DANILO ANTÔNIO CORRÊA PINTO JÚNIOR

**EFEITO DA ALBUMINA MODIFICADA POR GLICAÇÃO
AVANÇADA SOBRE A EXPRESSÃO DO GENE *SLC2A4*
EM MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Fisiologia Humana do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2016

DANILO ANTÔNIO CORRÊA PINTO JÚNIOR

**EFEITO DA ALBUMINA MODIFICADA POR GLICAÇÃO
AVANÇADA SOBRE A EXPRESSÃO DO GENE *SLC2A4*
EM MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Antônio Corrêa Pinto Júnior, Danilo
EFEITO DA ALBUMINA MODIFICADA POR GLICAÇÃO
AVANÇADA SOBRE A EXPRESSÃO DO GENE SLC2A4 EM MÚSCULO
ESQUELÉTICO / Danilo Antônio Corrêa Pinto Júnior;
orientador Ubiratan Fabres Machado. -- São Paulo,
2016.

80 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Produtos de glicação avançada. 2. GLUT4. 3.
Slc2a4. 4. NFkB. 5. Diabetes. I. Fabres Machado,
Ubiratan, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Danilo Antônio Corrêa Pinto Júnior

Título da Tese: EFEITO DA ALBUMINA MODIFICADA POR GLICAÇÃO
AVANÇADA SOBRE A EXPRESSÃO DO GENE *SLC2A4* EM MÚSCULO
ESQUELÉTICO

Orientador: Ubiratan Fabres Machado

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **124** nas fls. **134** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Ubiratan Fabres Machado**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeito in vitro da albumina glicada sobre a expressão do Slc2a4 em músculo esquelético*" do qual participam o(s) aluno(s) **Danilo Antonio Corrêa Pinto Júnior**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **18.09.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 19 de setembro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho à minha querida mãe,
por toda dedicação para que eu pudesse assim realizá-lo.

Agradeço à minha querida mãe, Adriana Maria do Santos, por todo o incentivo durante a minha jornada acadêmica e também por sempre me mostrar que todos os dias são novos recomeços. Obrigado mãe pelo apoio.

Agradeço aos meus irmãos, Monique Fonseca Corrêa Pinto e Murilo Fonseca Corrêa Pinto, pela compreensão nos momentos em que estive ausente e pelos momentos de companheirismo que sempre tivemos.

Agradeço ao meu "paidrasto", Nicola Balozzi, por todos os ensinamentos (sejam eles culinários ou até mesmo da vida) e por ter sempre me tratado como seu próprio filho. Obrigado Ni pelo carinho.

Agradeço ao meu pai e à minha querida "má drasta", Danilo Antônio Corrêa Pinto e Ana Lúcia Fonseca Corrêa Pinto, pela ajuda e compreensão nos meus momentos de ausência.

Agradeço aos meus queridos avós, Antônia Maria da Conceição Santos e José dos Santos, por todo carinho e por sempre me tratarem como o filho caçula, principalmente quando me perguntavam "como estava a escola" (referindo se ao doutorado). Obrigado pelo carinho sempre.

Agradeço à minha avó, Bernadete Cecotti, pelo carinho, seja por meio de ligações ou abraços calorosos.

Agradeço ao meu pai de criação, Ênio Vendramin, por ter me criado como seu próprio filho, por sempre compreender minha ausência e por ter sempre essa energia positiva. Obrigado pai.

Agradeço ao meu melhor amigo, Wesley Rodrigues, por sempre estar ao meu lado nos momentos mais difíceis, com paciência e palavras sinceras. Obrigado meu amigo.

Agradeço ao meu grande amigo, Vinicius Palacio, pela alegria e descontração nos momentos em que estamos juntos.

Agradeço ao meu amigo, Miguel Xavier, pelos momentos de conversas e rodas de violão, com certeza estes poucos momentos me ajudaram muito em períodos difíceis.

Agradeço ao meu orientador, Ubiratan Fabres Machado, por ter me dado a oportunidade de trabalhar num laboratório de excelência e por ter me orientado sempre de forma sábia e ética. Obrigado Bira por todos os ensinamentos e pela dedicação.

Agradeço à nossa querida técnica e mãe de todos no laboratório, Maristela Mitiko Okamoto, por todo empenho em ajudar a todos no laboratório e abençoar os nossos experimentos de Western Blotting. Obrigado Maris por toda ajuda.

Agradeço à minha amiga e colega de laboratório, Aline David Silva, por todos os ensinamentos de técnicas de laboratório, momentos de descontração e ajuda na coordenação do Curso de Verão.

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório, Caio Yogi Yonamine, Frederico Gerlinger e João Victor Delconti Esteves, por toda ajuda ao longo destes 4 anos de doutorado, e também pelas conversas, discussões, experimentos e momentos de descontração.

Agradeço ao pessoal do "turno da noite" do laboratório, Maria Luiza Estimo Michalani, Erika Machado, José Augusto Cipriano Guedes, João Andrade, obrigado por tornarem os experimentos falhos (que não foram poucos) em momentos mais leves e descontraídos. Obrigado de coração por terem essa energia boa.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Rosana Tieko Mori, Helayne Freitas, Daniela Tomie Furuya, Ana Barbara Alves Wagner, Luciana Alves e Raquel Campello, pela ajuda, discussões e bons momentos.

Agradeço à toda equipe do Laboratório de Lípedes (LIM 10), obrigado por fornecerem as aliquotas de albumina utilizadas em todos os experimentos. Em especial agradeço à professora Marisa Passarelli, Maria Lúcia Corrêa-Giannella, Karoline Silva, Adriana Lima e Rodrigo Iborra.

Agradeço ao pessoal da organização do Curso de Verão, professora Luciana Venturini Rossoni e Leila Afini, por toda ajuda e pelos momentos de aprendizado na organização deste evento.

Agradeço aos secretários de pós graduação, José Maria Rodrigues e Paloma Cañipa, por toda ajuda durante o meu doutorado. Obrigado pela paciência.

Agradeço à toda equipe da biblioteca do ICB por toda ajuda na revisão deste material. Em especial agradeço à Tereza e Valéria.

Agradeço à minha ex orientadora, Patricia Monteiro Seraphim, por ter me mostrado este lindo caminho que é a pesquisa científica e por ter me ensinado o quanto apaixonante é a fisiologia. Obrigado Paty, minha mãe querida.

Agradeço à minha "filha" Eva, por todo companheirismo e amor incondicional. Com certeza com a sua alegria tudo se torna mais fácil. Obrigado por existir em minha vida

Agradeço à minha segunda família (família Pechini Bento) por terem me acolhido como um filho e por terem me ajudado nos momentos em que precisei. Obrigado Mario, Sônia, Patricia, Cláudia e Eduardo pelo carinho.

Agradeço à minha namorada, Bruna Maria Pechini Bento, pelo grande amor, pela amizade, pelo companheirismo e pela compreensão nos momentos difíceis. Obrigado por todo o carinho e paciência.

Agradeço à FAPESP por todo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

Agradeço aos animais que doaram a vida para a execução deste trabalho.

Por último e não menos importante, agradeço a Deus por ter acalmado meu coração nos momentos mais difíceis e por ter me mostrado o caminho correto a ser seguido.

*"The sea's only gifts are harsh blows, and occasionally the chance to feel strong.
Now I don't know much about the sea, but I do know that that's the way it is here.
And I also know how important it is in life not necessarily to be strong but to feel
strong. To measure yourself at least once. To find yourself at least once in the most
ancient of human conditions. Facing the blind deaf stone alone, with nothing to help
you but your hands and your own head."
(Christopher McCandless - Into the Wild)*

RESUMO

PINTO JÚNIOR, D. A. C. **Efeito da albumina modificada por glicação avançada sobre a expressão do gene *SLC2A4* em músculo esquelético.** 2016 80 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A participação dos produtos de glicação avançada (AGEs) nas complicações crônicas relacionadas ao diabetes tem sido muito investigada. Entretanto, pouco se sabe sobre a participação direta dos AGEs na homeostasia glicêmica, na qual o transportador de glicose GLUT4 (proteína codificada pelo gene *SLC2A4*) desempenha um papel essencial. Portanto, o objetivo do presente estudo é investigar: (1) o efeito *in vivo* do tratamento crônico com AGEs em animais saudáveis sobre a homeostasia glicêmica e a expressão de *Slc2a4*/GLUT4 em músculo esquelético; (2) o efeito agudo *in vitro* dos AGEs sobre a expressão do *Slc2a4*/GLUT4 em músculo esquelético de ratos saudáveis; (3) o potencial envolvimento do estresse de retículo endoplasmático e da inflamação nas regulações observadas. Para a análise *in vivo*, os animais foram tratados por 12 semanas com 20 mg/kg/dia de albumina sérica de rato modificada por glicação avançada (AG) ou não (AC). Para a análise *in vitro*, o músculo sóleo foi incubado com albumina modificada por glicação avançada (AG) e seu respectivo contralateral foi incubado com albumina não glicada (AC) por 150, 300 e 450 minutos (1 mg/mL). Para a avaliação do quadro de resistência à insulina foi realizado o teste de tolerância à insulina (ITT). Os músculos, tanto da análise *in vivo* quanto da análise *in vitro*, foram processados para quantificação de mRNA (RT - qPCR) e de proteínas total, citosólica e nuclear (Western blotting). Os resultados *in vivo* mostraram a que o grupo AG apresentou menor sensibilidade insulínica, redução da expressão gênica de *Slc2a4* (~30%) seguido de redução do conteúdo proteico de GLUT4. A expressão gênica do receptor para AGEs *Ddost* também reduziu no grupo AG. Ainda, em animais AG, a proteína NFkB1 aumentou no compartimento nuclear (marcador inflamatório) e a proteína GRP78 aumentou no extrato total. Os resultados *in vitro* (150 minutos de incubação com AG) mostraram redução (~50%) na expressão de *Slc2a4* e aumento na expressão de *Ager*, na fosforilação de IKK alpha/beta, no conteúdo nuclear de NFkB1 e RELA, no conteúdo de GRP78 e GRP94 e na atividade de ligação do NFkB na região promotora do *Slc2a4*. Porém, a proteína GLUT4 somente reduziu após 450 minutos de incubação com AG. Por fim, estes resultados sugerem os AGEs como um mecanismo repressor da expressão do *Slc2a4*/GLUT4 no músculo esquelético, o que envolve as vias de estresse de retículo e inflamatória. Este efeito contribui para reduzir o clearance plasmático de glicose, indicando que a inibição/redução dos AGEs poderia ser um possível alvo para melhorar o controle glicêmico no diabetes.

Palavras-chave: Produtos de glicação avançada. Diabetes. GLUT4. *Slc2a4*. NFkB.

ABSTRACT

PINTO JÚNIOR, D. A. C. **Effect of albumin modified by advanced glycation in gene expression of *SLC2A4* in skeletal muscle.** 2016 80 f. Thesis (Ph. D. Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Advanced glycation end products (AGEs) participation in the diabetes-related chronic complications has been extensively investigated. However, little is known about AGEs participation in glycemic homeostasis, for which the glucose transporter GLUT4 (*Slc2a4* gene) plays a key role. The present study aimed to investigate: (1) the *in vivo* effect of chronic AGEs administration to health rats on glycemic homeostasis and skeletal muscle expression of *Slc2a4*/GLUT4; (2) the acute *in vitro* effect of AGEs on skeletal muscle expression of *Slc2a4*/GLUT4; and (3) the potential involvement of endoplasmic reticulum stress (ERS) and inflammation in the observed regulations. For *in vivo* analysis, rats were treated during 12 weeks with 20 mg/kg of rat serum albumin modified (AG) or not (AC) by advanced glycation. For *in vitro* analysis, soleus muscles were incubated with AlbAGE (1 mg/mL) or AlbC during 150 or 450 min. Insulin resistance was analyzed by insulin tolerance test (ITT), and soleus muscles from *in vivo* and *in vitro* protocols were processed for mRNA (RT - qPCR), and for total cellular, cytosolic or nuclear protein (Western blotting) quantification. *In vivo*, AlbAGE induced insulin resistance; reduced (~30%) *Slc2a4* mRNA, GLUT4 protein and AGE receptor *Ddost* mRNA; and increased (~30%) the nuclear content of the nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit (NFKB1, inflammatory marker), and 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78, ERS marker). *In vitro*, 150 min-incubation with AlbAGE decreased (50%) the *Slc2a4* mRNA; and increased (20-50%) *Ager* mRNA, phosphorylation of IKK-alpha/beta, nuclear content of NFKB1 and RELA, GRP78/94, and NFKB-binding into *Slc2a4* promoter region. Besides, GLUT4 protein was reduced after 450 min. The results reveal that AGEs repress *Slc2a4*/GLUT4 expression in muscle, in a reticulum endoplasmic stress- and inflammatory-mediated way. This effect contributes to impair plasma glucose clearance, highlighting AGEs reduction/inhibition as a target to improve glycemic control in diabetes.

