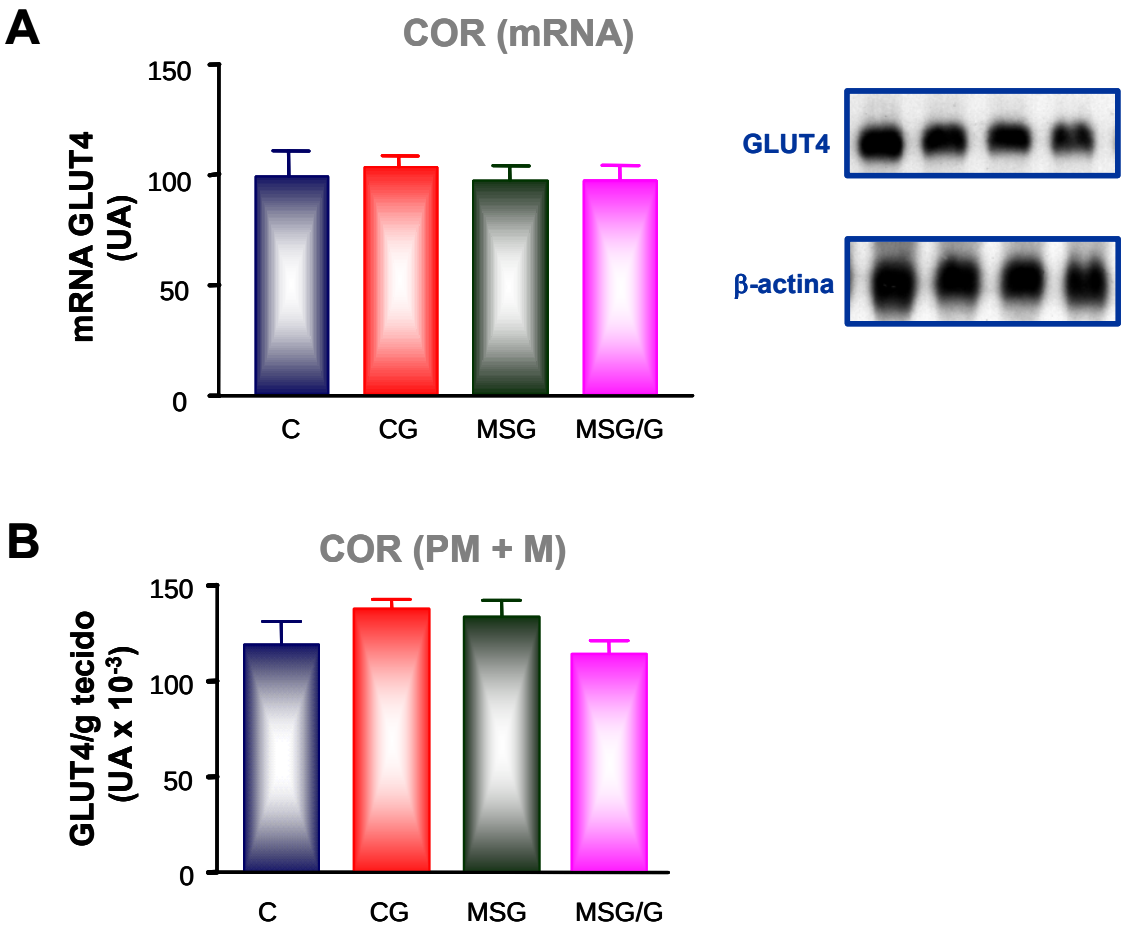


Figura 4 - Análise do mRNA do GLUT4 (A) e proteína GLUT4 (B) em músculo cardíaco de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. Em **A:** conteúdos do mRNA do GLUT4, normalizados pela β-actina, expressos em unidades arbitrárias (UA). Os resultados são média ± EPM de 3 experimentos distintos. **Ao lado:** Autorradiografias típicas de mRNA de GLUT4 e β-actina. Em **B:** Conteúdo da proteína em membranas totais (PM + M). Os resultados são média ± EPM de 4 experimentos distintos, expressos em UA/ g tecido. Valores numéricos das médias, EPM e n, no ANEXO 1. ANOVA de 1 via para dados independentes, $p>0,05$.

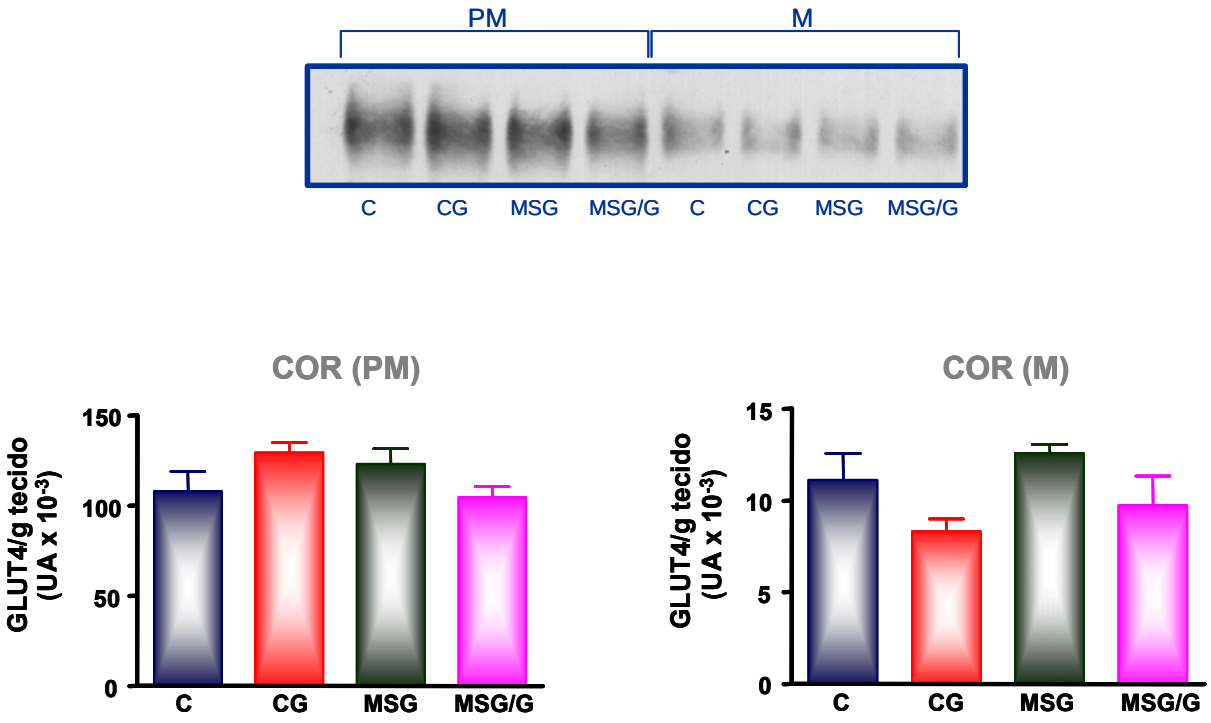


Figura 5 – Análise da proteína GLUT4 em membranas de frações subcelulares do músculo cardíaco de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. **À esquerda**: Conteúdo de GLUT4 em membrana plasmática (PM), contido numa mesma quantidade de proteínas totais (30 µg) submetidas à eletroforese e expresso em UA/g de tecido. **À direita:** Conteúdo de GLUT4 em microssoma (M), contido numa mesma quantidade de proteínas totais (30 µg) submetidas à eletroforese e expresso em UA/g tecido. **Acima:** Autorradiografias típicas das frações PM e M. Os resultados são média ± EPM de 4 experimentos distintos (ANEXO 1). ANOVA de 1 via para dados independentes, $p>0,05$.

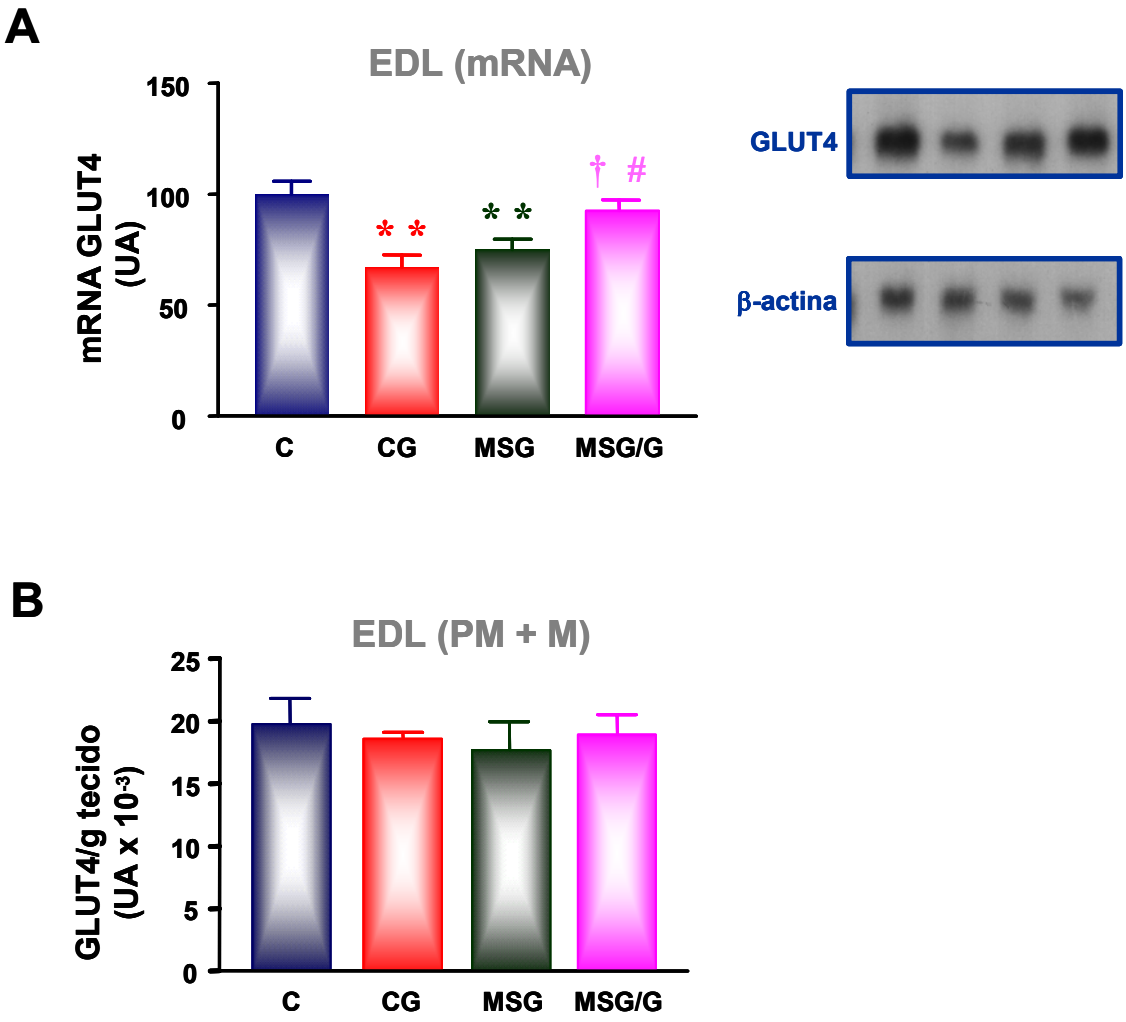


Figura 6 - Análise do mRNA do GLUT4 (A) e da proteína GLUT4 (B) em músculo extensor digital longo de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. Em **A:** conteúdos dos mRNAs do GLUT4, normalizados pela β-actina, expressos em unidades arbitrárias (UA). Os resultados são média ± EPM de 3 experimentos distintos. **Ao lado:** Autorradiografias típicas de mRNA de GLUT4 e β-actina. Em **B:** Conteúdo da proteína (UA/g tecido) em membranas totais (PM + M). Os resultados são média ± EPM de 4 experimentos distintos. Valores numéricos das médias, EPM e n, no ANEXO 2.

ANOVA de 1 via para dados independentes/SNK**:** ** $p < 0.01$ vs. C; † $p<0,05$ vs. CG

# $p < 0,05$ vs. MSG

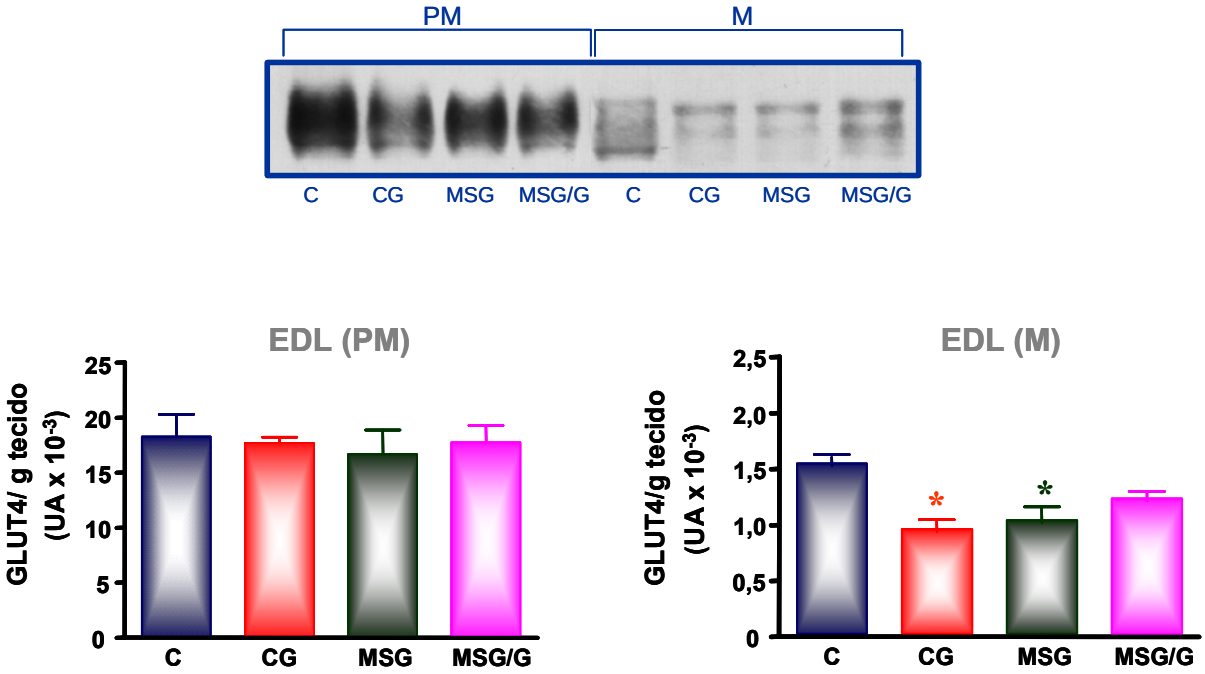


Figura 7 – Análise da proteína GLUT4 em membranas de frações subcelulares do músculo extensor digital longo de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. **À esquerda:** Conteúdo de GLUT4 em membranas plasmáticas (PM), contido numa mesma quantidade de proteínas totais (30 µg) submetidas à eletroforese. **À direita:** Conteúdo de GLUT4 em microssomas (M), contido numa mesma quantidade de proteínas totais (30 µg) submetidas à eletroforese. **Acima:** Autorradiografias típicas das frações PM e M. Os resultados são média ± EPM de 4 experimentos distintos, expressos em UA por grama de tecido (ANEXO 2).

ANOVA de 1 via para dados independentes/ SNK**:** * $p < 0,05$ vs. C

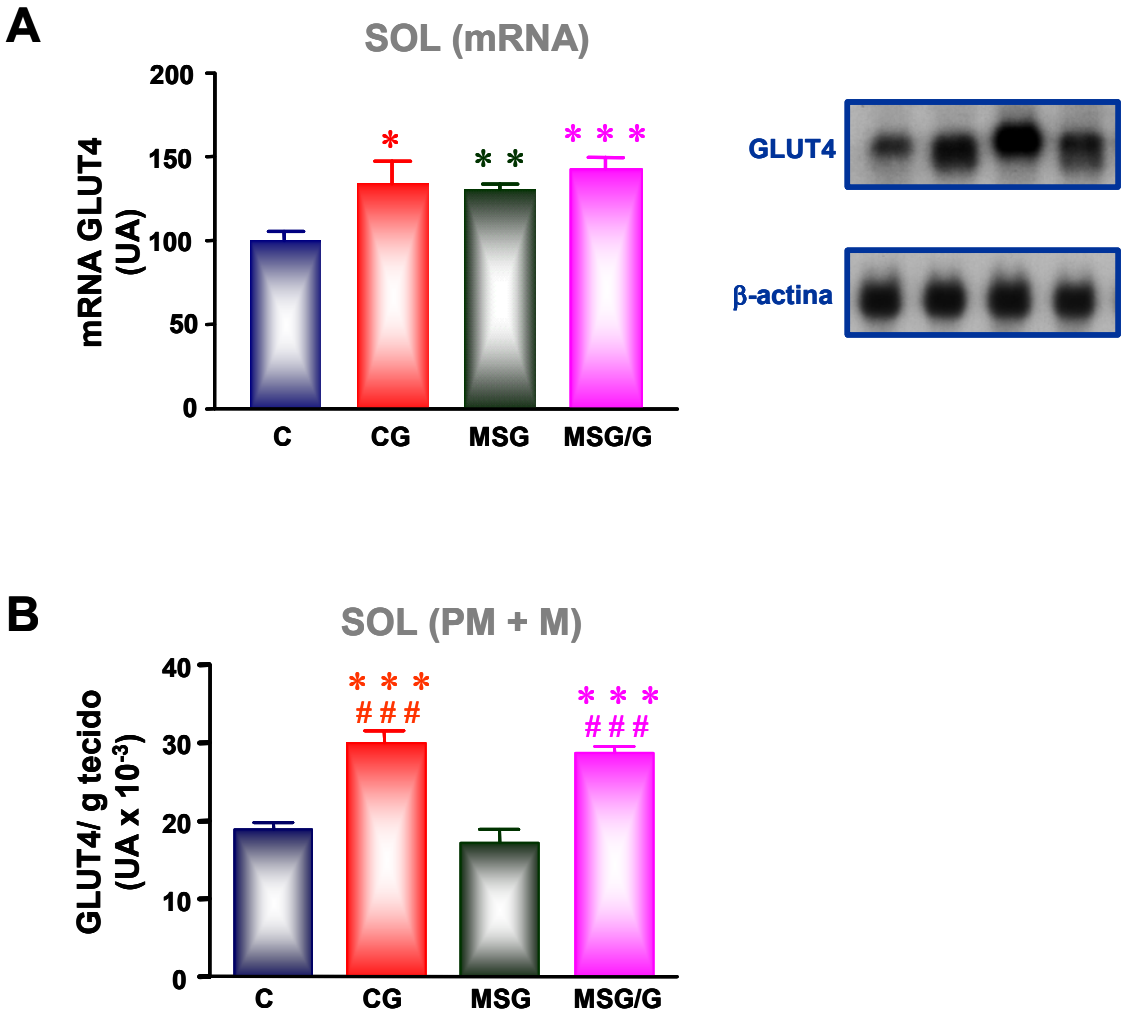


Figura 8 - Análise do mRNA do GLUT4 e proteína em músculo sóleo de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. Em **A:** conteúdos dos mRNAs do GLUT4, normalizados pela β-actina, expressos em unidades arbitrárias (UA). Os resultados são média ± EPM de 3 experimentos distintos. **Ao lado:** Autorradiografias típicas de mRNA de GLUT4 e β-actina. Em **B:** Conteúdo da proteína GLUT4 em membranas totais (PM + M). Os resultados são média ± EPM de 4 experimentos distintos, expressos em UA/ g tecido.

Para valores numéricos das médias, EPM e n, consultar ANEXO 3

ANOVA de 1 via para dados independentes/SNK**:** * $p < 0,05$ vs. C * * $p < 0.01$ vs. C

* * * $p < 0,001$ vs. C; # # # $p < 0,01$ vs. MSG

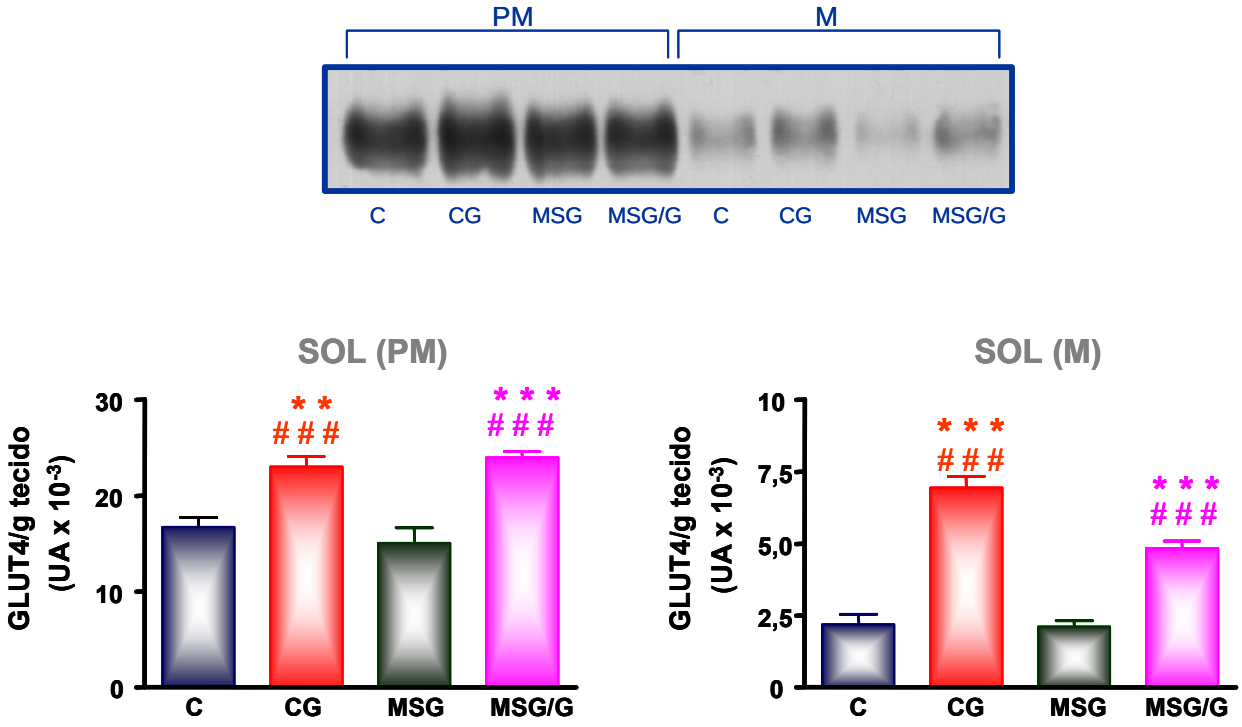


Figura 9 – Análise da proteína GLUT4 em membranas de frações subcelulares do músculo sóleo de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. **À esquerda:** Conteúdo de GLUT4 em membrana plasmática (PM), contido numa mesma quantidade de proteínas totais (30 µg) submetidas a eletroforese. **À direita:** Conteúdo de GLUT4 em microssoma (M), contido numa mesma quantidade de proteínas totais (30 µg) submetidas à eletroforese. **Acima:** Autorradiografia típica das frações PM e M. Os resultados são média ± EPM de 4 experimentos distintos, expressos em UA/ g tecido (ANEXO 3).

