

ANA CLÁUDIA POLETTO

**ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS OLÉICO E
LINOLÉICO REPRIMEM O GENE *S/c2a4* VIA NF-κB E
SREBP-1**

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
2011**

ANA CLÁUDIA POLETTO

**ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS OLÉICO E
LINOLÉICO REPRIMEM O GENE *S/c2a4* VIA NF-κB E
SREBP-1**

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 original

**São Paulo
2011**

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

reprodução não autorizada pelo autor

Poletto, Ana Cláudia.

Ácidos graxos insaturados oléico e linoléico reprimem o gene *Slc2a4* via NF-κB e SREBP-1 / Ana Cláudia Poletto. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Ubiratan Fabres Machado.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiopatologia do Diabetes Mellitus: papel dos transportadores de glicose.

Versão do título para o inglês: Oleic and Linoleic unsaturated fatty acids repressing *Slc2a4* gene via NF-κB and SREBP-1.

Descritores: 1. Ácido graxo não saturado 2. Fatores transcricionais 3. GLUT4 4. *Slc2a4* 5. NF-κB 6. SREBP-1 I. Machado, Ubiratan Fabres II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0149/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Cláudia Poletto.

Título da Tese: Ácidos graxos insaturados oléico e linoléico reprimem o gene *Slc2a4* via NF-κB e SREBP-1.

Orientador(a): Ubiratan Fabres Machado.

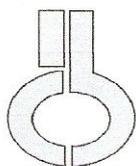
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Presidente: Nome completo:
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) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 270, referente ao projeto intitulado: “*Efeito dos ácidos graxos oléico e linoléico na expressão do gene da proteína transportadora de glicose GLUT4*” sob a responsabilidade de **Ana Cláudia Poletto**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPsh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 29 de outubro de 2008.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais Romeu e Terezinha

*Simplesmente amo vocês, obrigada pela educação, pelo apoio e imenso amor! Vocês são tudo
na minha vida!*

Ao meu irmão Daniel e a minha cunhada Karla

Muito obrigada pelo amor, carinho, compreensão e acolhimento. Amo vocês!

A minha princesa Julinha

Sua presença trouxe muita felicidade para minha vida! Tia Ana ama você!

A Deus,

"Que seja feita a vossa vontade assim na terra como no ceu."

Ao meu amor Murilo

*...Pra você guardei o amor
Que nunca soube dar
O amor que tive e vi sem me deixar
Sentir sem conseguir provar
Sem entregar
E repartir*

*Pra você guardei o amor
Que sempre quis mostrar
O amor que vive em mim vem visitar
Sorrir, vem colorir solar
Vem esquentar
E permitir*

*Pra você guardei o amor
Que aprendi vendo os meus pais
O amor que tive e recebi
E hoje posso dar livre e feliz...*

Wando Reis

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu querido professor Ubiratan pela confiança, oportunidade e pelos quase sete anos de orientação e dedicação. Muito obrigada por tornar este sonho possível. Amo você!

Agradeço as minhas amigas Dani Furuya e Aline David Silva. Muito obrigada por toda ajuda, amizade, carinho e amor. Amo muito vocês!

As amigas e técnicas Maristela e Helayne muito obrigada pelo carinho, ajuda, compreensão e apoio!

Aos meus queridos amigos do laboratório: Marcinha, Milano, Paty, Thaís, Fran, Laís, Paulo, Raquel, Ana Bárbara, Dani Carioca, Rosana, Gabi, Flor, Guilherme e Bruna. Agradeço pelos anos de convivência, carinho e amizade. Muito obrigada pelas boas risadas e me perdoem pelas vezes que não os acompanhei nos “eventos sociais”!

Ao Robinson e Elaine muito obrigada pela amizade, carinho e imensa confiança e incentivo. Muita saudade de vocês!

Agradeço ao professor Gabriel Anhê, ao Dr. Camilo Lellis e em especial a professora Silvana Bordin, pela fundamental colaboração para o desenvolvimento deste estudo, professora obrigada por todo carinho!

Agradeço a técnica Dra Rosângela Eichler pelo apoio e colaboração para a realização deste estudo.

Agradeço as professoras Dra. Patrícia Monteiro Seraphim, Dra. Luciana Catunda e Dra. Raquel Simões pela amizade, pelos conselhos e pelas boas risadas! Muito obrigada meninas!

Agradeço a todos os meus amigos do ICB pelo carinho e amizade!

Agradeço aos professores Dra. Maria Helena, Dra. Maria Tereza Nunes, Dr. José Cipolla, Dra. Carla Carvalho pelo espaço cedido para realização dos experimentos para este estudo.

Agradeço aos meus familiares especialmente as minhas madrinhas Eliane Volpini Belavenute e Laura Rita Gava que sempre estiveram muito presente em toda minha caminhada! Muito obrigada pelo apoio e por todo amor!

Agradeço de todo meu coração a Dra. Érica Stulzer por todos os ensinamentos de vida! Sinto muita saudade de você!

Agradeço muito ao Zé Maria por todo apoio e atenção durante estes anos de pós-graduação!

Agradeço aos funcionários da biblioteca pela atenção e revisão do meu trabalho!

Agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste estudo!

“Um pouco de ciência, nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”.

Louis Pasteur

RESUMO

POLETTI, A. C. **Ácidos graxos insaturados oléico e linoléico reprimem o gene *Slc2a4* via NF- κ B e SREBP-1**. 2011. 89 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Os ácidos graxos (AGs) são nutrientes essenciais para o adequado funcionamento do organismo. Entretanto, o aumento dos níveis circulantes de alguns AGs e o acúmulo ectópico de gordura estão relacionados com o desenvolvimento da resistência à insulina na obesidade e no *diabetes mellitus*. Os mecanismos envolvidos nesta regulação não estão totalmente elucidados, todavia, a participação dos AGs no controle transcricional do gene *Slc2a4* deve ser considerada. De acordo com estes aspectos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar em células musculares pertencentes à linhagem L6, o efeito de AGs muito consumidos na dieta ocidental, os AGs, oléico (OFA) e linoléico (LFA), na regulação de fatores transcricionais envolvidos no controle da expressão do GLUT4, tais como: NF- κ B, SREBP-1c, HIF-1 α , LXR α e PPAR γ . Na presença de OFA e de LFA, foi verificada uma redução significativa do conteúdo da proteína GLUT4 (OFA, 50 a 400 μ M, 29-43%; LFA, 300 μ M, 33% e 400 μ M, 54%, *versus* controle). Após esta etapa, para o prosseguimento das análises, foram selecionadas três concentrações para experimentos com OFA (25, 50 e 200 μ M) e com LFA (50, 200 e 300 μ M). Em todas as concentrações analisadas de OFA e LFA, foram detectadas redução da expressão do mRNA de GLUT4 (OFA, 25 a 200 μ M, 36-60%; LFA, 50 a 300 μ M, 34-52% *versus* controle), bem como redução da expressão do mRNA de SREBP-1c (OFA, 25 a 200 μ M, 38-74%; LFA, 50 a 300 μ M, 59-80%, *versus* controle). Adicionalmente, o tratamento com esses AGs resultou em aumento da expressão do mRNA de NF- κ B (OFA, 200 μ M, 49%; LFA, 200 μ M, 67%, e 300 μ M, 136% *versus* controle), HIF-1 α (OFA, 200 μ M, 125%; LFA, 200 μ M, 43%; LFA, 300 μ M, 56% *versus* controle), LXR α (OFA, 50 μ M, 66% e 200 μ M, 50%; LFA, 300 μ M, 103% *versus* controle) e PPAR γ (LFA, 300 μ M, 128% *versus* controle). Em relação à atividade de ligação ao gene *Slc2a4* foram identificadas duas bandas para NF- κ B, denominadas Complexo I e II; foi verificado aumento na atividade de ligação de NF- κ B (OFA, 200 μ M, 25% no Complexo I e para 25 a 200 μ M, 12-21% no Complexo II; LFA, 200 e 300 μ M, 12 e 24% respectivamente, para Complexo I e 200 e 300 μ M, 42 e 35% respectivamente, para Complexo II *versus* controle) e diminuição na atividade de ligação de PPAR γ (LFA, 50-300 μ M, 58-73% *versus* controle) e de SREBP-1 (OFA, 25 μ M, 42% e 200 μ M, 67%; LFA, 50 a 300 μ M, 49-68%). Não houve alteração quanto à ligação de LXR α e HIF-1 α ao gene *Slc2a4*. Por fim, tanto OFA, como LFA aumentaram a fosforilação de IKK α/β (OFA, 200 μ M, 346%; LFA, 50 a 300 μ M, 95-178% *versus* controle). Em conclusão, ambos AGs OFA e LFA

diminuem a expressão do GLUT4, com importante participação dos fatores transcricionais NF- κ B e SREBP-1, e, portanto, a atuação de nutrientes na regulação da expressão de genes traz uma nova vertente quanto à modulação dietética para prevenção e/ou tratamento de doenças relacionadas com o quadro de resistência a insulina.