Keywords: Advanced glycation end products. Diabetes. GLUT4. *Slc2a4*. NFKB.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Formação dos produtos de glicação avançada.....	23
Figura 2 - Vias de ativação do NFκB	26
Figura 3 - Vias de ativação do estresse de retículo endoplasmático	28
Figura 4 - Efeito da albumina glicada sobre a sensibilidade à insulina ..	39
Figura 5 - Efeito da albumina glicada sobre a expressão de <i>Slc2a4</i> e GLUT4 em músculo sóleo	40
Figura 6 - Efeito do tratamento com albumina glicada sobre a expressão gênica dos receptores para AGEs <i>Ager</i> e <i>Ddost</i> no músculo sóleo.....	41
Figura 7 - Efeito do tratamento com albumina glicada sobre fosforilação das proteínas IKKα e IKKβ no músculo sóleo	42
Figura 8 - Efeito do tratamento com albumina glicada sobre a expressão de IKKα e IKKβ no músculo sóleo	43
Figura 9 - Efeito do tratamento com albumina glicada sobre o conteúdo de NFκB1 e RELA em músculo sóleo	44
Figura 10 - Ensaio Western Blotting com o anticorpo Anti-KDEL	45
Figura 11 - Efeito do tratamento com albumina glicada sobre o conteúdo proteico de GRP78 e GRP94 no músculo sóleo	46
Figura 12 - Efeito <i>in vitro</i> da albumina glicada sobre a expressão gênica do <i>Slc2a4</i> e proteica do GLUT4 em músculo sóleo.....	47
Figura 13 - Efeito <i>in vitro</i> da albumina glicada sobre a expressão do GLUT4 em músculo sóleo	48
Figura 14 - Efeito <i>in vitro</i> da albumina glicada sobre a expressão gênica de <i>Ager</i> e <i>Ddost</i> em músculo sóleo.....	49
Figura 15 - Efeito <i>in vitro</i> da albumina glicada sobre a fosforilação das proteínas IKKα e IKKβ no músculo sóleo	50
Figura 16 - Efeito <i>in vitro</i> da albumina glicada sobre o conteúdo de IKKα e IKKβ no músculo sóleo	51
Figura 17 - Efeito <i>in vitro</i> da albumina glicada sobre o conteúdo de NFκB1 e RELA em músculo sóleo.....	52
Figura 18 - Padronização do ensaio de mobilidade eletroforética.....	53

Figura 19 - Efeito <i>in vitro</i> da albumina glicada sobre a atividade de ligação de proteínas nucleares no sítio NFκB do promotor do <i>Slc2a4</i> em músculo sóleo	54
Figura 20 - Efeito <i>in vitro</i> da albumina glicada sobre o conteúdo de GRP78 E GRP94 no músculo sóleo	55
Figura 21 - Círculo vicioso dos produtos de glicação avançada (AGEs) sobre a homeostasia glicêmica	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs -	do inglês, <i>advanced glycation end products</i>
AKT/PKB -	do inglês, <i>protein kinase B</i>
ATF6 -	do inglês, <i>activation transcription factor 6</i>
Bip/GRP78 -	do inglês, <i>binding immunoglobulin protein/78 kDa glucose regulated protein</i>
BSA -	do inglês, <i>bovine serum albumin</i>
CAMK -	do inglês, <i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase</i>
CEBPA -	do inglês, <i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
CML -	Carboximetil-lisina
DEPC -	Dietil pirocarbonato
DM -	Diabetes <i>mellitus</i>
DTT -	Ditiotreitol
eIF2α -	do inglês, <i>eukaryotic translation initiation factor 2 alpha</i>
EROs -	Espécies reativas de oxigênio
EMSA -	do inglês, <i>electrophoretic mobility shift assay</i>
FAFA -	do inglês, <i>fatty acids free albumin</i>
GAD -	do inglês, <i>glycolaldehyde</i>
GCK -	do inglês, <i>glucokinase</i>
GEF -	do inglês, <i>GLUT4 enhancer factor</i>
GLUT -	do inglês, <i>glucose transporter 4</i>
GRP94 -	do inglês, <i>94 kDa glucose regulated protein</i>
HIF1A -	do inglês, <i>hypoxia inducible factor 1 alpha</i>
HNF -	do inglês, <i>hepatocyte nuclear factor</i>
HUGO -	do inglês, <i>human genome organization gene nomenclature committee</i>
IκB -	do inglês, <i>inhibitor of nuclear factor kappa B</i>
IKK -	do inglês, <i>inhibitor of nuclear factor kappa B kinase</i>
IR -	do inglês, <i>insulin receptor</i>
IRE1 -	do inglês, <i>Inositol Requiring Enzyme 1</i>
IRS -	do inglês, <i>insulin receptor substrate</i>

JNK -	do inglês, <i>c-jun NH₂-terminal kinase</i>
KDa -	Kilo Dáton
KDEL -	Sequência de aminoácidos; lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e leucina
LDL -	do inglês, <i>low density lipoprotein</i>
MEF2 -	do inglês, <i>myocyte-specific enhancer factor 2</i>
MODY -	do inglês, <i>Maturity-Onset Diabetes mellitus of the Young</i>
MYOD -	do inglês, <i>myogenic differentiation 1</i>
NFKB -	do inglês, <i>nuclear factor kappa B</i>
PBS -	Tampão fosfato salino
PDK -	do inglês, <i>pyruvate dehydrogenase kinase</i>
PERK -	do inglês, <i>protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PH -	Sítio de homologia à pleckstrina
PI3K -	do inglês, <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKC -	do inglês, <i>protein kinase C</i>
PMSF -	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PPAR -	do inglês, <i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
RAGE -	do inglês, <i>receptor of advanced glycation end products</i>
S1P -	do inglês, <i>site-1 protease</i>
S2P -	do inglês, <i>site-2 protease</i>
SDS -	Dodecil sulfato de sódio
SH2 -	do inglês, <i>Src homology2</i>
Slc2a4 -	do inglês, <i>Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 4</i>
SREBP1C -	do inglês, <i>sterol regulatory element binding transcription factor 1C</i>
TBE -	Solução Tris-Borato-EDTA
TNF -	do inglês, <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRAF -	do inglês, <i>TNFα Receptor Associated Factor</i>
UA -	Unidade arbitrárias
UPR -	do inglês, <i>unfolded protein response</i>
UPS -	do inglês, <i>ubiquitin/proteasome system</i>
XBP1 -	do inglês, <i>X-Box DNA Binding Protein]</i>

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Diabetes <i>mellitus</i>	19
1.2 Captação de glicose pelo músculo esquelético	19
1.3 Regulação transcricional do <i>SLC2A4</i>	21
1.4 Produtos de glicação avançada (AGEs).....	22
1.5 Via do NFKB.....	24
1.6 Estresse de retículo endoplasmático	26
2 JUSTIFICATIVA.....	29
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Animais	31
<u>4.1.1 Animais utilizados no tratamento <i>in vivo</i>.....</u>	<u>31</u>
<u>4.1.2 Animais utilizados nas incubações <i>in vitro</i></u>	<u>31</u>
4.2 Procedimentos experimentais	31
<u>4.2.1 Coleta das amostras.....</u>	<u>31</u>
<u>4.2.2 Processo de glicação da albumina.....</u>	<u>31</u>
<u>4.2.3 Teste de tolerância à insulina.....</u>	<u>32</u>
<u>4.2.4 Incubação do músculo <i>in vitro</i></u>	<u>32</u>
<u>4.2.5 Avaliação da expressão gênica por RT - qPCR</u>	<u>33</u>
<u>4.2.6 Avaliação de proteínas por Western Blotting.....</u>	<u>34</u>
<u>4.2.7 Atividade de ligação do NFKB no promotor do <i>Slc2a4</i>.....</u>	<u>36</u>
4.3 Análise estatística	37
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Efeito da albumina glicada em músculos de ratos tratados 90 dias	39
<u>5.1.1 Teste de tolerância à insulina.....</u>	<u>39</u>
<u>5.1.2 Efeito do tratamento com albumina glicada na expressão de <i>Slc2a4</i>/GLUT4.....</u>	<u>40</u>

5.1.3 Efeito do tratamento com albumina glicada na expressão gênica dos receptores para AGEs.....	41
5.1.4 Efeito do tratamento com albumina glicada na via do NFκB.....	42
5.1.5 Avaliação de marcadores de estresse de retículo.....	45
5.2 Efeito <i>in vitro</i> da albumina glicada sobre o músculo sóleo	47
5.2.1 Efeito da albumina glicada na expressão de <i>Slc2a4</i> /GLUT4.....	47
5.2.2 Efeito da albumina glicada na expressão gênica dos receptores para AGEs	49
5.2.3 Efeito da albumina glicada na via do NFκB	50
5.2.4 Avaliação de marcadores do estresse de retículo.....	55
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICES	69
A - PADRONIZAÇÃO DO GENE DE REFERÊNCIA PARA A REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RT - qPCR.....	69
B - DADOS ESTATÍSTICOS.....	73
C - MEMBRANAS CORADAS COM PONCEAU.....	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes *mellitus*

O diabetes *mellitus* (DM), em conjunto com suas co-morbidades, caracteriza-se como um dos maiores problemas de saúde pública nos dias de hoje. O quadro de hiperglicemia está diretamente relacionado com a degeneração de vários sistemas orgânicos pelo comprometimento de retina, rins, nervos, vasos sanguíneos e musculatura esquelética (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). O DM pode ser classificado em: diabetes tipo 1, cuja gênese é a destruição das células β , e diabetes tipo 2 cuja gênese é a resistência insulínica. Além desses, outros tipos específicos de diabetes podem ocorrer como os MODYs, o diabetes gestacional e o diabetes secundário as outras disfunções endócrinas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; HU et al., 2014; ZHANG et al., 2012). Algumas diferenças entre portadores de DM1 e DM2 são bem evidentes, como a presença de obesidade e a reserva pancreática de insulina; entretanto, a hiperglicemia, e consequentemente o desenvolvimento de complicações tardias, são comuns a ambos os tipos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

A compreensão da hiperglicemia no DM passa pela análise dos fatores responsáveis pela manutenção da homeostasia glicêmica: 1) a secreção de insulina, 2) a captação periférica de glicose estimulada pela insulina (em tecido adiposo e muscular) e 3) a supressão da produção hepática de glicose regulada, em parte, pela insulina (DEFRONZO, 2004). A musculatura esquelética compreende cerca de 40% da massa corporal nos indivíduos não obesos, e, portanto, tem fundamental importância na captação de glicose estimulada por insulina, principalmente no período pós-prandial (ZORZANO et al., 2000). Assim, seja por falta de insulina e/ou seja por resistência insulínica, a redução na capacidade do músculo em depurar glicose do meio extracelular tem participação importante no desenvolvimento da hiperglicemia (SINACORE; GULVE, 1993).

1.2 Captação de glicose pelo músculo esquelético

Tanto a insulina como a própria contração muscular são capazes de estimular a captação de glicose pelo músculo. A etapa final, e limitante, dessa captação de

glicose é dependente do transportador de glicose 4 (GLUT4), que se expressa em abundância tanto no miócito quanto no adipócito (MACHADO et al., 2006). Baseado no sistema *Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee* (HUGO), a família dos genes que codificam proteínas responsáveis pela difusão facilitada da glicose foi designada como *Solute Carriers 2A* (SLC2A, *Slc2a* em roedores), e no caso da proteína GLUT4 o referido gene é chamado de *SLC2A4* (*Slc2a4* em roedores) (MACHADO et al., 2006).

A insulina, cuja secreção aumenta em resposta à elevação pós-prandial de glicose, inicia sua ação nas células musculares e adiposas por meio da ligação em seu receptor específico (IR). O IR, por possuir atividade tirosinacina intrínseca, se autofosforila, e desencadeia uma série de sinais intracelulares que culminam com ativação da proteína cinase B (AKT) (JAMES et al., 1996; WATSON et al., 2004) e proteína cinase C atípica (PKC atípica) (FARESE, 2002), as quais exercem papel fundamental na migração de vesículas ricas em GLUT4 do citosol para a membrana plasmática. Por fim, quando há a ancoragem das vesículas de GLUT4 na membrana plasmática, ocorre o aumento da captação de glicose por difusão facilitada (TANIGUCHI et al., 2006; WHITE et al., 1994; ZAID et al., 2008). Adicionalmente, em músculo esquelético e cardíaco, a translocação do GLUT4 pode ocorrer em resposta à contração muscular, por um mecanismo distinto do utilizado pela insulina. De maneira sucinta, o processo de contração muscular em si envolve: 1) o estímulo neural (liberação do neurotransmissor acetilcolina na junção neuromuscular); 2) a despolarização do miócito (por conta do influxo do íon Na^+); e 3) a abertura de canais de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático. Após a liberação do Ca^{2+} , esse íon interage com o miofilamento de actina para que, após a hidrólise do ATP, haja o processo de contração muscular. Tanto a liberação de cálcio quanto o consumo de ATP proveniente do processo de contração muscular induzem a translocação de vesículas contendo GLUT4 para a membrana plasmática, aumentando a captação de glicose no músculo. Quando ocorre o aumento das concentrações de cálcio, há a ativação da proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina (CAMK) e da PKC, as quais, em seu estado ativo, desencadeiam diversos fenômenos intracelulares entre eles a translocação de vesículas de GLUT4 (JENSEN; GOODYEAR, 2005). Paralelamente a este evento, quando há o consumo de ATP durante o processo de contração muscular, a célula detecta o aumento da demanda energética (aumento

da relação AMP:ATP) com isso ocorre a ativação de uma proteína conhecida como sensor energético da célula, a proteína cinase ativada por 5' AMP (AMPK), que desativa vias de gasto energético e ativa vias de síntese do ATP, como a captação de glicose oriunda da translocação do GLUT4 (HUANG; CZECH, 2007).