ANOVA de 1 via para dados independentes/SNK**:** ** $p < 0,01$ vs. C *** $p < 0,001$ vs. C

$p < 0,001$ vs. MSG

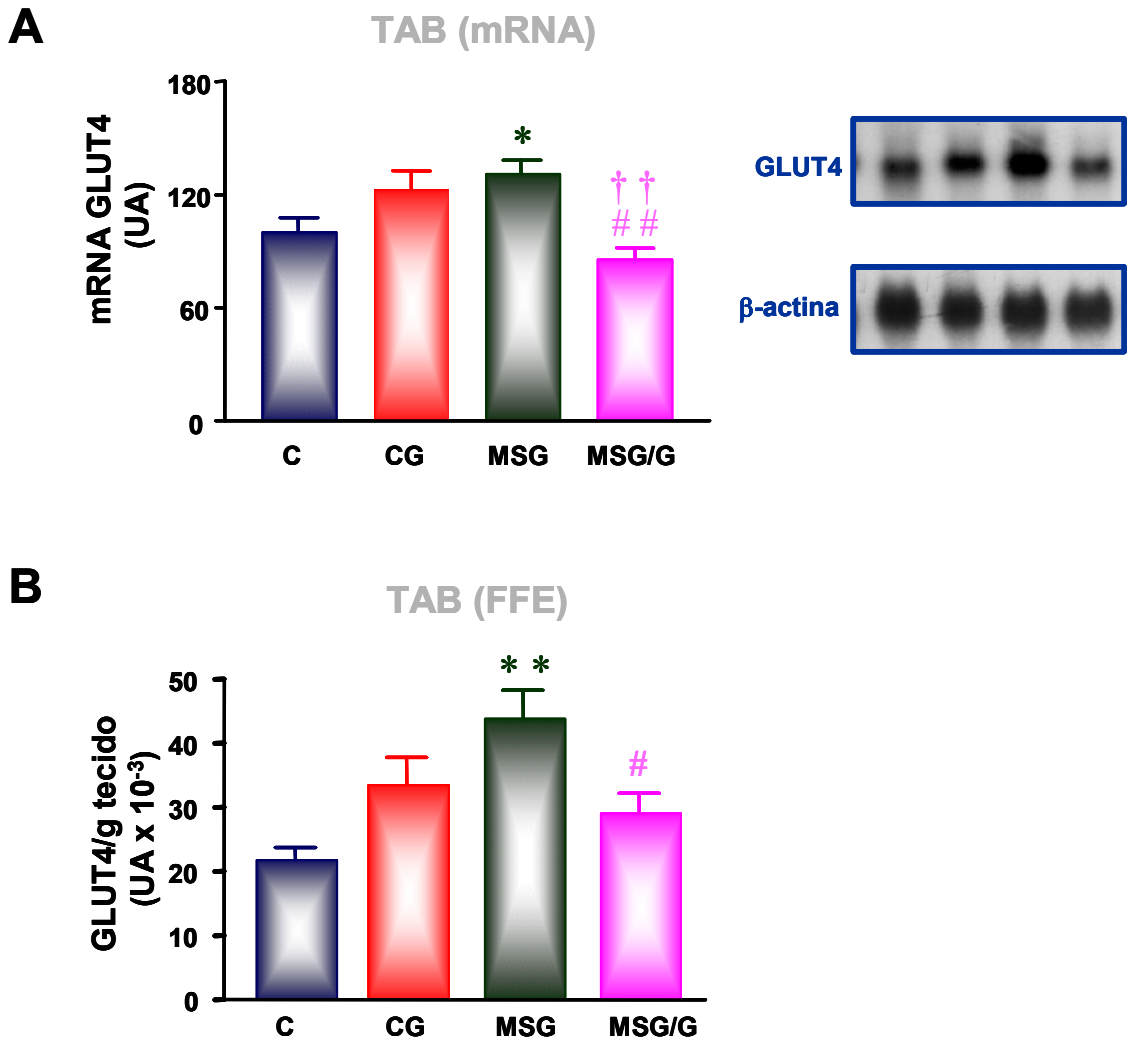


Figura 10 - Análise do mRNA do GLUT4 e proteína GLUT4 em tecido adiposo branco periepididimal de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. Em **A:** conteúdo do mRNA do GLUT4, normalizado pela β-actina, expresso em unidades arbitrárias. Os resultados são média ± EPM de 3 experimentos distintos. **Ao lado:** Autorradiografias típicas de mRNAs de GLUT4 e β-actina. Em **B:** Conteúdo da proteína por grama de tecido em FFE, que corresponde ao conjunto de membranas totais. Os resultados são média ± EPM de 3 experimentos distintos. Valores numéricos de médias, EPM e n: ANEXO 4.

ANOVA de 1 via para dados independentes/SNK: * $p < 0,05$ vs. C; ** $p < 0.01$ vs. C;

†† $p<0,01$ vs. CG; # $p<0,05$ vs. MSG ## $p < 0,01$ vs. MSG

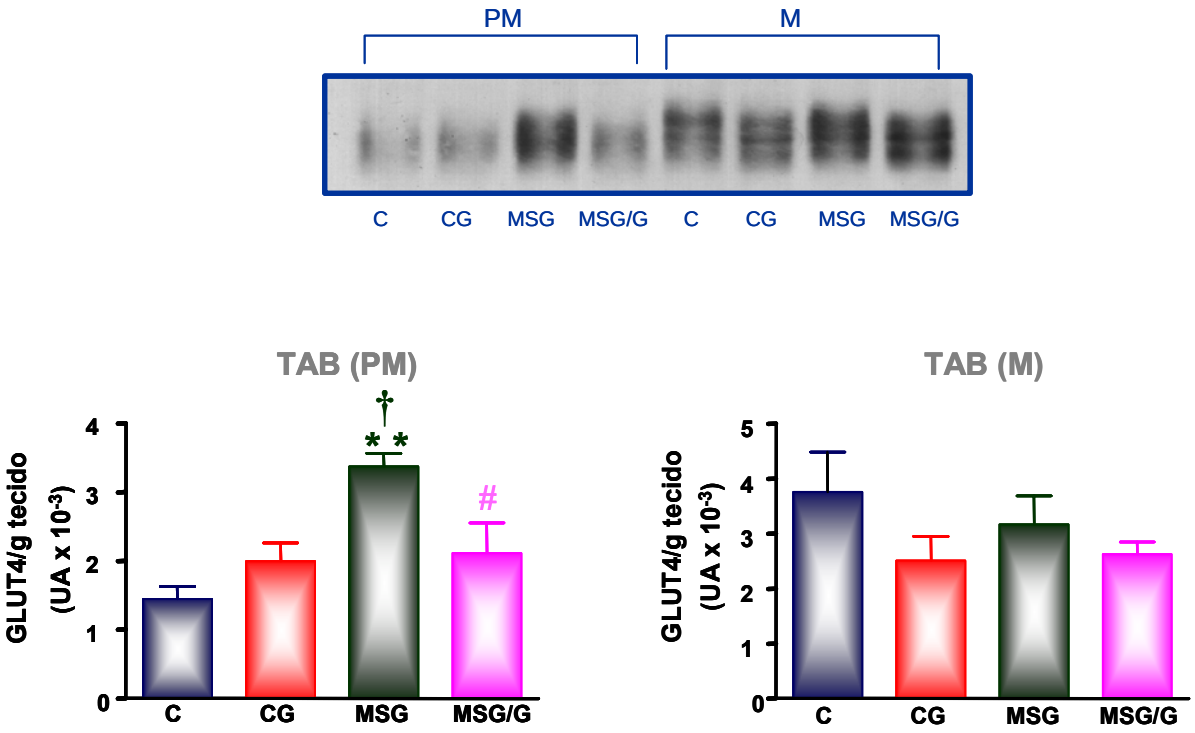


Figura 11 – Análise da proteína GLUT4 em membranas de frações subcelulares do tecido adiposo branco periepididimal de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. **À esquerda:** Conteúdo de GLUT4 em membrana plasmática (PM), contido numa mesma quantidade de proteínas totais (30 µg) submetidas à eletroforese. **À direita:** Conteúdo de GLUT4 em microssomas (M), contido numa mesma quantidade de proteínas totais (30 µg) submetidas à eletroforese. **Acima:** Autorradiografia típica das frações PM e M. Os resultados são média ± EPM de 4 experimentos distintos, expressos em UA/ g tecido (ANEXO 4).

ANOVA de 1 via para dados independentes/SNK: * * $p < 0,01$ vs. C † $p < 0,05$ vs. CG

# $p<0,05$ vs. MSG

Ensaios de Translocação do GLUT4 sob estímulo insulínico

Glicemia

A figura 12A apresenta as glicemias de jejum e após 10 minutos da injeção de insulina. Os diferentes grupos não apresentaram diferenças significativas entre si, seja no estado basal ou estimulado. No entanto, em todos os grupos, as injeções de insulina reduziram significativamente a glicemia ($p<0,001$). Os valores das médias, erros padrões e números de animais em cada grupo encontram-se expressos no ANEXO 6A.

É interessante ressaltar que, embora os grupos tenham apresentado, em cada situação (basal e após estímulo), glicemias semelhantes entre si, a queda glicêmica promovida pela insulina foi significativamente menor no grupo MSG ($\Delta_{glicose}$ = 12,71 ± 2,62 mg/dl) que nos animais C ($\Delta_{glicose}$ = 20,75 ± 2,21mg/dl) e CG ($\Delta_{glicose}$ = 23,67 ± 2,35 mg/dl), como se observa na figura 12B. Quando tratados com glimepirida, estes animais tiveram sua resposta glicêmica à insulina restaurada (MSG/G: $\Delta_{glicose}$ = 25,40 ± 2,46 mg/dl, $p<0,01$ vs. MSG).

Proteína GLUT4

Os conteúdos da proteína GLUT4 nas frações PM e M, antes (-) e após (+) a injeção de insulina estão expressos na figura 13 e ANEXO 6B.

No estado basal, não houve diferença entre os grupos na fração PM. No entanto, sob estímulo insulínico, houve aumento significativo no conteúdo de GLUT4 na fração PM (efeito da insulina:$p<0,001$ vs. Basal), sendo este aumento bem evidente nos grupos C e MSG/G (figura 13 e anexo 6B).

Na fração microssomal, o conteúdo de GLUT4 encontrou-se significativamente elevado no grupo MSG/G (figura 13), demonstrando que a glimepirida foi capaz de aumentar os estoques

intracelulares da proteína, disponíveis para a translocação. Após estímulo insulínico, os grupos não apresentaram diferenças significativas entre si, mas a análise de variância demonstrou um efeito significativo da insulina ($p<0,05$), diminuindo o conteúdo de GLUT4 intracelular, ainda que, mesmo no estado basal, 80% ou mais do total de GLUT4 já se encontrassem em PM, em todos os grupos (figura 14A).

Embora o índice de translocação (figura 14A) não tenha sido eficiente em demonstrar diferenças importantes entre os grupos quanto à resposta aguda à insulina (basal x estimulado: $p>0,05$), é interessante ressaltar que, analisando-se a amplitude da variação na quantidade de GLUT4 em PM antes e após o estímulo insulínico, observa-se que no grupo MSG/G, o aumento em PM provocado pela insulina foi muito mais acentuado que nos demais grupos, sendo inclusive maior que no grupo controle (figura 14B), o que demonstra um efeito importante da glimepirida melhorando a sensibilidade à insulina.

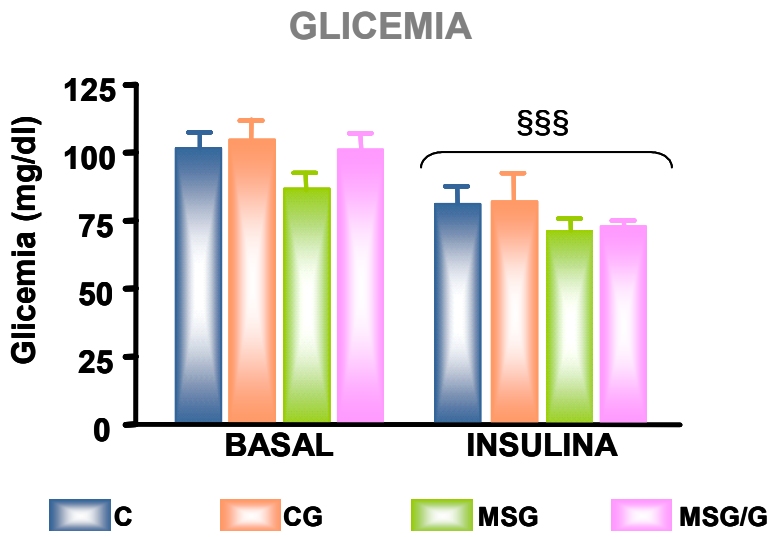


FIGURA 12A: Glicemias basais e após injeção i.v. de 4U de insulina, de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. Os resultados, cujos valores numéricos estão expressos no ANEXO 6A, são médias ± EPM de 6-10 animais, confrontadas por ANOVA de 2 vias para dados relacionados:

INSULINA: §§§ p<0,0001 vs. BASAL; *TRATAMENTOS: p>0,05;* *INTERAÇÃO: p>0,05*

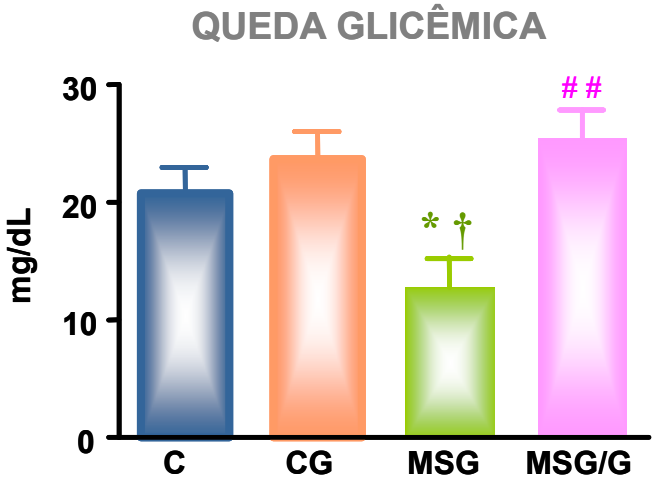


FIGURA 12B: Amplitude da variação dos valores de glicemias do estado basal até 10 minutos após a injeção de insulina. Os resultados são médias ± EPM das quedas glicêmicas de 6-10 animais, confrontados por ANOVA de 1 via para dados independentes, seguida do teste SNK.

** p<0,05 vs. C* *† p<0,05 vs. C* *## p<0,01 vs. MSG*

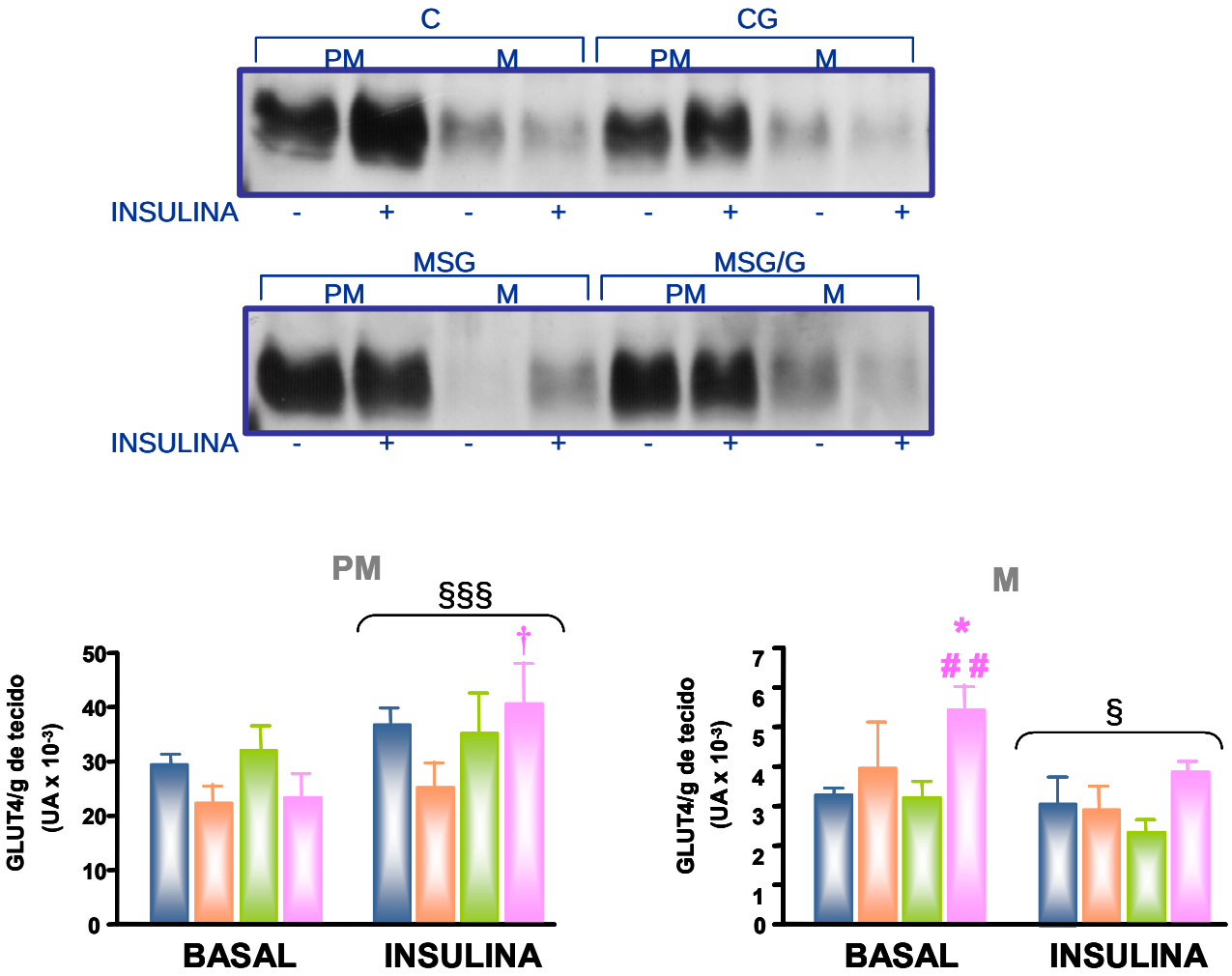


Figura 13 – Análise da proteína GLUT4 em membranas de frações subcelulares do músculo sóleo de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. **À esquerda:** Conteúdo de GLUT4/g de tecido, na fração de membranas plasmáticas (PM), expresso em unidades arbitrárias (UA/g tecido). **À direita:** Conteúdo de GLUT4 em microssomas (M). **Acima:** Autorradiografias típicas das frações PM e M nos estados basal (-) e após estímulo insulínico (+). Os resultados são médias ± EPM de 9 experimentos distintos (ANEXO 6B), confrontadas por ANOVA de 2 vias para dados relacionados, seguida do teste de Bonferroni.

Fração PM (esquerda):

§§§ INSULINA: p=0,0004 vs. BASAL; TRATAMENTO: p=0,0981; INTERAÇÃO: p=0,0441

BONFERRONI: †p<0,05 vs. CG

Fração M (direita):

§INSULINA: p=0,0167; TRATAMENTO: p=0,0061; INTERAÇÃO: p=0,6211

*BONFERRONI: *p<0,05 vs. C ##p<0,01 vs. MSG*

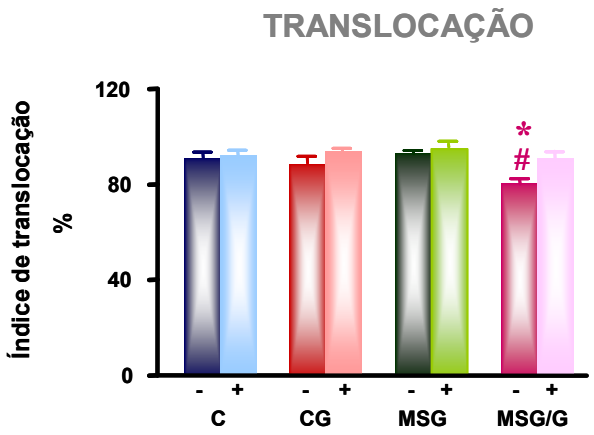


Figura 14A: Porcentagem de GLUT4 presente na fração de membranas plasmáticas de sóleo de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. Os resultados são médias ± EPM de 9 experimentos distintos, confrontadas por ANOVA de 1 via para dados independentes, seguida do teste de Student Newman-Kewls (SNK).

**p<0,05 vs. C* *# p<0,05 vs. MSG*

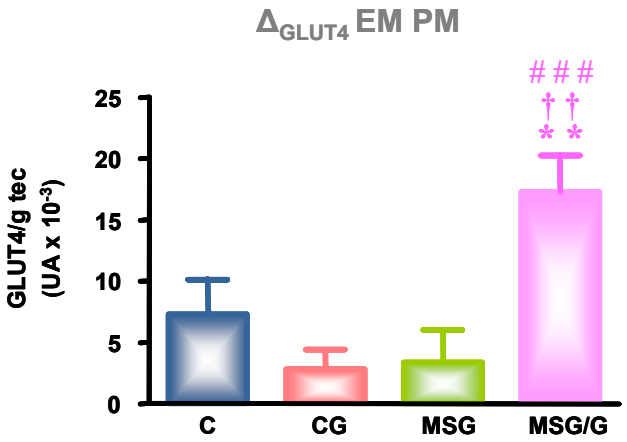


Figura 14B: Aumento do conteúdo de GLUT4 na fração de membranas plasmáticas de sóleo de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. Os resultados são médias ± EPM de 9 experimentos distintos, confrontadas por ANOVA de 1 via para dados independentes, seguida do teste de Student Newman-Kewls (SNK).

*** p<0,01 vs. C* *†† p<0,01 vs. CG* *### p<0,001 vs. MSG*

Captação de 2-deoxi –[2,6 -^{3}H] –D-glicose *in vitro*

Na figura 15, está expressa a captação de 2-deoxi –[2,6 -^{3}H] –D-glicose pelo músculo sóleo dos diferentes grupos, incubado em ausência e presença de 10mU/ml de insulina. Observa-se que os animais obesos (MSG: 2,03 ± 0,17µmol/g e MSG/G: 2,20 ± 0,14µmol/g) apresentaram captação basal significativamente menor ($p<0,01$) que os controles (C: 2,86 ± 0,11µmol/g e CG: 3,01 ± 0,20µmol/g). A presença da glimepirida, por outro lado, não afetou a captação basal, pois os grupos C e CG apresentaram valores semelhantes, assim como os grupos MSG e MSG/G.

Em todos os grupos, a captação em presença de insulina foi significativamente elevada em relação ao seu respectivo basal (C: 5,36 ± 0,07 µmol/g; CG: 5,29 ± 0,18 µmol/g; MSG: 4,15 ± 0,08 µmol/g e MSG/G: 5,06 ± 0,16 µmol/g, $p<0,001$ vs. Basais).

No grupo MSG, a captação estimulada pela insulina se manteve significativamente mais baixa que nos animais controles ($p<0,001$), evidenciando a resistência à ação do hormônio na captação de glicose. Por outro lado, o tratamento com a glimepirida elevou a captação de 2-deoxi –[2,6 -^{3}H] –D-glicose, estimulada pela insulina, dos animais obesos ao mesmo nível dos grupos C e CG, que foi significativamente maior que a observada nos animais MSG não tratados ($p<0,01$).

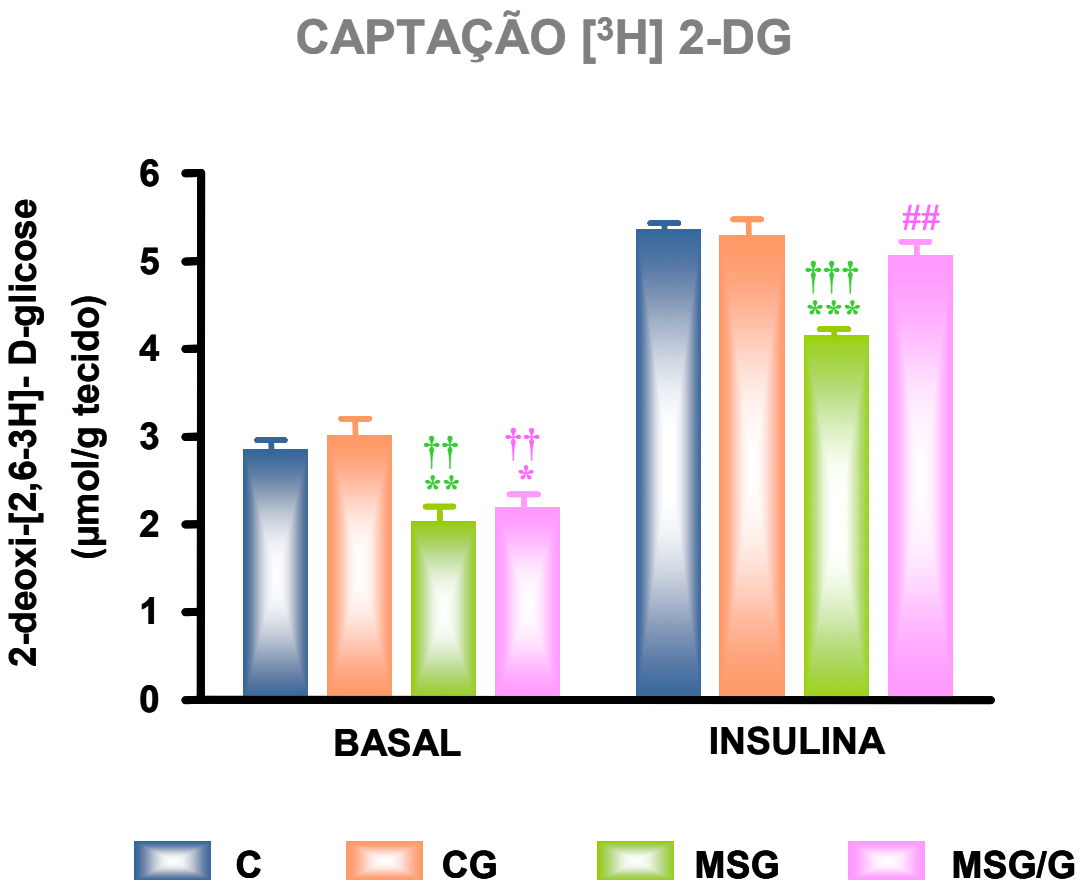


Figura 15 – Captação de 2-deoxi –[2,6 -^{3}H] –D-glicose pelo músculo sóleo de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. Os músculos foram incubados sem insulina (BASAL) e em presença de 10mU/ml (INSULINA). Os resultados são médias ± EPM de 5 amostras de cada grupo, confrontadas por ANOVA de duas vias para dados relacionados, seguida do teste de Bonferroni.