Palavras - chave: Ácido graxo oléico. Ácido graxo linoléico. *Slc2a4*. GLUT4. NF- κ B. SREBP-1.

ABSTRACT

POLETTO, A. C. **Oleic and Linoleic unsaturated fatty acids repressing *Slc2a4* gene via NF- κ B and SREBP-1**. 2011. 89 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Fatty acids (FAs) are essential for the growth and development of all organisms. However, high elevated levels of some but not all free fatty acids and ectopic lipid deposits are related with insulin resistance in obesity and *diabetes mellitus*. The real mechanisms by which FAs impair the action of insulin need to be clarified. Nevertheless the effects of these molecules in the transcriptional activity of the *Slc2a4* gene should be considered. According to these aspects, the aim of this work was to investigate the effects of the main unsaturated fatty acids such as oleic (OFA) and linoleic (LFA) in the activity and expression of NF- κ B, SREBP-1c, HIF-1 α , LXR α and PPAR γ . The results have showed a decrease in the GLUT4 protein content in the presence of 50 to 400 μ M, 29-43%, of the OFA and 300 μ M, 33%, and 400 μ M, 54%, of the LFA when compared with control. Besides, a reduction in the GLUT4 mRNA expression was detected in 25, 50 and 200 μ M of the OFA, 36-60% and 50, 200 and 300 μ M of the LFA, 34-52% vs. control. The transcriptional factors mRNA content was analyzed. A reduction in the SREBP-1c mRNA content (OFA, 25 to 200 μ M, 38-74%; LFA, 50 to 300 μ M, 59-80%) was detected. On the other hand, an increase in the NF- κ B (OFA, 200 μ M, 49%; LFA, 200 μ M, 67% and 300 μ M, 136% vs. control), HIF-1 α (OFA, 200 μ M, 125%; LFA, 200 μ M, 43% and 300 μ M, 56%), LXR α (OFA, 50 μ M, 66%; LFA, 200 μ M, 50% and 300 μ M, 103% vs. control) and PPAR γ (LFA, 300 μ M, 128%) mRNA content was showed. In addition, the binding activity of some transcriptional factors to the *Slc2a4* gene was investigated. Two specific bands to NF- κ B were detected, Complex I and II. The treatment with OFA and LFA showed an increase in the NF- κ B binding activity (OFA, 200 μ M, 25% in Complex I and for 25 to 200 μ M, 12-21% in Complex II; LFA, 200 μ M, 12% and 300 μ M, 24% in Complex I and 200 μ M, 42%, and 300 μ M, 35% in Complex II vs. control), and decrease in PPAR γ binding activity (LFA, 50-300 μ M, 58-73% vs. control), and SREBP-1 binding activity (OFA, 25 μ M, 42% e 200 μ M, 67%; LFA, 50 to 300 μ M, 49-68% when compared to control). LXR α and HIF-1 α binding activity did not altered. Finally, both fatty acids increased the IKK α / β phosphorylation (OFA, 200 μ M, 346%; LFA, 50 to 300 μ M, 95-178% vs. control). The present results show that unsaturated fatty acids OFA and LFA decrease the GLUT4 expression through the control of the NF- κ B and SREBP-1 binding activity. For this, the modulation of gene expression by some nutrients like fatty acids can help us to do an individual dietetic modulation to the treatment of some diseases related with insulin resistance in obesity and diabetes.

Keywords: Oleic fatty acid. Linoleic fatty acid. *Slc2a4*. GLUT4. NF- κ B. SREBP-1.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGs	ácidos graxos
AGIs	ácidos graxos insaturados
AGSs	ácidos graxos saturados
AMPK	protein cinase ativada por AMP
ATCC	do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
bHLH-Zip	do inglês, <i>basic helix-loop-helix-leucine zipper</i>
bHLH-PAS	do inglês, <i>basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim</i>
BSA	albumina bovina sérica
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CG	complexo de golgi
<i>ChIP assay</i>	ensaio de imunoprecipitação de cromatina
COP II	do inglês, <i>cargo-selection proteins</i>
CT	ciclo <i>threshold</i>
DAG	diacilglicerol
DMEM	do inglês, <i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
ECL	ensaio de quimioluminescência
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EPM	erro padrão médio
EMSA	ensaio de mobilidade eletroforética
ERK-MAPK	do inglês, <i>extracellular receptor kinase-mitogen activated protein kinase</i>
EROs	espécies reativas de oxigênio
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G-6-P	glicose 6 fosfato
GLUT	transportador de glicose
HETE	15-hidroxiieicosatetraenóico
HIF-1	do inglês, <i>hypoxia inducible factor-1</i>
HNF4	do inglês, <i>hepatocyte nuclear factor</i>
HODE	hidroxioctadecadienóico
HRP	do inglês, <i>horse radish peroxidase</i>

IKK	IκB cinase
IκB	inibidor de NF-κB
IL6	interleucina 6
Insig	do inglês, <i>insulin-induced gene</i>
JNK	do inglês, JUN NH ₂ terminal kinase
LBD	domínio de ligação do ligante
LFA	ácido graxo linoléico
LXR	do inglês, <i>liver X receptor</i>
LXRE	elemento responsivo a LXR
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
NIH	do inglês, <i>National Institute of Health</i>
NONIDET	octilfenoxipolietoxietanol
NF-κB	do inglês, <i>nuclear factor kappa B</i>
OFA	ácido graxo oléico
PBS	do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
PPARs	do inglês, <i>peroxisome proliferator-activated receptors</i>
PPRE	elemento responsivo a PPAR
PKC	proteína cinase C
PO ₂	pressão oxigênio
RE	retículo endoplasmático
RT	transcrição reversa
RXRα	do inglês, <i>retinoic X receptor α</i>
SCAP	do inglês, <i>cleavage-activating protein</i>
Slc2a4	do inglês, <i>solute carrier family 2A4</i>
SDS	sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida e sódio dodecil sulfato para eletroforese
SFB	soro fetal bovino
SER	elemento responsivo a SREBP
SREBPs	do inglês, <i>sterol regulatory element binding proteins</i>
TAG	triacilglicerol
TBE	TRIS/Borato/EDTA
TBST	tampão TRIS fosfato com Tween

TRIS	tri(hidroximetil)-aminometano
TZDs	Tiazolidinedionas
UDG	do inglês, <i>uracil-DNA glycosylase</i>
UR	unidade relativa
15d-PGJ2	15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J ₂

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Linhagem celular	27
3.1.1 Propagação, diferenciação e tratamento das células	27
3.2 Quantificação da proteína GLUT4	28
3.2.1 Extração de proteína total.....	28
3.2.2 <i>Western blotting</i>	29
3.3 Avaliação do grau de fosforilação das proteínas IKK α e IKK β	30
3.4 Densitometria óptica	31
3.5 Análise dos resultados.....	31
3.6 Extração de RNA total	31
3.7 Transcrição reversa.....	32
3.8 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR tempo real).....	32
3.9 Ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA) ou Gel shift.....	35
3.9.1 Extração de proteínas nucleares em amostras de células musculares L6	35
3.9.2 Obtenção das sondas.....	36
3.9.3 Reação de ligação e eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante	36
3.10 Ensaio de Imunoprecipitação de cromatina (ChIP assay).....	37
4 RESULTADOS	39
4.1 Ácido graxo oléico reduz a expressão do transportador de glicose GLUT4	39
4.2 Ácido graxo linoléico reduz a expressão do transportador de glicose GLUT4.....	41
4.3 Ácidos graxos oléico e linoléico aumentam a expressão do fator transcricional NF- κ B..	43
4.4 Determinação da especificidade da sonda e identidade da banda de NF- κ B.....	45
4.5 Ácido graxo oléico aumenta a atividade de ligação do fator transcricional NF- κ B a região promotora do gene <i>Slc2a4</i>	47
4.6 Ácido graxo linoléico aumenta a atividade de ligação do fator transcricional NF- κ B a região promotora do gene <i>Slc2a4</i>	49
4.7 Ácidos graxos oléico e linoléico estimulam a fosforilação das proteínas IKK α / β	51
4.8 Altas concentrações dos ácidos graxos oléico e linoléico aumentam a expressão do mRNA do fator transcricional do HIF-1 α	53
4.9 Avaliação da atividade de ligação ao domínio E-box	---
4.10 Ácidos graxos oléico e linoléico não alteram a atividade de ligação do fator transcricional HIF-1 α a região promotora do gene <i>Slc2a4</i>	56