Muito tem sido investigado sobre a translocação do GLUT4, esquecendo-se, no entanto, que uma adequada expressão do transportador é condição primordial para que a translocação das vesículas leve ao aumento da captação de glicose esperado. Por isso, o estudo da expressão gênica de *Slc2a4*/GLUT4 tem sido considerado fundamental (CORRÊA-GIANNELLA; MACHADO, 2013).

1.3 Regulação transcricional do *SLC2A4*:

A regulação da captação de glicose estimulada por insulina e/ou contração muscular vai muito além da translocação das vesículas ricas em GLUT4 para a membrana plasmática, alguns autores mostram que estímulos negativos ou positivos aumentam ou diminuem a expressão de fatores de transcrição, que por sua vez interferem diretamente na expressão gênica do *SLC2A4* e, conseqüentemente, têm influência direta na captação de glicose. Inúmeros fatores transcricionais têm sido descritos como estimuladores da transcrição do *SLC2A4*, tais como GEF, MEF2, MYOD, HIF1A, SREBP1C, CEBPA, entre outros (IM et al., 2007). A ativação de muitas dessas proteínas parece ser estimulada pela AMPK, e algumas atuam de maneira sinérgica na regulação positiva da expressão do *SLC2A4* (HOLMES et al., 2005; IM et al., 2007; ZHENG et al., 2001).

Todavia, existem poucas proteínas que se ligam na região promotora do *SLC2A4* e regulam negativamente sua expressão. O PPAR alpha é capaz de reduzir a transcrição do *SLC2A4*, porém de maneira indireta regulando negativamente MEF2A (BURKART et al., 2007; FINCK et al., 2005; IM et al., 2007). Já o PPAR gama, regula o *SLC2A4* de forma bastante ímpar: ligantes endógenos determinam maior atividade de ligação do PPARG no promotor do *SLC2A4*, reprimindo a expressão do gene (ARMONI et al., 2003); entretanto outros ligantes sintéticos (como as glitazonas) inibem a ligação do PPARG, então aumentando a transcrição do *SLC2A4* (IM et al., 2007). Um importante repressor do *SLC2A4* é o fator nuclear NF-kappa B (NFKB), que em seu estado ativo liga-se na região promotora em forma

de homo ou heterodímero e diminui a transcrição do mRNA *SLC2A4*, fato este que será melhor elucidado no tópico 1.5.

No diabetes, vários são os estímulos capazes de regular a transcrição de genes, cujas consequências repercutem no desbalanço metabólico e no desenvolvimento de complicações crônicas. Nesse sentido, merece destaque a inter-relação entre doença metabólica e inflamação, elegantemente apresentada há cerca de uma década por Hotamisligil (HOTAMISLIGIL, 2006), na qual as respostas imune (promovendo defesa contra o patógeno) e metabólica (promovendo melhor estoque de energia) foram fundamentais para a sobrevivência dos animais. Assim, as espécies evoluíram desenvolvendo em paralelo os genótipos/fenótipos de poupança energética e de alta responsividade imune. Como resultado, na espécie humana, obesidade, resistência insulínica e diabetes tipo 2 estão fortemente associados à inflamação crônica, com vias intracelulares compartilhadas e altamente inter-relacionadas (HOSTAMILIGIL, 2006). Com base nessa interação, não é surpresa que mediadores de resposta inflamatória sejam potentes reguladores do gene *SLC2A4* (um gene de poupança), conforme será comentado adiante.

1.4 Produtos de glicação avançada (AGEs)

No DM, as altas concentrações de glicose promovem diversas alterações metabólicas, entre as quais se destaca a modificação não enzimática de macromoléculas, e, conseqüentemente, a geração de produtos de glicação avançada (AGEs). Os AGEs são formados a partir da reação de glicação, que é um processo não enzimático, também conhecido como reação de escurecimento ou reação de Maillard (GLOMB; MONNIER, 1995; NGUYEN, 2006).

O processo de glicação basicamente inicia-se com a formação de uma base de *Schiff* instável, que é gerada a partir da reação de grupos carbonila de açúcares redutores com resíduos de Lisina e Arginina de porções amino-terminais de proteínas, fosfolípidos e ácidos nucleicos. A base de *Schiff* pode sofrer rearranjos e progredir para um produto Amadori, que é mais estável (GOLDIN et al., 2006). A autooxidação da glicose, a decomposição da base de *Schiff* e os rearranjos moleculares do produto de Amadori, levam a formação de açúcares dicarbonila (glioxal, metilglioxal, 3-deoxiglicossoma e glicolaldeído), e por serem extremamente

reativos levam a reação de glicação em sentido irreversível, com a formação dos AGEs (PEPPA et al., 2003).

Figura 1 - Formação dos produtos de glicação avançada. As porções aminoterminais de proteínas, fosfolípides e ácidos nucleicos são modificadas de forma não enzimática por açúcares redutores (1), formando primeiramente uma base de Schiff (2), que por sua vez é um composto instável e de fácil dissociação. Posteriormente, a base de Schiff pode se tornar mais estável, produtos amadori (3), o que leva a formação de oxoaldeídos, que por serem extremamente reativos, formam de maneira irreversível os produtos de glicação avançada (4). Adaptado de Castilho (2012).

Além dos AGEs endógenos (produzidos no organismo) há uma fonte exógena de AGEs (provenientes da dieta), que contribui significativamente para o conteúdo total de AGEs circulantes. Esses produtos são absorvidos no trato gastrointestinal, e transportados pela albumina e pelas LDLs, podendo agir nos mais diversos territórios do organismo (KOSCHINSKY et al., 1997; LU et al., 2004).

Os produtos de glicação avançada são reconhecidos por receptores de membrana celular, como os receptores para AGE (RAGE). A interação AGE/RAGE faz com que haja a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como

também a ativação do NFKB. Outros receptores também reconhecem essas macromoléculas modificadas, como os receptores *scavenger*, que atuam de forma semelhante ao RAGE. Por outro lado, os receptores para AGE 1, 2 e 3 (AGER-1, AGER-2 e AGER-3) contrastam com as respostas evidenciadas pelos outros receptores, pois sua interação com AGEs aumenta a remoção destes produtos, além de diminuir a inflamação e o estresse oxidativo (TORREGGIANI et al., 2009). Vale salientar que indivíduos diabéticos possuem uma maior expressão de RAGE na membrana celular, causando assim uma maior sensibilidade para estes compostos e consequentemente uma maior resposta intracelular (SHOELSON et al., 2006). Entre os efeitos induzidos pelos AGEs, que comprometem a homeostasia celular, destacam-se a ativação de vias pró-inflamatórias e de estresse de retículo endoplasmático.

1.5 Via do NFKB

A literatura clássica descreve a inflamação como a principal resposta do organismo frente a uma lesão, tendo como características o inchaço, vermelhidão, dor e calor. Essa resposta é considerada adaptativa, e crucial ao organismo para manter a sobrevivência, conforme já comentado acima. Porém, quando essa resposta celular é mantida cronicamente, as consequências não são benéficas, como acontece no diabetes *mellitus* (HOTAMISLIGIL, 2006) e/ou na resistência insulínica (SAVAGE et al., 2007), em que aumento na concentração plasmática de marcadores inflamatórios tem sido amplamente demonstrado.

Uma importante citocina pró-inflamatória, vista primeiramente como superexpressa em adipócitos de roedores obesos, é o fator de necrose tumoral alpha (TNF) (HOTAMISLIGIL et al., 1993), e que se encontra aumentado no plasma de humanos portadores de obesidade, resistência insulínica e DM (SAVAGE et al., 2007). O TNF interage com seu receptor na membrana celular, e ativa proteínas serinas/treoninas cinases como, por exemplo, o IKK (*Inhibitor of kappa B kinase*). O IKK, dentre outros efeitos, pode fosforilar em serina/treonina os IRSs, reduzindo assim o sinal insulínico (AGUIRRE et al., 2000; GAO et al., 2002). Porém, um importante efeito do IKK é induzir a ativação do NFKB, um importante fator transcricional que medeia a ação de algumas citocinas pró-inflamatórias (SHOELSON et al., 2006).

O NFKB modula positiva ou negativamente a transcrição de genes alvo. Há uma família de genes que codificam diferentes isoformas de NFKB descritas entre parênteses: *RELA* (RELA ou p65), *NFKB1* (NFKB1, ou p105/p50), *NFKB2* (NFKB ou p100/p52), *REL* (REL ou c-Rel) e *RELB* (RELB). Na maioria dos tipos celulares de mamíferos, como o tecido adiposo e muscular, o NFKB geralmente é encontrado como heterodímero *RELA/NFKB1* (p65/p50), e este complexo encontra-se no citosol, inativado por um inibidor *kappa* B (IKB), cuja isoforma mais comum é o IKBA (IkB α). A via canônica do NFKB ocorre pela ativação das proteínas IKKs, que por sua vez fosforilam o IKBA, que por sua vez desliga-se do complexo NFKB, e é ubiquitinado para posterior degradação. Após o desligamento do IKBA, os NFKBs ficam livres, e são translocados para o núcleo celular. Quando os NFKBs estão no compartimento nuclear, eles se ligam na região promotora de genes alvo e assim modulam a transcrição destes (FURUYA et al., 2013; LAWRENCE, 2009; SHOELSON et al., 2006).

Há muitos anos, Ruan e colaboradores demonstraram que a via do NFKB estava mais ativa em adipócitos incubados com TNF, e que isso contribuía para a modulação negativa da expressão do *Slc2a4*, assim como reduzia a expressão da proteína GLUT4 (RUAN et al., 2002). Entretanto, apenas recentemente, foi demonstrado um sítio de ligação para NFKBs na região promotora do gene do *SLC2A4*, assim como foi confirmada sua atividade repressora sobre esse gene (FURUYA et al., 2013). Quando avaliada a ligação de proteínas nucleares a esse sítio do promotor do *Slc2a4*, foi demonstrada a presença de NFKB1 e de RELA em dois distintos complexos moleculares, sugerindo a ligação na forma de heterodímero, mas com diferentes proteínas co-reguladoras (FURUYA et al., 2013). Adicionalmente, nosso grupo já demonstrou a participação do NFKB na regulação do *Slc2a4* induzida por insulina (MORAES et al., 2014), estradiol (CAMPELLO et al., 2012) e ácidos graxos oleico e linoleico (POLETTTO et al., 2015), demonstrando a participação dessa via nas regulações induzidas fatores metabólico-hormonais, independentemente de atividade pró-inflamatória evidente.

Considerando que a via inflamatória do NFKB pode ser ativada pelos AGEs, conforme apresentado acima, podemos considerar a hipótese de que os produtos de glicação avançada podem desempenhar um papel importante na regulação da

expressão de *Slc2a4* por modularem a via do NFKB, conforme esquematizado na Figura 2.

Figura 2 - Via canônica de ativação do NFKB. Produtos de glicação avançada, TNF e espécies reativas de oxigênio podem ativar o NFKB por meio da fosforilação de seu inibidor (IKB) por proteínas cinases que adicionam um fosfato no IKB, designadas IKKs, proporcionando assim a translocação do complexo homo ou heterodimérico (NFKB1/RELA, NFKB1/NFKB1 ou RELA/RELA) para o núcleo, onde irá regular expressão de genes alvo como o *Slc2a4*.

1.6 Estresse de retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático é uma importante organela celular, pois é neste compartimento que as proteínas são sintetizadas e processadas pós-traducionalmente. Entretanto, quando ocorre o mal enovelamento das proteínas, estas se acumulam no lúmen do retículo, e são rapidamente degradadas pelo sistema ubiquitina/proteassoma. Caso o retículo não consiga regular sua homeostasia, e proteínas mal enoveladas continuem se acumulando no lúmen da organela, ocorre então o estresse de retículo endoplasmático (ENGIN; HOTAMISLIGIL, 2010), que resultará na ativação de respostas celulares que visam

restaurar a homeostasia celular, e que são coletivamente chamadas de UPR (*unfolded protein response*).

Uma das primeiras respostas da UPR envolve a regulação positiva de genes que codificam as chaperonas GRP78 (78 *kDA glucose-regulated protein*, previamente conhecida como *binding immunoglobulin protein*) e GRP94 (94 *kDA glucose regulated protein*) (ANELLI; SITIA, 2008), as quais aumentam a retenção das proteínas no lúmen do retículo, favorecendo o correto enovelamento (SCHRODER, 2008). Além disso, a GRP78 no estado basal está ligada em porções terminais de proteínas de membrana do retículo como PERK, ATF6 e IRE1, e na condição de estresse, a GRP78 libera as proteínas de membrana que se ativam e dão início a UPR.

O ATF6 (*activating transcription factor 6*) liberado da GRP78 migra da membrana do retículo para o golgi, onde interage com duas proteases (S1P e S2P) que o clivam, liberando a forma ativa capaz de migrar ao núcleo, e modular a expressão de genes alvos da UPR, tais como algumas enzimas do sistema ubiquitina/proteassoma. As proteínas mal enoveladas e acumuladas no retículo são marcadas com ubiquitina, para assim serem reconhecidas pela unidade proteassomal e por fim serem degradadas (HAMPTON, 2002; VEMBAR; BRODSKY, 2008).