INSULINA: ***p < 0,0001*** *TRATAMENTOS:* ***p<0,0001*** *INTERAÇÃO:* ***p = 0,0193***

BONFERRONI: **** p < 0,05 vs. C*** **** * p < 0,01 vs. C*** **** * * p < 0,001 vs. C***

† † p < 0,01 vs. CG ***† † † p < 0,001 vs. CG***

 # # p < 0,01 vs. MSG

Incorporação de [U-^{14}C]-D-glicose ao glicogênio muscular *(in vitro)*

A figura 16 mostra a quantidade de [U-^{14}C]-D-glicose incorporada ao glicogênio durante incubação do músculo sóleo, em ausência e presença de 10 mU/ml de insulina. Os dados estão de acordo com os resultados do ensaio de captação, pois no estado basal, os animais MSG (0,45 ± 0,13 µmol/g) e MSG/G (0,39 ± 0,23 µmol/g) tiveram menor incorporação de glicose marcada que os animais controles (C: 0,91 ± 0,02 µmol/g e CG: 0,98 ± 0,16 µmol/g, $p<0,01$).

Novamente ratificando os resultados de captação, sob estímulo insulínico houve um aumento significativo da síntese de glicogênio. No entanto, o grupo MSG (2,42 ± 0,10 µmol/g) apresentou menor incorporação de [U-^{14}C]-D-glicose, quando comparado aos grupos C (3,44 ± 0,14 µmol/g) e CG (3,02 ± 0,13 µmol/g), $p<0,05$, enquanto o tratamento com glimepirida desses animais aumentou significativamente a síntese de glicogênio (MSG/G: 2,96 ± 0,20 µmol/g, $p<0,05$ vs. MSG).

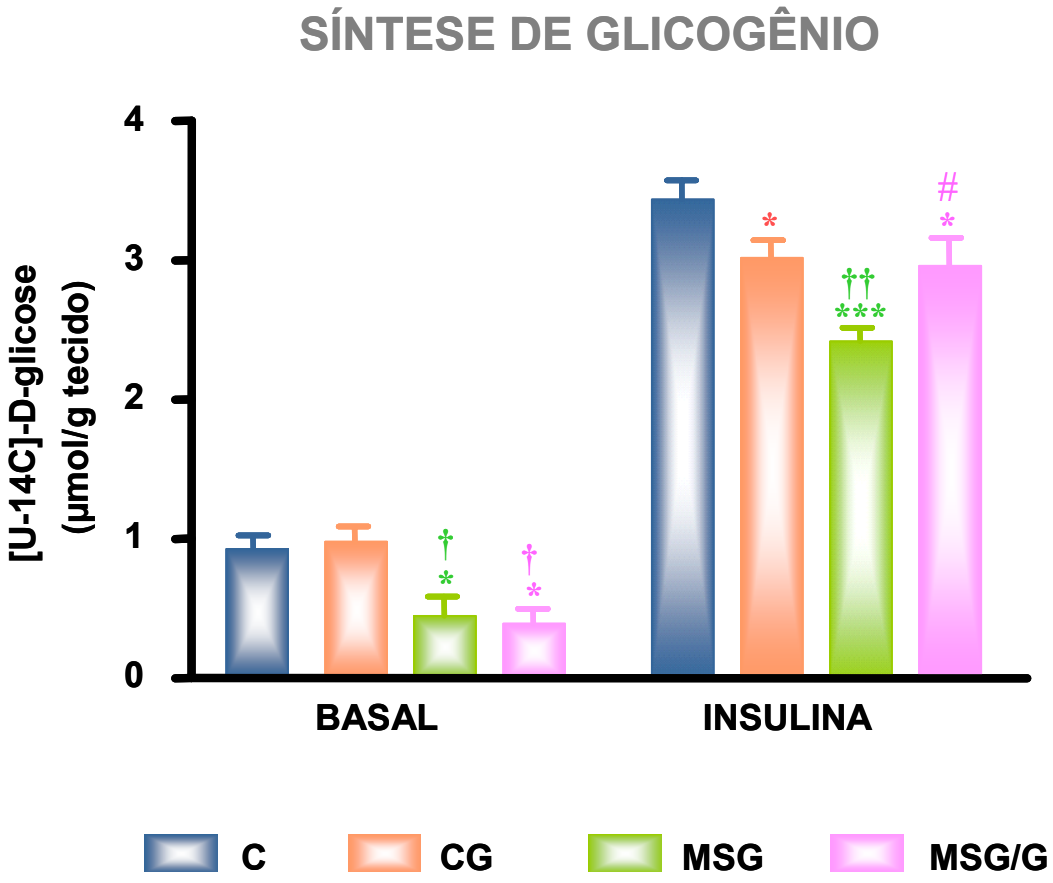


Figura 16 – Incorporação de [U-^{14}C]-D-glicose ao glicogênio do músculo sóleo de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. Os músculos foram incubados sem insulina (BASAL) e em presença de 10 mU/ml (INSULINA). Os resultados são médias ± EPM de 5 amostras de cada grupo, confrontadas por ANOVA de duas vias para dados relacionados, seguida do teste de Bonferroni.

INSULINA: ***p < 0,0001*** *TRATAMENTOS:* ***p= 0,0001*** *INTERAÇÃO:* ***p = 0,1101***

BONFERRONI: **** p < 0,05 vs. C*** **** * * p < 0,001 vs. C***

† p < 0,05 vs. CG ***† † p < 0,01 vs. CG***

 # p < 0,05 vs. MSG

Glicogênio hepático

A figura 17 representa o conteúdo de glicogênio hepático nos diferentes grupos, expresso em miligramas de glicogênio por grama de tecido. Observa-se que os animais obesos (MSG: 6,86 ± 0,55 mg/g) apresentaram significativamente menos glicogênio que os animais controles (C: 12,84 ± 1,27mg/g e CG: 10,72 ± 0,62mg/g), após 10 horas de jejum. O tratamento com a glimepirida (MSG/G: 10,22 ± 1,17mg/g, $p<0,05$ vs. MSG) reverteu este quadro, restaurando o conteúdo de glicogênio ao mesmo nível dos grupos controles.

Conteúdo hepático da glicogênio sintase kinase 3 fosforilada

A abundância da glicogênio sintase kinase fosforilada (GSK-3 inativa) no fígado dos animais dos diferentes grupos encontra-se expressa na figura 18 (médias ± EPM e n, ANEXO 7). Em todos os grupos, o conteúdo basal da proteína foi semelhante, tendendo os animais MSG a apresentar menor conteúdo, mas não significativamente.

Sob estímulo insulínico, o grupo MSG manteve o mesmo conteúdo de p-GSK3, que foi significativamente reduzido comparado aos grupos C ($p<0,01$) e CG ($p<0,05$). Quando tratados com a glimepirida, os animais obesos tiveram uma melhora significativa na fosforilação da GSK3 em resposta à insulina ($p<0,01$ vs. MSG).

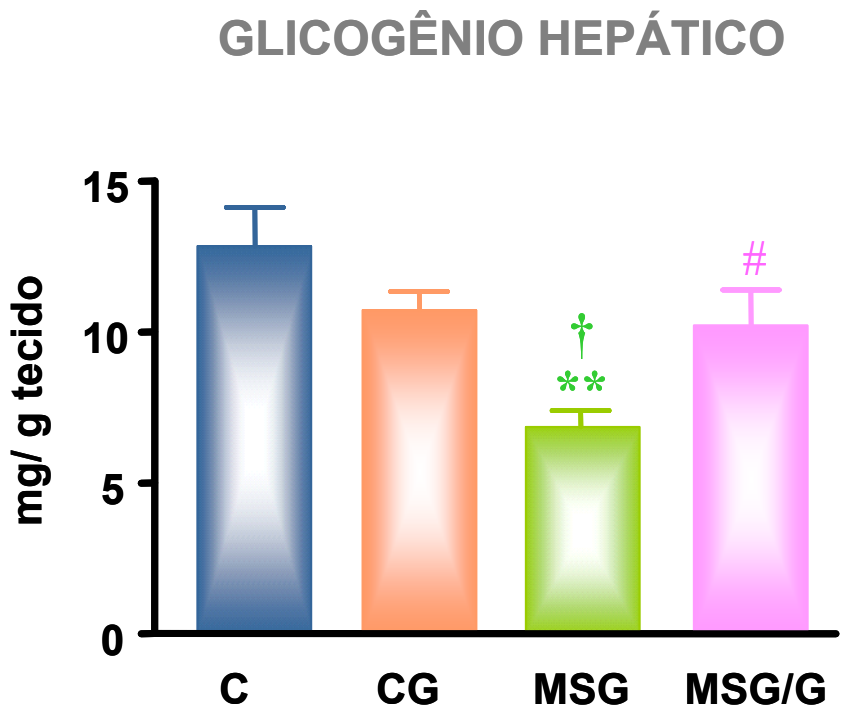


Figura 17 – Conteúdo de glicogênio hepático de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. Os resultados são médias ± EPM de 5 animais, comparados por ANOVA de 1 via, para dados independentes, seguida do teste de Student Newman-Kewls.

*** $p < 0,01$ vs. C* †$p < 0,05$ vs. CG* #$p < 0,05$ vs. MSG*

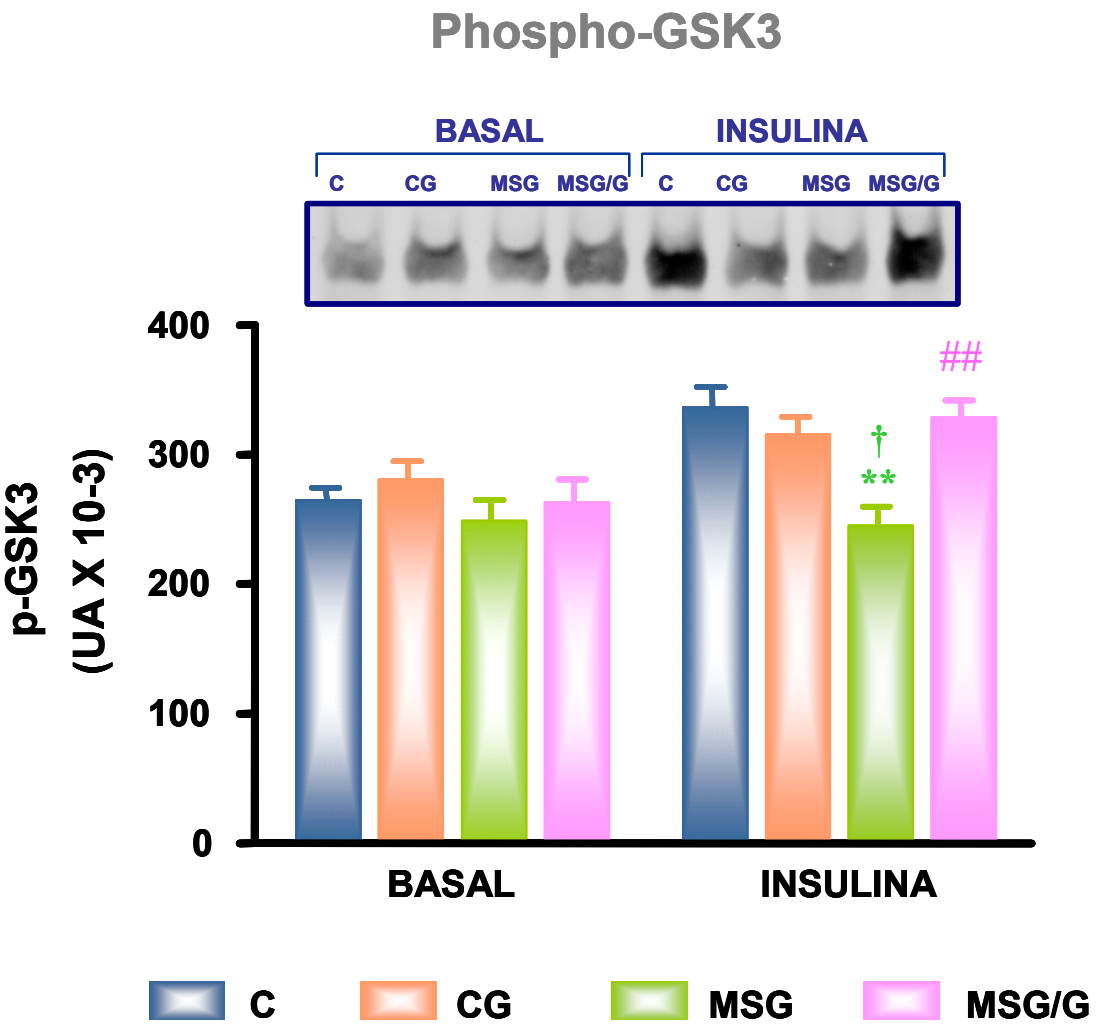


Figura 18 – Conteúdo da proteína glicogênio sintase kinase 3 fosforilada em fígado de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. As amostras foram coletadas no estado BASAL e após 10 minutos da injeção i.v. de 4U/animal de INSULINA. Os resultados são médias ± EPM de 7 animais de cada grupo, confrontadas por ANOVA de 2 vias para dados relacionados, seguida do teste de Bonferroni.

INSULINA: ***p < 0,0001*** *TRATAMENTOS:* ***p= 0,0161*** *INTERAÇÃO:* ***p = 0,0123***

BONFERRONI: *** p < 0,01 vs. C* *† p < 0,05 vs. CG* *# #p < 0,01 vs. MSG*

DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o efeito da glimepirida sobre a sensibilidade à insulina e expressão do gene do GLUT4, procurando esclarecer os mecanismos extra-pancreáticos através dos quais esta sulfoniluréia poderia melhorar a sensibilidade periférica à ação da insulina. Adicionalmente também foi investigada a glicogeniogênese hepática, como um dos mecanismos de controle da homeostasia glicêmica modulado pela glimepirida. Como modelo animal, utilizamos ratos obesos MSG, que apresentam resistência insulínica acompanhada de alterações na expressão de GLUT4 (PAPA et al, 2002; MACHADO et al, 1994).

Obesidade induzida por MSG

Primeiramente, é importante ressaltar a efetiva reprodução da síndrome de obesidade induzida pelo MSG descrita na literatura (OLNEY, 1969; CAMERON et al, 1978).

Os animais apresentaram, após tratamento com MSG, peso corpóreo absoluto significativamente reduzido em relação aos ratos C (tabela 3), o que foi acompanhado de aumento da massa adiposa e diminuição no peso dos músculos (tabela 2A). Porém, o menor peso dos tecidos musculares foi reflexo do prejuízo no crescimento, sem diminuição da massa magra relativa, pois a análise do peso dos músculos em relação à massa corpórea demonstrou não haver diferença entre C e MSG. De fato, menor crescimento é descrito neste modelo, em que há diminuição dos níveis de GHRH, com conseqüente diminuição da transcrição de gene do GH, resultando em baixos níveis de GH circulante (MARMO et al, 1994; KOVACS et al., 2000). Por outro lado, nos animais obesos, a massa adiposa encontrou-se significativamente elevada em valores absolutos e, principalmente, quando analisada relativamente ao peso corpóreo, caracterizando a presença de obesidade (tabela 2B). Além disso, o índice de Lee,

significativamente elevado, confirmou que os animais MSG apresentaram maior massa corpórea em relação ao comprimento naso-anal, ou seja, foram significativamente mais gordos (tabela 3).

Quanto ao consumo hídrico e alimentar (tabelas 4A e 4B), os animais obesos ingeriram menor quantidade absoluta de água e alimento que os controles. No entanto, relativamente aos seus respectivos pesos corpóreos, todos os grupos ingeriram a mesma quantidade de água e ração, de modo que os grupos obesos foram normofágicos e não hipofágicos como descrevem alguns dados da literatura (SPURLOCK et. al., 1996; MORI et al., 1999). Aliás, considerando-se a redução de atividade simpática e, portanto, reduzido gasto energético presente na obesidade induzida pelo MSG (MORRIS et al., 1998), pode-se interpretar que, com relação às suas necessidades energéticas, estes animais tenham, aliás, ingestão muito alta diante de suas necessidades calóricas reduzidas, e por isso acumulam gordura.

Os níveis de glicose e insulina plasmáticas foram semelhantes aos dos animais controles, diferentemente dos níveis elevados relatados por Macho e colaboradores (2000), que utilizaram ratos Sprague-Dawley, e de Machado & Saito (1995), que utilizaram camundongos. As alterações metabólico-hormonais da obesidade induzida pelo MSG instalam-se progressivamente ao longo do desenvolvimento dos animais, podendo variar conforme a espécie ou linhagem utilizada. Em camundongos, por exemplo, o MSG produz uma obesidade grave, com aumento de peso corpóreo e níveis glicêmicos e insulinêmicos altos, já aos três meses de idade, (MACHADO; SAITO, 1995). No entanto, outros estudos detectaram hiperglicemia nos camundongos apenas aos seis meses (PAPA et al., 1997; PAPA et al., 2002). Em ratos, normalmente não se observa hiperglicemia, mas a insulinemia encontra-se usualmente elevada (HIRATA et al., 1997; GUIMARÃES et al., 2002; THIRONE et al., 2004). No presente estudo, os ratos MSG não apresentaram alterações nos níveis glicêmicos e a inulinemia tendeu a elevar-se, embora não siginificativamente. No entanto, a presença da resistência insulínica nestes animais foi claramente

demonstrada pelo teste de tolerância à insulina (ITT). Esta resistência associada à obesidade está de acordo com resultados obtidos em animais obesos pelo envelhecimento, cuja resistência insulínica foi confirmada através de teste de tolerância à glicose. (MACHADO et al, 1992). Além disso, menor constante de decaimento da glicose (kITT) já havia sido demonstrada em ratos obesos pelo MSG em outros estudos (THIRONE et al., 2004) que também utilizaram estes animais como modelo de resistência à insulina.

Tratamento com glimepirida

As sulfonilureas são drogas de efeito anti-hiperglicemiante utilizadas no tratamento do diabetes mellitus tipo 2, por seu potente efeito sobre as células B do pâncreas, onde estimulam a secreção de insulina. A glimepirida, embora tenha baixa afinidade pelas células B, apresenta efeitos anti-hiperglicemiantes satisfatórios (KRAMER et al., 1996; MULLER & GEISEN, 1996), o que sugeriu sua maior eficiência na melhora da sensibilidade periférica à insulina, comparativamente a outras sulfoniluréias.

Neste estudo, a glimepirida foi diluída na água de beber para absorção pelo trato gastro-intestinal, evitando-se os efeitos indesejáveis do estresse da administração por gavagem. A droga não alterou a palatabilidade do alimento e, principalmente, da água onde foi diluída, pois não afetou a ingestão de água nem de alimento dos animais C ou MSG (tabelas 4A e 4B). Os grupos tratados (CG e MSG/G) também não apresentaram alterações das características morfométricas em relação aos seus respectivos controles (C e MSG), como mostram as tabelas 1 e 2.

A dose diária de 0,1 mg/kg de peso foi determinada com base em dados da literatura que demonstram ser esta a dose mínima necessária para inibir a elevação da glicose plasmática após sobrecarga oral em ratos (EL-REYANI et al, 1999). Como observado no teste de tolerância à insulina (figura 3), foi também eficiente na reversão do quadro de resistência insulínica presente

em animais obesos pelo MSG, pois aumentou a constante de decaimento da glicose (kITT). Por outro lado, a glimeprida não afetou a sensibilidade à insulina em animais controles.

A glicemia (tabela 5) também não foi afetada pelo tratamento com a glimepirida. A insulinemia, no entanto, elevou-se significativamente, o que demonstra a efetividade do medicamento como secretagogo de insulina, efeito este conhecido por ocorrer através da ação das sulfoniluréias sobre os canais de potássio sensíveis a adenosina trifosfato (K_{ATP}), que apresentam subunidades denominadas SUR (*Sulfonylureas Receptors*) (GRIBBLE & ASHCROFT, 2000).

Estes canais K_{ATP}, encontrados não apenas nas células B, mas também na musculatura esquelética, cardíaca, lisa vascular e adipócitos, permanecem abertos, mantendo constante o efluxo de K^+, que mantém o potencial de repouso da membrana (-70mV) (GRIBBLE & REIMANN, 2003; SHI et al., 1999). Especificamente nas células B, quando aumenta a metabolização da glicose, o aumento de ATP bloqueia estes canais, impedindo o efluxo de K^+, o que despolariza a membrana e provoca a abertura de canais de Ca^{++} voltagem-dependentes. As sulfoniluréias, ao se ligarem aos SURs, desencadeiam este mesmo mecanismo de inibição dos canais de potássio, provocando a secreção de insulina (GRIBBLE & REIMANN, 2003).

Diferentes sulfoniluréias apresentam diferenças de afinidade e especificidade pelos canais de potássio (GRIBBLE & ASHCROFT, 2000), tendo a glimepirida baixa afinidade pelos canais K_{ATP} da célula B, porém igual ou maior efeito sobre a glicemia (KRAMER et. al., 1996). De fato, já foi demonstrado que a glimepirida pode ser mais eficiente que a glibenclamida no controle glicêmico, além de melhorar a sensibilidade insulínica, como demonstrado pela diminuição do índice HOMA-IR em pacientes hiperinsulinêmicos (HAMAGUCHI et al., 2004).

Os resultados de nosso estudo demonstraram que a glimepirida não apenas foi eficiente como secretagogo de insulina, mas apresentou também um efeito sensibilizador à mesma *in vivo*.

Neste sentido, é muito importante que se ressalte que o aumento crônico de insulina é *per se* um fator indutor de resistência ao hormônio.

É importante lembrar que a dose utilizada no presente estudo (0,1mg/kg/dia) foi bastante alta se comparada à dose utilizada em pacientes diabéticos. No entanto, em se tratando de ratos, animais de pequeno porte e de metabolismo mais acelerado que humanos, não são válidas as comparações de valores absolutos. Considerando-se o efeito sobre a secreção de insulina, sem variações glicêmicas importantes ao longo do período de tratamento, como demonstrado pela dosagem da frutosamina, somado à melhora da sensibilidade sistêmica à insulina dos animais obesos, sem prejudicar a homeostase glicêmica nos animais controles, pode-se interpretar que, em ratos, esta dose equivaleu à dose terapêutica utilizada em humanos.

Análise da expressão do GLUT4

O teste de tolerância à insulina confirmou diminuição na sensibilidade ao hormônio nos animais obesos (figura 3). Esta resistência periférica à insulina é indicativa de ação inadequada deste hormônio em tecidos insulino-sensíveis e, um passo chave neste processo é o menor transporte de glicose devido à alteração da expressão da proteína GLUT4. Por isso, foi quantificado o conteúdo protéico e de mRNA do GLUT4 em diferentes tecidos sensíveis à insulina, para investigar se o efeito sensibilizador da glimepirida estaria relacionado a efeitos sobre a expressão deste transportador.

Os resultados referentes ao conteúdo de mRNA e de proteína foram analisados em paralelo (figuras 4, 6, 8 e 10). Nestas análises, consideramos os valores correspondentes ao conteúdo de GLUT4 em membranas totais, pois a expressão do mRNA se reflete na quantidade total de proteína traduzida à partir deste mRNA, e não em cada fração subcelular em separado. No entanto, a fração que efetivamente realiza a captação de glicose corresponde à fração de

membranas plasmáticas. Por isso, as frações subcelulares também foram analisadas separadamente (figuras 5, 7, 9 e 11).

Além disso, o conteúdo de GLUT4, calculado a partir da densidade óptica obtida nas auto - radiografias e da recuperação protéica total, foi analisado considerando-se o conteúdo da proteína por grama de tecido, pois este é o conteúdo que realmente expressa a capacidade do tecido em captar glicose.

Músculo cardíaco

Sendo o transporte de glicose passo limitante para sua utilização e, conseqüentemente, um determinante do metabolismo em todos os tipos celulares, alterações em nível de regulação gênica do GLUT4 são relevantes para a função do tecido. Dados conflitantes encontram-se na literatura quanto às alterações no conteúdo de GLUT4 em músculo cardíaco de roedores obesos. SERAPHIM (2001) não observou alteração em ratos obesos pelo envelhecimento, mas outros autores relatam diminuição de GLUT4 no coração de camundongos obesos e ratos Zucker obesos (MACHADO et al, 1993; UPHUES et al, 1995).

Os resultados obtidos neste estudo não mostraram alteração de expressão da proteína GLUT4, nem de seu mRNA em músculo cardíaco de ratos MSG, mas é importante que se ressalte que os estudos em que se verificaram alterações na expressão de GLUT4, no coração, utilizaram animais com obesidade grave, nos quais o estado de resistência à insulina foi muito mais acentuado, comparativamente ao presente estudo.