4.11 Redução da expressão de SREBP-1c na presença dos ácidos graxos oléico e linoléico	58
4.12 Efeito dos ácidos graxos oléico e linoléico na atividade de ligação do fator transcricional SREBP-1 na região promotora do gene <i>Slc2a4</i>	60
4.13 Aumento da expressão de LXR α na presença dos ácidos graxos oléico e linoléico.....	63
4.14 Participação dos ácidos graxos oléico e linoléico no controle da ligação do fator transcricional LXR α à região promotora do gene <i>Slc2a4</i>	65
4.15 Ácido graxo linoléico aumenta a expressão do fator transcricional PPAR γ	67
4.16 Participação do ácido graxo linoléico no controle da atividade de ligação do fator transcricional PPAR γ à região promotora do gene <i>Slc2a4</i>	69
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos são nutrientes essenciais para o crescimento e o desenvolvimento do organismo. Além de importante substrato energético para o trabalho celular, estas biomoléculas atuam na composição estrutural da membrana plasmática, na acilação de proteínas e no fornecimento de sinalizadores intracelulares, como eicosanóides, diacilglicerol, ceramidas e ácido fosfatídico que regulam a atividade de proteínas, como as pertencentes à via de sinalização da insulina (SAVAGE et al., 2007; SESTI, 2006), e à expressão de genes envolvidos no controle do metabolismo, crescimento e diferenciação celular (JUMP, 2004; PÉRGORIER; LE; GIRARD, 2004).

Além de abundantemente encontrados em alimentos de origem animal e vegetal, principalmente como triacilglicerol (TAG), alguns ácidos graxos podem também ser sintetizados endogenamente a partir da glicose, como o ácido graxo saturado palmítico (C16:0) (JUMP, 2004), ou a partir de ácidos graxos poliinsaturados essenciais, como os ácidos graxos araquidônico (C20:4), *n*6 e docosahexaenóico (C22:6) *n*3 (SPRECHER, 2000), ambos importantes constituintes da membrana celular (JUMP, 2004).

A alteração nos níveis de alguns ácidos graxos livres circulantes provenientes da ingestão excessiva de gordura dietética, e/ou a partir dos estoques de gordura corporal, pode estar relacionada com o surgimento de desordens metabólicas como redução na sensibilidade à ação da insulina em músculo esquelético e tecido adiposo (BODEN, 2003), considerados importantes sítios de captação de glicose em resposta ao estímulo insulínico (MACHADO et al., 2006). Ambos tecidos expressam duas isoformas de proteínas transportadoras de glicose, o GLUT1, principal responsável pelo transporte deste substrato no estado basal, e o GLUT4, responsável pelo transporte em resposta a estímulos específicos (MACHADO, 1998).

A isoforma GLUT4, cujo gene é denominado *Slc2a4* (JOOST e THORENS, 2001) está expressa predominantemente, mas não exclusivamente, nestes tecidos. Em resposta ao estímulo insulínico, que ocorre pela ligação da insulina ao seu receptor de membrana plasmática e consequentes fosforilações intracelulares (CARVALHEIRA et al., 2002; SALTIEL e KANH, 2001), vesículas contendo este transportador translocam-se, ancoram-se e fundem-se na membrana plasmática aumentando a densidade de GLUT4 e a captação de glicose (BRADY; PESSIN; SALTIEL, 1999; KOISTINEN e ZIERATH, 2002; MACHADO, SHIMIZUI, SAITO, 1994). A redução na expressão gênica e/ou na densidade deste transportador na superfície celular pode estar relacionada com resistência à insulina (THORENS; CHARRON; LODISH, 1990).

Estudos clássicos já demonstravam a atuação dos ácidos graxos no desencadeamento de alterações na sensibilidade à insulina. Randle et al. (1963) determinaram, em amostras dos músculos cardíaco e diafragmático de ratos, que o acúmulo intracelular de produtos oriundos da oxidação de ácidos graxos altera a atividade de enzimas pertencentes à via glicolítica, com consequente aumento na concentração intracelular de glicose-6-fosfato (G6P), um inibidor alostérico da hexoquinase, e diminuição na captação celular de glicose.

Dresner et al. (1990) utilizando amostras de músculo esquelético de indivíduos normais submetidos à *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico e concomitante infusão de lípidos, verificaram uma diminuição na concentração de G6P e de glicose intracelular; e a estas observações atribuíram um possível papel dos ácidos graxos na alteração do transporte de glicose, via GLUT4, e/ou propagação do sinal da insulina.

Ácidos graxos e/ou seus metabólitos bioativos podem controlar a transcrição gênica, regulando a estabilidade de mRNAs e a participação de fatores transcripcionais como, PPARs (do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptors*), LXR α (do inglês, *liver X receptor α*), HNF4 (do inglês, *hepatocyte nuclear factor α e γ*), RXR α (do inglês, *retinoic X receptor α*), SREBPs (do inglês, *sterol regulatory element binding proteins*), NF- κ B (do inglês, *nuclear factor kappa B*) e HIF-1 α (do inglês, *hypoxia inducible factor-1 α*) (JUMP, 2004), já descritos como reguladores do gene *Slc2a4*.

Entre todos os fatores transcricionais regulados por ácidos graxos e/ou por seus metabólitos bioativos, a família dos PPARs é a mais estudada (PÉRGORIER; LE; GIRARD, 2004).

Descoberta em meados dos anos 90 a isoforma PPAR γ se expressa predominantemente nos tecidos adiposo, branco e marrom, intestino grosso e baço, mas também é encontrada em músculo esquelético (FAJAS et al., 1997). Atualmente, três subtipos de PPAR γ já foram identificados e classificados como γ 1, γ 2 e γ 3 (FAJAS et al., 1997; FAJAS; FRUCHART; AUWERX, 1998); apenas as isoformas 1 e 2 expressam-se no músculo esquelético (ARMONI; HAREL; KARNIELI, 2007; FAJAS et al., 1997). Entre as inúmeras funções de PPAR γ destacam-se a sua participação no controle da diferenciação dos adipócitos, da resposta inflamatória e do metabolismo lipídico (DESVERGENE et al., 1998; TAKAHASHI e KAWADA, 2001) e glicídico (ARMONI et al., 2003).

A ação de PPAR γ na regulação da expressão gênica pode ocorrer por transativação ou transrepressão. A transativação consiste na ativação deste fator transcricional por agonistas endógenos e/ou sintéticos com posterior recrutamento de co-ativadores, dimerização a RXR α e ligação ao seu elemento responsivo PPRE (do inglês, *PP responsive element*) em genes alvo (CHIARELLI e MARZIO, 2008) como *Slc2a4*, cujo sítio de ligação foi determinado em meados de 2003 (ARMONI et al., 2003). Por outro lado, a transrepressão é um mecanismo pelo qual o PPAR γ inibe a atividade transcricional de proteínas como NF- κ B, por se associar diretamente a elas e não ao DNA (CHIARELLI e MARZIO, 2008).

Os medicamentos pertencentes à classe das Tiazolidinedionas (TZDs), bem como os produtos derivados do aminoácido L-tirosina, GI262570, GW1929 e GW7845, são considerados importantes ativadores sintéticos de PPAR γ . Entre os agonistas naturais destacam-se o prostanóide 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂) e também produtos derivados da via da lipoxigenase como 9 e 13-hidroxiocetadecadienóico (9 e 13 HODE) e 15-hidroxi-eicosatetraenóico (15-HETE) (KLIEWER et al., 2001). Ao contrário do ácido graxo monoinsaturado oléico e de alguns poliinsaturados pertencentes à família *n*6, com exceção do ácido graxo araquidônico (C20:4), ácidos graxos pertencentes à família *n*3 como, eicosapentaenóico (C20:5), docosahexaenóico (C22:6) e gama e alfa linolênico (C18:3) são muito efetivos na ativação de PPAR γ (DESVERGENE e WAHLI, 1999; XU et al., 1999).