Outra resposta bastante rápida é ativação de uma proteína cinase presente no retículo, a PERK (*Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*), que uma vez liberada da GRP78, ativa-se e induz a fosforilação da porção alfa do fator eucariótico de iniciação traducional, EIF2A (*Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*). Essa proteína tem participação importante no acoplamento das subunidades 40S e 60S dos ribossomos, exercendo papel fundamental na síntese das proteínas. Quando o EIF2A é ativado, a taxa de tradução reduz, e consequentemente a quantidade de proteínas recém-sintetizadas no lúmen do retículo também é reduzida (KIM et al., 2008).

Um estado crônico de estresse de retículo aciona outras respostas celulares, com a ativação da proteína IRE1 (do ingles, *inositol requiring enzyme 1*). Quando esta proteína está em seu estado ativo, ela cliva e remove uma porção intrônica do RNA primário *XBP1* (do ingles, *x-box DNA binding protein*), gerando um mRNA “spliced” que codifica um novo XBP1, o qual é capaz de regular positivamente a

expressão de vários genes da UPR (caspases e enzimas proteolíticas). Ainda, o ATF6 e o XBP1 podem interagir com sequências semelhantes no DNA, na forma de heterodímero, integrando assim uma resposta crônica da UPR (HAN et al., 2009). Finalmente, a IRE1 em seu estado ativo induz mudanças conformacionais na célula que promovem a sua associação à proteína TRAF2 (*TNF receptor associated factor 2*); o complexo pode levar a ativação da JNK (do inglês, *c-jun NH₂-terminal kinase*) e do NFKB (TABAS; RON, 2011).

Considerando que um dos efeitos dos AGEs na homeostasia celular é a ativação de estresse de retículo endoplasmático, e consequentemente da UPR, e considerando que a UPR pode ativar NFKB, reforça-se a hipótese de que os AGEs possam regular a expressão de *Slc2a4*/GLUT4.

Figura 3 - Vias de ativação do estresse de retículo endoplasmático. Produtos de glicação avançada podem levar ao acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen do retículo, desencadeando assim a UPR. As chaperonas nesta condição ficam ativas, assim como a IRE, PERK e ATF6. Caso a célula não recupere a sua homeostasia, as respostas celulares frente ao estresse de retículo endoplasmático podem levar à apoptose.

2 JUSTIFICATIVA

Muito tem se estudado sobre a participação dos AGEs no desenvolvimento de complicações do DM. Entretanto, pouco se sabe sobre a capacidade desses produtos interferirem na utilização de glicose pelos tecidos que captam glicose sob estímulo insulínico, prejudicando ainda mais o controle glicêmico.

A albumina, por ser a proteína mais abundante no plasma pode representar até 80% do total de produtos glicosados presentes no plasma de portadores de DM (COHEN, 2003); ainda, frente à injúria endotelial, pode extravasar para o interstício, participando da injúria celular. Com base nessas observações, a albumina glicada torna-se uma excelente ferramenta para investigação dos efeitos dos AGEs.

Nossa hipótese é que os AGEs, aqui representados pela albumina glicada, possam reduzir a expressão do *Slc2a4*/GLUT4, contribuindo para o comprometimento da homeostasia glicêmica. Espera-se demonstrar um efeito injuriante dos AGEs, ainda muito pouco investigado, o qual contribuiria para exacerbar o comprometimento do controle glicêmico no DM.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito da albumina modificada por glicação avançada sobre a expressão gênica do *Slc2a4* em músculo esquelético de ratos saudáveis.

3.2 Objetivos específicos

Investigar, *in vivo*, o efeito do tratamento com albumina glicada sobre a sensibilidade à insulina, e avaliar em músculo esquelético:

- a expressão do mRNA *Slc2a4* e da proteína GLUT4;
- a atividade de marcadores da via do NFkB;
- sinais de desencadeamento de estresse de retículo endoplasmático.

Confirmar, *in vitro*, o efeito da albumina glicada sobre o músculo esquelético avaliando:

- a expressão do mRNA *Slc2a4* e da proteína GLUT4;
- a atividade da via do NFkB e sua participação na regulação do *Slc2a4*;
- o desencadeamento de estresse de retículo endoplasmático.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

4.1.1 Animais utilizados no tratamento *in vivo*

Foram utilizados ratos Wistar provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da USP, e posteriormente mantidos no biotério de experimentação, com água e ração padrão ad libitum. Durante 12 semanas os animais foram tratados com 20 mg/kg/dia (via intraperitoneal) de albumina de rato não glicada (AC) ou glicada (AG). Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo 002/14).

4.1.2 Animais utilizados nas incubações *in vitro*

Foram utilizados ratos Wistar, obtidos junto ao Biotério de Criação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e acondicionados no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para extração de músculo esquelético sóleo, utilizado nos estudos *in vitro*. Esse protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo número 124, folha 134, livro 2).

4.2 Procedimentos experimentais

4.2.1 Coleta das amostras

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico 50 mg/Kg (Thiopentax, Cristalia Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Lindóia, São Paulo), e os procedimentos foram iniciados somente quando os animais não apresentavam mais os reflexos corneanos e de retirada da pata à dor. Os músculos sóleo esquerdo e direito foram cuidadosamente dissecados para posterior incubação *in vitro*.

4.2.2 Processo de glicação da albumina

Albumina bovina defatada (Sigma- Aldrich, Steinheim, Alemanha) e albumina de rato defatada (A6414; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), para uso *in*

vitro e *in vivo*, respectivamente, foram submetidas à glicação avançada na presença de 10 mM de glicolaldeído (GAD; Sigma- Aldrich, Fluka-Buchs, Alemanha), dissolvido em tampão fosfato (PBS) (NaCl 137 mmol/L; Na₂HPO₄ 4 mmol/L; K₂PO₄ 1 mmol/L) contendo EDTA (pH 7,4) em condições estéreis, atmosfera de nitrogênio e banho de água a 37 °C, sob agitação lenta, durante 4 dias. Albumina controle (AC) foi preparada apenas na presença de PBS/EDTA. As amostras foram dialisadas contra PBS/EDTA, esterilizadas em filtro 0,22 µm. A concentração final de proteína foi determinada pelo método de (LOWRY et al., 1951).

As albuminas utilizadas no presente estudo foram gentilmente cedidas pela Dra. Marisa Passarelli (LIM 10 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) e o processo de glicação já foi utilizada em vários estudos (MACHADO-LIMA, et al. 2015; OKUDA, et al., 2012.)

4.2.3 Teste de tolerância à insulina

Os animais que foram tratados com albumina de rato modificada ou não por glicação avançada ficaram em restrição alimentar por 4 horas e os testes foram realizados entre 9 e 11 horas. Após anestesia com thiopental sódico, foi coletado sangue da cauda para avaliação da glicemia basal (tempo 0). Então foi administrada insulina regular (0,75U/kg) pela veia peniana, e, foram coletadas amostras de sangue de 5 em 5 minutos até 30 minutos. A glicose foi medida medida em glicosímetro (Advantage, Roche). A constante de decaimento da glicose (kITT) ao longo do teste foi calculada a partir da regressão linear do logaritmo neperiano dos valores de glicemia.

4.2.4 Incubação do músculo *in vitro*

Após a remoção, os músculos foram incubados em tampão Krebs-Henseleit, pH 7,4, oxigenado com 95% O₂:5% CO₂, à temperatura de 37 °C, e acrescido de glicose 8 mM, e 1 mg/mL de albumina controle (sóleo direito) ou albumina modificada por glicação avançada (sóleo esquerdo). O tempo de incubação foi de 150 minutos na maioria das análises, exceto na avaliação da proteína GLUT4, em que o tempo foi estendido para 300 e 450 minutos. A solução de incubação foi trocada a cada hora. Ao final da incubação, os músculos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para análise posterior.

4.2.5 Avaliação da expressão gênica por RT - qPCR

A quantificação do mRNA dos genes *Slc2a4*, *Ddost* e *Ager* (genes que codificam as proteínas GLUT4, AGER1 e RAGE respectivamente) foi realizada por PCR (polimerase chain reaction) em tempo real (RT - qPCR), conforme previamente descrito (LIMA, 2011). A extração do RNA total foi feita pelo método do Trizol, conforme instruções do fabricante (Trizol Reagent, Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, USA).

Primeiramente foi produzido o DNA complementar (cDNA) a partir de 1 µg de RNA total, e utilizando-se 1 µL de ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, USA), 1 µL de *primers* randômicos (0,5 µg) (Life Technologies, USA), 1 µL de nucleotídeos dNTP mix (0,5 mM) (Invitrogen Life Technologies, USA), 2,4 µL MgCl₂ (3 mM) (Promega, USA), 4 µL de ImProm-II 5x™ reaction buffer (1x) (Promega, USA) e água deionizada para volume final de 20 µL. As reações foram incubadas por 50 minutos à 42 °C, seguida de aquecimento à 70 °C por 15 minutos para desnaturação da enzima no equipamento Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Após a transcrição reversa, os cDNAs foram utilizados para a q-PCR utilizando-se o sistema Taqman (Invitrogen Life Technologies, USA). A sequência dos iniciadores e das sondas para os genes *Slc2a4*, *Ddost*, *Ager* e *B2m* foram:

- *Slc2a4*: Forward: 5'-GGCTGTGCCATCTTGATGAC-3'; Reverse: 5'-CACGATGGACACATAACTCATGGAT-3'; Sonda: 5'-FAM-AACCCGCTCCAGCAGC-MGB3' (Taqman) fornecida pela empresa Applied Biosystems™;
- *Ddost* Sequências de primers e sondas inventoriados pela Applied Biosystems™ (código Rn01518759_m1)
- *Ager* Sequências de primers e sondas inventoriados pela Applied Biosystems™ (código Rn01525753_g1)
- *B2m* Sequências de primers e sondas inventoriados pela Applied Biosystems™ (código Rn00560865_m1).

A diluição do cDNA para cada gene foi otimizada a partir de uma curva padrão, que possibilitou avaliar a linearidade e a eficiência da amplificação. As diluições utilizadas foram: 1:1; 1:2; 1:4; 1:8 e 1:16 de cDNA. As diluições de amostra e os respectivos valores de C_t foram colocados num gráfico que permitiu verificar a relação entre essas duas variáveis ($C_t \times \log$ da diluição de cDNA). Os sinais de fluorescência foram detectados pelo equipamento StepOne Plus Instrument (Applied Biosystems, USA), e os dados foram analisados em “software” próprio do equipamento. Durante a fase exponencial da amplificação, foi gerado um valor numérico, denominado *cycle threshold* (C_t).

Para cada amostra de cDNA, foi realizado um Δ dos valores de C_t do gene alvo com os valores de C_t do gene de referência. Este cálculo é denominado como ΔC_t , no qual é feita a subtração do valor de C_t do gene de referência pelo valor de C_t do gene alvo. Para avaliar a variação de expressão gênica entre os grupos, foi utilizado o parâmetro de $\Delta\Delta C_t$, que é calculado a partir da subtração do valor médio de ΔC_t do "calibrador" (neste caso o calibrador foi o valor médio de ΔC_t dos músculos incubados com albumina controle) pelo valor de ΔC_t das amostras. Os dados de $\Delta\Delta C_t$ foram transformados em escala logarítmica ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) para avaliação final.

4.2.6 Avaliação de proteínas por Western Blotting

A quantificação das proteínas GLUT4, pIKKA, pIKKB, NFkB1, RELA, IKBA, IKBB, GRP78 e GRP94 foi feita pela técnica de Western Blotting. Distintos procedimentos de extração de proteínas foram utilizados, conforme a proteína alvo.

Para avaliação do GLUT4 utilizou-se uma fração enriquecida em proteínas de membranas totais (membrana plasmática + membranas de vesículas intracelulares), conforme previamente descrito (LIMA et al., 2009). Resumidamente, as amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, e sacarose 250 mM, e então centrifugadas a 1.000 g, por 10 minutos, à 4 °C. O precipitado foi ressuspensão e centrifugado novamente a 1.000 g por 10 minutos. Os dois sobrenadantes foram então centrifugados a 150.000 g, por 75 minutos, à 4 °C. O *pellet* foi ressuspensão em tampão de homogenização.

Para avaliação das proteínas IKKA, IKKB, IKBA, IKBB, GRP78 e GRP94 utilizou-se uma fração de proteínas totais da célula. Os músculos foram

homogeneizados em tampão TRIS 100 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM, Triton X-100 1% e aprotinina 0,01 mg/mL, em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g, à 4 °C por 20 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para avaliação pIKKA, pIKKB, IKBA, IKBB, GRP78 e GRP94.