É interessante lembrar ainda que, sendo um músculo oxidativo aeróbio, o coração é capaz de obter energia via β - oxidação, o que lhe possibilita utilizar menos glicose, especialmente nos animais obesos, que normalmente apresentam altas taxas de ácidos graxos livres, embora isto

dependa de um bom aporte de oxigênio. Além disso, relativamente à massa corpórea, a massa cardíaca representa uma porção muito pequena para que seu consumo chegue a alterar a glicemia. Assim, embora seja um tecido insulino-sensível, a musculatura cardíaca pouco contribui para a homeostasia glicêmica e instalação da resistência à insulina. Finalmente, mais que nos músculos esqueléticos, a atividade contrátil neste tecido se mantém constante, de forma que alterações de expressão do GLUT4 e sua localização celular devem ser menos afetadas por alterações metabólicas e hormonais, sendo provavelmente relevantes apenas em situações de hipóxia, quando a geração de ATP pela glicólise anaeróbia passa a ser fundamental. Realmente, já se observou aumento de utilização de glicose no miocárdio pós-isquêmico, acompanhado de aumento da translocação de GLUT4 para a superfície celular (SALVI, 2001).

É interessante lembrar ainda que, na fibra cardíaca em condições de normóxia, a presença de ATP mantém os canais K_{ATP} fechados. Durante a isquemia, porém, estes canais se abrem em resposta à diminuição do ATP intracelular, num mecanismo de proteção natural, que facilita a repolarização, reduz a entrada de cálcio, diminuindo o trabalho cardíaco e,conseqüentemente, preservando ATP durante a isquemia. Estes canais K_{ATP} participam ainda do chamado condicionamento pré-isquêmico, que é um mecanismo de proteção desencadeado pela exposição prévia a um ou mais períodos curtos de isquemia, que torna o miocárdio mais resistente aos danos acarretados por uma isquemia mais prolongada (RIVELINE et al., 2003). Este mecanismo protetor é totalmente abolido pela sulfoniluréia glibenclamida, o mesmo não se observando com a glimepirida, que preserva os efeitos do condicionamento pré-isquêmico, como a diminuição da pressão diastólica final, redução do tamanho do infarto e menor duração do potencial de ação (HORIMOTO et al., 2002).

As sulfoniluréias podem interagir com canais de K^+ da fibra cardíaca, provocando efeitos tais como aumento da pressão arterial, diminuição do fluxo coronário e aumento da resistência

coronariana (GEISEN et al, 1996). Estes efeitos são siginificativamente menores com a glimepirida que com outras sulfoniluréias, e sugere-se que ela não interaja com canais de K^+ cardíacos (RAPTIS & DIMITRIADIS, 2001), o que reforça a observação de que o condicionamento pré-isquêmico seja preservado pela glimepirida. Aliás, esta baixa afinidade pelos canais de K^+ poderia também explicar sua menor capacidade de secreção de insulina, embora as células B e fibras cardíacas apresentem subtipos diferentes de receptores para sulfoniluréias (SUR1 e SUR2A, respectivamente) (GRIBBLE; HEIMANN, 2003).

Foi diante destes dados que consideramos interessante avaliar a expressão de GLUT4 e possíveis modificações após tratamento com glimepirida neste tecido e, conforme observamos, os grupos tratados não alteraram a expressão do transportador, preservando suas características normais e, provavelmente, conservando sua habilidade de adaptação a situações de injúria ao tecido. Além disso, é importante ressaltar que, experimentalmente, os efeitos cardíacos em ratos foram observados com doses de 2,0 mg/kg, 20 mg/kg (GEISEN, 1996) ou 5 mg/kg (EL-REYANI et al., 1999), ou seja, doses muito maiores que a utilizada no presente estudo, o que indica que, na quantidade utilizada, a glimepirida não apresenta efeitos cardíacos.

Músculos esqueléticos

Sendo os músculos esqueléticos os principais responsáveis pela utilização da glicose estimulada pela insulina *in vivo*, participam de forma importante na regulação dos níveis plasmáticos de glicose (GARVEY et al., 1998). De fato, camundongos transgênicos, que superexpressam GLUT4 no músculo esquelético, apresentam taxa de transporte de glicose basal e estimulada pela insulina elevadas neste tecido, com conseqüente aceleração da depuração da glicose sangüínea (KATZ et al, 1996). Por outro lado, camundongos que não expressam GLUT4, são resistentes à insulina, mas conservam a capacidade de manter-se euglicêmicos, embora às

custas de insulinemia elevada (KATZ et al, 1996). Assim, variações na expressão do GLUT4 no tecido muscular são um fator fundamental na regulação da homeostasia glicêmica e na determinação da sensibilidade periférica à insulina.

Foram selecionados dois diferentes tipos de tecidos musculares esqueléticos: o músculo sóleo, composto predominantemente por fibras vermelhas, oxidativas, e o extensor digital longo (EDL), músculo predominantemente branco, glicolítico, com a finalidade de estudar a regulação da expressão gênica do GLUT4 para cada tipo de fibra muscular. Diferenças de expressão do GLUT4, dependendo do tipo de fibra muscular já foram relatadas, sendo os músculos compostos por fibras vermelhas mais sensíveis à ação da insulina, além de apresentarem taxa de transporte máximo de glicose mais alta que os músculos compostos por fibras brancas (RICHARDSON et al., 1991). Nossos dados concordam com estes relatos, pois diferentes efeitos foram observados no sóleo e EDL, sendo que o tratamento com glimepirida provocou alterações muito mais evidentes no sóleo.

Nas figuras 6 e 8, nota-se que o MSG elevou o conteúdo de mRNA do GLUT4 no sóleo, mas reduziu no EDL. No entanto, provavelmente não chegou a alterar funcionalmente a captação de glicose nestes tecidos, pois o conteúdo total da proteína se manteve semelhante ao grupo controle, nos dois tipos de fibra muscular, embora no EDL, diminuição significativa tenha sido observada na fração microssomal, concordando com a redução no mRNA neste tecido. No sóleo dos animais obesos, embora o mRNA tenha se elevado em relação a C, o conteúdo protéico foi incapaz de acompanhar esta elevação, sugerindo algum defeito em nível pós-transcricional na regulação da expressão do GLUT4 neste tecido.

É importante destacar que, nos músculos esqueléticos, nem sempre os conteúdos da proteína GLUT4 e seu mRNA variam paralelamente frente a alterações na homeostasia glicêmica. Em *pools* de quadríceps/ gastrocnêmio de ratos dibéticos por estreptozotocina,

Richardson e colaboradores (1991) verificaram diminuição no conteúdo da proteína GLUT4, sem alteração no conteúdo do mRNA correspondente, o que concorda com os dados observados em nossos animais obesos e reforça a idéia de que a expressão gênica do GLUT4 esteja sob regulação de mecanismos pós-transcricionais complexos.

Nossos resultados diferem, em parte, dos encontrados anteriormente por Seraphim (2001), que observou que os conteúdos de GLUT4 e seu mRNA em sóleo e EDL de ratos obesos não se alteram. No entanto, Papa e colaboradores (2002) observaram, em camundongos MSG, redução do conteúdo de GLUT4 em músculo gastrocnêmio, demonstrando que, neste tipo de obesidade, realmente se altera a expressão desta proteína em músculo esquelético.

Quando animais controles foram tratados com glimepirida, apresentaram variações opostas conforme o tipo de fibra, no conteúdo de mRNA, que aumentou no sóleo e diminuiu no EDL, o que demonstra a capacidade da glimepirida em promover uma regulação complexa, envolvendo mecanismos tecido – específicos. A expressão da proteína GLUT4 acompanhou as variações do mRNA em cada tecido, aumentando no sóleo e diminuindo na fração M do EDL, evidenciando paralelismo nos mecanismos de tradução do mRNA.

No EDL de ratos MSG, a menor expressão do mRNA do GLUT4 e proteína em M foi revertida pela glimepirida. No sóleo, a incapacidade dos animais obesos de elevar o conteúdo protéico, mesmo com a elevação do mRNA, foi completamente revertida pela glimepirida.

Embora ambos os grupos tratados com glimepirida (CG e MSG/G) tenham apresentado insulinemias elevadas, não podemos atribuir somente à insulina o efeito sobre a expressão do GLUT4, pois já se relataram efeitos diretos da glimepirida sobre a utilização da glicose, via metabolização não oxidativa, estimulando a lipogênese e glicogeniogênese (MÜLLER & GEISEN, 1996).

Além disso, a glimepirida foi capaz de estimular *in vitro* a translocação de GLUT4 em adipócitos resistentes à ação da insulina, na ausência do hormônio (MÜLLER & WIED, 1993). Nossos resultados, entretanto, demonstraram que a maior parte do GLUT4 já se localizava na fração de membranas plasmáticas (figuras 7 e 9), tanto no sóleo (em torno de 80% "translocado") quanto no EDL (cerca de 90%), mesmo nos grupos não tratados com glimepirida.

É importante ressaltar que, em tecidos musculares, a atividade contrátil é um grande regulador da expressão e translocação do GLUT4, sendo estas tanto mais elevadas quanto mais intensa a atividade do músculo (DAUGAARD & RICHTER, 2001). Assim, é possível que a atividade contrátil encarregue-se de manter elevada a porcentagem de GLUT4 na membrana plasmática, por uma necessidade constante do próprio tecido de utilização e armazenamento de substrato energético. Aliás, a contração muscular melhora a ação da insulina na captação de glicose aumentando a expressão não apenas do GLUT4, mas também de outras proteínas envolvidas no metabolismo da glicose, como a hexoquinase e glicogênio sintase (HJELTNES et. al., 1998). Além disso, a regulação pela atividade contrátil tem se demonstrado um importante regulador da expressão gênica, independente de fatores metabólico-hormonais, sendo capaz de ativar *per se* fatores de transcrição diretamente relacionados ao promotor do gene do GLUT4, como os MEF2A, MEF2D (*Myocite Enhancer Factor* 2A e 2D) e HIF1-a (*Hypoxia Inducible Factor* 1-a) (SILVA et al., 2005).

Tecido Adiposo

O tecido adiposo periepididimal foi escolhido como modelo de tecido adiposo branco visceral por apresentar área bem delimitada, facilitando sua retirada com precisão. Além disso, sabe-se que a gordura situada na região intra-abdominal é um importante tecido envolvido na resistência à insulina.

Assim, o excesso de deposição de gordura abdominal pode ser uma das causas do desenvolvimento de resistência à insulina nos animais tratados com MSG, que apresentam diminuição da proteína GLUT4 no tecido adiposo branco, segundo MACHADO e colaboradores (1994), que estudaram a expressão e translocação deste transportador em camundongos. Nossos resultados não confirmam este achado, pois os ratos obesos apresentaram conteúdo elevado, tanto da proteína GLUT4 quanto de seu mRNA (figura 10).

Como comentado anteriormente, a gravidade das alterações provocadas pelo MSG pode variar, sobretudo temporalmente. Em camundongos, provoca uma obesidade muito mais acentuada que em ratos, sendo, portanto, provável que nossos ratos MSG, apesar de já apresentarem resistência à insulina, não tenham desenvolvido ainda prejuízos morfo-funcionais maiores, de modo que o GLUT4 ainda se encontrou elevado. Aliás, elevada expressão desta proteína já foi encontrada por Papa e cols. (2002) em camundongos MSG jovens, quadro que se inverte quando, mais tarde, estabilizam a obesidade e apresentam franca resistência insulínica. Considerando estes estudos, o aumento de GLUT4 observado sugere que os animais MSG do presente estudo encontravam-se ainda em fase de progressão da obesidade.

Se levarmos, ainda, em consideração o consumo alimentar relativamente excessivo, como discutido anteriormente, espera-se que os adipócitos dos animais obesos estejam apresentando uma alta capacidade de captar glicose, já que, na vigência de excedente calórico, o tecido adiposo tem papel importante no armazenamento de substrato. Neste mecanismo, maior aporte de glicose para as células adiposas depende, entre outros fatores, de aumento da expressão do transportador.

Após tratamento com a glimepirida, o conteúdo de GLUT4 e de mRNA retornaram ao mesmo nível dos animais C, revertendo a alteração provocada pelo MSG, embora os grupos MSG e MSG/G não diferissem quanto ao peso dos tecidos. Estes dados, em conjunto, indicam que o aumento da sensibilidade à insulina pela glimepirida ocorreu sem exacerbar a obesidade.

Uma vez que, em ratos espontaneamente diabéticos, já se observou efeito da glimepirida na prevenção do diabetes (PAN et. al., 1995), é possível questionar se, caso o tratamento se iniciasse mais cedo, poderia ser prevenida a obesidade dos ratos MSG. Ressalte-se, evidentemente, que esta abordagem não pretende sugerir o uso da glimepirida como medicamento para prevenção de diabetes, pois o aumento precoce da insulinemia é altamente indesejável, já que provavelmente precipitaria a resistência insulínica e falência da célula B. No entanto, a demonstração de que o mesmo agente secretagogo de insulina seja capaz de diminuir a captação de glicose no tecido adiposo é relevante, haja vista que o intuito do medicamento incluiria melhorar a sensibilidade à insulina, o que usualmente acompanha-se de exacerbação da obesidade.

No entanto, uma vez que o grupo MSG/G diminuiu a expressão da proteína GLUT4, apesar de melhorar a sensibilidade insulínica *in vivo*, fica evidente que, se o tratamento crônico com glimepirida induziu resistência à insulina quanto à captação de glicose no tecido adiposo, necessariamente teve de aumentar a captação de glicose em outros territórios. Desta forma, explica-se a ausência de ganho de peso, mesmo com a elevação da insulinemia, e o aumento da sensibilidade sistêmica à insulina.

De fato, observamos nas fibras musculares oxidativas, neste estudo representadas pelo músculo sóleo, um aumento importante na expressão do GLUT4 (proteína e mRNA) após o tratamento crônico com a glimepirida. Por este motivo, este tecido foi avaliado funcionalmente quanto à sua habilidade de responder ao estímulo insulínico agudo, o que permitiu discriminar as respostas como efeitos do tratamento prévio com a glimepirida e não apenas como efeito da elevação da insulinemia.

Translocação do GLUT4 sob estímulo insulínico

O conhecimento de que a insulina é capaz de estimular a translocação de transportadores de glicose do meio intracelular para a superfície da célula data do início da década de 80, antes mesmo da caracterização das várias isoformas de transportadores de glicose. Especificamente no tecido muscular, Wardzala e Jeanrenaud (1981) demonstraram que, em diafragma isolado, sob estímulo insulínico, havia aumento na fração de membranas plasmáticas e concomitante diminuição na fração de membranas intracelulares do *binding* de [^{3}H]-citocalasina B. Resultados semelhantes já haviam sido demonstrados em adipócitos, por Cushman e Wardzala (1980) e Suzuki e Kono (1980).

A identificação e clonagem dos transportadores de glicose, à partir de meados da década de 80 (MUECKLER et al., 1985) e, principalmente, a caracterização do GLUT4, a isoforma sensível à ação da insulina (JAMES, STRUBE, MUECKLER, 1989), vieram a confirmar aqueles achados e constituem, ainda hoje, área para vastos estudos relacionados à sensibilidade à insulina e homeostase glicêmica.

Em ensaios de translocação da proteína GLUT4 em adipócitos *in vitro*, Matthaei et al. (1991) observaram que a quase totalidade do GLUT4 se encontrava nos compartimentos intracelulares e que o estímulo insulínico chegava a deslocar cerca de 50% deste total para a membrana plasmática. Resultados semelhantes foram observados por MACHADO et al. (1993) em tecido adiposo *in vivo*.

Atualmente, o mecanismo da translocação do GLUT4, como um dos efeitos biológicos desencadeados pela transdução do sinal insulínico, encontra-se relativamente bem esclarecido, embora continuamente se desvendem novos conhecimentos acerca deste fenômeno, vital para a regulação da homeostasia glicêmica (BJÖRNHOLM; ZIERATH, 2005). Nos músculos, esta regulação é muito mais complexa que no tecido adiposo, uma vez que a atividade contrátil

também é reguladora, não apenas da expressão do GLUT4, mas também da sua translocação, por vias independentes da sinalização insulínica (ZORZANO; PALACIN; GUMÀ, 2005). Uma dessas vias envolve o cálcio liberado dos retículos sarcoplasmáticos pela despolarização das membranas dos túbulos transversos. O Ca^{++} é capaz de ativar isoformas de PKC, envolvidas no transporte de glicose, independentemente da atividade de PI3K. Além disso, o AMP, gerado pela degradação de ATP durante a contração, ativa a AMPK (proteína quinase ativada por AMP), um complexo enzimático composto por uma subunidade catalítica (α) e duas subunidades regulatórias (β e γ), envolvido na captação de glicose e translocação do GLUT4 (ZORZANO, PALACIN, GUMÀ, 2005).

Todos estes dados, em conjunto, demonstram que a efetiva capacidade de captação de glicose no músculo correlaciona-se, em situações fisiológicas, muito mais com a contração muscular do que com a insulinemia, pois depende diretamente do conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática. No entanto, o aumento crônico da expressão desta proteína pode, por aumentar os estoques intracelulares do transportador, melhorar a capacidade de translocação em resposta à insulina ou à contração. Por isso, uma das formas de avaliar os efeitos crônicos do tratamento com a glimepirida sobre a sensibilidade insulínica foram os ensaios de translocação do GLUT4 no músculo sóleo.

É importante lembrar que, no estado alimentado, na vigência do estado metabólico-hormonal natural de cada grupo, como foram avaliados nos experimentos de *Northern* e *Western Blotting*, o tratamento com a glimepirida elevou significativamente a expressão do mRNA e da proteína GLUT4 no sóleo, tanto na membrana plasmática quanto na fração microssomal. Nos ensaios de translocação, avaliamos a resposta de cada grupo a um estímulo insulínico supra-fisiológico após um período de restrição alimentar (10 horas), de modo que não houve influência das insulinemias de cada grupo, as quais foram sobrepujadas pelo estímulo e, portanto, as

diferenças observadas entre os grupos se devem a alterações crônicas prévias, que determinam diferentes capacidades de resposta.

Os valores de glicemia, tanto no estado basal quanto após estímulo insulínico, foram semelhantes entre os grupos (figura 12). Verificamos também que as injeções de insulina foram efetivas, reduzindo significativamente a glicemia ($p<0,001$ vs. BASAL). Entretanto, é interessante ressaltar que a magnitude da queda glicêmica foi significativamente menor no grupo MSG, o que está de acordo com o resultado do teste de tolerância à insulina (figura 3), no qual este grupo apresentou constante de decaimento da glicose significativamente inferior à dos demais grupos.

Analisando-se o conteúdo de GLUT4 das frações subcelulares no estado basal (figura 13), observamos que todos os grupos apresentaram conteúdos semelhantes do transportador na fração PM. Após o tratamento com a glimepirida (MSG/G), um aumento significativo do conteúdo de GLUT4 ocorreu na fração M em comparação com os demais grupos, que não diferiram entre si. Este dado demonstra um aumento da expressão do GLUT4 por efeito da glimepirida que, portanto, não exacerbou o fenômeno da translocação em si, mas aumentou os estoques intracelulares do transportador, melhorando a capacidade de translocação em resposta à insulina. Após estímulo insulínico (figura 13), elevou-se a quantidade de GLUT4 na membrana plasmática ($p<0,001$ vs. BASAL). Além disso, concomitantemente, houve diminuição significativa na fração microssomal, que foi muito evidente no grupo MSG/G, reiterando o efeito da glimepirida na melhora da capacidade de translocação, sobretudo quando o conteúdo intracelular do transportador aumentar.

Quando calculamos a porcentagem de GLUT4 total encontrado na membrana plasmática, constatamos que, mesmo no estado basal, mais de 80% do conteúdo total (recuperado nas frações PM e M), já se encontrava na fração PM (figura 14), porcentagem excessivamente

elevada comparando-se com adipócitos, onde a maior parte do GLUT4 se encontra internalizada, e cerca de 50% se desloca para a superfície após estímulo insulínico (MATTHAEI et al., 1991; MACHADO et al., 1993).

No entanto, PLOUG et al. (1998), estudando a distribuição subcelular do GLUT4 em sóleo de ratos, descreveram que no estado basal, 68% do GLUT4 total encontram-se na superfície celular, como demonstrado pela localização por imunofluorescência. Se considerarmos ainda que estes estudos foram conduzidos em fibras musculares isoladas, estes resultados são compatíveis com os observados no presente estudo, em que os tecidos foram avaliados *in vivo*, quando os músculos se encontravam na vigência do seu tônus natural e, portanto, sob ação de um certo grau de contração muscular, que sabidamente ativa os mecanismos de translocação do GLUT4 (CORTRIGHT AND DOHM, 1997).

Além disso, na situação *in vivo*, nunca se avalia o tecido na ausência de insulina, como é o caso de estudos *in vitro,* nos quais a condição basal é sempre sem insulina. No animal *in vivo*, mesmo em jejum, há níveis insulinêmicos baixos, mas que não se equiparam à ausência total do hormônio. Portanto, nossos achados de que a maior parte do GLUT4 já se encontra translocado em músculo esquelético no estado basal, embora originais, talvez não sejam contraditórios, mas reflitam o verdadeiro mecanismo *in vivo*, ainda não demonstrado.

Ploug e colaboradores (1998) relatam que, nas fibras musculares esqueléticas, a distribuição do GLUT4 é organizada de forma única para suprir as necessidades metabólicas das fibras, que são células grandes, multinucleadas, em que a superfície celular se constitui de duas regiões distintas, que são as membranas plasmáticas propriamente ditas (sarcolema), e os túbulos transversos (T). Estes últimos são invaginações da superfície celular, que garantem a rápida propagação das mudanças no potencial de membrana, por toda a fibra muscular. Estudos detalhados das frações subcelulares de músculos esqueléticos, que separaram quatro frações

distintas (membranas plasmáticas, duas frações de túbulos T e membranas intracelulares), demonstraram que 90% das proteínas totais recuperadas nessas diferentes frações encontraram-se no conjunto de membranas plasmáticas e túbulos transversos (DOMBROWSKI; MARETTE, 1995). Em nossas frações, aqui denominadas de membranas plasmáticas (PM), de onde excluímos as vesículas intracelulares, mas não os túbulos T, também encontramos 70% a 90% das proteínas totais, o que concorda com esses dados e indicam que, embora nossas frações possam não ser puras em membranas plasmáticas, sejam representativas do conteúdo de GLUT4 que efetivamente participa na captação de glicose nas fibras musculares.

Ainda que sustentados por estes relatos, consideramos importante confirmar a eficiência do fracionamento, demonstrando que a fração PM era de fato rica em proteínas de membrana plasmática, comparativamente à fração de membranas intracelulares (M).

Dosagem da atividade específica da 5´nucleotidase

A degradação dos nucleotídeos purínicos (AMP e GMP) se dá por meio de uma via na qual um grupo fosfato (Pi) é retirado pela ação da 5´nucleotidase, uma enzima localizada na membrana das células, sendo amplamente reconhecida como marcador de membranas plasmáticas (SCHIMMEL et al., 1973; DOMBROWSKI; MARETTE, 1995). A atividade específica desta enzima foi dosada nas frações PM e M de todos os tecidos musculares utilizados neste estudo.

É importante lembrar que as recuperações protéicas totais, embora não diferissem entre os grupos, foram muito diferentes entre as frações PM e M (tabela 6). Por isso, foi preciso considerar não apenas a atividade específica em cada miligrama de proteína, mas também a quantidade de proteína presente em cada fração, a partir de uma mesma quantidade de tecido, pois, se em PM há muito mais proteínas que em M, quando se considera um miligrama de

proteína de ambas as frações, referimo-nos a uma diminuta quantidade de tecido (PM), comparada a uma grande quantidade de tecido (M). Assim, as atividades específicas foram normalizadas relativamente ao conteúdo de proteínas totais e expressas em atividade por grama de tecido. Este dado é o que indica, de fato, o quanto rica em uma determinada proteína se encontra cada fração, permitindo comparar diferentes frações entre si.

Os valores de atividade enzimática por grama de tecido, expressos em µmol Pi/60min/g, encontram-se nos anexos 5A, 5B e 5C. Em todos os tecidos, 75% a 90% da atividade total recuperada nas duas frações (PM + M), foi encontrada em PM, validando as análises do GLUT4.

No sóleo (anexo 5C), a atividade em PM foi quase 20% maior nos animais obesos, sugerindo alterações morfo-estruturais na composição das membranas devidas à obesidade. Uma vez que, para cada grupo tratado existiu seu respectivo controle, tais alterações não afetaram a interpretação dos resultados quanto ao tratamento com a glimepirida. No EDL (anexo 5B), os grupos não apresentaram diferenças entre si na distribuição relativa da atividade de 5´nucleotidase. O coração foi o tecido onde se observaram as maiores recuperações protéicas totais (tabela 6) em todos os grupos, resultando em atividade por grama de tecido muito superior às observadas nos músculos esqueléticos (anexo 5A).