Além dos aspectos sobreditos, a atividade deste fator transcricional também pode ser controlada por meio da ação de cinases como ERK-MAPK (do inglês, *extracellular receptor kinase-mitogen activated protein kinase*) e AMPK (do inglês, *5'-AMP-activated protein kinase*) (BURNS e HEUVEL, 2007).

O LXR α é outro importante regulador transcricional que deve ser ressaltado. Está expresso predominantemente no fígado, intestino, rim, baço e tecido adiposo, mas também se encontra no músculo esquelético (BARANOWSKI 2008; KASE et al., 2005). Embora três isoformas de LXR α já tenham sido identificadas, apenas a denominada $\alpha 1$ possui uma importante atividade transcricional (WÓJCICKA et al., 2007). É como heterodímero junto a RXR α , que o LXR α se liga ao seu elemento responsivo (LXRE), modulando a expressão de inúmeros genes envolvidos no metabolismo de lípidos e de colesterol como, SREBP-1c, ácido graxo sintase e esteroil-CoA desaturase (BARANOWSKI, 2008); também de carboidratos como, GLUT4 e GLUT1, no músculo esquelético (KASE et al., 2005) e tecido adiposo (JUMP, 2002; PÉRGORIER; LE; GIRARD, 2004; SAMPATH et al., 2004).

Dalen et al. (2003) mostraram, em adipócitos de humanos e de camundongos, a presença de elemento responsivo para LXR α no promotor do gene *Slc2a4*. Kase et al. (2005), utilizando cultura de células musculares humanas incubadas com ativador de LXR α , mostraram aumento na expressão de inúmeros genes, dentre os quais PPAR γ , SREBP-1c, GLUT4 e GLUT1.

Alguns oxisteróis como 22(R) hidroxicolesterol e 24(S) hidroxicolesterol são considerados importantes agonistas endógenos de LXR α . Contrariamente, ácidos graxos poliinsaturados pertencentes às famílias, *n*3 como eicosapentaenóico (C20:5) e docosahexaenóico (C22:6) e *n*6 como araquidônico (C20:4) e linoléico (C18:2) são considerados inibidores competitivos de LXR α , uma vez que impedem a ligação dos oxisteróis. Ácidos graxos monoinsaturados possuem um efeito mínimo nesta inibição já os saturados não participam na regulação deste mecanismo (WÓJCICKA, 2007).

O SREBP faz parte de uma família de fatores de transcrição conhecida como bHLH-Zip (do inglês, *basic helix-loop-helix-leucine zipper*). Até o momento, três isoformas de SREBP já foram identificadas e denominadas: 1a, 1c e 2 (HUA et al., 1993; YOKOYAMA et al., 1993). Expressam-se predominantemente no fígado e tecido adiposo (IM et al., 2007) mas também são encontrados no músculo esquelético (COMMERFORD et al., 2004).

Ácidos graxos poliinsaturados (eicosapentaenóico, araquidônico e linoléico) ou monoinsaturado (oléico), atuam na regulação da expressão gênica da isoforma SREBP-1c (JUMP, 2002; PÉRGORIER; LE; GIRARD, 2004). Em amostras de tecido adiposo provenientes de ratos realimentados após jejum de 24 horas e de ratos diabéticos submetidos à insulino-terapia, um aumento na expressão de SREBP-1c foi relacionado com um aumento de GLUT4 neste tecido. Ao mesmo tempo o SRE (do inglês, *sterol-response element*) foi mostrado no gene *Slc2a4*, reforçando a possível ação deste fator transcricional no controle da expressão do GLUT4 (IM et al., 2006).

Diferente dos outros fatores transcricionais já citados, a expressão de SREBP envolve um mecanismo complexo dependente do *pool* intracelular de esteróis. A proteína inicialmente encontra-se na forma de uma molécula precursora associada à membrana do retículo endoplasmático (RE) e composta por dois domínios organizados denominados amino e carboxi-terminal. Ao domínio carboxi-terminal encontra-se associada a SCAP (do inglês, *cleavage-activating protein*). Em células ricas em esteróis, o complexo SCAP/SREBP mantém-se ligado a uma proteína constitutiva denominada Insig (do inglês, *insulin-induced gene*), cuja função é impedir a interação deste complexo com proteínas relacionadas com a síntese de vesículas de transporte denominadas, COPII (do inglês, *cargo-selection proteins*). Por meio deste mecanismo, a forma precursora de SREBP é mantida. Entretanto, com a depleção dos níveis de esteróis a ligação entre Insig-SCAP/SREBP é rompida e desta forma o complexo é “captado” por COPII e transportado ao complexo de golgi (CG). Neste local por ação de duas proteases há a liberação do domínio amino-terminal de SREBP responsável pela sua atividade transcricional que consiste na ligação, como dímero, ao seu elemento responsivo localizado em genes envolvidos no controle do metabolismo lipídico, de colesterol e glicídico (ESPENSHADE, 2006; HORTON, 2002).

O NF- κ B e o HIF-1 α , ambos relacionados com a expressão gênica de GLUT4 (SILVA et al., 2005), também possuem os ácidos graxos e/ou seus metabólitos bioativos como possíveis reguladores de sua atividade e/ou expressão.

A família do NF- κ B é composta por cinco membros denominados, RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105) e NF- κ B2 (p52/p100). Ambas as subunidades p50 e p52 são sintetizadas a partir de proteínas precursoras longas, p105 e p100. Em geral, a forma ativa de NF- κ B consiste de um heterodímero composto pela subunidade p65 associada à p50 ou p52. Na maioria das células, este heterodímero

reside no citosol associado a um inibidor protéico, I κ B (do inglês, *inhibitors of NF- κ B*). Em mamíferos, há três principais isoformas de I κ B: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ . A ativação de NF- κ B tipicamente envolve a fosforilação de I κ B pelo complexo I κ B cinase (do inglês, *I κ B kinase*), composto por IKK α , IKK β e IKK γ (NEMO). Pela via clássica de ativação de NF- κ B, I κ B ao ser fosforilado, dissocia-se das subunidades heterodiméricas de NF- κ B sendo direcionado à degradação proteossomal. Como consequência o NF- κ B migra ao núcleo onde se liga as sequências de DNA, conhecidas como sítios κ B, localizadas nas regiões promotoras de genes relacionados a apoptose, adesão celular, resposta imune, inflamação, estresse celular e remodelamento tecidual. É importante ressaltar que a expressão desses genes é também dependente da ação de outras vias de sinalização e fatores de transcrição. Assim, os resultados da ativação de NF- κ B dependerão da natureza e do contexto da célula (PERKINS, 2007).

Ácidos graxos e/ou produtos derivados do seu metabolismo celular podem modular a atividade de cinases envolvidas na regulação da atividade de NF- κ B (CHAVEZ et al., 2003; FURUKAWA et al., 2004; MONTELL et al., 2001; WORGALL et al., 1998).

A atuação de NF- κ B na regulação do gene *Slc2a4* foi sugerida em meados de 2002 (RUAN et al., 2002). Silva et al. (2005) relacionaram o aumento no nível do mRNA e na atividade de ligação ao DNA de NF κ B, com a diminuição na expressão gênica de GLUT4 em amostras de músculo solear de ratos jejados. Além disto, a repressão na expressão do gene *Slc2a4* já foi relacionada com aumento no conteúdo de IL-6 do (inglês, *interleucin 6*) devido ativação da via PKC/NF- κ B por palmitato, em células musculares C2C12 (JOVÉ et al., 2005).

O HIF faz parte de uma família de fatores transcricionais, bHLH-PAS (do inglês, *basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim*), que se associam ao DNA como heterodímero. É composto por uma subunidade α , sensível aos níveis de oxigênio e uma β , constitutiva. Três subunidades alfa já foram identificadas e denominadas 1 α , 2 α , 3 α , sendo todas passíveis de sofrerem degradação proteossomal (KE e COSTA, 2006).