Para avaliação das isoformas de NFkB (RELA e NFkB1) foram utilizadas frações de proteínas citosólicas e nucleares. As proteínas nucleares foram extraídas com base no método descrito por Andrews e Faller (1991). Amostras de tecido congelado foram trituradas em um suporte de cerâmica com nitrogênio líquido, e colocadas em tubos eppendorf de 1,5 mL, onde foi acrescentado 1 mL de PBS 1X gelado, seguindo-se uma centrifugação a 1.000 g, 10 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi estocado como fração citosólica. Ao *pellet* (contendo núcleos) foi adicionado 500 µL de tampão de lise gelado (HEPES-KOH, pH 7,9, 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, PMSF 0,2 mM e DTT 0,5 mM), a mistura foi mantida em repouso no gelo (10 minutos), e posteriormente centrifugada a 12.000 g, por 10 segundos e à 4°C. O *pellet* resultante foi ressuspenso em 100 µL de tampão de extração gelado (HEPES-KOH, pH 7,9, 20 mM, glicerol 25%, NaCl 420 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 0,2 mM e PMSF 0,2 mM), incubado no gelo por 20 minutos, e centrifugado por 2 minutos a 12.000 g à 4 °C. O sobrenadante, enriquecido em proteínas nucleares, foi aliquoteado e armazenado à -80 °C.

Em todas as amostras, a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford.

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), e transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK), conforme previamente descrito (OKAMOTO et al., 2011).

As membranas de nitrocelulose foram incubadas, conforme a proteína alvo, com os anticorpos e respectivas diluições descritos abaixo:

- Anti-GLUT4: 1:3.000 (rabbit anti-GLUT4 polyclonal antibody, Millipore - Cat. #07-1404);
- Anti-pIKK α /B: 1:1.000 (rabbit anti-pIKK α /B Ser¹⁸⁰/Ser¹⁸¹ polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology - Cat. sc-23470-R);
- Anti-IKBA: 1:1.000 (rabbit anti-IkBa polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology - Cat. sc-371);
- Anti-IKBB: 1:1.000 (rabbit anti-IkB β polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology - Cat. sc-945);
- Anti-NFKB1: 1:500 (goat anti-p50 polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology - Cat. sc-1190);
- Anti-RELA: 1:500 (rabbit anti-p65 polyclonal antibody, Abcam - Cat. ab-7970);
- Anti-GRP78/94 1:1.000 (mouse anti-KDEL, Enzo Lifesciences - Cat. ADI-SPA-827-F).

As membranas foram então reveladas pela técnica de quimioluminescência, e imediatamente expostas a filme de RX (Hyperfilm – Amersham, Buckinghamshire, UK), durante 1 a 15 minutos.

A intensidade dos *blots* foi avaliada por densitometria óptica (software Image Quant TL, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, SW). A densidade ótica de cada *blot* foi normalizada pela densidade ótica da respectiva trilha, avaliada na membrana corada com Ponceau. Os resultados foram então novamente normalizados, considerando-se a média do grupo controle em cada membrana como 100. Os conteúdos finais foram expressos em unidades arbitrárias por μ g de proteína aplicada no gel (UA/ μ g).

4.2.7 Atividade de ligação do NFKB no promotor do *Slc2a4*

A atividade de ligação do fator de transcrição NFKB na região promotora do gene do *Slc2a4* foi avaliada por Ensaio de Mobilidade Eletroforética (*Eletrophoretic Mobility Shift Assay – EMSA*), conforme previamente descrito (FURUYA et al., 2013).

O oligonucleotídeo utilizado no Ensaio de Mobilidade eletroforética foi anelado com o seu complemento e sua sequência está descrita abaixo:

- (5'-GGGTGGGGGCGTGGCCTTTTGG-3') correspondente à sequência -134/-113 do gene do *Slc2a4* de camundongos, já demonstrada como sítio de ligação de NFkB1 e RELA (FURUYA et al., 2013).

Vale ressaltar que a sequência utilizada (do gene de camundongo) corresponde à sequência -166/-144 do gene do rato, apresentando 95% de homologia (na sequência do rato ocorre a inserção de um “T” na posição -131 da sequência âncora da extremidade 5’; portanto, com o sítio de ligação de NFkB totalmente conservado. Já foi confirmada a eficiência desse oligonucleotídeo para detecção de NFkB em proteínas nucleares de rato (FURUYA et al., 2013).

Inicialmente, 250 ng do oligonucleotídeo de dupla fita foram marcados com p³²-γATP (PerkinElmer Life, Waltham, MA, USA) utilizando-se 1 μL da enzima T4 poliquinase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Ao final, a mistura foi purificada em coluna de Sephadex, por centrifugação a 1.000 g, por 4 minutos. Uma alíquota do produto (1 μL) foi utilizada para contagem em contador β (Perkin Elmer Life, Waltham, MA, EUA).

Em alíquotas contendo 10 μg de proteínas nucleares foram adicionados 6 μL de tampão de ligação (60 mM HEPES, pH 7,6, 10% glicerol, KCl 150 mM, EDTA 0,6 mM, DDT 3 mM), contendo 1,5 μg de Poli dl-dC, 1 μL de sonda marcada (1,5x10⁵ cpm) e água bidestilada autoclavada para completar o volume para 15 μL. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos, para permitir a ligação de proteínas nucleares à sonda.

O material foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 4% não desnaturante. Ao final da eletroforese, o gel foi transferido para folha de papel de filtro, secado a vácuo por 60 minutos à 80 °C e exposto a filme RX, à -80 °C por 7 dias. Os blots foram quantificados por densitometria ótica conforme descrito acima.

4.3 Análise estatística

Foi utilizado o teste “t” de Student pareado para a comparação de variáveis analisadas nos músculos incubados com albumina controle (AC) e nos músculos incubados com albumina modificada por glicação avançada (AG), ambos provenientes do mesmo animal, e processados ao mesmo tempo. Para a análise de variáveis em músculos de animais tratados ou não com albumina glicada de rato foi

utilizado o teste "t" de Student não pareado. O *software* utilizado para realizar a análise estatística foi o *Graph Pad Prism* 5.00. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM, e o nível de significância e o número de animais são mostrados na legenda das figuras.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da albumina glicada em músculos de ratos tratados por 90 dias.

5.1.1 Teste de tolerância a insulina

A figura 4 mostra que o tratamento com albumina glicada reduziu o decaimento da glicose em resposta à insulina.

Figura 4 - Efeito da albumina glicada sobre a sensibilidade à insulina. Constante de decaimento da glicose (kITT), obtida a partir do teste de tolerância à insulina, em animais tratados (AG) ou não (AC) com albumina glicada. Os resultados são média $\pm$ EPM de 4 amostras, * $P < 0,05$.

5.1.2 Efeito do tratamento com albumina glicada na expressão de *Slc2a4*/GLUT4

A figura 5 mostra que o tratamento com albumina glicada induziu uma redução na expressão do mRNA *Slc2a4* e da proteína GLUT4.

Figura 5 - Efeito da albumina glicada sobre a expressão de *Slc2a4* e GLUT4 em músculo sóleo. Os ratos foram tratados (AG) ou não (AC) durante 90 dias com albumina glicada, e então os músculos sóleos foram colhidos para avaliação do mRNA *Slc2a4* (A) e da proteína GLUT4 (B). Os resultados são média $\pm$ EPM de 6 a 7 amostras, * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

5.1.3 Efeito do tratamento com albumina glicada na expressão gênica dos receptores para AGEs

A figura 6 mostra que o tratamento dos ratos com albumina glicada foi capaz de reduzir a expressão do gene que codifica a proteína AGER1 (*Ddost*), mas não alterou estatisticamente a expressão do gene que codifica a proteína RAGE (*Ager*).

Figura 6 - Efeito do tratamento com albumina glicada sobre a expressão gênica dos receptores para AGEs *Ager* e *Ddost* no músculo sóleo. Expressão do mRNA *Ager* (A) e do mRNA *Ddost* (B) em músculo de animais tratados (AG) ou não (AC) com albumina glicada. Os resultados são média ± EPM de 5 a 7 amostras, * $P < 0,05$.

5.1.4 Efeito do tratamento com albumina glicada na atividade da via do NF κ B

A figura 7 mostra que o tratamento por 90 dias com albumina glicada não foi capaz de aumentar a fosforilação das proteínas IKKA e IKKB.

Figura 7 - Efeito do tratamento com albumina glicada sobre a fosforilação das proteínas IKKA e IKKB no músculo sóleo. Conteúdo da fosfo-IKKA (**A**) e fosfo-IKKB (**B**) no músculo sóleo de ratos tratados (AG) ou não (AC) com albumina glicada. Os resultados são média $\pm$ EPM de 5 a 7 amostras.

A figura 8 mostra que o tratamento com albumina glicada também não alterou a expressão das proteínas IKBA e IKBB.

Figura 8 - Efeito do tratamento com albumina glicada sobre a expressão de IKBA e IKBB no músculo sóleo. Conteúdo de IKBA **(A)** e IKBB **(B)** em músculos de animais tratados (AG) ou não (AC) com albumina glicada. Os resultados são média $\pm$ EPM de 5 a 7 amostras.

A figura 9 mostra que o conteúdo de RELA, tanto no citosol como no núcleo, e o conteúdo de NFKB1 no citosol não se alterou em músculos de animais tratados com albumina glicada. Entretanto, o conteúdo nuclear de NFKB1 aumentou significativamente em resposta ao tratamento ($P<0,05$).

Figura 9 - Efeito do tratamento com albumina glicada sobre o conteúdo de NFKB1 e RELA em músculo sóleo. Conteúdo de NFKB1 (A e B) e RELA (C e D) nos compartimentos citosólico (A e C) e nuclear (B e D) de músculo de animais tratados (AG) ou não (AC) com albumina glicada (AG). Os resultados são média $\pm$ EPM de 5 a 7 amostras, * $P<0,05$.

5.1.5 Avaliação de marcadores do estresse de retículo

A figura 10 mostra a imagem típica de um ensaio de Western Blotting com as bandas referentes às proteínas identificadas pelo anticorpo anti-KDEL. Para a quantificação das diferentes bandas foram utilizados diferentes tempos de exposição do filme da autorradiografia. O ensaio indentifica as chaperonas GRP78 e GRP94, além de uma outra banda de peso molecular ~55 kDa.

Figura 10 - Ensaio Western Blotting com o anticorpo anti-KDEL. Amostras de proteínas citoplasmáticas de músculo foram submetidas a Western Blotting com a utilização do anticorpo anti-KDEL. Quantidades iguais de proteínas foram aplicadas em gel de acrilamida (30µg).

A figura 11 mostra que a expressão da chaperona GRP78 aumentou em resposta ao tratamento com albumina glicada, mas nenhum efeito foi observado na GRP94.

Figura 11 - Efeito do tratamento com albumina glicada sobre o conteúdo proteico de GRP78 e GRP94 no músculo sóleo. GRP78 (A) e GRP94 (B) foram avaliadas em músculo de ratos tratados (AG) ou não (AC) com albumina glicada. Os resultados são média $\pm$ EPM de 6 a 7 amostras, ** $P < 0,01$.

5.2 Efeito *in vitro* da albumina glicada sobre o músculo sóleo

5.2.1 Efeito da albumina glicada na expressão de *Slc2a4*/GLUT4

A figura 12 mostra que a albumina glicada durante 150 minutos de incubação, reduziu a expressão do mRNA *Slc2a4* (50%, $P<0,01$), mas não alterou a proteína GLUT4.

Figura 12 - Efeito *in vitro* da albumina glicada sobre a expressão gênica do *Slc2a4* e proteica do GLUT4 em músculo sóleo. Expressão do mRNA *Slc2a4* (**A**) e da proteína GLUT4 (**B**) em músculos incubados (AG) ou não (AC) com albumina glicada (AG). Os resultados são média $\pm$ EPM de 5 a 8 amostras, ** $P<0,01$.

A figura 13 mostra que a ampliação do tempo de incuacão dos músculos com albumina glicada termina por evidenciar uma redução ($P<0.05$) no conteúdo de proteína GLUT4: 10% e 25 % após 300 e 450 minutos respectivamente.

Figura 13 - Efeito *in vitro* da albumina glicada sobre a expressão do GLUT4 em músculo sóleo. Músculos sóleos foram incubadas (AG) ou não (AC) com albumina glicada durante 300 **(A)** ou 450 **(B)** minutos. Os resultados são média $\pm$ EPM de 5 amostras, * $P<0,05$.

5.2.2 Efeito da albumina glicada na expressão gênica dos receptores para AGEs

A figura 14 evidencia que a albumina glicada induziu aumento na expressão do gene que codifica a proteína RAGE ($P<0,05$). Entretanto, o gene que codifica a proteína AGER1 encontra-se inalterado nos músculos incubados com albumina glicada.

Figura 14 - Efeito *in vitro* da albumina glicada sobre a expressão gênica de *Ager* e *Ddost* em músculo sóleo. Expressão do mRNA *Ager* (A) e do mRNA *Ddost* (B) em músculo sóleo incubado na presença (AG) ou não (AC) de albumina glicada. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM de 7 amostras, * $P<0,05$.

5.2.3 Efeito da albumina glicada na via do NF κ B

A figura 15 mostra que a albumina glicada aumentou da fosforilação do IKKA em 30% ($P<0,01$) e do IKKB em 14% ($P<0,05$).

Figura 15 - Efeito *in vitro* da albumina glicada sobre a fosforilação das proteínas IKKA e IKKB no músculo sóleo. Conteúdo de p-IKKA (**A**) e p-IKKB (**B**) em músculos incubados (AG) ou não (AC) com albumina glicada. Os resultados são média $\pm$ EPM de 6 amostras, * $P<0,05$, ** $P<0,01$.

A figura 16 mostra que o conteúdo proteico de IKBA e IKBB reduziu em músculos incubados com albumina glicada ($P<0,05$).