Embora diferentes tratamentos possam provocar alterações quanto ao conteúdo total da 5´nucleotidase ou outras proteínas de membranas nos diferentes grupos, tais diferenças não acarretaram prejuízo na recuperação das proteínas de membrana plasmática nas frações PM, ou seja, a separação por centrifugações diferenciais foi eficiente para a obtenção das frações subcelulares propostas.

Uma vez que toda a análise do GLUT4 foi feita à partir do conteúdo presente em 1grama de tecido, eventuais alterações de recuperação protéica ou de composição das membranas foram corrigidas, proporcionando análises funcionais corretas. Os resultados de GLUT4 são, portanto,

eficientes para se analisar o papel do tecido, no organismo como um todo, quanto à sua capacidade de depurar glicose.

Captação de 2-deoxi–[2,6-^{3}H]–D-glicose e incorporação de [U-^{14}C]-D-glicose ao glicogênio em músculo sóleo, *in vitro*

Confirmada a capacidade da glimepirida em elevar a expressão do GLUT4 no músculo sóleo, melhorando inclusive a capacidade de translocação em resposta à insulina neste tecido, por aumentar os estoques intracelulares do transportador nos animais obesos, restava testar a captação de glicose neste tecido para avaliar se as alterações promovidas pelo tratamento crônico com a glimepirida teriam, de fato, importância funcional confirmando o aumento da sensibilidade insulínica periférica, demonstrada pelos testes de tolerância à insulina.

Dados na literatura indicam haver discrepâncias entre a magnitude da translocação de GLUT4 e a taxa de captação de glicose (FURTADO et al., 2003), de modo que a quantificação da glicose captada seria a medida mais segura do efeito da glimepirida sobre a homeostasia glicêmica. Assim, a avaliação do transporte de glicose nos possibilitou investigar todo um processo modulado pela glimepirida. Este efeito, nas fibras oxidativas, envolveu estimulação da expressão do gene do GLUT4, melhora da capacidade de translocação desta proteína, o que se refletiu em aumento da captação de glicose, demonstrando a importância funcional destas alterações de conteúdo e de resposta ao estímulo insulínico, na depuração de glicose plasmática.

Além do efeito sobre a captação de glicose, há relatos de que a glimepirida aumenta dose-dependentemente a glicogeniogênese estimulada pela insulina em células musculares esqueléticas em cultura (HAUPT et at., 2002). Estes autores sugerem que este efeito da glimepirida dependa da presença de insulina, pois nenhum efeito sobre a síntese basal de glicogênio foi observado. Já a glibenclamida não tem efeito algum sobre a glicogeniogênese muscular, demonstrando que a

glimepirida, de fato, apresenta um efeito diferenciado sobre a sensibilidade periférica à insulina, comparativamente às demais sulfoniluréias (HAUPT et at., 2002).

Nossos experimentos com músculo sóleo, incubado em presença e ausência de insulina, estão de acordo com estes dados, pois nenhuma diferença na síntese basal de glicogênio foi observada entre os grupos (figura 16). Por outro lado, na presença de insulina, os animais obesos apresentaram menor incorporação de [U-^{14}C]-D-glicose ao glicogênio muscular que os animais controles e, quando tratados cronicamente com a glimepirida, apresentaram aumento na síntese de glicogênio, demonstrando a eficiência do tratamento (MSG/G, $p<0,05$ vs. MSG).

É importante ressaltar que todos os estudos que demonstraram aumento de captação de glicose e síntese de glicogênio, bem como elevações na expressão ou translocação do transportador de glicose (MULLER & WIED, 1993; BAHR et al., 1995; HAUPT et. al., 2002) utilizaram células em cultura, onde o efeito da glimepirida foi avaliado adicionando-se a droga ao meio de cultura, em presença ou ausência de insulina. Em nossos ensaios, foram utilizados porções dos tecidos musculares retirados dos animais tratados com o anti-diabético, que não esteve presente no meio de incubação. Portanto, os efeitos observados sobre a captação de glicose e sobre a síntese de glicogênio, que melhoraram nos animais obesos tratados, foram devidos à ação prévia da glimepirida sobre as características funcionais do tecido, tornando-o mais apto a responder ao estímulo insulínico. Esta idéia está de acordo com a ausência de efeito agudo da glimepirida sobre a captação de 3-orto-metil-glicose em cardiomiócitos, os quais após um período crônico (20 horas) de incubação em presença da glimepirida, tiveram a captação de glicose significativamente elevada (BAHR et. al., 1995).

Conteúdo de glicogênio hepático

Embora os músculos esqueléticos, devido à sua abundância no organismo, sejam responsáveis por quase 80% da captação de glicose estimulada pela insulina (DeFRONZO et al., 1981), a importância do fígado como órgão chave na regulação da homeostase glicêmica não pode ser ignorada.

Vale lembrar mais uma vez que a dose de 0,1mg/kg/dia de glimepirida foi escolhida por ser a dose necessária para obtenção de efeito significativo sobre a homeostasia glicêmica em ratos (EL-REYANI et al., 1999). Com esta dose, obtivemos melhora da sensibilidade à insulina nos animais MSG/G, sem provocar alterações glicêmicas importantes nos animais controles, além de aparentemente não prejudicar a função hepática, pois embora seja rara, já foi relatada ocorrência de hepatotoxicidade com algumas sulfoniluréias (SCHNEIDER et al., 1984; GOODMAN et al., 1987; DOURAKIS et al., 2000). A glimepirida, como as demais sulfoniluréias, é lipofílica, e o fígado é o órgão responsável por sua biotransformação a metabólicos hidroxi e carboxi-derivados, e eliminação de cerca de 40% da droga, sendo o restante eliminado pelos rins (ROSENSTOCK et al., 1996).

Para investigar a possível participação do fígado na restauração da sensibilidade insulínica em nossos animais obesos, foi dosado o conteúdo de glicogênio hepático dos diferentes grupos. Nossos dados (figura 17) comprovaram relatos anteriores de diminuição de glicogênio em fígado de ratos MSG (MALIK & AHLUWALIA, 1994). É interessante ressaltar que, justamente neste grupo, a constante de decaimento de glicose (kITT) foi significativamente menor (figura 3), o que sugere que a resistência à insulina tenha um componente hepático. Adicionalmente, nesses animais já foi descrita atividade lipogênica aumentada no fígado (NASCIMENTO-CURI et al., 1991), o que pode contribuir ainda mais para diminuir o conteúdo de glicogênio hepático.

Na obesidade pelo MSG, pode ocorrer altos níveis de glicocorticóides, que sabidamente elevam a atividade da PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinase) e da glicose -6-fosfatase, enzimas chaves da gliconeogênese (BARTHEL & SCHMOLL, 2003). Adicionalmente, na resistência à insulina, perde-se a ação inibitória da insulina sobre estas enzimas gliconeogênicas, o que significa que estes animais devem apresentar gliconeogênese aumentada. Nesse caso, é importante lembrar que já se demonstrou efeito de sulfoniluréias de primeira e segunda geração (tolbutamida e glibenclamida) sobre a produção de frutose 2,6, bifosfato, que é regulador alostérico da fosfofrutoquinase -1, enzima chave da glicólise hepática, e inibidor da enzima gliconeogênica frutose 1,6 bifosfatase (KAKU et al., 1995). Portanto, as sulfoniluréias seriam capazes de atuar diretamente no metabolismo de carboidratos no fígado, diminuindo a gliconeogênese e estimulando a glicólise, o que diminuiria a produção hepática de glicose, que se encontra aumentada na resistência insulínica.

Agudamente, não se observou efeito da glimepirida sobre a captação hepática de glicose em pacientes diabéticos, mas a administração de glimepirida por 7 dias aumentou a captação de glicose pelo fígado, em cães (KAWAMORI et al., 1995). No presente estudo, após tratamento com a glimepirida (MSG/G), tanto a kITT quanto o conteúdo de glicogênio hepático dos obesos retornaram aos valores do grupo C, sugerindo uma participação importante do fígado na melhora da sensibilidade à insulina por efeito do medicamento. De fato, uma vez que receptores para sulfoniluréias já foram identificados em hepatócitos, já se sugeriu ser o fígado um dos seus sítios de ação extra–pancreática (KAKU et al., 1995).

Conteúdo de phospho-GSK-3α/β (p-GSK3) no fígado

A GSK-3 é uma das quinases que fosforilam e inativam a glicogênio sintase (GS), enzima final da biossíntese de glicogênio. Por ação da insulina, inativa-se a GSK-3, através de sua

fosforilação em resíduos de serina N – terminais (Ser^{21} em GSK-3α e Ser^{9} em GSK-3β), catalisada pela Akt (CROSS ET AL., 1995). Inativada a GSK-3, inibe-se a fosforilação da GS, que toma sua forma ativa, estimulando-se assim a síntese de glicogênio. Considerando estes mecanismos, procuramos confirmar se o restabelecimento do conteúdo de glicogênio hepático nos animais MSG/G esteve realmente relacionado a um efeito da glimepirida sobre os mecanismos de biossíntese do glicogênio.

É interessante salientar que os animais submetidos à análise do glicogênio hepático e p-GSK-3 foram previamente submetidos a uma privação alimentar de 10 horas. Portanto, foram avaliados em período pós absortivo, quando gliconeogênese e glicogenólise se encontram ativas. Estas condições poderiam dificultar a resposta à insulina, já que o jejum é um indutor de resistência à insulina. Por outro lado, justamente o fato de os animais estarem sob condições que favoreciam o estado de resistência à ação da insulina, torna mais relevante o efeito da glimepirida no sentido de melhorar a resposta aguda ao hormônio.

Nossos dados demonstraram que, no estado basal, todos os grupos apresentaram conteúdos semelhantes da p-GSK-3 (figura 18). No entanto, após o estímulo insulínico, justamente no grupo MSG, que apresentou menor conteúdo hepático de glicogênio (figura 17), a fosforilação da GSK-3 foi significativamente menor ($p<0,01$ vs. C; $p<0,05$ vs. CG). Este dado está de acordo com a menor sensibilidade à insulina apresentada pelo grupo MSG. Além disso, a glimepirida claramente melhorou a resposta aguda à insulina no grupo MSG/G, que apresentou conteúdo de p-GSK3 significativamente elevado com relação ao grupo MSG ($p<0,01$). Este efeito ocorreu a despeito da elevação crônica da insulinemia, decorrente do tratamento com o agente secretagogo.

Em células musculares de humanos diabéticos, em cultura, o conteúdo de GSK-3 encontra-se aumentado, e esta elevação se correlaciona a diminuição da atividade da glicogênio

sintase estimulada pela insulina e diminuição da utilização de glicose (NIKOULINA et al., 2002). Estes dados confirmam a relação positiva entre inativação (fosforilação) da GSK-3 e melhora da captação de glicose.

Aliás, tem-se investigado a possibilidade de utilização de compostos inibidores da GSK-3 para o tratamento do DM2 (FRAME & COHEN, 2001), uma vez que a atividade desta enzima encontra-se elevada, tanto em camundongos obesos quanto diabéticos (ELDAR-FINKELMAN et al., 1999). Em hepatócitos, inibidores seletivos da GSK-3 mimetizam a ação da insulina, promovendo ativação da glicogênio sintase (COGHLAN et al., 2000), diminuição da expressão da glicose 6-fosfatase e PEPCK (LOCHEAD et al., 2001) e, portanto, diminuem a produção hepática de glicose e melhoram a utilização de glicose. Assim, glimepirida, por ser capaz de aumentar a fosforilação/inativação da GSK-3 nos animais resistentes à insulina, demonstrou-se capaz de agir sobre a sensibilidade insulínica, não apenas aumentando a captação da glicose, mas também melhorando sua utilização.

SUMÁRIO

Nossos resultados demonstraram que:

1 -) O tratamento crônico com a glimepirida melhorou a sensibilidade insulínica dos animais MSG.

2 -) Este efeito foi acompanhado de variações tecido – específicas no conteúdo da proteína GLUT4 e de seu mRNA, resumidas no quadro abaixo:

EFEITOS DA GLIMEPIRIDA SOBRE O GLUT4

	CONTROLE		MSG	
TECIDO	**mRNA**	**PROTEÍNA**	**mRNA**	**PROTEÍNA**
COR	___	___	___	___
EDL	⬇⬇	⬇ **(M)**	⬆	⬆ **(M)**
SOL	⬆⬆	⬆⬆⬆ **(PM e M)**	⬆⬆⬆	⬆⬆⬆ **(PM e M)**
WAT	___	___	⬇	⬇

3 -) No músculo sóleo, a glimepirida melhorou também a capacidade de translocação do GLUT4 sob estímulo insulínico, nos animais obesos.

4 -) Estes efeitos sobre o GLUT4 se refletiram funcionalmente no sóleo, melhorando, nos animais obesos tratados, a capacidade deste tecido em captar glicose e sintetizar glicogênio, sob estímulo insulínico.

5-) A glimepirida teve também efeitos hepáticos, restaurando o conteúdo de glicogênio que se encontrou significativamente reduzido nos animais resistentes.

6-) O aumento do glicogênio hepático esteve associado à capacidade da glimepirida de melhorar a fosforilação/ inativação da enzima GSK-3, em resposta à insulina, o que favorece a ativação da glicogênio sintase, aumentando a glicogeniogênese hepática.

Conclusão

O tratamento crônico com a glimepirida promoveu, além do aumento da secreção da insulina, efeitos extra-pancreáticos, melhorando a sensibilidade sistêmica ao hormônio. Os efeitos observados sobre a expressão do GLUT4 não apenas demonstraram um provável mecanismo de controle da glicemia, através de maior captação de glicose pelas fibras musculares, como ainda confirmaram que a glimepirida não agrava a obesidade, por acelerar a instalação da resistência à insulina especificamente no tecido adiposo. Além disso, os efeitos sobre a síntese de glicogênio, tanto no fígado quanto no sóleo demonstraram uma melhora na metabolização não oxidativa da glicose.

Estes dados, em conjunto, vêm trazer demonstrações importantes, num modelo *in vivo,* de fenômenos, até então, somente observados *in vitro* e ainda não muito considerados na prática clínica, em que a glimepirida é considerada apenas um secretagogo de insulina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMA, R.S. & FLIER, J.S. - Leptin - **Annu Rev Phisiol**, v.62, p. 413-437, 2000.

AVRUCH, J.; WALLACH, D.F.H. Preparation and properties of plasma membrane and endoplasmic reticulum fragments from isoloated rat fat cells. **Biochim Biophys. Acta**, v. 233, p. 334-347, 1971.

BAHR M,; VON HOLTEY M.; MULLER G.; ECKEL J. Direct stimulation of myocardial glucose transport and glucose transporter-1 (GLUT1) and GLUT4 protein expression by the sulfonylurea glimepiride. **Endocrinology**;v. 136, n. 6, p.2547-53, 1995.

BARTHEL, A; SCHMOLL, D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 285, p. E685-E692, 2003.

BELL, G.L.; BUSE, J.B.; BURRANT, C.F.; TAKEDA, J; LIN, D.; FUKUMOTO, H.; SEINO, S. Molecular Biology of mammalian glucose transporters. **Diabetes Care, v.**13, n.3, p. 198-208, 1990.

BJÖRNHOLM, M.; AL-KHALILI, L.; DICKER, A; NÄSLUND, S.; RÖSSNER, S.; ZIERATH, J.R.; ARNER, P. Insulin signal transduction and glucose transport in human adipocytes: effects of obesity and low calorie diet. **Diabetologia**, v. 45, p. 1128-1135, 2002.

BJÖRNHOLM, M.; ZIERATH, J.R. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in tyoe II diabetes. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, part 2, p. 354-357, 2005.

BRAY, G.A. Obesity - A disease of nutrient or energy balance? **Nutr. Rev.,** v.45, p. 33-43, 1987.

BUSE, J.B; POLONSKY, K.S.; BURANT, C.F. Type 2 Diabetes Mellitus. In: LARSEN. P.R; KRONEMBERG, H.M.; MELMED, S.; POLONSKY, K.S. **Williams textbook of Endocrinology**, 10.ed., Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders Company, 2003. p. 1427-1484.

CAMERON, D.P.; CUTBUSH, L.; OPAT, F. Effect of monosodium glutamate-induced obesity in mice on carbohydrate metabolism and insulin secretion. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.5, p. 41-51, 1978.

CHALLISS, R.A.; ESPINAL, J.; NEWSHOLME, E.A. Insulin sensitivity of rates of glycolysis and glycogen synthesis in soleus, stripped soleus, epitrochlearis, and hemi-diaphragm muscles isolated from sedentary rats. **Biosci. Rep**., v.3, n. 7, p. 675-679, 1983.

CHALLISS, R.A.; LOZEMAN, F.J.; LEIGHTON, B.; NEWSHOLME, E.A. Effects of the beta-adrenoceptor agonist isoprenaline on insulin sensitivity in soleus muscle of the rat. **Biochem J***,* v. 233, n. 2, p. 377-381, 1986.

COGHLAN, M.P.; CULBERT, A.A.; CROSS, D.A.; CORCORAN, S.L.; YATES, J.W.; PEARCE, N.J.; RAUSCH, O.L.; MURPHY, G.J.; CARTER, P.S.; ROXBEE COX, L. ET. AL. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase -3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. **Chem Biol**, v.7, p. 793-803, 2000.

CORTRIGHT, R.N.; DOHM, G.L. Mechanisms by which insulin and muscle contraction stimulate glucose transport. **Can J. Appl. Physiol**., v. 22, p. 519-530, 1997.

COYLE, J.T.; BIRD S.J.; EVANS, R.H.; GULLEY, R.L.; NADLER, J.V.; NICKLAS, W.J.; OLNEY, J.W. Excitatory aminoacid neurotoxins: selectivity, specificity and mechanisms of action. **Neurosci. Res. Prog. Bull**., v. 19, n. 4, p. 331-427, 1981.

CRETTAZ, M.; PRENTKI, M.; ZANINETTI, D.; JEANRENAUD, B. Insulin resistance in soleus muscle from obese Zucker rats. Involvement of several defective sites. **Biochem J,** v. 186, n.2, p. 525-534, 1980.

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. 785-789, 1995.

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

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

DAVIS, S.N. The role of glimepiride in the effective management of type 2 diabetes. **J. Diabetes and Its Complications**, v. 18, p. 367-376, 2004.

DEFRRONZO, R.A.; JACOT, E.; JAQUIER, E.; MAEDER, E.; FELBER, J.P. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose: results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. Diabetes, v.30, p. 1000-1007, 1981.

DEFRONZO, R.A.; FERRANNINI, E. Insulin resistance – A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care,** v.14, n. 3; p. 173-194, 1991.

DOHM, G.L.; ELTON, C.W.; FRIEDMAN, J.E.; PILCH, P.F.; PORIES, W.J.; ATKINSON, S.N. Jr; CARO, J.F. Decreased expression of glucose transporter in muscle from insulin-resistant patients. **Am J Physiol**, v. 260, n. 3 Pt 1, p. E459-E463, 1991.

DOLNIKOFF, M; MARTIN-HIDALGO, A.; MACHADO, U.F.; LIMA, F.B; HERRERA, E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monossodium-glutamate (MSG) treated rats. **International Journal of Obesity**, v. 25, p. 426-433, 2001.

DOMBROWSKI, L.; MARETTE, A. Marked depletion of GLUT4 transporters in transverse tubules of skeletal muscle from streptozotocin-induced diabetic rats. **FEBS Letters**, v. 374, p. 43-47, 1995.

DOURAKIS, S.P.; TZEMANAKIS. E.; SINANI, C.; KAFIRI, G.; HADZIYANNIS, S.J. Gliclazide – induced acute hepatitis**. Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 12, n.1, p. 119-121, 2000.

ELDAR-FINKELMAN, H.; SCHEREYER, S.A.; SHINOHARA, M.M.; LeBOEUF, R.C.; KREBS, E.G. Increased glycogen synthase kinase-3, activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice. **Diabetes**, v.48, p. 1662-1666, 1999.

EL-REYANI, N.E.; BOZDOGAN, Ö, BACZKÓ, I.; LEPRÁN, I.; PAPP, J.G. Comparison of the efficacy of glibenclamide and glimepiride in reperfusion-induced arrhythmias in rats, **Eur. J. Pharmacol**., v. 365, p. 187-92, 1999.

FRAME, S.; COHEN, P. GSK-3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. **Biochem J**, v.359, p. 1-16, 2001.

FURTADO, M.; POON, V.; KLIP, A. GLUT4 activation: thoughts on possible mechanisms. **Acta Physiol. Scand**., v.178, p. 287-296, 2003.

GARFIN, D.E. One dimensional gel eletrophoresis. **Methods Enzimol**, v.182, p. 425-441, 1991.

GARVEY, W.T.; MAIANU, L., HUECKSTEAD, T.P.; BIMBAUM, M.J.; MOLINA, J.M.; CIARALDI, T.P. Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. **J. Clin. Invest.**, v.87, p. 1072-1081. 1991.

GARVEY, W.T.; MAIANU, L.; ZHU, J.H.; BRECHTEL-HOOK, G; WALLACE, P; BARON, A.D. Evidence for defects in the traffic and translocation of GLUT4 glucose transportersin skeletal muscle as a cause of humaninsulin resistance**. J. Clin. Invest.**, v. 101, n. 11, p. 2377-2386, 1998.

GASTER, M.; HANDBERG, A.; SCHÜRMANN, A.; JOOST, H.-G.; BECK-NIELSEN, H.; SCHRODER, H.D. GLUT11, but not GLUT8 or GLUT12, is expressed in human skeletal muscle in a fibre type – specific pattern. **Eur J Physiol***, 448:* 105-113, 2004

GEARY, N; LANGHANS, W; SCHARRER, E. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. **Am J. Physiol**., v.241 (Regulatory Integrative Com. Physiol. 10), p. R330-R335, 1981.

GEISEN, K.; VÉGH, A.; KRAUSE, E.; PAPP, J.G. Cardiovascular effects of conventional sulfonilureas and glimepiride, **Horm. Metab. Res**., v. 28, p. 496-507, 1996.

GOODMAN, R.C.; DEAN, P.J.; RADPARVAR, A.; KITABCHI, A.E. Glyburide- induced hepatitis**. Ann Intern Med**, v.106, n. 6, p. 837-839, 1987.

GRIBBLE, F.M.; ASHCROFT, F.M. Sulfonylurea sensitivity of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels from β cells and extrapancreatic tissues. **Metabolism**, n. 49, Suppl. 10, p. 3-6, 2000.

GRIBBLE, F.M.; REIMANN, F. Differential selectivity of insulin secretagogues. Mechanisms, clinical implications, and drug interactions. **J Diabetes and Its Complications,** v. 17, p.11-15, 2003.

GUIMARÃES, R.B.; TELLES, M.M.; COELHO, V.B.O.; MORI, R.C.T.; NASCIMENTO, C.M.O., RIBEIRO, E.B. Adrenalectomy abolishes the food-induced hypothalamic serotonin release in both normal and monosodium glutamate-obese rats**. Brain Res Bull**, v.58, n.4, p. 363-369, 2002.

HAMAGUCHI, T, HIROSE, T., ASAKAWA, H., ITOH, Y., KAMADO, K., TOKUNAGA, K., TOMITA, K., MASUDA, H., WATANABE, N., NAMBA, M. Efficacy of glimepiride in type 2 diabetic patients treated with glibenclamide**. Diabetes Res. and Clin. Practice**, v. 66S, p. S129-S132, 2004.

HAUNER, H. he mode of action of thiazolidinediones. **Diabetes Metab Res Ver,** v.18, Suppl. 2, p. S10-S15, 2002.

HAUPT, A.; KAUSCH, C.; DAHL, D.; BACHMANN, O.; STUMVOLL, M.; HÄRING, H.U. MATTHAEI, S. Effect of glimepiride on insulin–stimulated glycogen synthesis in cultured human skeletal muscle cells, **Diabetes Care**, v. 25, p. 2129-2132, 2002.

HIRATA, A.E.; ANDRADE, I.S.; VASKEVICIUS, P.; DOLNIKOFF, M.S. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resitance to peripheral glucose uptake**. Braz J Med Biol Res**, v.30, n. 5, p. 671-674, 1997.

HJELTNES, N.; GALUSKA, D.; BJÖRNHOLM, M.; AKSNES, A-K.; LANNEM, A.; ZIERATH, J.R. Exercise-induced overexpression of key proteins involved in glucose uptake and metabolism in tetraplegic persons: Molecular mechanism for improved glucose homeostasis. **FASEB J**, v.12, p. 1701-1712, 1998.

HOLSTEIN, A.; PLASCHKE, A.; EGBERTS, E.H. Lower incidence of severe hypoglycaemia in patients with type 2 diabetes treated with glimepiride versus glibenclamide. **Diabetes Metab Res and Rev**, v. 17, p. 467-473, 2001.