Em situações de hipóxia a proteína HIF-1 α torna-se estável e transloca ao núcleo onde dimeriza com a isoforma HIF1 β regulando a expressão de genes relacionados com a angiogênese, eritropoiese, glicólise e captação de glicose. Embora a tensão de oxigênio seja o principal regulador da ação de HIF-1 α , fatores

de crescimento e ambientais, insulina, citocinas, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (KE e COSTA, 2006; SEMENZA, 2000; ZELZER et al., 1998) parecem controlar este fator de transcrição. Cabe ressaltar que em situações de normóxia, a expressão da isoforma 1 α torna-se praticamente indetectável, devido efeitos que a direcionam para degradação proteosomal (KE e COSTA, 2006).

A participação do fator transcricional HIF-1 α na regulação da transcrição gênica das isoformas 1 e 3 dos transportadores de glicose foi descrita em meados dos anos 90 (EBERT et al., 1996). Posteriormente foi proposta sua atuação na expressão de GLUT4 (SILVA, 2005) após ser observado aumento do mRNA de GLUT4 e de HIF-1 α em músculo solear, mediante estímulo de contração *in vitro*. Embora a regulação deste fator transcricional por ácidos graxos e/ou seus metabólitos não esteja elucidada, suas características transcricionais o tornam um alvo promissor de investigação.

Há anos acreditava-se que a regulação de genes relacionados ao estado nutricional era única e exclusivamente controlada por hormônios e/ou pelo sistema nervoso. Atualmente, além destes mecanismos, sabe-se que os próprios nutrientes podem participar desta regulação.

Além de abundantes no meio intracelular (GORSKI; NARWROCKI; MURTHY, 1998), os ácidos graxos monoinsaturado oléico e poliinsaturado linoléico encontram-se em grande quantidade no soro (FÉRNANDEZ-REAL et al., 2003) e contribuem para o acúmulo de gordura em diferentes tecidos como músculo esquelético e fígado, circunstâncias nas quais desempenham importante papel fisiopatológico.

A literatura ainda oferece dados incompletos a respeito dos mecanismos moleculares capazes de explicar a verdadeira atuação dos diferentes ácidos graxos na regulação da expressão gênica do GLUT4 e na sensibilidade à insulina. Desta forma, credita-se à elucidação dos efeitos destas biomoléculas na regulação da expressão do GLUT4 a prevenção e/ou tratamento de doenças relacionadas com o quadro de resistência à insulina.

O músculo esquelético é o principal sítio de captação de glicose sob estímulo insulínico (ZORZANO; PALACIN; GUMÁ, 2005). Mioblastos da linhagem L6, obtidos a partir de células musculares glicolíticas de ratos (*rattus norvegicus*), são capazes de diferenciarem-se em miotubos que expressam GLUT4 (MITSUMOTO e KLIP, 1992), semelhantes à célula muscular madura, e por isto são utilizados para investigar mecanismos relacionados à musculatura esquelética.

Diante dos fatos aqui expostos, hipotetizamos que os ácidos graxos possam acionar mecanismos transcricionais específicos capazes de regular a expressão do transportador de glicose GLUT4 em músculo esquelético, e assim contribuir na modulação da homeostasia glicêmica.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar em células musculares pertencentes à linhagem L6, o efeito dos ácidos graxos monoinsaturado oléico (C18:1 *n*9) e poliinsaturado linoléico (C18:2 *n*6) sobre a regulação da expressão do gene *Slc2a4* e possíveis fatores transcricionais envolvidos.

Estratégias experimentais

Para alcançar os objetivos propõe-se investigar, na presença e ausência dos ácidos graxos, oléico e linoléico:

1. A expressão do gene *Slc2a4* medindo o conteúdo de mRNA e proteína por RT-PCR em tempo real e *Western blotting*, respectivamente;
2. O conteúdo do mRNA dos fatores transcricionais NF- κ B, PPAR γ , SREBP-1c, HIF-1 α e LXR α , por RT-PCR em tempo real;
3. A atividade de ligação dos fatores transcricionais NF- κ B, SREBP-1, HIF-1 α e LXR α , aos seus respectivos elementos responsivos na região promotora do gene *Slc2a4*, por meio de ensaio de mobilidade eletroforética (*EMSA-Gel shift*);
4. A atividade de ligação dos fatores transcricionais SREBP-1, LXR α e PPAR γ aos seus respectivos elementos responsivos na região promotora do gene *slc2a4* por meio de ensaio de imunoprecipitação de cromatina (*ChIP assay*);
5. O grau de ativação/fosforilação das proteínas IKK α e IKK β .

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagem Celular

Foram utilizadas células musculares da linhagem L6, provenientes do banco mundial de células ATCC (*American Type Culture Collection*).

3.1.1 Propagação, diferenciação e tratamento das células

Alíquotas de células musculares pertencentes à linhagem L6 foram descongeladas e cultivadas conforme sugerido pelo fornecedor. Desta forma, a propagação e a diferenciação foram realizadas utilizando Meio Dulbecco MEM (DMEM) (4.500 mg/L de glicose, Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, BR) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino-SFB (v/v) (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, BR) e 1% de antibiótico (penicilina/ estreptomicina) (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Permaneceram em incubadora Nuair a 5% de CO₂, 37 °C até atingirem confluência de cerca de 70%. Neste ponto, o meio de propagação foi substituído por meio de diferenciação contendo, Meio Dulbecco MEM (4.500 mg/L de glicose, Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, BR) suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino-SFB (v/v) (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, BR) e 1% de antibiótico (penicilina/ estreptomicina) (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Após sete dias de diferenciação (YONEMITSU et al., 2001), o meio contendo 2% de SFB foi substituído por Meio Dulbecco MEM (DMEM), (1.000 mg/L de glicose, Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, BR) suplementado com 1%, de albumina bovina sérica (BSA) (p/v) (HOMMELBERG et al., 2009) e de antibiótico (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 12 horas. Em seguida, os tratamentos foram iniciados permanecendo a condição experimental sobredita.

Células musculares L6 foram mantidas, por 16 horas (DIMOPOULOS et al., 2006), em presença dos ácidos graxos, monoinsaturado oléico - OFA (C18:1 *n*9) (O1257 *oleic acid-water soluble*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e poliinsaturado linoléico - LFA (C18:2 *n*6) (L5900 *linoleic acid-water soluble* Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ambos solúveis em água por serem conjugados à metil beta ciclodextrina.

Para verificar o efeito dos ácidos graxos OFA e LFA na expressão da proteína GLUT4, foi inicialmente realizada uma curva de concentração para cada ácido graxo estudado, sendo 12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 300 μM e 400 μM para OFA e 50 μM , 100 μM , 200 μM , 300 μM e 400 μM para LFA. Baseados nos resultados obtidos com a realização da curva, concentrações foram selecionadas para a investigação da expressão gênica do GLUT4 e dos fatores transcricionais NF- κB , PPAR γ , HIF-1 α , SREBP-1c e LXR α . É importante ressaltar que durante o tratamento o grupo controle foi sempre mantido na seguinte condição experimental: Meio Dulbecco MEM (DMEM), (1.000 mg/L de glicose, Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, BR) suplementado com 1% de albumina bovina sérica (BSA) (p/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

3.2 Quantificação da proteína GLUT4

3.2.1 Extração de proteína total

De acordo com Barros et al. (2008) amostras de células musculares L6 foram lavadas em PBS1X gelado (0,8% (140 mM) NaCl; 0,115% (8 mM) Na₂HPO₄.(12H₂O); 0,02% (3 mM) KCL; 0,02% (1,5 mM) KH₂PO₄, pH 7,2), com inibidores de proteases [aprotinina (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/leupeptina (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)], e então homogeneizadas em tampão (10 mM Tris HCL, 1 mM EDTA e 250 mM Sacarose, pH 7,4), submetidas à centrifugação de 1.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi reservado e o precipitado foi ressuscitado e centrifugado novamente a 1.000 x g por 10 minutos a 4 °C. Os 2 sobrenadantes foram então submetidos à ultracentrifugação (150.000 x g), por 75 minutos a 4 °C. O precipitado final, correspondendo ao conjunto de proteínas totais de membranas celulares, foi ressuscitado em tampão e estocado a - 20 °C.

A concentração de proteínas totais na amostra foi determinada pelo emprego de reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). A ligação à proteína ocorre quando absorção máxima da solução ácida Coomassie Brilliant Blue G-250 muda de 465 para 595 nm. Interações iônicas e hidrofóbicas estabilizam a forma aniônica do corante, cuja coloração é visível.