Figura 16 - Efeito *in vitro* da albumina glicada sobre o conteúdo de IKBA e IKBB no músculo sóleo. Conteúdo de IKBA (A) e IKBB (B) em músculo incubado (AG) ou não (AC) com albumina glicada. Os resultados são média $\pm$ EPM de 6 a 7 amostras, * $P<0,05$.

A figura 17 mostra que músculos incubados com albumina glicada não alteraram o conteúdo citosólico de NFkB1 e RELA; entretanto, aumentou o conteúdo nuclear, tanto de NFkB1 como de RELA.

Figura 17 - Efeito *in vitro* da albumina glicada sobre o conteúdo de NFkB1 e RELA em músculo sóleo. Conteúdo de NFkB1 (**A e B**) e de RELA (**C e D**) em frações de proteínas citosólicas (**A e C**) e nuclear (**B e D**) de músculos tratados (AG) ou não (AC) com albumina glicada. Os resultados são média $\pm$ EPM de 6 a 7 amostras, * $P < 0,05$.

A figura 18 mostra imagem de ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA), demonstrando: 1) que a adição de oligonucleotídeo não marcado vai apagando a imagem (lanes 3 a 5) quando comparada à imagem padrão mostrada na lane 6; e 2) que o emprego de quantidades crescentes de proteína nuclear vai aumentando a imagem dos complexos moleculares (lanes 7 a 9). Além disso, a imagem mostra a presença de pelo menos 2 complexos DNA/proteína, designados como complexo A (banda mais lenta) e complexo B (banda mais rápida), semelhante ao previamente descrito (FURUYA et al., 2013).

Figura 18 - Padronização do Ensaio de Mobilidade Eletroforética. Na “Lane” 1, oligonucleotídeo marcado puro (OP); “lane” de 2 à 6, oligonucleotídeo marcado + 5 µg de proteínas nucleares + oligo não marcado 0x (“lane” 6), 5x (“lane” 2), 10x (“lane” 3), 50x (lane 4), 100x (lane 5); “lanes” 7 a 8, oligonucleotídeo marcado + quantidades crescentes de proteínas nucleares (5, 10 e 15 µg, da esquerda para a direita). As setas indicam as bandas, designadas como complexos A e B.

Na figura 19 são apresentados os resultados da atividade de ligação de proteínas nucleares no sítio de ligação do NFkB no promotor do gene *Slc2a4*, em amostras proteínas nucleares de músculos incubados *in vitro* com albumina glicada por 150 minutos. Observa-se que a albumina glicada aumentou a formação do complexo A em 110% ($P<0,05$) e do complexo B em 46% ($P<0,05$).

Figura 19 - Efeito *in vitro* da albumina glicada sobre a atividade de ligação de proteínas nucleares no sítio NFkB do promotor do *Slc2a4* em músculo sóleo. Quantificação dos complexos A (**A**) e B (**B**) formados a partir de proteínas nucleares extraídas de músculos incubados (AG) ou não (AC) com albumina glicada (AG). Imagem representativa do ensaio de mobilidade eletroforética (**C**). Os resultados (A e B) são média $\pm$ EPM de 7 amostras, * $P<0,05$.

5.2.4 Avaliação de marcadores do estresse de retículo

A figura 20 mostra que a albumina glicada aumentou a expressão de ambas chaperonas, GRP78 em 30% ($P<0,05$) e GRP94 em 80% ($P<0,05$). Paralelamente, observou-se também aumento da proteína de 55 kDa reconhecida pelo anticorpo anti-KDEL (dado não apresentado).

Figura 20 - Efeito *in vitro* da albumina glicada sobre o conteúdo de GRP78 e GRP94 no músculo sóleo. Conteúdo de GRP78 (**A**) e GRP94 (**B**) em músculos incubados (AG) ou não (AC) com albumina glicada. Os resultados são média ± EPM de 8 amostras, * $P<0,05$.

6 DISCUSSÃO

O DM é caracterizado por hiperglicemia, devido à deficiência na secreção e/ou na ação da insulina, o que envolve uma miríade de alterações fisiopatológicas. Consequentemente, uma crescente farmacopéia vem se desenvolvendo, visando melhorar o controle glicêmico, tanto no tratamento do DM1 como do DM2 (DEGEETER, 2014; KAHN et al., 2014). Nesse sentido, a caracterização de novos mecanismos fisiopatológicos do DM contribui sempre para a busca de novas estratégias terapêuticas.

O dismetabolismo induzido pela alta concentração de glicose resulta na formação exacerbada de produtos de glicação avançada (AGEs) (GOLDIN et al., 2006; PEPPA et al., 2003), que podem se acumular tanto no meio extra como no intracelular, notadamente em células relacionadas ao sistema vascular. No DM, a maior geração de AGEs tem sido claramente associada a aumento no risco de desenvolvimento de alterações microvasculares e macrovasculares (STIRBAN et al., 2014), que estão implicadas no desenvolvimento da maioria das complicações crônicas do DM. Assim, muito tem sido investigado sobre o papel dos AGEs no desenvolvimento de disfunções vasculares e complicações crônicas do DM; entretanto, pouca ou nenhuma importância tem sido dada a uma possível participação dos AGEs na própria homeostasia glicêmica. Devido ao papel fundamental que o tecido muscular desempenha na regulação da glicemia (DE FRONZO, 2004), o músculo é, por conseguinte, o melhor alvo para investigação do efeito dos AGEs na captação de glicose e consequentemente no controle glicêmico.

No DM, o aumento das concentrações circulantes e/ou locais de AGEs cursa com disregulações do metabolismo de carboidratos e de lípidos, as quais por si mesmas contribuem para o comprometimento do controle glicêmico, dificultando a demonstração de efeitos próprios e diretos dos AGEs sobre o controle glicêmico. Por isso, iniciamos o presente estudo investigando o efeito do tratamento de ratos normais com AGEs, nos quais não coexistem as alterações metabólicas comuns do DM. De fato, observamos o desenvolvimento de um estado de resistência à insulina, no qual a depuração de glicose sanguínea em resposta ao hormônio está reduzida. Esse efeito deve decorrer de menor captação de glicose pela musculatura

esquelética, uma vez que o conteúdo de GLUT4 reduziu de maneira importante na célula muscular. Essa diminuição de GLUT4 foi um efeito transcricional, uma vez que semelhante redução foi observada na expressão do mRNA *Slc2a4*.

Sabendo que os AGEs podem interferir na homeostasia celular por ativar vias inflamatória e/ou de estresse de retículo, efeitos esses que podem modular a expressão de *Slc2a4*/GLUT4, investigamos como alguns marcadores dessas vias. Embora alguns marcadores dessas vias não tenham se alterado, observamos que o conteúdo nuclear de NFκB1 (mediador inflamatório) e o conteúdo de GRP78 (marcador de estresse de retículo) estavam aumentados. Nosso grupo já demonstrou que a ativação de NFκB1 (FURUYA, 2013; MORAES et al., 2014), assim como a ativação do estresse de retículo (SILVA, 2012), são capazes de inibir a expressão de *Slc2a4*/GLUT4. Em conjunto, essas observações indicam os AGEs, *in vivo*, podem induzir uma redução de GLUT4 que leva ao comprometimento da sensibilidade insulínica e consequentemente do controle glicêmico.

Afim de confirmar, e melhor esclarecer o efeito direto dos AGEs sobre a expressão do transportador de glicose no músculo, partimos para investigação *in vitro*, na qual o músculo é exposto aos AGEs durante poucas horas, e sabendo que inibição da expressão de *Slc2a4*/GLUT4 já foi observada em 3 horas.

Nossos resultados mostraram que o mRNA *Slc2a4* está reduzido em 50% após 2 horas e meia de exposição à albumina glicada, entretanto a redução significativa na proteína GLUT4 somente foi observada a partir de 5 horas, e ficando mais evidente (25%) em 7 horas e meia. Respostas de aumento na expressão de *Slc2a4* e GLUT4 já foram observadas bem mais rapidamente: 30 a 70 minutos no mRNA *Slc2a4* (LIMA et al., 2009; SILVA et al., 2005) e 2 a 3 horas na proteína GLUT4 (LIMA et al., 2009; MORAES et al., 2014). Entretanto, redução no conteúdo da proteína é um fenômeno que envolve, além do efeito repressor da transcrição, todos os mecanismos de degradação da proteína que determinam sua meia-vida, o que pode ser bastante variável. Já foi demonstrada redução da proteína GLUT4: 1) em células musculares L6 após 16 horas de exposição aos ácidos graxos linoléico e oléico (POLETTTO et al., 2015), 2) em células 3T3-L1 após 24 horas de exposição ao agonista seletivo do receptor 1 do estradiol 1 (ESR1) (CAMPELLO et al., 2013); e músculo esquelético incubado em condições semelhantes às do presente estudo, após 3 horas de exposição ao fator de necrose tumoral alfa (TNF) (MORAES et al.,

2014). Em conjunto, esses estudos advertem que o efeito de redução de conteúdo do GLUT4 pode variar de acordo com a maquinaria de degradação proteica ativada em cada tipo celular. Adicionalmente, foi descrito que a captação de glicose estimulada por insulina em célula muscular C2C12 exposta à albumina glicada está inalterada após 4 horas, mas diminuída após 8 horas (WU et al., 2011); o que está de acordo com nossa observação de que o GLUT4 começa a reduzir a partir de 5 horas.

Já foi demonstrado que os AGEs, a partir de sua ligação ao receptor, podem induzir estresse de retículo endoplasmático (PIPERI et al., 2012), uma importante resposta celular, que visa a manutenção da homeostasia celular, e na qual um excelente marcador é o aumento na expressão de chaperonas (ENGIN; HOTAMISLIGIL, 2010; SCHEUNER; KAUFMAN, 2008). No presente estudo, a albumina glicada *in vitro* induziu um claro aumento na expressão de GRP78 e GRP94, reforçando os indícios observados *in vivo*. Já foi demonstrado, em células endoteliais de aorta, que o estresse de retículo induzido por concentrações crescentes de nitrato de chumbo ativa primeiramente a chaperona GRP78, e apenas com doses maiores ativa a GRP94 (SHINKAI et al., 2010). Por paralelismo, podemos propor que o tratamento *in vivo* ainda não tenha sido suficiente (por questão de dose e/ou tempo) para ativar a GRP94.

Um fundamental passo na resposta ao estresse de retículo é a ativação de IRE1, capaz de recrutar/ativar proteínas TRAFs, a partir das quais pode ocorrer a ativação das vias canônica e não-canônica do NFKB (DUTTA et al., 2006; HU et al., 2006). Além disso, há indícios de que vias pró-inflamatórias possam ser diretamente ativadas por RAGE, independentemente de estresse de retículo (WENDT et al., 2006; YAMAGISHI et al., 2008). De fato, o estudo *in vitro* confirmou a ativação da via inflamatória que leva a ativação dos fatores transcrpcionais NFKB1 e RELA, comprovadamente potentes repressores transcrpcionais do *Slc2a4*, e, consequentemente, do GLUT4 (FURUYA et al., 2013). Os resultados *in vitro* evidenciaram: 1) o aumento na fosforilação de IKKA e IKKB, passo inicial da via canônica de ativação do NFKB; 2) a redução no conteúdo citosólico das proteínas inibidoras do NFKB (IKBA e IKBB), que são degradadas em resposta a ativação de IKKA/B; e 3) o aumento do conteúdo nuclear de NFKB e RELA, lembrando que é a

degradação de IKBA e IKBB que libera NFkB e RELA para translocar ao núcleo (TAK; FIRESTEIN, 2001).

Para confirmar que a ativação da via inflamatória estaria regulando a expressão de *Slc2a4*/GLUT4, analisamos a ligação das proteínas nucleares extraídas de músculos incubados com AGEs em oligonucleotídeo que contém o domínio de ligação NFkB1/RELA. Essa análise (EMSA), revelou a formação de 2 complexos moleculares A e B, os quais aumentam em cerca de 100% e 50% após exposição à albumina glicada. Considerando que a presença das isoformas NFkB1 e RELA já foi confirmada em ambos os complexos, por meio de competição com anticorpos específicos (FURUYA et al., 2013), pode-se afirmar que a albumina glicada além de translocar NFkB1 e RELA para o núcleo, aumentou a ligação desses fatores no promotor do *Slc2a4*. Considerando estudo de *gene reporter* realizado por Furuya e colaboradores (FURUYA et al., 2013), que demonstrou que esse domínio kappa B tem efeito repressor na transcrição do *Slc2a4*, podemos concluir que a albumina glicada esteja reduzindo a expressão de *Slc2a4*/GLUT4 por mecanismo que envolve a ativação da via inflamatória em toda a sua extensão.