HORIMOTO, H.; NAKAI, Y.; MIENO, S.; NOMURA, Y.; NAKAHARA, K.; SASAKI, S. Oral hypoglycemic sulfonylurea glimepiride preserves the myoprotective effects of ischemic preconditioning. **Journal of Surgical Research**, v. 105, p. 181-188, 2002.

HOST, H.H.; HANSEN, P.A.; NOLTE, L.A.; CHEM, M.M.; HOLLOSZY, J.O. Rapid reversal of adaptative increases in muscle GLUT4 and glucose transport capacity after training cessation. **J Appl Physiol**, v.84, n. 3, p. 798-802, 1998.

JAMES, D.E.; STRUBE, M.; MUECKLER, M. Molecular cloning and charactrization of an insulin-regulatable glucose transporter. **Nature (Lond)**, v. 338, p. 83-87, 1989.

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

KAHN, B.B. Glucose transport: pivotal step in insulin action. **Diabetes**, v.45, p. 1644-1654, 1996.

KAKU, K.; INOUE, Y.; KANEKO, T. Extrapancreatic effecs of sulfonylurea drugs. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 28, suppl., p. S105-S108, 1995.

KASANICKI, M.A.; PILCH, P.F. Regulation of glucose transporter function. **Diabetes Care**, v.13, p. 219-227, 1990.

KATZ, E.B.; BURCELIN, R; TSAO, T.S.; STENBIT, A.E.; CHARRON, M.J. The metabolic consequences of altered glucose transporter expression in transgenic mice. **J. Mol. Med.**, v. 74, p. 639-52, 1996.

KAWAMORI, R.; MORISHIMA, T.; KUBOTA, M.; MATSUHISA, M.; IKEDA, M.; KAMADA, T. Influence of oral sulfonylurea agents on hepatic glucose uptake. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 28, suppl., p. S109-S113, 1995.

KECSKEMET, V., BAGI, Z., PACHER, P., POZA, I., KOCSIS, E., KOLTAI, M.Z. New trends in the development of new antidiabetic drugs. **Curr Med Chem**, v.9, p. 53-71, 2002.

KIZER, J.S.: NEMEROFF, C.B.; YOUNGBLOOD, W.W. Neurotoxic aminoacids and structurally analogs**. Pharmacol. Rev**., v. 29, n. 4, p. 301-311, 1978.

KOISTINEN, H.A.; ZIERATH, J.R. Regulation of glucose transport in human skeletal muscle. **Ann Med,** v. 34, p. 410-418, 2002.

KOVACS, M.; KINEMAN, R.D.; SCHALLY, A.V.; FLERKO, B.; FROHMAN, L.A. Increase in mRNA concentrations of pituitary receptors for growth hormone-releasing hormone and growth hormone secretagogues after neonatal monosodium glutamate tratment. **J Neuroendocrinol**, v. 12, p. 335-341, 2000.

KRAMER, W.; MULLER, G.; GEISEN, K. Characterization of the molecular mode of action of the sulfonylurea, glimepiride, at β cell. **Horm Metab Res**,v. 28, p. 464-468, 1996.

LOCHHEAD, P.A.; GOGHAN, M.; RICE, S.Q.; SUTHERLAND, C, Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. Diabetes, v.50, p. 937-946, 2001.

LOWRY, O.H.; ROSEMBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J.Biol.Chem**., v.193, p. 265-75, 1951.

MACHADO, U.F. Transportadores de glicose. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 42, n.6, p. 413-421, 1998.

MACHADO, U.F.; NOGUEIRA, C.R.; CARPINELLI, A.R. Obesity is the major cause of alterations in insulin secretion and calcium fluxes by isolated islets from aged rats. **Physiol. Behav**., v. 52, p. 717-721, 1992.

MACHADO, U.F.; SHIMIZU, I; SAITO, M. Decreased glucose transporter (GLUT4) content in insulin-sensitive tissues of obese Aurothioglucose - and Monosodium glutamate- treated mice. **Horm Metab.Res**., v. 25, p. 462-5, 1993.

MACHADO, U.F.; SHIMIZU, I.; SAITO, M. Reduced content and preserved translocation of glucose transporter (GLUT4) in white adipose tissue of obese mice. **Physiol and Behavior**, v. 55, n. 4, p. 621-625, 1994.

MACHADO, U.F.& SAITO, M. The effect of adipose cell size on the measurement of GLUT4 in white adipose tissue of obese mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 28, n. 3, p. 369-376, 1995.

MACHO, L.; FICKOVÁ, M, JEZOVÁ, D; ZÓRAD, S. - Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. - **Phisiol Res.**, v.49, Suppl.1, p. S79-S85, 2000.

MALIK, V.B.T & AHLUWALIA, P. Studies on effect of monosodium glutamate (MSG) on various fractions of lipids and certain carbohydrate metabolic enzymes in liver and blood of adult male mice. **Toxicol Lett.,** v. 74, n.1, p. 69-77, 1994.

MARMO, M.R.; NUNES, M.T.; VOLPATO, C.T.; KETEKHUT, I.C.; HELL, N.S.; LIMA, F.B.; DOLNIKOFF, M.S. Reduced growth hormone mRNA levels in 28d-old MSG rats impair protein and lipid metabolism (Abs). **Eur. J. Physiol**., v.427, R29, 1994.

MASHARANI, U.; KARAM, J.H. Pancreatic Hormones & Diabetes Mellitus. In: **Basic and clinical endocrinology**, 6. ed. Mcgraw Hill, 2002. p. 623 - 641.

MATTHAEI, S.; HAMANN, A.; LEIN, H.H.; BENECKE, H.; KREYMANN, G.; FLIER, J.S.; GRETEN, H. Association of metformin´s effect to increase insulin-stimulated glucose transport with potentiation of insulin-induced translocation of glucose transporters from intracellular pool to plasma membrane in rat adipocytes***. Diabetes,*** v. 40, p.: 850-857, 1991.

MITSUMOTO, Y.; KLIP, A. Developmental regulation of the subcellular distribution and glycosylation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during myogenesis of L6 muscle cells**. J. Biol Chem**, v. 267, n.7, p. 4957-4962, 1992.

MORI, R.C.T.; GUIMARÃES, R.B.; NASCIMENTO, C.M.O.; RIBEIRO, E.B. Lateral hypothalamic serotonergic responsiveness to food intake in rat obesity as measured by microdialysis. **Can. J. Physiol. and Pharmacol**., v.77, p. 286-292, 1999.

MORRIS, M.J.; TORTELLI, C.F.; FILIPPIS, A., PROIETTO, J. Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. **Regul Peptide**, v.25, n. 75-76, p. 441-447, 1998.

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.

MÜLLER G, WIED S. The sulfonylurea drug, glimepiride, stimulates glucose transport, glucose transporter translocation, and dephosphorylation in insulin-resistant rat adipocytes in vitro, **Diabetes** ;v. 42, n.12, p.1852-67, 1993.

MÜLLER G.; WIED, S.; WETEKAN, E.M.; CRECELIUS, A.; UNKELBACH, A.; PUNTER, J. Stimulation of glucose utilization in 3T3 adipocytes and rat diaphragm in vitro by sulfonylureas, glimepiride and glibenclamide, is correlated with modulations of the cAMP regulatory cascade. **Biochem Pharmacol**, v.48, n.5, p. 985-996, 1994.

MÜLLER, G.; SATOH, Y.; GEISEN, K. Extrapancreatic effects of sulfonylureas – a comparison between glimepiride and conventional sulfonylureas. **Diabetes Res Clin Pract,** v.28, p. S115-S137, 1995.

MÜLLER, G.; GEISEN, K. Characterization of the molecular mode of action of the sulfonylurea, glimepiride, at adipocytes. **Horm Metab Res**, v. 28, n. 9, p. 469-487, 1996.

NASCIMENTO CURI, C.M.O.; MARMO, M.R.; EGAMI, M.; RIBEIRO, E.B.; ANDRADE, I.S.; DOLNIKOFF, M.S. Effect of monosodium glutamate treatment during neonatal development on lipogenesis rate and LPL activity. **Biochem. International**, v.24, n. 5, p. 927-35, 1991.

NIKOULINA, S.E.; CIARALDI, T.P.; MUDALIAR, S.; CARTER, L.; JONHSON, K.; HENRY, R.R. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 improves insulin action and glucose metabolism in human skeletal muscle. **Diabetes**, v. 51, n.7, p. 2190-2198, 2002.

OLNEY, J.H. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science,** v.164, p. 719-721, 1969.

PAN, J.; CHAN, E.K.; CHETA, D.; SCHRANZ, V.; CHARLES, M.A. The effects of nicotinamide and glimepiride on diabetes prevention in BB rats. **Life Sci**, v.57, n.16, p. 1525-1532, 1995.

PAPA, P.C.; SERAPHIM, P.M.; MACHADO, U.F. Loss of weight restores GLUT4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated mice**. International Journal of Obesity**, v. 21, p. 1065-1070, 1997.

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

PETERSEN, K.F.; SHULMAN, G.I. Cellular mechansism of insulin resistance in skeletal muscle. **J R Soc Med**, v.95, n.42, p. 8-13, 2002.

PLOUG, T.; DEURS, V.B.; AI, H.; CUSHMAN, S.W.; RALSTON, E. Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers, identification of distinct storage compartments trhat are recruited by insulin and muscle contractions. **J. Cell. Biol**., v.146, p. 1429-1446, 1998.

PROKS, P.; REIMANN, F.; GREEN, N.; GRIBBLE, F.; ASHCROFT, F. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. **Diabetes,** v. 51, suppl. 3, p. S368-S376, 2002.

RAPTIS, S.A.; DIMITRIADIS, G.D. Oral hypoglycemic agents: insulin secretagogues, alpha-glucosidase inhibitors and insulin sensitizers. **Exp Clin Endocrinol Diabetes,** v.109, Suppl. 2, p. S265-S287, 2001.

REAVEN, G.M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, p. 1595-1607, 1988.

RICHARDSON, J.M.; BALON, T.W,; TREADWAY, J.L.; PESSIN, J.E. Differential regulation of glucose transporter activity and expression in red and white skeletal muscle. **J. Biol. Chem**., v. 266, n. 16, p. 12690-12694, 1991.

RIVELINE, J.P.; DANCHIN, N.; LEDRU, F.; VARROUD-VIAL, M.; CHARPENTIER, G. Sulfonylureas and cardiovascular effects: from experimental data to clinical use. Available data in humans and clinical applications. **Diabetes Metab**, v. 29, p. 207-222, 2003.

ROSENSTOCK, J.; SAMOLS, E.; MUCHMORE, D.B.; SCHNEIDER, J. Glimepiride, a new once-daily sulfonylurea. A doub le blind placebo-controlled study of NIDDM patients. Glimepiride study group, Diabetes Care, v. 19, n.11, p. 1194-1199, 1996.

SALVI, S. Protecting the miocardium from ischemic injury. A critical role for α_1-adrenoreceptors? **Chest**, v. 119, p. 1242-1249, 2001.

SAMBROOK, J.F., E.F.; MANIATIS, T. Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eucariotic cells. In: C.S. Laboratory (Ed.). **Molecular Cloning: A laboratory Manual: 2 ed.** New York, 1989. Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eucariotic cells

SCHNEIDER, H.L.; HORNBACH, K.D.; KNIAZ, J.L.; EFRUSY, M.E. Chlorpropamide hepatotoxicity: report of a case and review of the literature. **Am J Gastroenterol**, v.79, n.9, p.: 721-724, 1984.

SERAPHIM, P.M. A resistência à insulina reduz a expressão do gene do GLUT4 na presença e na ausência de obesidade. São Paulo, 2001. [Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo]

SHI, H; MOUSTAID-MOUSSA, N.; WILKISON, W.O.; ZEMEL, M.B. Role of sulfonylurea receptor in regulating human adipocyte metabolism. **FASEB J.,** v, 13, p. 1833-1838, 1999.

SHIMMEL, S.D.; KENT, C.; BISCHOFF, R.; VAGELOS, P.R. Plasma membrane from cultured cells: isolation procedure and separation of putative plasma-membrane marker enzymes. **Proc. Nat. Acad. Sci**., v.70, n. 11, p. 3195-3199, 1973.

SILVA, J.L.T.; GIANNOCCO, G.; FURUYA, D.T.; LIMA, G.A.; MORAES, P.A.C.; NACHEF, S.; BORSIN, S.; BRITTO, L.R.G.; NUNES, M.T.; MACHADO, U.F. NF-κB, MEF-2A, MEF-2D and HIF1a involvement on insulin and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. **Mollecular and Cellular Endocrinology**, v. 240, p. 82-93, 2005.

SLOT, J.W.; GEUZE, H.J.; GIGENGACK, S.; LIENHARD, G.E.; JAMES, D.E. Immunolocalization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. **J Cell Biol**, v.113, n. 1, p. 123-135, 1991.

SPURLOCK, M.E.; HAHN, K.J.; MINER, J.L. Regulation of adipsin and body composition in the monosodium glutamate(MSG) – treated mouse**. Physiol Behav**, v.60, p. 1217-1221, 1996.

SUZUKI, K.; KONO, T. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. **Proc Natl Acad Sci**, v.77, n.5, p. 2542-2545, 1980.

THIRONE, A.C.P.; CARVALHEIRA, J.B.C.; HIRATA, A.E.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.A. Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissues of two models of insulin resistance. Endocrinology, v.145, n. 1, p. 281-293, 2004.

TOZZO, E.; GNUDI, L.; KAHN, B.B. Amelioration of insulin resistance in streptozotocin diabetic mice by transgenic overexpression of GLUT4 driven by na adipose-specific promoter. **Endocrinology***,* v. 138, n. 4, p. 1604-1611, 1997.

TRIPATHI, B.K.; SRIVASTAVA, A.K. Diabetes Mellitus: Complications and therapeutics, **Med Sci Monit** v. 12, n.7, p. RA130-RA147, 2006.

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

UNGER, R.H; FOSTER, D.W. Diabetes Mellitus. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W. **Williams textbook of Endocrinology**, 8. ed. Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders Company,1992. p.1255 – 1333.

UPHUES, I.; KOLTER, T.; GOUD,B; ECKEL, J. Failure of insulin-regulated recruitment of glucose transporterGLUT4 in cardiac muscle of obese Zucker rats is associated with alterations of small-molecular mass GTP-binding proteins. **Biochem J.** , v.311, p. 161-6, 1995.

WARDZALA, L.; JEANRENAUD, B. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat diaphragm. Apparent translocation of intracellular transport units to the plasma membrane**. J Biol Chem**, v. 256, n. 4, p. 7090-7093, 1981.

WEITGASSER R.; LECHLEITNER, M.; LUGER, A; KLINGLER, A. Effects of glimepiride on HbA_{1c} and body weight in type 2 diabetes: results of a 1.5-year follow-up study. Diabetes Research and Clinical Practice, v. 61, p. 13,19, 2003.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global Prevalence of Diabetes – Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

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

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

ANEXO 1

Conteúdos de mRNA do GLUT4 e proteína GLUT4 total de membranas plasmáticas e microssomais, de músculo cardíaco de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida, por 4 semanas.

GRUPO	mRNA (UA)	PROTEÍNA (UA/g tecido)
C	99,98 ± 11,88 (n=6)	119.092 ± 12.040 (n=7)
CG	103,52 ± 4,64 (n=5)	137.811 ± 4.935 (n=5)
MSG	96,90 ± 6,55 (n=7)	133.749 ± 8.400 (n=5)
MSG/G	96,88 ± 6,85 (n=5)	114.369 ± 6.688 (n=5)

Resultados expressos como média ± EPM, comparados por ANOVA de 1 via para dados independentes, p>0,05.

Conteúdo de proteína GLUT4 nas frações de membranas plasmáticas (PM) e microssomais (M) de músculo cardíaco de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida, por 4 semanas.

GRUPO	PM (UA/g tecido)	M (UA/g tecido)
C	107.989 ± 14.213 (n=7)	11.103 ± 1453 (n=7)
CG	129.521 ± 5.402 (n=5)	8.290 ± 693 (n=5)
MSG	123.205 ± 8.502 (n=7)	12.562 ± 497 (n=5)
MSG/G	104.636 ± 5912 (n=5)	9.733 ± 1.581 (n=5)

Resultados expressos como média ± EPM, comparados por ANOVA de 1 via para dados independentes, p>0,05.

ANEXO 2

Conteúdos de mRNA do GLUT4 e proteína GLUT4 total (membranas plasmáticas + microssomais) de músculo EDL de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida, por 4 semanas.

GRUPO	mRNA (UA)	PROTEÍNA (UA/g tecido)
C	99,99 ± 6,00 (n=11)	19.773 ± 2.046 (n=6)
CG	67,03 ± 5,52 * * (n=7)	18.587 ± 529 (n=5)
MSG	75,10 ± 4,75 * * (n=11)	17.677 ± 2.277 (n=5)
MSG/G	92,49 ± 4,87 † # (n=10)	18.925 ± 1591 (n=5)

Resultados expressos como médias ± EPM, comparadas por ANOVA de 1 via para dados independentes, seguida do teste de Student Newman-Kewls.

** p <0.01 vs. C; † p<0,05 vs. CG; # p<0,05 vs. MSG.

Conteúdo de proteína GLUT4 nas frações de membranas plasmáticas (PM) e microssomais (M) de músculo EDL de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida, por 4 semanas.

GRUPO	PM (UA/g tecido)	M (UA/g tecido)
C	18.251 ± 2.056 (n=6)	1.522 ± 77 (n=6)
CG	18.062 ± 552 (n=6)	934 ±110 (n=5) *
MSG	17.123 ± 1.855 (n=6)	1.016 ± 146 (n=5) *
MSG/G	16.542 ± 1.741 (n=6)	1.212 ± 85 (n=5)

Resultados são médias ± EPM, comparadas por ANOVA de 1 via para dados independentes, seguida do teste de Student Newman-Kewls.

* p<0,05 vs. C.

ANEXO 3

Conteúdos de mRNA do GLUT4 e proteína GLUT4 total (membranas plasmáticas + microssomais) de músculo sóleo de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida, por 4 semanas.

GRUPO	mRNA (UA/g tecido)	PROTEÍNA (UA/g tecido)
C	99,98 ± 5,63 (n=6)	18.888 ± 864 (n=6)
CG	133,77 ± 13,73 (n=4) *	29.945 ± 1.546 (n=5) ***###
MSG	130,56 ± 3,24 (n=8) **	17.159 ± 1.722 (n=6)
MSG/G	142,82 ± 6,94 (n=6) ***	28.674 ± 806 (n=5) ***###

Resultados expressos como média ± EPM, comparados por ANOVA de 1 via para dados independentes, seguida do teste de Student Newman-Kewls.

* p<0,05 vs. C; ** p <0.01 vs. C; *** p<0,001 vs. C; ### p<0,001 vs. MSG.

Conteúdo de proteína GLUT4 nas frações de membranas plasmáticas (PM) e microssomais (M) de músculo sóleo de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida, por 4 semanas.

GRUPO	PM (UA/g tecido)	M (UA/g tecido)
C	16.720 ± 970 (n=6)	2.168 ± 360 (n=6)
CG	22.983 ± 1.072 (n=5) * * # # #	6.940 ± 400 (n=6) *** ###
MSG	15.058 ± 1.583 (n=6)	2.102 ± 207 (n=6)
MSG/G	23.970 ± 609 (n=5) * * * # # #	4.840 ± 236 (n=6) *** ††† ###

Resultados expressos como média ± EPM, comparados por ANOVA de 1 via para dados independentes, seguida do teste de Student Newman-Kewls.

** p <0.01 vs. C; *** p<0,001 vs. C; †††p<0,001 vs. CG; ###p<0,001 vs. MSG.

ANEXO 4

Conteúdos de mRNA do GLUT4 e proteína GLUT4 em extrato livre de gordura (FFE) de tecido adiposo branco periepididimal, de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida, por quatro semanas.

GRUPO	mRNA (UA)	PROTEÍNA em FFE (UA/g tecido)
C	100,00 ± 7,99 (n=7)	21.794 ± 1.938 (n=5)
CG	122,60 ± 9,94 (n=5)	33.572 ± 4.242 (n=5)
MSG	130,90 ± 7,21 (n=6) *	43.829 ± 4.432 (n=5) **
MSG/G	85,44 ± 6,16 (n=7) † † # #	29.042 ±3.210 (n=5) #

Resultados expressos como média ± EPM, comparados por ANOVA de 1 via para dados independentes, seguida do teste de Student Newman-Kewls.

* p<0,05 vs. C; ** p <0.01 vs. C; †† p<0,01 vs. CG; ## p<0,01 vs. MSG.

Conteúdo de proteína GLUT4 nas frações de membranas plasmáticas (PM) e microssomais (M) de tecido adiposo branco periepididimal de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida, por 4 semanas.

GRUPO	PM (UA/g tecido)	M (UA/g tecido)
C	1.446 ± 186 (n=5)	3.754 ± 722 (n=5)
CG	1.994 ± 267 (n=5)	2.507 ± 437 (n=5)
MSG	3.370 ± 194 (n=5) * * †	3.166 ± 514 (n=5)
MSG/G	2.113 ± 438 (n=5) #	2.618 ± 225 (n=5)

Resultados expressos como média ± EPM, comparados por ANOVA de 1 via para dados independentes, seguida do teste de Student Newman-Kewls.

** p <0.01 vs. C; † p<0,05 vs. CG; # p<0,05 vs. MSG.

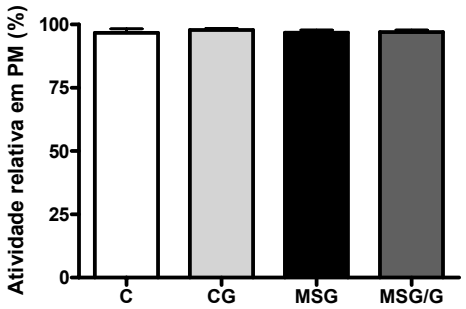
ANEXO 5A

Dosagem da atividade enzimática da 5´nucleotidase no músculo cardíaco

Atividade de 5´nucleotidase, em µmol de fósforo inorgânico (Pi) gerado em 60 minutos pelo conteúdo protéico de 1 grama de tecido, nas frações de membrana plasmática (PM) e microssomal (M), de músculo cardíaco de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida.

GRUPO	ATIVIDADE 5´NUCLEOTIDASE (CORAÇÃO) (µmol Pi/60 min/g_{tecido})	
	PM	M
C (6)	22,60 ± 3,57	0,90 ± 0,28 ● ● ●
CG (6)	26,05 ± 5,37	0,57 ± 0,12 ● ● ●
MSG (6)	24,17 ± 6,47	0,87 ± 0,33 ● ●
MSG/G (7)	26,82 ± 6,07	0,69 ± 0,14 ● ●

Dados expressos como média ± EPM
● ● $p < 0,01$ vs PM ● ● ● $p < 0,001$ vs PM



Porcentagem da atividade total de 5´nucleotidase recuperada na fração de membrana plasmática de músculo cardíaco de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (c e MSG) com glimepirida.

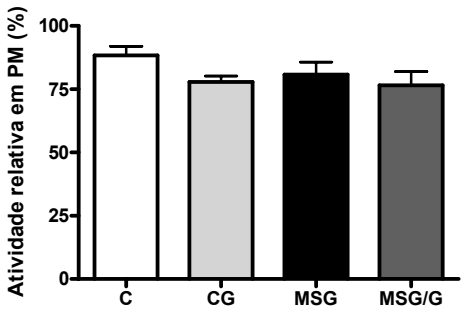
ANEXO 5B

Dosagem da atividade enzimática da 5´nucleotidase no músculo EDL

Atividade de 5´nucleotidase, em µmol de fósforo inorgânico (Pi) gerado em 60 minutos pelo conteúdo protéico de 1 grama de tecido, nas frações de membrana plasmática (PM) e microssomal (M), de músculo extensor digital longo de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida.

GRUPO	ATIVIDADE 5´NUCLEOTIDASE (EDL) (µmol Pi/60 min/g_{tecido}) PM	M
C (4)	3,25 ± 0,57	0,34 ± 0,15 ● ●
CG (4)	2,43 ± 0,16	0,76 ± 0,31 ● ●
MSG (4)	3,05 ± 0,38	0,61 ± 0,08 ● ● ●
MSG/G (4)	3,90 ± 0,73	0,99 ± 0,21 ● ●

Dados expressos como média ± EPM
● ● $p < 0,01$ vs PM ● ● ● $p < 0,001$ vs PM



Porcentagem da atividade total de 5´nucleotidase recuperada na fração de membrana plasmática de EDL de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (c e MSG) com glimepirida,

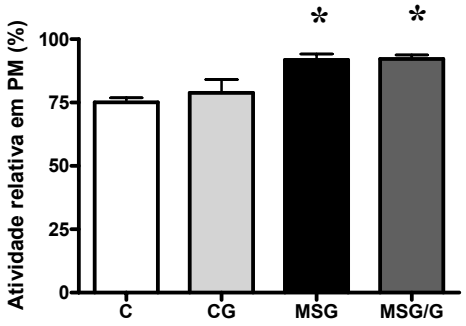
ANEXO 5C

Dosagem da atividade enzimática da 5´nucleotidase no músculo sóleo

Atividade de 5´nucleotidase, em µmol de fósforo inorgânico (Pi) gerado em 60 minutos pelo conteúdo protéico de 1 grama de tecido, nas frações de membrana plasmática (PM) e microssomal (M), de músculo solear de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida.