3.2.2 Western blotting

Este método consiste em quatro etapas fundamentais, assim descritas:

“SDS-PAGE”: foi utilizado um sistema descontínuo de dois géis contíguos (GARFIN, 1990):

a - gel de empacotamento (“stacking gel”) = 6%T; 2,7%C

b - gel de separação (“resolving gel”) = 10%T; 2,7%C

Alíquotas de amostras contendo 30 µg de proteínas totais foram solubilizadas em tampão de Laemmli (50 mM TRIS, 15% glicerol, 0,05% bromophenol blue, 9% SDS, 6% 2-mercaptoetanol e água deionizada), fervidas por 3 minutos e submetidas à eletroforese. Foi mantida voltagem constante de 40 V durante corrida em gel de empacotamento (por cerca de 1 hora) e corrente constante de 55 mA para corrida em gel de separação (por cerca de 5 horas). Foi utilizado um marcador de peso molecular (Fermentas Life Sciences, Vilnius, LTU, EUR) composto por uma mistura de proteínas de conhecidos pesos moleculares.

Transferência eletroforética: após separação das frações protéicas no gel de poliacrilamida a 10%, foi realizada a transferência eletroforética para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), mantendo corrente constante de 35 mA, por 16 horas, a 4 °C.

A qualidade da transferência foi verificada corando-se o gel com azul brilhante de coomasie.

“ECL- Enhanced Chemiluminescence”: após a transferência eletroforética, foi iniciado o processo de ECL para detecção da proteína GLUT4:

1) Bloqueio inespecífico da membrana em leite desnatado 8% (p/v) diluído em PBS (0,8% (140 mM) NaCl; 0,115% (8 mM) Na₂HPO₄.(12H₂O); 0,02% (3 mM) KCL; 0,02% (1,5 mM) KH₂PO₄, pH 7,2) por 2 horas;

2) Incubação com anticorpo primário anti-GLUT4 (Millipore, Massachusetts, MA, EUA) (1:4000) em PBS/BSA 8% (p/v) a 37 °C, por 3 horas, sobre agitação;

3) Lavagens:

. Duas lavagens rápidas com 10 mL de solução de lavagem (TBST: 1% (0,01 M), Tris HCL, 3% (0,15 M) NaCL, 0,01% Tween 20);

- . Uma lavagem de 15 minutos com TBST, sobre o agitador;
 - . Três lavagens com TBST, 5 minutos cada;
- 4) Incubação com anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com HRP (do inglês, *Horse Radish Peroxidase*) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) (1:10.000) em TBST + 1% leite desnatado, por 1 hora a temperatura ambiente, sobre agitação;
- 5) Lavagens:
- . Duas lavagens rápidas com TBST;
 - . Uma lavagem com TBST por 15 minutos;
 - . Quatro lavagens de 5 minutos cada com TBST;
- 6) Detecção: reagentes A (1% luminol, 0,44% ácido p-cumárico, 10% (100 mM) TRIS e água deionizada) e B (0,06% peróxido de hidrogênio, 10% (100 mM) TRIS e água deionizada) foram misturados e expostos às membranas por 1 minuto. Posteriormente foi realizada a autorradiografia;
- 7) Autorradiografia: as membranas foram expostas a filme de RX-A (IBF Indústria de filmes brasileiros, Rio de Janeiro, RJ, BR), por um tempo variável de 15 segundos a 30 minutos. Após esse período, o filme foi revelado com solução reveladora e reforçadora GBX e solução fixadora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, SP, BR).

3.3 Avaliação do grau de fosforilação das proteínas IKK α e IKK β

Amostras de células musculares L6 foram inicialmente centrifugadas a 1.500 x g por 10 minutos em PBS1X gelado. Sinteticamente, o pellet formado foi homogeneizado em tampão de extração (TRIS 100 mM pH7,5; EDTA 10 mM; pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM; ortovanadato de sódio 10 mM; SDS 5% e inibidores de proteases aprotinina (15 μ g/mL)/leupeptina (4 μ g/mL)) e submetido a banho maria a 95 °C por 10 minutos. O homogenato foi centrifugado 10.000 x g por 10 minutos 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para avaliação do grau de fosforilação de IKK α e IKK β . Em um gel de poliacrilamida (SDS/PAGE 7,5%) foram aplicadas 60 μ g de proteínas. As proteínas separadas no gel foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi tratada para imunodetecção conforme recomendado pelo fabricante (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA). Diluições: anticorpo específico anti-[fosfo-IKK-

α (Ser180)/ β (Ser(181), 1:1000] e anticorpo secundário conjugado a peroxidase (anti-IgG de coelho, 1:2000).

3.4 Densitometria Óptica

A intensidade dos “blots” foi avaliada por densitometria óptica, utilizando o “software” Image Master 1D (Pharmacia Biotech, Upsala, SE, UE).

3.5 Análise dos resultados

Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. Utilizando-se os resultados numéricos obtidos com a realização da densitometria dos “blots” de GLUT4 e IKK α / β considerando o grupo controle como 100%. Para GLUT4 foi calculado o conteúdo relativo desta proteína por μ g de proteína total aplicada à eletroforese, sendo expresso como Unidade Relativa de GLUT4/ micrograma de proteína⁻¹ (UR GLUT4. μ g PTN⁻¹).

A análise estatística foi feita por meio da análise de variância ANOVA “one-way”, utilizando-se “Student-Newman-Keuls” como pós-teste. Valores de *P* menores que 0,05 foram considerados significativos.

3.6 Extração de RNA total

Amostras de células musculares L6 tratadas conforme previamente descrito foram lavadas com PBS, para retirar o excesso de meio de cultura e, posteriormente, destinadas a extração de RNA total com reagente Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), conforme instruções do fabricante. A concentração de RNA total das amostras e o grau de pureza destas, determinado pela razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, foram avaliados por espectrofotometria (Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Pharmacia Biotech, Upsala, SE, UE). A integridade do RNA extraído foi avaliada pela visualização das bandas 28 e 18S, sob luz ultravioleta, após corrida em gel de agarose (1%).

3.7 Transcrição reversa

Um μg de RNA total foi adicionado a 1 μL de ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, EUA), 1 μL *primers* Oligo dT (0,5 μg) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1 μL nucleotídeos dNTP mix (0,5 mM) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 2,4 μL MgCl_2 (3 mM) (Promega, Madison, WI, EUA), 4 μL de ImProm-II 5X™ reaction buffer (1X) (Promega, Madison, WI, EUA) e água deionizada 0,01%, para volume final de 20 μL , para etapa de transcrição reversa. Os cDNAs foram armazenados a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

3.8 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-tempo real)

Os cDNAs sintetizados foram utilizados para PCR em tempo real conforme previamente proposto. Foi utilizado o sistema *TaqMan Two Step RT-PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com *Custom TaqMan gene expression assays* para análise dos mRNAs do GLUT4 e da GAPDH (Tabela 1). Diferentemente, a verificação da expressão dos mRNAs de NF- κB , SREBP-1c, HIF-1 α , PPAR γ , LXR α e β -actina (Tabela 2) foi realizada com Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Os iniciadores e sondas foram selecionados de acordo com sequências disponíveis no banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health (NIH)* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Alguns iniciadores foram desenhados com auxílio do programa *Primer 3*.

Tabela 1 - Iniciadores para PCR em Tempo Real - sistema de amplificação *TaqMan Two Step RT-PCR*.

Genes	Iniciadores	Espécie	Fragmento	Número de acesso
GLUT4	S 5'GGCTGTGCCATCTTGATGAC3' AS 5'CACGATGGACACATAACTCATGGA3' FAM AACCCGCTCCAGCAGC MGB	Rato	75bp	NM_012751.1
GAPDH	Sequência não fornecida pela Applied Biosystems	Rato	87bp	NM_017008.3

Tabela 2 - Iniciadores para PCR em Tempo Real - sistema de amplificação Platinum[®] SYBR[®] Green.