Finalmente, é importante que se discutam os resultados observados em relação à expressão dos genes que codificam os receptores para AGEs. A literatura mostra que os diferentes receptores para AGE têm respostas celulares muito distintas. A interação dos produtos de glicação avançada com o receptor RAGE (gene *Ager*) é responsável por aumentar estresse oxidativo e atividade inflamatória, principalmente na vigência de concentrações elevadas de glicose (COUGHLAN et al., 2009). Por outro lado a interação de AGEs com o receptor AGER1 (gene *Ddost*) pode induzir captação e posterior degradação dos AGEs, mostrando assim um potencial benéfico de contrarregulação. De fato, a superexpressão de AGER1 em camundongos protege o animal frente a estresse oxidativo e inflamação induzidos por AGEs (TORREGGIANI et al., 2009), e o efeito anti-inflamatório do AGER1 foi confirmado em estudos de superexpressão, em células ovarianas, e de silenciamento, em células mesangiais (LU et al., 2004). Assim, no presente estudo, tanto a redução da expressão do mRNA *Ddost* (AGER1) observada *in vivo*, como o aumento da expressão de *Ager* (RAGE) observado *in vitro*, são regulações que favorecem o desenvolvimento dos efeitos injuriantes dos AGEs, participando da ativação de respostas inflamatória, de estresse oxidativo e de estresse de retículo.

Em conjunto, tanto *in vitro* como *in vivo* AGE parece estar reduzindo expressão de *Slc2a4*/GLUT4 pela ativação de via inflamatória, mas com participação distinta dos receptores RAGE e AGER1. Não podemos, entretanto, descartar a possibilidade de que esses 2 mecanismos se intercanbalem de forma tempo dependente.

Já está bem evidenciado na literatura que o DM induz menor expressão de *Slc2a4*/GLUT4 (CORRÊA-GIANNELLA; MACHADO, 2013), fenômeno associado ao agravamento à perda de controle glicêmico. Essa redução de *Slc2a4*/GLUT4 no DM tem sido relacionada tanto à resistência insulínica (FURUYA et al., 2010; MORI et al., 2008) como à hiperglicemia *per se* (HWANG, 2005; OKAMOTO et al., 2011; PAPA et al., 1997). Nesse contexto, o presente estudo adiciona um novo controle inibitório do *Slc2a4*/GLUT4, exercido direta e exclusivamente por AGE, colocando essa regulação num círculo vicioso, conforme proposto na figura 21, no qual os AGES gerados pela hiperglicemia, realimentam a hiperglicemia.

Figura 21 - Círculo vicioso dos produtos de glicação avançada (AGEs) sobre a homeostasia glicêmica. A hiperglicemia gera AGEs; a interação dos AGEs com seus receptores específicos reprimem o *Slc2a4*/GLUT4 por meio da ativação do NFKB e pela ativação de estresse de retículo endoplasmático (ER), fato este que pode reduzir captação periférica de glicose, exacerbando assim o quadro de hiperglicemia, que por sua vez favorece a formação de AGEs.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo observou-se:

- 1) em ratos tratados com albumina glicada, resistência à insulina;
- 2) em músculo sóleo de ratos tratados com albumina glicada:
 - aumento da expressão proteica de GRP78 e do conteúdo nuclear de NFkB1;
 - redução na expressão do mRNA *Slc2a4* e da proteína GLUT4;
- 3) em músculo sóleo incubado com albumina glicada:
 - aumento na fosforilação das proteínas IKKA e IKKB;
 - redução da expressão proteica de IKBA e IKBB;
 - aumento na expressão das chaperonas Bip/GRP78 e GRP94;
 - aumento no conteúdo nuclear de NFkB1 e RELA;
 - aumento na atividade de ligação de proteínas nucleares no sítio de ligação de NFkB/RELA na região promotora do gene *Slc2a4*;
 - redução na expressão do mRNA *Slc2a4* e da proteína GLUT4.

Conclui-se, portanto, que a albumina modificada por glicação avançada é capaz de ativar rapidamente a via do NFkB, e com isso reduzir a expressão gênica/proteica de *Slc2a4*/GLUT4 em músculo esquelético, comprometendo a homeostasia glicêmica. Esse efeito representa mais uma ação deletéria dos AGEs no diabetes *mellitus*.

REFERÊNCIAS*

AGUIRRE, V.; UCHIDA, T.; YENUSH, L.; DAVIS, R.; WHITE, M. F. The c-Jun NH₂-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser³⁰⁷. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. (12), p. 9047-9054, 2000.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, **Diabetes Basics**. Alexandria, VA, 2014.

ANDREWS, N. C.; FALLER, D. V. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 2499, 1991.

ANELLI, T.; SITIA, R. Protein quality control in the early secretory pathway. **EMBO Journal**, v. 27, p. 315-327, 2008.

BURKART, E. M.; SAMBANDAM, N.; HAN, X.; GROSS, R. W.; COURTOIS, M.; GIERASCH, C. M.; SHOGHI, K.; WELCH, M. J.; KELLY, D. P. Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPAR alpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. (12), p. 3930-3939, 2007.

CASTILHO, G. **Inibição do estresse de retículo endoplasmático restaura o conteúdo de ABCA-1 e o efluxo de colesterol em macrófagos tratados com albumina modificada por glicação avançada**. 2012. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CAMPELLO, R. S.; ALVES-WAGNER, A. B. T.; ABDULKADER, F.; MORI, R. C. T.; MACHADO, U. F. Carbohydrate and lipid-enriched meals acutely disrupt glycemic homeostasis by inducing transient insulin resistance in rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v 90, p. 537-545, 2012.

COHEN, M. P. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, p. 25-30, 2003.

CORRÊA-GIANNELLA, M. L.; MACHADO, U. F. *SLC2A4* gene: a promising target for pharmacogenomics of insulin resistance. **Pharmacogenomics**, v. 14, n. (8), p. 847-850, 2013.

DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes *mellitus*. **Medical Clinics of North America**, v. 88, p. 787-835, 2004.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração: Rio de Janeiro, 2002.

DEGEETER, M.; WILLIAMSON, B. Alternative agents in type 1 diabetes in addition to insulin therapy: Metformin, alpha-Glucosidase inhibitors, Pioglitazone, GLP-1 agonists, DPP-IV inhibitors and SGLT-2 inhibitors. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 13, p. 1-16, 2014.

DUTTA, J.; FAN, Y.; GUPTA, N.; FAN, G.; GÉLINAS, C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- κ B. **Oncogene**, v. 25, p. 6800-6816. 2006.

ENGİN, F.; HOTAMISLIGİL, G. S. Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones: an emerging therapeutic approach for metabolic diseases. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 12, n. (2), p. 108-115, 2010.

FARESE, R. V.; SAJAN, M. P.; STANDAERT, M. L. Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): Actions and defects in obesity and type II diabetes. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230, n. (9), p. 593-605, 2005.

FINCK, B. N.; BERNAL-MIZRACHI, C.; HAN, D. H.; COLEMAN, T.; SAMBANDAM, N.; LARIVIERE, L. L.; HOLLOSZY, J. O.; SEMENKOVICH, C. F.; KELLY, D. P. A potential link between muscle peroxisome proliferator-activated receptor- α signalling and obesity-related diabetes. **Cell Metabolism**, v. 1, p. 133-144, 2005.

FURUYA, D. T.; POLETTO, A. C.; FAVARO, R. R.; MARTINS, J. O.; ZORN, T. M.; MACHADO, U. F. Anti-inflammatory effect of atorvastatin ameliorates insulin resistance in monosodium glutamate-treated obese mice. **Metabolism**, v. 59, p. 395-399, 2010.

FURUYA, D. T.; NERI, E. A.; POLETTO, A. C.; ANHÊ, G. F.; FREITAS, H. S.; CAMPELLO, R. S.; REBOUÇAS, N. A.; MACHADO, U. F. Identification of nuclear factor- κ B sites in the *Slc2a4* gene promoter. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 370, p. 87-95, 2013.

GAO, Z.; HWANG, D.; BATAILLE, F.; LEFEVRE, M.; YORK, D.; QUON, M. J.; YE, J. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor κ B kinase complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. (50), p. 48115-48121, 2002.

GLOMB, M. A.; MONNIER, V. M. Mechanisms of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the maillard reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. (17), p.10017-10026, 1995.

GOLDIN, A.; BECKMAN, J. A.; SCHMIDT, A. M.; CREAGER, M. A. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, p. 597-605, 2006.

HAMPTON, R. Y. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, p. 476-482, 2002.

HAN, D.; LERNER, A. G.; VANDE-WALLE, L.; UPTON, J. P.; XU, W.; HAGEN, A.; BACKES, B. J.; OAKES, S. A.; PAPA, F. R. IRE1 α kinase activation modes control alternate Endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. **Cell**, v. 138, p. 562-575, 2009.

HOLMES, B. F.; SPARLING, D. P.; OLSON, A. L.; WINDER, W. W.; DOHM, G. L. Regulation of muscle GLUT4 enhancer factor and myocyte enhancer factor 2 by AMP-activated protein kinase. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 289, p. E1071-E1076, 2005.

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

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. (14), p. 860-867, 2006.

HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. **Cell**, v. 140, n. (6), p. 900-917, 2010.

HUANG, S.; CZECH, M. P. The GLUT4 glucose transporter. **Cell Metabolism**, v. 5, p. 237-252, 2007.

HWANG, L. E.; LIU, I. M.; TZENG, T. F.; CHENG, J. T. Activation of imidazoline receptors in adrenal gland to lower plasma glucose in streptozotocin – induced diabetic rats. **Diabetologia**, v. 48, p. 767-775, 2005.

IM, S. S.; KWON, S. K.; KIM, T. H.; KIM, H. I.; AHN, Y. H. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. **IUBMB Life**, v.59, p. 134-145, 2007.

JAMES, S. R.; DOWNES, C. P.; GIGG, R.; GROVE, S. J.; HOLMES, A. B.; ALESSI, D. R. Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate without subsequent activation. **Biochemical Journal**, v. 315, n. (3), p. 709-713, 1996.

JESSEN, N.; GOODYEAR, L. J. Contraction Signalling to glucose transport in skeletal muscle. **Journal Applied of Physiology**, v. 99, p. 330-337, 2005.

KAHN, R.; DAVIDSON, M. B. the reality of type 2 diabetes prevention. **Diabetes Care**, v. 37, n. (4), p. 943-949, 2014.

KIM, I.; XU, W.; REED, J. C. Cell Death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. **Nature**, v. 7, p. 1013-1030, 2008.

KOSCHINSKY, T.; HE, C. J.; MITSUHASHI, T.; BUCALA, R.; LIU, C.; BUETING, C.; HEITMANN, K.; VLASSARA, H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 6474-6479, 1997.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, p. 1-10, 2009.

LIMA, G. A.; ANHÊ, G. F.; GIANNOCO, G.; NUNES, M. T.; CORREA-GIANNELLA, M. L.; MACHADO, U. F. Contractile activity *per se* induces transcriptional activation of *Slc2a4* gene in soleus muscle: involvement of MEF2D, HIF – 1 α , and TR α transcriptional factors. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, p.E132-E138, 2009.

LIN, J. H.; WALTER, P.; YEN, T. S. B. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. **Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease**, v.3, p. 399-425, 2008.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. (1), p. 265-275, 1951.

LU, C.; HE, J. C.; CAI, W.; LIU, H.; ZHU, L.; VLASSARA, H. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. (32), p. 11767-11772, 2004.

MACHADO-LIMA, A.; IBORRA, R.T.; PINTO, R.S.; CASTILHO, G.; SARTORI, C.H.; OLIVEIRA, E.R.; OKUDA, L.S.; NAKANDAKARE, E.R.; GIANNELLA-NETO, D.; MACHADO, U.F.; CORREA-GIANNELLA, M.L.; TRALDI, P.; PORCU, S.; ROVERSO, M.; LAPOLLA, A.; PASSARELLI, M. In type 2 diabetes mellitus glycated albumin alters macrophage gene expression impairing ABCA1-mediated cholesterol efflux. **J Cell Physiol**, v. 230, p. 1250-1257, 2015.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. Glucose transporters in the metabolic syndrome. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, p. 177-189, 2006.

MORAES, P. A.; YONAMINE, C. Y.; PINTO-JÚNIOR, D. C.; ESTEVES, J. V. D.; MACHADO, U. F.; MORI, R. C. Insulin acutely triggers transcription of *Slc2a4* gene: Participation of the AT-rich, E-box and NF κ B-binding sites. **Life Sciences**, v. 114, p. 36-44, 2014.

MORI, R. C. T.; HIRABARA, S. M.; HIRATA, A. E.; OKAMOTO, M. M.; MACHADO, U. F. Glimepiride as insulin sensitizer: increased liver and muscle responses to insulin. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 10, p. 596-600, 2008.

NGUYEN, C. V. Toxicity of the AGEs generated from maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological AGEs. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, p. 1140-1149, 2006.

OKAMOTO, M. M.; ANHÊ, G. F.; SABINO-SILVA, R.; MARQUES, M. F. S. F.; FREITAS, H. S.; MORI, R. C. T.; MELO, K. F. S.; MACHADO, U. F. Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism – related mechanism in muscle and liver. **Journal of Endocrinology**, v. 211, p. 55-64, 2011.

OKUDA, L.S.; CASTILHO, G.; ROCCO, D.D.; NAKANDAKARE, E.R.; CATANOZI, S.; PASSARELLI, M. Advanced glycated albumin impairs HDL anti-inflammatory activity and primes macrophages for inflammatory response that reduces reverse cholesterol transport. **Biochim Biophys Acta**, v.1821, p. 1485-1492, 2012.

ÖZCAN, U.; YIUMAZ, E.; ÖZCAN, L.; FURUHASHI, M.; VAILLANCOURT, E.; SMITH, R. O.; GÖRGÜN, C. Z.; HOTAMISLIGİL, G. S. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. **Science**, v. 313, p.1137-1140, 2006.