	ATIVIDADE 5´NUCLEOTIDASE (SÓLEO) (µmol Pi/60 min/g_{tecido})	
GRUPO	**PM**	**M**
C (5)	1,06 ± 0,08	0,33 ± 0,08 ● ● ●
CG (6)	1,14 ± 0,10	0,25 ± 0,05 ● ● ●
MSG (5)	1,57 ± 0,16	0,17 ± 0,04 ● ● ●
MSG/G (4)	5,21 ± 0,55 * † #	0,51 ± 0,15 ● ● ●

Dados expressos como média ± EPM
* $p < 0,05$ vs. C † $p < 0,05$ vs. CG # $p < 0,05$ vs. MSG
● ● ● $p < 0,001$ vs PM



Porcentagem da atividade total de 5´nucleotidase recuperada na fração de membrana plasmática de sóleo de ratos controle e obeso, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (c e MSG) com glimepirida,

ANEXO 6A

Ensaios de translocação do GLUT4

Glicemias no estado basal (jejum de 10 horas) e após 10 minutos da injeção de 4U de insulina, de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G)e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas.

GRUPO	GLICEMIA BASAL (mg/dl)	GLICEMIA APÓS ESTÍMULO (mg/dl)
C (n=8)	95,88 ± 5,57	75,12 ± 6,34
CG (n=6)	99,67 ± 4,89	76,00 ± 5,95
MSG (n=7)	80,57 ± 3,39	67,86 ± 3,07
MSG/G (n=10)	95,22 ± 4,55	70,00 ± 1,68

Resultados expressos como média ± EPM, comparados por ANOVA de duas vias para dados relacionados.

Efeito da INSULINA: $p<0,0001$

Efeito dos TRATAMENTOS: $p=0,1874$

INTERAÇÃO:$p=0,0596$.

ANEXO 6B

Conteúdo de proteína GLUT4 em membranas plasmáticas (PM) do músculo sóleo de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. As amostras foram coletadas de animais em jejum de 10 horas, antes (BASAL) e após 10 minutos após a injeção de 4U de insulina (ESTIMULADO).

GRUPO	PM - BASAL (UA/g tecido)	PM - ESTIMULADO (UA/g tecido)
C (n=8)	29.452 ± 1.864	36.762 ± 3.004
CG (n=7)	22.397 ± 3.023	25.227 ± 4.684
MSG (n=7)	32.063 ± 3.647	35.402 ± 5.427
MSG/G (n=7)	23.405 ± 4.320	40.691 ± 5.375†

Dados expressos como média ± EPM, confrontados por ANOVA de 2 vias para dados relacionados, seguida do teste de Bonferroni.

INSULINA: p=0,0004; TRATAMENTO: p=0,0981; INTERAÇÃO: p=0,0441

BONFERRONI: †p<0,05 vs. CG

Conteúdo de proteína GLUT4 em membranas microssomais (M) do músculo sóleo de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. As amostras foram coletadas de animais em jejum de 10 horas, antes (BASAL) e após 10 minutos após a injeção de 4U de insulina (ESTIMULADO).

GRUPO	M - BASAL (UA/g tecido)	M - ESTIMULADO (UA/g tecido)
C (n=7)	3.284 ± 408	3.105 ± 671
CG (n=7)	3.951 ± 743	2.901 ± 599
MSG (n=7)	3.224 ± 388	2.336 ± 322
MSG/G (n=7)	5.430 ± 592* ##	3.864 ± 270

Dados expressos como média ± EPM, confrontados por ANOVA de 2 vias para dados relacionados, seguida do teste de Bonferroni.

INSULINA: p=0,0167; TRATAMENTO: p=0,0061; INTERAÇÃO: p=0,6211

BONFERRONI: *p<0,05 vs. C ##p<0,01 vs. MSG

ANEXO 7

Conteúdo da enzima glicogênio sintase quinase 3 fosforilada (p-GSK3) em fígado de ratos controles e obesos, tratados (CG e MSG/G) e não tratados (C e MSG) com glimepirida por 4 semanas. As amostras foram coletadas de animais em jejum de 10 horas, antes (BASAL) e após 10 minutos após a injeção de 4U de insulina (ESTIMULADO).

GRUPO	p-GSK3 - BASAL (UA)	p-GSK3 - ESTIMULADO (UA)
C (n=7)	265, 01 ± 14,65	336,50 ± 15,51
CG (n=7)	283,59 ± 13,52	315,70 ± 13,33
MSG (n=7)	249,00 ±16,03	245,30 ± 14,69 * * †
MSG/G (n=7)	263,01 ± 17,82	329,00 ± 12,92 ##

Dados expressos como média ± EPM, confrontados por ANOVA de 2 vias para dados relacionados, seguida do teste de Bonferroni.

INSULINA: p<0,0001; TRATAMENTO: p=0,0161; INTERAÇÃO: p=0,0123

BONFERRONI: **p<0,01 vs. C †p<0,05 vs. CG ##p<0,01 vs. MSG

CHRONIC TREATMENT WITH GLIMEPIRIDE RESTORES INSULIN SENSITIVITY WITHOUT ENHANCING FAT DEPOSITION IN OBESE RATS – TISSUE SPECIFIC REGULATION OF GLUT4 GENE EXPRESSION

Rosana Cristina Tieko Mori, Maristela Mitiko Okamoto, Ubiratan Fabres Machado

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

Correspondence to:

Dr. Ubiratan F Machado
Department of Physiology and Biophysics,
Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, São Paulo (SP)
05508-900, Brazil
Phone: +55-1130917494
Fax: +55-1130917285
e-mail: ubiratan@icb.usp.br

Hypothalamic obesity induced by monosodium glutamate (MSG) is an experimental model in which insulin resistance is accompanied by altered GLUT4 expression in both young and adult animals. This study was aimed to investigate whether insulin sensitivity would be restored in MSG-obese rats by chronic treatment with the sulfonylurea drug glimepiride, and whether this action might involve changes in GLUT4 expression, for this anti-hyperglycemic drug is believed to act not only as an insulin secretagogue, but also as a sensitizer, increasing insulin action on peripheral tissues. Skeletal muscle and adipose tissue are the most important tissues concerning insulin-dependent glucose uptake. Thus, GLUT4 protein and mRNA contents were analyzed in both white and red muscle fibers, as well as in cardiac muscle and epididymal fat of control and MSG-obese rats, treated or not with glimepiride for four weeks.

MSG- rats presented lower glucose disappearance rate in the insulin tolerance test (kITT) when compared to their control littermates, being this parameter restored after glimepiride treatment, showing an amelioration of the insulin sensitivity *in vivo*. This effect involved increase in GLUT4 expression, in red muscle fibers, which are well known to play an essential role in the regulation of glucose homeostasis. On the other hand, a decrease in GLUT4 expression was observed in white adipose tissue (WAT) of the glimepiride-treated MSG-rats.

Thus, we were able to demonstrate that glimepiride enhanced insulin sensitivity *in vivo* by altering GLUT4 gene expression. This tissue-specific effect must be important to enable this sulfonylurea drug to promote an efficient glycemic control accompanied by an increased insulin resistance specifically in adipose tissue, preventing additional fat deposition.

Key words

Insulin resistance, monosodium glutamate, glimepiride, GLUT4, skeletal muscle, white adipose tissue

Introduction

Insulin resistance, which is characterized by an impaired ability of the insulin-sensitive tissues to take up glucose in response to insulin, has been related to the onset of serious diseases, such as hypertension, dislipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease, which may associate to obesity or type 2 diabetes to produce the metabolic syndrome, as first described by Reaven (1988). This resistance to peripheral insulin-induced glucose disposal may be due to defective insulin signal transduction or to defects in the glucose transport system itself (Koistinen

and Zierath, 2002; Björnholm, 2002). In this context, GLUT4 gene which codifies the insulin regulatable glucose transporter plays a key role in the maintenance of glucose homeostasis.

In human beings, insulin resistance has been described in both skeletal muscle fibres and white adipocytes, as accompanied by reduced GLUT4 protein expression (Dohm et. al., 1991; Björnholm, 2002). In addition, although elevated GLUT4 expression and increased insulin sensitivity in white adipose tissue (WAT) favor fat accumulation in young MSG-obese animals (Dolnikoff et al., 2001; Papa et al., 2002), in adulthood, when insulin resistance is definitely installed, GLUT4 levels have been reported to be reduced in WAT and skeletal muscle of MSG-obese mice (Machado et al., 1994; Papa et al., 2002). Thus, GLUT4 expression seems to depend on the severity of insulin resistance and on the stage of obesity development. Besides, weight loss, well known to improve insulin sensitivity, restores GLUT4 content in MSG-obese mice (Papa et al., 1997).

Excessive weight gain leads to insulin resistance, usually advancing towards diabetes mellitus. Such condition, whose symptoms develop slow and insidiously, may remain undiagnosed for years (De Fronzo and Ferranini, 1991; Koistinen and Zierath, 2002), being already accompanied by its most hazardous complications, such as retinopathy or nephropathy by the time it comes to be treated. Taking into account that insulin resistance can be detected long before overt diabetes is established, and that an early diagnosis is vital to attenuate the manifestation of clinical complications of the diabetes and other diseases associated to the insulin resistance,understanding the mechanisms through which this resistance to insulin action installs is of paramount importance to contribute to the treatment of complicated pathological states.

Several drugs including α-glucosidase inhibitors, insulin sensitizers and secretagogues are available for the management of type 2 diabetes. In pancreatic β-cells, the sulfonylurea drugs bind to specific receptors associated to K_{ATP} channels, favoring cell depolarization which

culminates in insulin secretion (Kramer et al., 1996). For the sulfonylurea drug glimepiride the binding affinity to the β-cell is lower than that of other sulfonylureas, leading to a lower effect on insulin secretion (Kramer et al., 1996). However, its action on glucose homeostasis is maintained, supporting the hypothesis of a pronounced insulin sensitizing mechanism (Muller and Geisen, 1996; Muller et al., 1995).

In fact, *in vitro* experiments have demonstrated that glimepiride increases glucose uptake and GLUT4 translocation in adipocytes and elevates GLUT4 protein in cardiomyocytes (Muller and Wied, 1993; Bähr et al., 1995). Clinically, glimepiride has been found to be as efficient as glibenclamide in ameliorating glycemic homeostasis, besides being able to improve insulin sensitivity in hyperinsulinemic patients (Hamaguchi et al., 2004). Notwithstanding, there are no reports of the GLUT4 gene expression being studied *in vivo* after glimepiride treatment.

Taking all the above into consideration, this study was aimed to determine if the chronic treatment with glimepiride would be able to modulate the insulin resistance of MSG-obese animals, and if this effect would be due to adaptive changes in GLUT4 expression, which might contribute to its potential insulin sensitizer action.

Material and methods

Animals

Male offspring of Wistar rats received daily subcutaneous injections of MSG (4.0 g/kg b.w., Sigma-Aldrich Chemicals, Steinhein, Germany) dissolved in 0.9% NaCl, from second to eighth day after birth. Control littermates were given equivalent volume of vehicle. Animals were weaned on the 28th day and housed in standard cages, 4 to 5 animals per cage, under controlled

temperature (23 ± 2 °C) and light (12:12h light-dark cycle) conditions, with free access to water and standard rodent chow (NUVILAB CR-1, Nuvital, Curitiba, Brasil).

At the age of three months, half the control and MSG-treated animals started receiving 0.1 mg/kg/day of glimepiride (Amaryl®, Aventis Pharma , Scoppito, Italy.) in the drinking water, what resulted in four experimental groups: C (control rats), CG (control rats treated with glimepiride), O (MSG-obese rats) and OG (MSG-obese rats treated with glimepiride). The water intake was monitored along the treatment, so that the dosage would be kept unchanged by manipulating the concentration of the drug in the water.

After four weeks of glimepiride consumption, animals were used for tissue and blood sampling and for the Insulin Tolerance Test (ITT), all conducted between 8:00AM and 10:00AM. The tissue samples of epididymal white adipose tissue (WAT), extensor digitorum longus (EDL) and soleus skeletal muscles, and cardiac muscle were removed under anesthesia, weighed, immediately frozen in liquid nitrogen, and store at -70 °C until assayed. All tissues, except the heart, were removed before respiratory arrest.

The experimental procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Research (CEEA) of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, under the protocol number # 04/ 63.

Intravenous Insulin Tolerance Test (IVITT)

Under sodium pentobarbital (60m g/kg b.w.) anesthesia, tail blood samples were collected before (time 0) and 4, 8, 12 and 16 minutes after an intravenous bolus injection of regular insulin (0.75U /kg b.w., Biohulin, Biobrás, Montes Claros, MG, Brazil). Glucose concentrations were measured using a glucometer (Precision QIR, Abbott Laboratories Medisense Products, Bedford,

MA, USA). The values were used to calculate the constant rate for plasma glucose disappearance (kITT), based on the linear regression of the neperian logarithm of blood glucose concentrations obtained from 0 to 16 minutes of the test.

Northern Blotting for GLUT4 mRNA

GLUT4 mRNA was analyzed as previously described (Zanquetta et al., 2006). Total RNA was extracted from 100 mg of snap frozen skeletal or cardiac muscle samples, or 600 mg of white adipose tissue samples, using Trizol® reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to manufacturer ´s instructions. Twenty µg of extracted RNA were electrophoresed on 1.3% agarose-formaldehyde gel, blotted and fixed onto nylon membranes, which were prehybridized in 0.5 M Na_2HPO_4, pH 6.8, 7% SDS, 1% BSA, 1 mM EDTA, 100 µg/ml salmon sperm DNA solution, for 3 hours, at 65 ºC. Subsequently, the membranes were probed with specific (α^{32}-P)dCTP – labeled rat GLUT4 cDNA (1 x 10^6 cpm/ml), in an overnight hybridization performed at 65 ºC. Membranes were washed under high stringency conditions and exposed to Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech) at –70 ^oC for 5 days. After that, the membranes were stripped, and rehybridized to cDNA probe for β-actin. The blots were analyzed by scanner densitometry (Image Master 1D®, Pharmacia Biotech, Upsalla, SW), and the results were expressed as arbitrary units (AU), after normalization to the corresponding β-actin value, considering the mean of control rats in each membrane as 100.

Subcellular membrane fractions preparation

Tissue samples were homogenized in buffer (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 250 mM sucrose, pH 7,4), 1/6 w/v, using a Brinkman Polytron. Muscle samples were submitted to a series of differential centrifugations, as described (Mitsumoto and Klip, 1992). The crude homogenate was centrifuged at 760 x *g*, 10 minutes, 4 ºC. Supernatant was centrifuged at 31,000 x *g* for 60 minutes, at 4 ºC, and the pellet was resuspended in homogenization buffer as the plasma membrane rich fraction (PM). Microsomal fraction (M) was obtained after supernatant ultra centrifugation at 190,000 x *g*. WAT samples were processed differently (Machado et al., 1994). Homogenate was centrifuged at 3,000 x *g* for 15 minutes, fat cake was discarded and the infranatant (fat free extract) was centrifuged at 12,000 x *g* for 15 minutes. The pellet was resuspended as the PM fraction and the supernatant was centrifuged at 28,000 x *g* for 15 minutes. The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged at 146,000 x *g* for 75 minutes. The final pellet was resuspended as the M fraction. The total protein content of membrane samples was assayed by Lowry´s method and used for GLUT4 protein analysis.

Western Blotting for GLUT4 protein

Thirty µg of protein were solubilized in sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 7.5; 9% SDS; 15% glycerol; 0.05% bromophenol blue; 6% 2-mercaptoethanol), subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 10%), and electrophoretically transferred to nitrocellulose membrane, as previously described (Zanquetta, 2006). Nonspecific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the membrane in blocking buffer containing 8% nonfat milk. The nitrocellulose membrane was then incubated with anti-

GLUT4 antiserum (Polyclonal Rabbit Raised Anti-GLUT4, AB1346, Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA), and submitted to enhanced chemiluminescent detection, according to manufacturer instructions (ECL™ Western Blotting Detection, RPN2106, Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK). The intensity of the blots was quantified by densitometry (Image Master 1D®, Pharmacia Biotech, Upsalla, SW), and the protein expression in control rat tissues was normalized as 100. GLUT4 content was expressed in arbitrary units (AU) per gram of tissue, taking into account the total protein recovery (mg protein/g tissue) of each fraction.

5´nucleotidase assay

To testify the PM fractions in the muscular tissues were rich in plasma membrane proteins, the enzymatic activity of the plasma membrane marker 5´nucleotidase was assayed according to Avruch and Wallach (1971). Briefly, the samples were incubated in 100 mM Tris, 360 µM $MgSO_4$ and 4 mM AMP, for 60 minutes, 37 ºC. Reactions were stopped with SDS 20%, and the enzyme activity, corrected to the protein content in each gram of tissue, was expressed in µmol Pi x 60 min^{-1} x g_{tissue}^{-1}.

2-deoxi-[2,6-^{3}H] D-glucose uptake and [U-14C]-D-glucose incorporation to glycogen in soleus muscle in vitro

Food was removed from the cage five hours before the experiments which were initiated at 11:00AM. Rats were killed by cervical dislocation and soleus muscle was removed and carefully divided into 25-35mg strips for incubation, as described by Crettaz et al (1980). Pre-incubations were carried out in 4 ml of bicarbonate-buffered medium pH7.4 containing glucose 5.6 mM, at 37 ºC, under constant 120 rpm shaking. Strips were then removed to flasks containing the same buffer added by 2-deoxi-[2,6-^{3}H] D-glucose 0.2 µCi/ml and [U-14C]-D-glucose 0.3

μCi/ml and incubated for one hour in the absence or presence of insulin, 415 ng /ml. After incubation, strips were washed in cold saline 0.9% and immediately frozen in liquid nitrogen. 2-deoxi-[2,6-^{3}H] D-glucose uptake and [U-14C]-D-glucose incorporation to glycogen were measured as described by Challis et al. (1986) and Crettaz et al. (1980).

Analytical prcedures

Blood samples were collected from the inferior vena cava immediately after the removal of the tissue samples. Animals had not been submitted to previous fasting. Plasma samples were assayed for glucose by the glucose oxidase method (Glicose Enzimatica, ANALISA Diagnostica, Belo Horizonte, MG, Brazil), and for plasma insulin by RIA (Coat-A-Count, DPC Diagnostic Products, Los Angeles, CA). To check for significant glycemic variations during the treatment due to the higher insulinemia resulted from the glimepiride treatment, fructosamine was assayed (*Fructosamina AA*, Wiener lab., Rosario, Argentina).

Data analysis

All values are expressed as mean ± S.E.M. and the number of animals or experiments is indicated in tables and legends. Intergroup statistical testing was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student Newman-Keuls as a post hoc test. Data on 2-deoxi-[2,6-^{3}H] D-glucose uptake and [U-14C]-D-glucose incorporation to glycogen in soleus were analyzed by two way ANOVA, followed by the Bonferroni´s test. Differences were considered significant when $P<0.05$

Results

General characteristics of the animals

Body weight and length were lower in obese animals ($P<0.001$ vs. control), while Lee Index was higher for these animals ($P<0.05$), characterizing the MSG-obesity(Table 1). Besides, increased visceral fat deposition was clearly observed in obese groups (40-50% higher than control rats, $P<0.05$), while skeletal and cardiac muscle weights decreased significantly ($P<0.001$).The WAT weight related to the body weight was 73% higher in obese rats, reinforcing the increased fat mass (data not shown). On the other hand, comparing C and O rats, the relative soleus, EDL and heart weights were unchanged, revealing a similar lean mass development (data not shown). Food and water daily consumption in absolute values were lower in MSG-obese animals ($P<0.05$ and $P<0,01$, respectively), but were not different when considering the relative intake to 100 g of b.w. (Table 1).

After four weeks of continuous glimepiride treatment, neither control nor obese rats presented any alteration in the morphometric parameters evaluated, compared to their respective nontreated group (Table 1). Absolute or relative intakes of food and water of control and obese animals were not affected by the drug either, as compared to their respective untreated group, ensuring that the presence of glimepiride in the water did not alter its palatability or animal´s apetite (Table 1).

Metabolic-hormonal characteistics of the animals

Plasma glucose levels (Fig. 1A) were 7.65 ± 0.17 mM and 8.01 ± 0.22 mM in C and O, respectively. Concerning plasma insulin (Fig. 1B), although O rats tended to present higher levels (20.87 ± 1.58 μU/ml) compared to control rats (16.95 ± 2.09 μU/ml), this difference was not

significant. In the insulin tolerance test, however, obese rats showed a significant 30% decrease in the glucose disappearance constant (kITT) (Fig. 1C), clearly showing the insulin resistance.

Plasma glucose (Fig. 1A) remained unchanged after treatment in control (CG, 7.92 ± 0.14 mM) and obese rats (OG, 8.12 ± 1.25 mM). Differently, plasma insulin (Fig. 1B) increased 60% in CG group ($P<0.05$) compared to its respective control. In the OG animals this increase was of the same magnitude (66%), what shows the effectiveness of glimepiride as an insulin secretagogue. Interestingly, while the kITT was clearly reduced in O animals (Fig. 1C), confirming the whole body insulin resistance of MSG rats, the glimepiride treatment in OG rats made their kITT return to the control levels, revealing the effect of the drug upon insulin sensitivity. On the other hand, glimepiride did not affect the insulin sensitivity in control animals, thus this group CG was not investigated for the molecular mechanisms involved in this effect of the glimepiride drug.

The fructosamine concentrations were similar among all groups: C, 132.30 ± 7.69; CG, 125.40 ± 7.85; O, 137.70 ± 6.11 and OG, 135.30 ± 7.53 ($P>0.05$), indicating there was no significant variation in glycemia along the period of glimepiride treatment. It is interest to highlight that these values were significantly lower than that observed in diabetic rats, which were assayed as positive controls (data not shown).

GLUT4 mRNA and protein expression in cardiac muscle

Among the tissues analysed for GLUT4 expression, cardiac muscle was the only one in which no significant effect was observed. Obese animals presented levels of GLUT4 mRNA (Fig. 2A) and protein (Figs. 2B, C and D) similar to those observed in control animals. When treated with glimepiride, obese animals showed no change in mRNA or protein levels. Surprisingly, the

amount of GLUT4 protein found in internal vesicles corresponded to only 10% of the amount of GLUT4 protein detected in plasma membrane (Fig. 2D and 2E).

All samples obtained from the subcellular membranes fractionation were assayed for activity of 5´nucleotidase, a plasma membrane marker. In all tissues analyzed, 75%-95% of the total 5´nucleotidase activity (PM and M) was found in the PM fraction, assuring this fraction contained most of the plasma membrane proteins (Table 2).

GLUT4 mRNA and protein expression in EDL

In EDL, a typical glicolytic skeletal muscle, the MSG treatment promoted a significant decrease of 25% in the GLUT4 mRNA ($P<0.01$ vs. C). On the other hand, glimepiride - treated obese rats had their GLUT4 mRNA restored to the control level (Fig 3A).

The significant decrease observed in GLUT4 mRNA was accompanied by a correspondent decrease of the GLUT4 protein in microssomal fraction of untreated obese group (Fig 3E). However, this reduction was not reflected on the total GLUT4 content, and all groups presented the same level of total GLUT4 protein expression (Fig 3B). Similar to what was observed for the cardiac muscle, more than 90% of the total GLUT4 was recovered in the plasma membrane fraction (Fig 3D), where no differences among the groups were observed.

GLUT4 mRNA and protein expression in Soleus

In the soleus muscle, MSG-treatment led to an increase of 30% in GLUT4 mRNA ($P<0.01$ vs. C) and after glimepiride treatment, a further 20% increase was observed ($P < 0.001$ vs. C and $P > 0.05$ vs. MSG) (Fig 4A).

The analysis of the protein content showed that in obese rats GLUT4 did not alter compared to C group, despite the significant elevation in mRNA level. This observation suggests

obese rats are prone to present a deficiency in this protein expression, for they could keep the same protein content as C animals, but only by means of a significant increase in the correspondent mRNA. Glimepiride treatment clearly corrected this deficiency, producing a significant elevation in GLUT4 protein to levels above those observed in C animals, in both plasma (Fig 4D) and microssomal membranes (Fig 4E) of OB group.

GLUT4 mRNA and protein expression in WAT

Obese animals presented a 30% elevation in the GLUT4 mRNA content compared to C ($P<0.01$). This difference disappeared after glimepiride consumption and the OG group had its mRNA content similar to that of C (Fig 5A).