Genes	Iniciadores	Espécie	Fragmento	Número de acesso
NF-κB (p65)	S 5'CCATGGACGATCTGTTTCC3' AS 5'CGCACTTGTAACGGAAACG3'	Rato	116bp	AF079314.1
SREBP1c	S 5'GGAGCCATGGATTGCACATT3' AS 5'AGGAAGGCTTCCAGAGAGGA3'	Rato	191bp	L16995 Kakuma et al., (1993)
HIF-1α	S 5'CAGTCGACACAGCCTCGATA3' AS 5'TAAATTGAACGGCCCAAAG3'	Rato	99bp	NM_024359
PPARγ	S 5'CGAGGACATCCAAGACAACCTGC3' AS 5'CGTGCTCTGTGACAATCTGCCTG3'	Rato	90bp	NM_013196
LXRα	S 5'TCAAGCCACATCGGTGTCCC3' AS 5'CGAAGTCGGTCAGAGAAGGAGC3'	Rato	141bp	NM_031627
β actina	S 5'CCTCTGAACCCTAAGGCC3' AS 5'AGCCTGGATGGCTACGTAC3'	Rato	89bp	NM_031144.2

A quantidade de cDNA para cada gene foi otimizada a partir de curva-padrão que permite avaliar a linearidade e a eficiência da amplificação. Para essa finalidade, foram utilizadas as diluições (1, 1:10, 1:100 e 1:1000) de cDNA de amostras usadas apenas para teste nos ensaios de PCR em tempo real. As diluições de cDNA e os respectivos valores de Ct foram colocados em gráfico que permite verificar a relação entre essas duas variáveis (Ct x log da diluição de cDNA). O ajuste na concentração dos *primers* utilizados nas reações, também foi realizado. Desta forma para GLUT4 e GAPDH foram utilizadas 900 nM de sonda e de iniciadores, para SREBP-1c, HIF-1 α e β actina foi utilizado 400 nM e para NF- κ B, LXR α e PPAR γ foi utilizado 800 nM.

Brevemente, o programa da PCR em tempo real foi:

1) para SYBR[®] Green: (1) um ciclo 2 minutos a 50 °C (ativação de UDG); (2) um ciclo de 2 minutos a 95 °C (inativação de UDG); (3) 30 ciclos de 20 segundos a 95 °C (desnaturação), 60 segundos a 60 °C (hibridização) e 15 segundos a 72 °C (extensão);

2) para TaqMan[®] Probes: (1) um ciclo 2 minutos a 50 °C (ativação de UNG); (2) um ciclo de 10 minutos a 95 °C (inativação de UNG); (3) 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C (desnaturação) e 1 minuto a 60 °C (hibridização e extensão);

Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos foram detectados pelos equipamentos ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para GLUT4 e GAPDH e Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, NSW, AUS) para os outros genes estudados. Os dados foram analisados pelos seus respectivos Softwares. Em ambos, a partir do sinal de fluorescência detectado, fase exponencial de amplificação, foram gerados um valor numérico que é denominado *ciclo threshold* (C_t) (WONG e MEDRANO, 2005). Para cada amostra de cDNA, o C_t de cada gene alvo é registrado e comparado com o C_t do controle endógeno sendo, GAPDH para GLUT4 e β -actina para os outros genes avaliados.

Os valores de C_t obtidos nesses ensaios foram utilizados para calcular a expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do controle endógeno. Essa relação é denominada Delta C_t (ΔC_t):

$$\Delta C_t = (C_t_{\text{gene alvo}} - C_t_{\text{controle endógeno}})$$

Com objetivo de avaliar a variação de expressão entre os grupos foi utilizado o parâmetro Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) que é calculado utilizando o Delta Ct da média dos controles, usando a seguinte fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{amostra} - \Delta Ct_{controle})$$

Os dados de $\Delta\Delta Ct$ foram transformados em escala logarítmica ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) para comparar dados entre os grupos. A expressão é interpretada pelo aumento ou diminuição após o tratamento.

A análise estatística foi realizada conforme acima descrito (item 3.5.).

3.9 Ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA) ou gel shift

3.9.1 Extração de proteínas nucleares em amostras de células musculares L6

A extração de proteínas nucleares foi realizada baseada em Kawamoto et al. (2008) e Sinhá et al. (2004). Brevemente, amostras de células foram homogeneizadas em 1 mL PBS1X gelado, seguindo-se de uma centrifugação à 2.000 x g, 10 minutos, 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a etapa supracitada foi repetida. Posteriormente, o “pellet” foi ressuspensão em 400 µL de tampão de lise gelado (10 mM HEPES-KOH pH: 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCL, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 0,1 mM EDTA, com inibidores de proteases (aprotinina (15 µg/mL)/leupeptina (5 µg/mL)), homogeneizado, mantido em repouso no gelo por 15 minutos e acrescido de 2,5% NONIDET-40 a 10%. A seguir as amostras foram centrifugadas a 11.000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante (contendo as proteínas nucleares) ressuspensão em 50 µL de tampão de extração gelado (20 mM HEPES pH: 7,9, 25% glicerol, 300 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,25 mM EDTA, 0,5 mM DTT e 0,5 mM PMSF e inibidores de proteases (aprotinina (12 µg/mL)/leupeptina (4 µg/mL)). O sobrenadante, contendo as proteínas nucleares, foi aliquoteado e armazenado a – 70 °C. A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford utilizando o reagente Bio-Rad protein Assay (Bio-Rad Laboratórios, Rio de Janeiro, RJ, BR), conforme descrito no item 3.2.1.

3.9.2 Obtenção das sondas

As sondas marcadas foram obtidas a partir dos oligonucleotídeos pareados (Tabela 3) e (γ - ^{32}P)-ATP (PerkinElmer Life, Waltham, MA, EUA), na presença da enzima T4 poliquinase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Posteriormente, a reação foi acrescida de água MiliQ autoclavada, e a amostra purificada em coluna Sephadex. Uma alíquota do produto (1 μL) foi utilizada para contagem em contador β (PerkinElmer Life, Waltham, MA, EUA).

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para EMSA.

Genes	Iniciadores	Espécie	Referência
NF- κB	5'GGGTGGGGGCGTGGCCTTTGG3'	Rato	Furuya et al., (2008)
HIF-1 α	5'GGGACCTGACATTTGGCGGA3'	Rato	Silva et al., (2005)
SREBP-1	5'GGCCTTTTGGGGTGTGCGGG3'	Rato	Im et al., (2006)
LXR α	5'CGGGTACTTCGGGGCATTG3'	Rato	Dalen et al., (2003)

3.9.3 Reação de ligação e eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante

Foram colocados em tubo de microcentrífuga: tampão de ligação 3X (HEPES 60 mM, pH 7,6; glicerol 10%; KCL 150 mM; EDTA 0,6 mM); BSA 1,93 mg/mL; DTT 2,3 mM, Poly dIdc 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, extrato nuclear e sonda marcada. Para ensaio de competição foi adicionado oligonucleotídeo não marcados em excesso. Em ensaios de *supershift* foram acrescidos 10 μL de anticorpo específico para as subunidades NF- κB p65 (Abcam 7970-1) antes da adição da sonda marcada e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a adição da sonda marcada as amostras foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, e então o conteúdo total da reação foi aplicado em gel de poliacrilamida não desnaturante, e submetido a uma corrida por 2 horas a 150 V em tampão TBE 0,5 X (TBE1X= Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 1 mM). Ao final da corrida, o gel foi cuidadosamente transferido para um filtro de papel Whatman, seco à vácuo por a 80 $^{\circ}\text{C}$ e exposto por 3 dias a filme RX, a -70°C .

A atividade de ligação foi calculada utilizando os resultados numéricos obtidos da densitometria dos “blots”. O grupo controle foi considerado como 100%. A análise estatística foi realizada conforme descrito no item 3.5.

3.10 Ensaio de imunoprecipitação de cromatina (do inglês, *Chromatin Immunoprecipitation assay, ChIP assay*)

Brevemente, para promover a estabilização da ligação de proteínas nucleares ao DNA, amostras de células musculares L6 foram fixadas em DMEM contendo formaldeído 1% por 10 minutos, à temperatura ambiente, e então transferidas para tampão de lise, concentrado em SDS, para o rompimento de membranas, celular e nuclear. Posteriormente, por sonicação (8 pulsos, 10 segundos cada, 40% de potência), a cromatina foi rompida em fragmentos de 200 a 1.000 pares de bases. As amostras foram diluídas em *dilution buffer* e pré-lavadas por 2 horas a 4 °C, com Proteína A sefarose (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) para PPAR γ e SREBP-1 e Proteína G sefarose (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) para LXR α , sempre saturada com DNA de esperma de salmão. Após esta etapa uma alíquota de 10 μ L foi coletada e utilizada como “*input*”. O restante do sobrenadante foi destinado a imunoprecipitação com anticorpo específico para PPAR γ (SC-7196X), SREBP-1 (SC-367X) e LXR α (SC-1202X) (Santa Cruz Biotechnology) por 24 horas a 4 °C. Após a incubação, para testar a imunoprecipitação, os “pellets” de sefarose foram preparados e aplicados em gel de poliacrilamida. Novas amostras foram tratadas conforme acima descrito, e os “fragmentos” de DNA co-imunoprecipitados foram eluídos em tampão de alta concentração de SDS e bicarbonato de sódio. O *cross-link* do DNA ao fator de transcrição foi revertido com incubação das amostras a 65 °C por 24 horas. No final, o DNA foi purificado com fenol-clorofórmio, e uma alíquota foi submetida à amplificação por RT-PCR com *primers* flanqueadores específicos para as regiões do gene *Slc2a4* com sítios de ligação para PPAR γ , SREBP-1 ou LXR α (Tabela 4).