PAPA, P. C.; SERAPHIM, P. M.; MACHADO, U. F. Loss of weight restores GLUT 4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated obese mice. **International Journal of Obesity**, v. 21, p.1065-1070, 1997.

PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: What is the new and what works. **Clinical Diabetes**, v. 21, n. (4), p. 186-187, 2003.

PIPERI, C.; ADAMOPOULOS, C.; DALAGIORGOU, G.; DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; PAPAVALASSIOU, A. G. Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. (7), p. 2231-2242, 2012.

POLETTTO, A. C.; FURUYA, D. T.; DAVID-SILVA, A.; EBERSBACH-SILVA, P.; CORRÊA-GIANNELLA, M. L.; PASSARELLI, M.; MACHADO, U. F. Oleic and linoleic fatty acids downregulate *Slc2a4*/GLUT4 expression via NFκB and SREBP1 in skeletal muscle cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 401, p. 65-72, 2015.

RUAN, H.; HACOEN, N.; GOLUB, T. R.; PARIJS, L. V.; LODISH, H. F. Tumor necrosis factor-α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes. Nuclear factor-κB activation by TNF-α is obligatory. **Diabetes**, v. 51, p. 1319-1336, 2002.

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

SCHEUNER, D.; KAUFMAN, R. J. The unfolded protein response: A pathway that links insulin demand with β -Cell failure and diabetes. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. (3), p. 317-333, 2008.

SCHRODER, M. Endoplasmic reticulum stress response. **Cell and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 862-894, 2008.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. (7), p. 1793-1801, 2006.

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

SILVA, P. E. **Redução da expressão do GLUT4 induzida por palmitato não envolve o estresse de retículo endoplasmático em células musculares L6**. 2013. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SINACORE, D. R.; GULVE, E. A. The role of skeletal muscle in glucose transport, glucose homeostasis and insulin resistance: Implications for physical therapy. **Physical Therapy**, v. 73, p. 878-891, 1993.

STIRBAN, A.; GAWLOWSKI, T.; RODEN, M. Vascular effects of advanced glycation end products: Clinical effects and molecular mechanisms. **Molecular Metabolism**, v. 3, p. 94-108, 2014.

TABAS, I.; RON, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. (3), p. 184-190, 2011.

TANIGUSHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nature Reviews**, v. 7, p. 85-96, 2006.

TOBIAS, D. K.; HU, F. B.; CHAVARRO, J.; ROSNER, B.; MOZAFFARIAN, D.; ZHANG, C. Healthful dietary patterns and type 2 diabetes risk among women with a history of gestational diabetes. **Archives of Internal Medicine**, v. 172, n. (20), p. 1566-1572, 2012.

TORREGGIANI, M.; LIU, H.; WU, J.; ZHENG, F.; CAI, W.; STRIKER, G.; VLASSARA, H. Advanced glycation end product receptor-1 transgenic mice are resistant to inflammation, oxidative stress and post-injury intimal hyperplasia. **American Journal of Pathology**, v. 175, n. (4), p. 1722-1732, 2009.

VEMBAR, S. S.; BRODSKY, J. L. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 944-957, 2008.

WENDT, T.; HARJA, E.; BUCCIARELLI, L.; QU, W.; LU, Y.; RONG, L. L.; JENKINS, D. G.; STEIN, G.; SCHMIDT, A. M.; YAN, S. F. RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. **Atherosclerosis**, v.185, p. 70-77, 2006.

WHITE, M. F.; KAHN, C. R. The insulin signalling system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. (1), p. 1-4, 1994.

WU, C. H.; HUANG, H. W.; HUANG, S. M.; LIN, J. A.; YEH, C. T.; YEN, G. C. AGE-induced interference of glucose uptake and transport as a possible cause of insulin resistance in adipocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. (14), p. 7978-7984, 2011.

YAMAGISHI, S. I.; NAKAMURA, K.; MATSUI, T.; NODA, Y.; IMAIZUMI, T. Receptor for advanced glycation end products (RAGE): A novel therapeutic target for diabetic vascular complication. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 487-495, 2008.

ZAID, H.; ANTONESCU, C. N.; RANDHAWA, V. K.; KLIP, A. Insulin action on glucose transporters through molecular switches, tracks and tethers. **Biochemical Journal**, v. 413, n. (2), p. 201-215, 2008.

ZHANG, C.; TOBIAS, D. K.; CHAVARRO, J. E.; BAO, W.; WANG, D.; LEY, S. H.; HU, F. B. Adherence to healthy lifestyle and risk of gestational diabetes *mellitus*: prospective cohort study. **BMJ-British Medical Journal**, v. 349, p. g5450-g5460, 2014.

ZHENG, D.; MACLEAN, P. S.; POHNERT, S. C.; KNIGHT, J. B.; OLSON, A. L.; WINDER, W. W.; DOHM, G. L. Regulation of muscle GLUT4 transcription by AMP-activated protein kinase. **Journal Applied of Physiology**, v. 91, p. 1073-1083, 2001.

ZORZANO, A.; FANDOS, C.; PALACÍN, N. Role of plasma membrane transporters in muscle metabolism. **Biochemical Journal**, v. 349, p. 667-688, 2000.

APÊNDICES

A - PADRONIZAÇÃO DO GENE DE REFERÊNCIA PARA A REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RT - qPCR

Para a escolha do gene de referência foi realizado um ensaio de RT - qPCR utilizando amostras de cDNA de músculos incubados com albumina controle ou albumina glicada, assim como também amostras de animais tratados com albumina controle ou albumina glicada utilizando os seguintes genes de referência:

- *Actb*
- *B2m*
- *Gapdh*
- *Hprt1*

A1. Foram utilizados para a análise 4 diferentes métodos: Delta CT, BestKeeper, Normfinder e Genorm. Abaixo estão os resultados dos genes de referência de acordo com a sua estabilidade. O gene de referência mais estável em todos os métodos foi a *B2m*.

Evaluating Reference Genes Expression>>

RefFinder is a user-friendly web-based comprehensive tool developed for evaluating and screening reference genes from extensive experimental datasets. It integrates the currently available major computational programs (**geNorm**, **Normfinder**, **BestKeeper**, and the **comparative $\Delta\Delta Ct$ method**) to compare and rank the tested candidate reference genes. Based on the rankings from each program, it assigns an appropriate weight to an individual gene and calculated the geometric mean of their weights for the overall final ranking. Please cite [F Xie, P Xiao, D Chen, L Xu, B Zhang. 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. Plant molecular biology 80 \(1\), 75-84.](#)

Input your data:

Actb	b2m	gapdh	hprt1
24,51	22,55	22,41	32,07
23,03	21,64	22,66	31,32
24,33	21,33	22,5	31,1
24,08	21,75	21,27	30,77
23,69	21,08	21,9	30,63
24,34	21,41	22,01	30,33

Analyze Try example remove data

Ranking Order (Better--Good--Average)

Method	1	2	3	4
Delta CT	b2m	gapdh	Actb	hprt1
BestKeeper	b2m	Actb	gapdh	hprt1
Normfinder	b2m	gapdh	hprt1	Actb
Genorm	b2m gapdh	Actb	hprt1	
Recommended comprehensive ranking	b2m	gapdh	Actb	hprt1

A2. Abaixo os genes de referência de acordo com sua estabilidade.

A3. Abaixo o método Delta CT.

Genes Average of STDEV

Gene	Average of STDEV
b2m	0.55
gapdh	0.60
Actb	0.69
hprt1	0.69

A4. Abaixo o método BestKeeper.

A5. Abaixo o método Normfinder

Gene name	Stability value
b2m	0.183
gapdh	0.365
hprt1	0.577
Actb	0.577

A6. Abaixo o método Genorm.

Gene name	Stability value
b2m gapdh	0.548
Actb	0.576
hprt1	0.634

B - DADOS ESTATÍSTICOS

B1. Tabela de dados dos músculos incubados *in vitro*

Análise	Média	EPM	N	P
<i>Slc2a4</i> AC	100	8	8	0,0064
<i>Slc2a4</i> AG	51,9	7,5	8	
GLUT4 150' AC	100	6,3	5	0,799
GLUT4 150' AG	98,7	10,7	5	
GLUT4 300' AC	100	7,1	5	0,0198
GLUT4 300' AG	91,6	8,9	5	
GLUT4 450' AC	100	12,6	5	0,0401
GLUT4 450' AG	75,9	14,5	5	
<i>Ager</i> AC	100	14,7	7	0,0381
<i>Ager</i> AG	133,6	20,2	7	
<i>Ddost</i> AC	100	12,3	7	0,2651
<i>Ddost</i> AG	109	12,3	7	
pIKK alpha AC	100	14,2	6	0,0075
pIKK alpha AG	129,4	12,5	6	
pIKK beta AC	100	14,7	6	0,0369
pIKK beta AG	114,2	17,4	6	
IkB alpha AC	100	10,6	6	0,0282
IkB alpha AG	84,4	13,2	6	
IkB beta AC	100	10,7	7	0,0295
IkB beta AG	91,6	11,1	7	
NFKB1 citosol AC	100	23,8	7	0,0682
NFKB1 citosol AG	83,7	21,8	7	
NFKB1 núcleo AC	100	19,2	6	0,0312
NFKB1 núcleo AG	147,5	18,6	6	
RELA citosol AC	100	13,6	6	0,1156
RELA citosol AG	124,7	8,6	6	
RELA núcleo AC	100	12,8	7	0,0309
RELA núcleo AG	150,5	14,9	7	
Complexo A -134 AC	100	26	7	0,0387
Complexo A -134 AG	209,2	61,8	7	
Complexo B -134 AC	100	6,8	7	0,0094
Complexo B -134 AG	145,7	11,9	7	
GRP78 AC	100	13,2	8	0,0455
GRP78 AG	131,8	21,3	8	
GRP94 AC	100	30,1	8	0,0477
GRP94 AG	183,6	54,8	8	

AC - Albumina controle

AG - Albumina glicada

B2. Tabela de dados dos músculos incubados *in vivo*

Análise	Média	EPM	N	P
<i>Slc2a4</i> AC	100	8,4	6	0,0158
<i>Slc2a4</i> AG	65,6	8,4	7	
GLUT4 AC	100	4	6	0,0047
GLUT4 AG	79,6	3,9	7	
<i>Ager</i> AC	100	16,5	5	0,3369
<i>Ager</i> AG	81,3	10,1	7	
<i>Ddost</i> AC	100	8,8	5	0,0416
<i>Ddost</i> AG	69,3	9,1	6	
pIKK alpha AC	100	6,8	5	0,1664
pIKK alpha AG	84	7,6	6	
pIKK beta AC	100	5,2	7	0,8888
pIKK beta AG	98,2	12	6	
IkB alpha AC	100	3,5	6	0,3857
IkB alpha AG	94,8	5,2	7	
IkB beta AC	100	11,7	5	0,3522
IkB beta AG	117,9	12,9	7	
NFKB1 citosol AC	100	16,8	5	0,1688
NFKB1 citosol AG	70,7	11	6	
NFKB1 núcleo AC	100	8,3	5	0,0418
NFKB1 núcleo AG	138	12,7	6	
RELA citosol AC	100	5,5	5	0,4762
RELA citosol AG	117,7	19,5	7	
RELA núcleo AC	100	9,1	6	0,9001
RELA núcleo AG	101,3	5	7	
GRP78 AC	100	2,6	6	0,0091
GRP78 AG	123,2	6,2	7	
GRP94 AC	100	24,1	7	0,2923
GRP94 AG	61,6	25,1	7	

AC - Albumina controle

AG - Albumina glicada

C - MEMBRANAS CORADAS COM PONCEAU

C1. Membrana utilizada para a detecção da proteína GLUT4 em amostras de músculos incubados por 150 minutos na presença ou ausência de albumina glicada.

C2. Membrana utilizada para a detecção da proteína GLUT4 em amostras de músculos incubados por 300 minutos na presença ou ausência de albumina glicada.

C3. Membrana utilizada para a detecção da proteína GLUT4 em amostras de músculos incubados por 450 minutos na presença ou ausência de albumina glicada.

C4. Membrana utilizada para a detecção do grau de fosforilação das proteínas pIKKA e pIKKB em amostras de músculos incubados por 150 minutos na presença ou ausência de albumina glicada.

C5. Membrana utilizada para a detecção das proteínas IKBA e IKBB em amostras de músculos incubados por 150 minutos na presença ou ausência de albumina glicada.

C6. Membrana utilizada para a detecção das proteínas GRP78 e GRP94 em amostras de músculos incubados por 150 minutos na presença ou ausência de albumina glicada.

C7. Membrana utilizada para a detecção da proteína GLUT4 em amostras de músculos de animais tratados por 90 dias com albumina glicada.

C8. Membrana utilizada para a detecção do grau de fosforilação das proteínas pIKKA e pIKKB em amostras de músculos de animais tratados por 90 dias com albumina glicada.

C9. Membrana utilizada para a detecção das proteínas IKBA e IKBB em amostras de músculos de animais tratados por 90 dias com albumina glicada.

C10. Membrana utilizada para a detecção das proteínas GRP78 e GRP94 em amostras de músculos de animais tratados por 90 dias com albumina glicada.