GLUT4 protein content in the total membranes represented by the fatty free extract, varied in accordance with that pattern observed for its mRNA, with a significant increase in MSG-obese group, which was reversed by the glimepiride treatment (Fig 5B). The analysis of the subcellular fractions showed that these differences were due to the alterations in the plasma membrane content, in which the GLUT4 protein doubled in obese animals ($P<0.001$ vs. C), and the glimepiride treatment reduced it to the control value (Fig 5D). No significant changes were observed in GLUT4 microssomal content, and differently from that observed in muscles, less than 20% of the total cellular content was detected in the plasma membrane fraction.

2-deoxi-[2,6-^{3}H] D-glucose uptake and [U-14C]-D-glucose incorporation to glycogen in soleus muscle

Basal glucose uptake and its incorporation to glycogen in strips of soleus muscle *in vitro* were lower in the obese rats ($P<0.05$ vs. C,) as shown in Table 3. In response to insulin, the untreated obese rats also presented lower glucose uptake and non-oxidative glucose

metabolisation than control rats ($P<0.001$ vs. C). However, the glimepiride treated ones had these functions restored to levels similar to control or at least higher than the untreated-obese values (glucose incorporation to glycogen, Table3).

Discussion

The disfunctions induced by the neonatal treatment with MSG have been extensively described by studies on this complex syndrome named obesity. In adulthood, MSG animals present decreased carcass protein content and high lipoprotein lipase activity in epididymal and retroperitoneal adipose tissues (Ribeiro et al., 1997; Nascimento Curi et al., 1991). Sympathetic activity and thermogenesis in brown adipose tissue are diminished what contributes to high fat deposition, in spite of their normo or hypophagia (Bray, 1987; Morris et al., 1998). The insulin resistance of MSG-obese animals gradually develops as the obese state advances (Dolnikoff et al., 2001; Papa et al., 2002), and the animals can achieve such a pronounced impairment of the glycemic homeostasis that it is enough as a type 2 diabetes diagnosis (Machado et al., 1994; Papa et al., 1997). Because of that, the MSG-obesity turned out to be an adequate model to study the reversal of insulin resistance progress by the glimepiride drug.

Sulfonylurea drugs are oral antihyperglycemic agents widely used for the treatment of type 2 diabetes. They are efficient in decreasing blood glucose by stimulating insulin secretion from the pancreatic β-cells and also they are believed to have peripheral effects, improving insulin sensitivity (Kecskemeti et al., 2002; Muller and Geisen, 1996). Glimepiride differs from other sylfonylureas by its lower binding affinity to the β-cell receptor (Krammer et. al, 1996) and lower hypoglycemic-prone effect, although the glycemic control is efficient, as evidenced by

amelioration of HbA1c and fasting plasma glucose (Holstein et al., 2001; Hamaguchi et al.,2004). Also, blood glucose control by glimepiride accompanies unchanged or even reduced body weight (Hamaguchi, 2004). In fact, no additional fat deposition was observed in either control or obese animals in the present study, despite the elevated insulin levels.

The glimepiride dosage of 0.1 mg/kg b.w./day has been shown as the minimum dose which is able to inhibit glycemia elevation after an oral glucose load (El-Reyane et al., 1999). As we could observe in the ITT, this dosage did not induce any changes in the insulin sensitivity of control animals. However, the kITT was clearly higher in treated obese as compared to the nontreated group, revealing the *in vivo* glimepiride-induced improvement of the insulin sensitivity, in spite of the increased insulin levels. In this context, it is important to highlight that the hyperinulinemia itself induces insulin resistance, pointing out the ability of glimepiride to improve insulin sensitivity.

It has been reported that insulin-treated diabetic patients may present brief swings to hyperglycemia after episodes of hypoglycemia. In the present study, as shown by the unaltered fructosamine, the elevated insulin in the glimepiride-treated animals did not induce significant changes in the glycemia all along the treatment.

Glimepiride effects on GLUT4 protein expression and translocation have been shown by *in vitro* studies in the 90´s (Muller and Wied, 1993; Bähr et al., 1995). However, *in vivo*, the demonstration of variations in GLUT4 gene expression after glimepiride treatment, accompanied by amelioration of the whole body insulin sensitivity has been firstly described in the present study. It is important to notice that we have analyzed the GLUT4 mRNA and protein in fed animals, what allowed us to investigate the responses to the treatment under the physiological levels of glycemia and insulinemia in the fed state. In this regard, we have already observed that

during fasting, GLUT4 mRNA decreases in gastrocnemius and rapidly increases in response to refeeding in parallel with plasma insulin (Zanquetta et al., 2006)

Our results on GLUT4 content in cardiac muscle of the obese rats differ from data found in the literature reporting decreased GLUT4 content in MSG-induced and genetic Zucker obesities (Machado et al., 1993; Uphues et al., 1995). However, it is relevant to notice that in those cases the obesity was more severe and the insulin resistance much more evident than that of the animals in the present study. Moreover, cardiac mass is too small as compared to the total body mass and thus, although it is an insulin sensitive tissue, cardiac muscle contributes very little to the glycemic homeostasis and insulin resistance *in vivo*. On the other hand, the absence of effect of glimepiride on the glucose transporter content in cardiac muscle is in accordance with the beneficial effect of glimepiride on ischemic pre-conditioning, a protective mechanism which can be impaired by other sulfonylureas (Lee and Chou, 2003).

Skeletal muscles are the most important tissues concerning insulin-stimulated glucose utilization. In fact, high glucose transport rate has been observed in transgenic mice overexpressing GLUT4 in skeletal muscle, while GLUT4 gene *knockout* mice are insulin resistant (Tozzo et a., 1997; Stenbit et al., 1997). Richardson et al (1991) have reported that the regulation of GLUT4 gene expression in muscle is differently modulated depending on the fibre type, pointing out that the slow twitch (oxidative) fibres are more sensitive to insulin action than fast twitch (glycolytic) fibres. Accordingly, in the present study, we observed that MSG treatment can promote either decrease (EDL) or increase (soleus) in GLUT4 mRNA, depending on the fibre type. Consequently, both muscle types responded differently to glimepiride treatment, which affected both GLUT4 mRNA and protein expression in obese rats. In accordance with Richardson et al. (1991), it was in the oxidative fibres that the most pronounced changes were observed with glimepiride treatment, after which a significant increase in the insulin levels was

observed. The clear elevation of GLUT4 protein in the soleus muscle of glimepiride treated rats suggests that oxidative fibres play a relevant role in the maintenance of the glycemic control in these animals.

This finding was reinforced by the demonstration that the insulin stimulated glucose uptake in soleus muscle *in vitro* was significantly improved in the obese rats after glimepiride treatment. In the context of the present study, this observation was essential to show that the effects observed in the treated groups were due to the treatment and not to the elevated levels of insulin presented by the treated animals in the *in vivo* situation. In accordance with our findings, Bahr et al. (1995) reported the effects of glimepiride and insulin on the glucose uptake are additive, suggesting they stimulate glucose transport by activating different pathways. Besides this effect on the glucose uptake, glimepiride seems to present also a stimulatory effect on the insulin-stimulated glycogenesis, as it could be presently observed by the augmented insulin-stimulated incorportaion of ^{14}C-glucose to glycogen in soleus muscle strips. This finding agrees with the observation of Haupt et al., (2002) who studied cultured muscle fibresand also observed increased insulin-stimulated glycogenesis in the presence of glimepiride.

The excessive fat deposition is an important determinant of insulin resistance in obese subjects. Decreased GLUT4 protein has been described in WAT of MSG obese mice (Machado et al., 1994), differently from our MSG rats, which presented significant elevation in both GLUT4 mRNA and protein. Considering that the present obese animals were neither hyperglycemic nor hyperinsulinemic in comparison to control group, and that GLUT4 levels vary in accordance with the severity of insulin resistance (Papa et al., 2002), it could be argued that we analyzed them in a period in which establishment of insulin resistance was still in progress, with accelerated weight gain, and some features of obesity yet to be installed. After glimepiride treatment both GLUT4 mRNA and protein returned to control levels, suggesting glimepiride

accelerates local insulin resistance in WAT. This effect can be important to prevent further fat deposition, which would be expected to be observed since the treatment significantly elevated insulin levels.

GLUT4 being differently expressed in various tissues of obese animals, it allowed us to observe tissue-specific responses to glimepiride. While cardiac and white skeletal muscle showed to be little affected by hormonal and metabolic changes, in red muscle fibres and WAT the patterns of GLUT4 expression were clearly altered by both MSG and glimepiride. Of the utmost importance was the observation that the chronic treatment with glimepride was able to improve the insulin sensitivy *in vivo* and that this effect involved significant alterations in GLUT4 mRNA and protein expression, which increased in soleus and decreased in WAT of insulin resistant animals. Taken together, these events must be important to enable the glimepiride drug to promote an efficient glycemic control and avoid obesity to exacerbate all at once.

This research was supported by FAPESP 02/13692-3.

References

Bahr M,; von Holtey M.; Muller G.; Eckel J. - Direct stimulation of myocardial glucose transport and glucose transporter-1 (GLUT1) and GLUT4 protein expression by the sulfonylurea glimepiride. *Endocrinology* Jun;136(6):2547-53, 1995.

Björnholm, M.; Al-Khalili, L.; Dicker, A; Näslund, S.; Rössner, S.; Zierath, J.R.; Arner, P. – Insulin signal transduction and glucose transport in human adipocytes: effects of obesity and low calorie diet. *Diabetologia, 45*: 1128-1135, 2002

Bray, G.A. - Obesity - A disease of nutrient or energy balance? *Nutr. Rev., 45*: 33-43, 1987.

DeFronzo, R.A.; Ferrannini, E. – Insulin resistance – A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 14(3); 173-194, 1991

Dohm, G.L.; Elton, C.W.; Friedman, J.E.; Pilch, P.F.; Pories, W.J.; Atkinson, S.N. Jr; Caro, J.F. - Decreased expression of glucose transporter in muscle from insulin-resistant patients. *Am J Physiol.* 260, 3 Pt 1, E459-E463, 1991.

Dolnikoff, M; Martin-Hidalgo, A.; Machado, U.F.; Lima, F.B; Herrera, E. – Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monossodium-glutamate (MSG) treated rats. *International Journal of Obesity*, 25: 426-433, 2001.

El-Reyani, N.E.; Bozdogan, Ö, Baczkó, I.; Leprán, I.; Papp, J.G. - Comparison of the efficacy of glibenclamide and glimepiride in reperfusion-induced arrhythmias in rats, *Eur. J. Pharmacol., 365:* 187-92, 1999.

Gale, E.A.; Kurtz, A.B.; Tattersall, R.B., 1980. In search of the Somogyi effect. *Lancet*, 9; 2 (8189): 279-282.

Hamaguchi, T, Hirose, T., Asakawa, H., Itoh, Y., Kamado, K., Tokunaga, K., Tomita, K., Masuda, H., Watanabe, N., Namba, M., 2004. Efficacy of glimepiride in type 2 diabetic patients treated with glibenclamide. Diabetes Res. and Clin. Practice, 66S: S129-S132.

Holstein, A., Plaschke, A., Egberts, E.H., 2001. Lower incidence of severe hypoglycaemia in patients with type 2 diabetes treated with glimepiride versus glibenclamide. *Diabetes and Metabolism Research and Reviews*, 17: 467-473.

Kecskemet, V., Bagi, Z., Pacher, P., Poza, I., Kocsis, E., Koltai, M.Z., 2002. New trends in the development of new antidiabetic drugs. *Curr Med Chem*, 9: 53-71.

Koistinen, H.A. & Zierath, J.R.- Regulation of glucose transport in human skeletal muscle. *Ann Med*, 34: 410-418, 2002

Kramer, W.; Muller, G.; Geisen, K. – Characterization of the molecular mode of action of the sulfonylurea, glimepiride, at β cell. *Horm Metab Res*, 28: 464-468, 1996.

Machado, U.F.; Shimizu, I.; Saito, M. – Reduced content and preserved translocation of glucose transporter (GLUT4) in white adipose tissue of obese mice. *Physiol and Behavior*, 55(4): 621-625, 1994

Morris, M.J.; Tortelli, C.F.; Filippis, A., Proietto, J. - Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. *Regul Peptide, 25 (75-76):* 441-447, 1998.

Muller G, Wied S. - The sulfonylurea drug, glimepiride, stimulates glucose transport, glucose transporter translocation, and dephosphorylation in insulin-resistant rat adipocytes in vitro, *Diabetes Dec;42(12):*1852-67, 1993.

Muller, G.; Geisen, K. – Characterization of the molecular mode of action of the sulfonylurea, glimepiride, at adipocytes. *Horm Metab Res*, 28(9): 469-487, 1996

Muller, G.; Satoh, Y.; Geisen, K. – Extrapancreatic effects of sulfonylureas – a comparison between glimepiride and conventional sulfonylureas. *Diabetes Res Clin Pract* 28: S115-S137, 1995.

Nascimento Curi, C.M.O.; Marmo, M.R.; Egami, M.; Ribeiro, E.B.; Andrade, I.S.; Dolnikoff, M.S. - Effect of monosodium glutamate treatment during neonatal development on lipogenesis rate and LPL activity. *Biochem. International, 24* (5): 927-35, 1991.

Papa, P.C.; Seraphim, P.M.; Machado, U.F. – Loss of weight restores GLUT4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated mice. *International Journal of Obesity*, 21: 1065-1070, 1997.

Papa, P.C.; Vargas, A.M.; Silva, J.L.T., Nunes, M.T.; Machado, U.F. - GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. *Life Sciences*, 71: 1917-1928, 2002

Reaven, G.M. - Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes, 37:* 1595-1607, 1988.

Ribeiro EB, Marmo MR, Andrade IS, Dolnikoff MS. Effect of fasting on monosodium glutamte-obese rats. *Braz J Med Biol Res 22*: 917-21, 1989.

Richardson, J.M.; Balon, T.W,; Treadway, J.L.; Pessin, J.E.- Differential regulation of glucose transporter activity and expression in red and white skeletal muscle. *J. Biol. Chem., 266 (16):* 12690-12694, 1991.

Sheehan, J.P., 2004. Fasting hyperglycemia: etiology, diagnosis, and treatment. *Diabetes Technol Thers*, 6 (4): 525-533.

Stenbit A.E., Tsao T.S., Li J., Burcelin R., Geenen D.L., Factor S.M., Houseknecht K., Katz E.B., Charron M.J., 1997. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med.,* 3 (10): 1096-1101.

Zanquetta M.M., Nascimento, M.E.C., Mori, R.C.T., DÁgord Schaan, B., Young, M., Machado, U.F., 2006. Participation of β-adrenergic modulation of GLUT4 expression during fasting and refeeding in rats. *Metabolism Clinical and Experimental, 55 (6)*: 1538-1545.

TABLE 1:

General characteristics of control and obese rats, untreated (C and O) or treated with glimepiride (CG and OG), for four weeks.

	C	CG	O	OG
Body weight (g)	350 ± 11 (n = 17)	350 ± 10 (n = 13)	291 ± 9 *** ††† (n = 18)	288 ± 7 *** ††† (n = 18)
Naso anal length (cm)	22.7 ± 2.10 (n = 17)	23.0 ± 0.17 (n = 13)	20.9 ± 0.19 *** ††† (n = 18)	21.0 ± 0.21 *** ††† (n = 18)
Lee Index ($\sqrt[3]{g}$/cm)	31.00 ± 0.14 (n = 17)	30.60 ± 0.23 (n = 13)	31.61 ± 0.12 * †† (n = 18)	31.45 ± 0.14 * †† (n = 18)
WAT (g)	3.62 ± 0.23 (n = 11)	3.34 ± 0.29 (n = 7)	5.21 ± 0.25 * † (n = 14)	5.50 ± 0.75 * † (n = 10)
Soleus (g)	0.130 ± 0.006 (n = 11)	0.130 ± 0.008 (n = 7)	0.100 ± 0.002 *** ††† (n = 14)	0.100± 0.004 *** ††† (n = 10)
EDL (g)	0.150 ± 0.007 (n = 11)	0.140± 0.005 (n = 7)	0.120 ± 0.006 *** † (n = 14)	0.130 ± 0.006 * (n = 10)
Heart (g)	0.96 ± 0.03 (n = 11)	0.93± 0.05 (n = 7)	0.78 ± 0.02 *** †† (n = 14)	0.78 ± 0.03 *** †† (n = 10)
Food intake (g/animal/day)	23.80 ± 0.95	24.10 ± 0.40	20.80 ± 0.40 * †	21.00 ± 0.25 * †
Relative intake (g/100g/day)	6.34 ± 0.25	6.44 ± 0.11	6.90 ± 0.13	6.98 ± 0.08
Water intake (ml/animal/day)	35.60 ± 0.60	33.60 ± 2.23	27.40 ± 1.46 * * †	27.20 ± 0.90 * * †
Relative intake (ml/100g/day)	10.68 ± 0.15	10.21 ± 0.68	9.09 ± 0.48	9.05 ± 0.30

Lee index = [($\sqrt[3]{\text{body weight}}$)÷(nasoanal length)] x 100

WAT, epididymal white adipose tissue; EDL, extensor digitorum longus. The number of animals in each group is indicated in brackets. Food and water intake were measured from 3-4 cages per group, housing 4-5 animals each. Data are mean ± S.E.M.* $P < 0.05$, * * $P<0.01$ and * * * $P< 0.001$ vs. C; † $P<0.05$, †† $P<0.01$ and ††† $P<0.001$ vs. CG; ANOVA/Student-Newman-Keuls test.

TABLE 2:

5´nucleotidase activity found in plasma membrane (PM) and microssomal (M) fractions of cardiac and skeketal muscles of control (C), obese (O) and glimepride-treated obese rats (OG). Enzyme activity is expressed in µmol Pi generated in one hour by the protein content in each gram of tissue:

	Heart ($\mu mol\ Pi \times h^{-1} \times g_{tissue}^{-1}$)		EDL ($\mu mol\ Pi \times h^{-1} \times g_{tissue}^{-1}$)		Soleus ($\mu mol\ Pi \times h^{-1} \times g_{tissue}^{-1}$)	
	PM	M	PM	M	PM	M
C	22.60 ± 3.57 (6)	0.90 ± 0.28 (6) †††	3.25 ± 0.57 (4)	0.34 ± 0.15 (4) ††	1.06 ± 0.08 (5)	0.33 ± 0.08 (5) †††
O	24.17 ± 6.47 (6)	0.87 ± 0.33 (6) ††	3.05 ± 0.38 (4)	0.61 ± 0.08 (4) †††	1.57 ± 0.16 (5)	0.17 ± 0.04 (5) †††
OG	26.82 ± 6.07 (7)	0.69 ± 0.14 (7) ††	3.90 ± 0.73 (4)	0.99 ± 0.21 (4) ††	5.21 ± 0.55 (4)* #	0.51 ± 0.15 (4) †††

EDL, extensor digitorum longus. The number of animals in each group is indicated in brackets. Data are mean ± S.E.M. †† $P<0.01$ and ††† $P<0.001$ vs. respective PM, * $P<0.05$ vs. C, # $P<0.05$ vs. O, ANOVA/Student-Newman-Keuls test, with comparisons only among samples from the same tissue

TABLE 3

Basal and insulin stimulated 2-deoxi-[2,6-^{3}H]glucose uptake and ^{14}C-glucose incorporation to glycogen in soleus muscle of control (C) and obese rats, untreated (O) or treated with glimepiride (OG), for four weeks.

2-DG-uptake (μmol/g)	BASAL	INSULIN
C (5)	2.86 ± 0.11	5.36 ± 0.07
O (5)	2.03 ± 0.17 **	4.15 ± 0.08 ***
OG (5)	2.20 ± 0.14 *	5.06 ± 0.16 ##
^{14}C-glucose in glycogen (μmol/g)	BASAL	INSULIN
C (5)	0.91 ± 0.02	3.44 ± 0.14
O (5)	0.45 ± 0.13 *	2.42 ± 0.10 ***
OG (5)	0.39 ± 0.23 *	2.96 ± 0.20 *#

The number of animals in each group is showed in brackets. Data are mean ± S.E.M . ANOVA 2 WAY*: Insulin effect: P*<0.0001; *Treatment: P*<0.0001; *Interaction: P*= 0.0193 for 2-DG uptake and *P*=0.1101 for ^{14}C-glucose incorporation. Bonferroni's test: * *P*<0.05, ** *P*<0.01, and *** *P*<0.001 vs. C; # *P*<0.05 and ## *P*<0.01 vs. O

Figure Legends:

Figure 1: Plasma glucose, plasma insulin and glucose disappearance constant in Control and MSG-obese rats, untreated (C and O) or treated with glimepiride for four weeks (CG and OG). kITT, constant rate of plasma glucose disappearance, obtained from the linear regression of neperian logarithm of blood glucose concentration values along the insulin tolerance test. Data are mean ± S.E.M. for 7-8 animals per group in the insulin tolerance test, and 11-18 animals for plasma glucose and insulin. * $P<0.05$ and ***$P<0.001$ vs. C; † $P<0.05$ vs. CG; # $P<0.05$ vs. O; ### $P<0.001$ vs. O (ANOVA and Student-Newman-Keuls as post hoc test).

Figure 2: GLUT4 mRNA and protein contents in cardiac muscle of control and obese rats, untreated (O) or treated with glimepiride for four weeks (OG). **A, left pannel:**: GLUT4 mRNA as a ratio of β-actin mRNA content, and normalized considering the control mean of each membrane as 100. **A, right pannel:** typical images of GLUT4 and respective β-actin mRNAs. **B:** GLUT4 protein content in total membranes. **C:** Representative blots out of four separate experiments. **D:** GLUT4 protein content in plasma membrane (PM); **E:** GLUT4 protein content in microsome (M); 30 µg protein of each subcellular fraction were subjected to SDS/PAGE, followed by immunoblotting for GLUT4 and data were calculated analysing GLUT4 per gram of tissue. Results, expressed in arbitrary units (AU), are mean ± SEM of 6 rats in each group.

Figure 3: GLUT4 mRNA and protein contents in extensor digitorum longus (EDL) of control and obese rats, untreated (O) or treated with glimepiride for four weeks (OG). **A, left pannel:**: GLUT4 mRNA as a ratio of β-actin mRNA content, and normalized considering the control

mean of each membrane as 100. **A, right pannel:** typical images of GLUT4 and respective β-actin mRNAs. **B:** GLUT4 protein content in total membranes. **C:** Representative blots out of four separate experiments. **D:** GLUT4 protein content in plasma membrane (PM); **E:** GLUT4 protein content in microsome (M); 30 μg protein of each subcellular fraction were subjected to SDS/PAGE, followed by immunoblotting for GLUT4 and data were calculated analysing GLUT4 per gram of tissue. Results, expressed in arbitrary units (AU), are mean ± SEM of 5 and 10 rats in each group for protein and mRNA, respectively.

* $P<0.05$ and ** $P<0.01$ vs. C; # $P<0.05$ vs. O (ANOVA and Student-Newman-Keuls as post hoc test).

Figure 4: GLUT4 mRNA and protein contents in soleus skeletal muscle of control and obese animals, untreated (O) or treated with glimepiride for four weeks (OG). **A, left pannel:**: GLUT4 mRNA as a ratio of β-actin mRNA content, and normalized considering the control mean of each membrane as 100. **A, right pannel:** typical images of GLUT4 and respective β-actin mRNAs. **B:** GLUT4 protein content in total membranes. **C:** Representative blots out of four separate experiments. **D:** GLUT4 protein content in plasma membrane (PM); **E:** GLUT4 protein content in microsome (M); 30 μg protein of each subcellular fraction were subjected to SDS/PAGE, followed by immunoblotting for GLUT4 and data were calculated analysing GLUT4 per gram of tissue. Results, expressed in arbitrary units (AU), are mean ± SEM of 5-6 and 6-8 rats in each group for protein and mRNA, respectively.

*** $P<0.001$ vs. C; ### $P<0.001$ vs. O (ANOVA and Student-Newman-Keuls as post hoc test).

Figure 5: GLUT4 mRNA and protein contents in epididymal white adipose tissue of control and obese animals, untreated (O) or treated with glimepiride for four weeks (OG). **A, left pannel:**: GLUT4 mRNA as a ratio of β-actin mRNA content, and normalized considering the control mean of each membrane as 100. **A, right pannel:** typical images of GLUT4 and respective β-actin mRNAs. **B:** GLUT4 protein content in fatty free extract. **C:** Representative blots out of four separate experiments. **D:** GLUT4 protein content in plasma membrane (PM); **E:** GLUT4 protein content in microsome (M); 30 µg protein of each subcellular fraction were subjected to SDS/PAGE, followed by immunoblotting for GLUT4 and data were calculated analysing GLUT4 per gram of tissue. Results, expressed in arbitrary units (AU), are mean ± SEM of 5-6 and 6-7 rats in each group for protein and mRNA, respectively.

**$P<0.01$ and *** $P<0.001$vs. C; ## $P<0.01$ vs. O (ANOVA and Student-Newman-Keuls as post hoc test).