Tabela 4 - Iniciadores Utilizados para *ChIP* assay

Gene <i>slc2a4</i>	Iniciadores	Fragmento	Referência
SREBP-1	S 5'CCACTTTGAAATCCCAGAGGCAG3' AS 5'GCCCTTCACAACACCCATTGG3'	128bp	Armoni et al., (2003)
PPAR γ	S 5'CCACTTTGAAATCCCAGAGGCAG3' AS 5'GCCCTTCACAACACCCATTGG3'	128bp	Im et al., (2006)
LXR α	S 5'CCCTTAAGGCTCCATCTCCC3' AS 5'GTACTIONGCGGGTACGGGTAAC3'	240bp	Dalen et al., (2003)

Os valores de Ct obtidos nesses ensaios foram utilizados para calcular a ligação, in vivo, dos fatores transcricionais acima citados no gene *Slc2a4*; estes valores foram normalizados pelos valores de Ct do “input” de cada amostra. Os valores de $\Delta\Delta Ct$ obtidos com a realização dos cálculos foram transformados em escala logarítmica ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) para comparar os dados entre os grupos.

A análise estatística foi realizada conforme acima descrito (item 3.5.).

4 RESULTADOS

4.1 Ácido graxo oléico reduz a expressão do transportador de glicose GLUT4

Após 16 horas de tratamento, foi observada redução na expressão da proteína GLUT4 (Figura 1B) na presença de 50 μM (~29%), 100 μM (~34%), 200 μM (~42%), 300 μM (~43%) e 400 μM (~43%) de ácido graxo monoinsaturado oléico (OFA) quando comparada ao observado em controle (0 μM) (** $P<0,01$) e as concentrações 12,5 μM e 25 μM . O mRNA do GLUT4 foi avaliado em apenas três concentrações de OFA (Figura 1C), e em todas foi verificada redução (25 μM , ~36%; 50 μM , ~49% e 200 μM , ~60%), quando comparadas ao observado no controle (0 μM) (** $P<0,001$). Ainda, em 200 μM , o mRNA do GLUT4 também reduziu quando comparado ao observado em 25 μM .

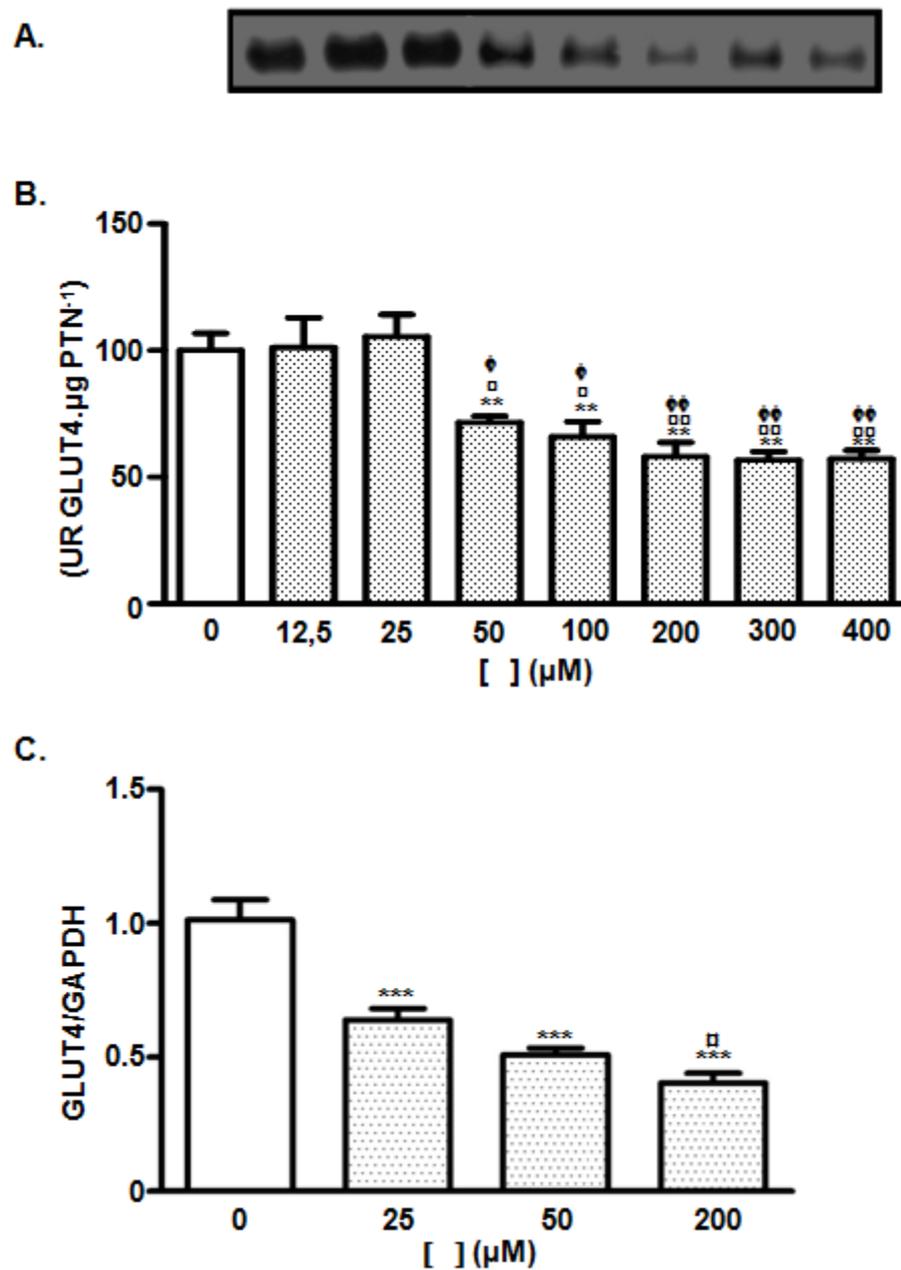


Figura 1 - Quantificação da expressão da proteína e do mRNA do GLUT4 em células musculares L6 na presença de diferentes concentrações do ácido graxo oléico (OFA). Em **A**, autoradiografia típica da proteína GLUT4. Em **B**, gráfico representando o conteúdo da proteína GLUT4 ($n=4-10$). Em **C**, gráfico representando o conteúdo do mRNA do GLUT4 ($n=5-9$). Os valores são média \pm EPM, sendo $**P<0,01$ e $***P<0,001$ vs. controle (0 μM); $^{\phi}P<0,05$ e $^{\phi\phi}P<0,01$ vs. 12,5 μM ; $^{\square}P<0,05$ e $^{\square\square}P<0,01$ vs. 25 μM . ANOVA one-way, pós-teste, Student-Newman-Keuls.

4.2 Ácido graxo linoléico reduz a expressão do transportador de glicose GLUT4

O tratamento por 16 horas com ácido graxo linoléico (LFA) reduziu a expressão da proteína GLUT4 apenas na concentração de 300 μM (~33%) ($*P<0,05$) e 400 μM (~54%) ($**P<0,01$), quando comparadas ao observado tanto no controle (0 μM) como em 50 μM (Figura 2B). Três concentrações de LFA foram selecionadas para análise da expressão do mRNA do GLUT4 (Figura 2C). Redução na expressão do mRNA do GLUT4 foi observada em 50 μM (~34%), 200 μM (~52%) e 300 μM (~52%) comparadas ao controle (0 μM) ($***P<0,001$). Também se observou redução nas concentrações de 200 e 300 μM , quando comparadas ao observado em 50 μM .

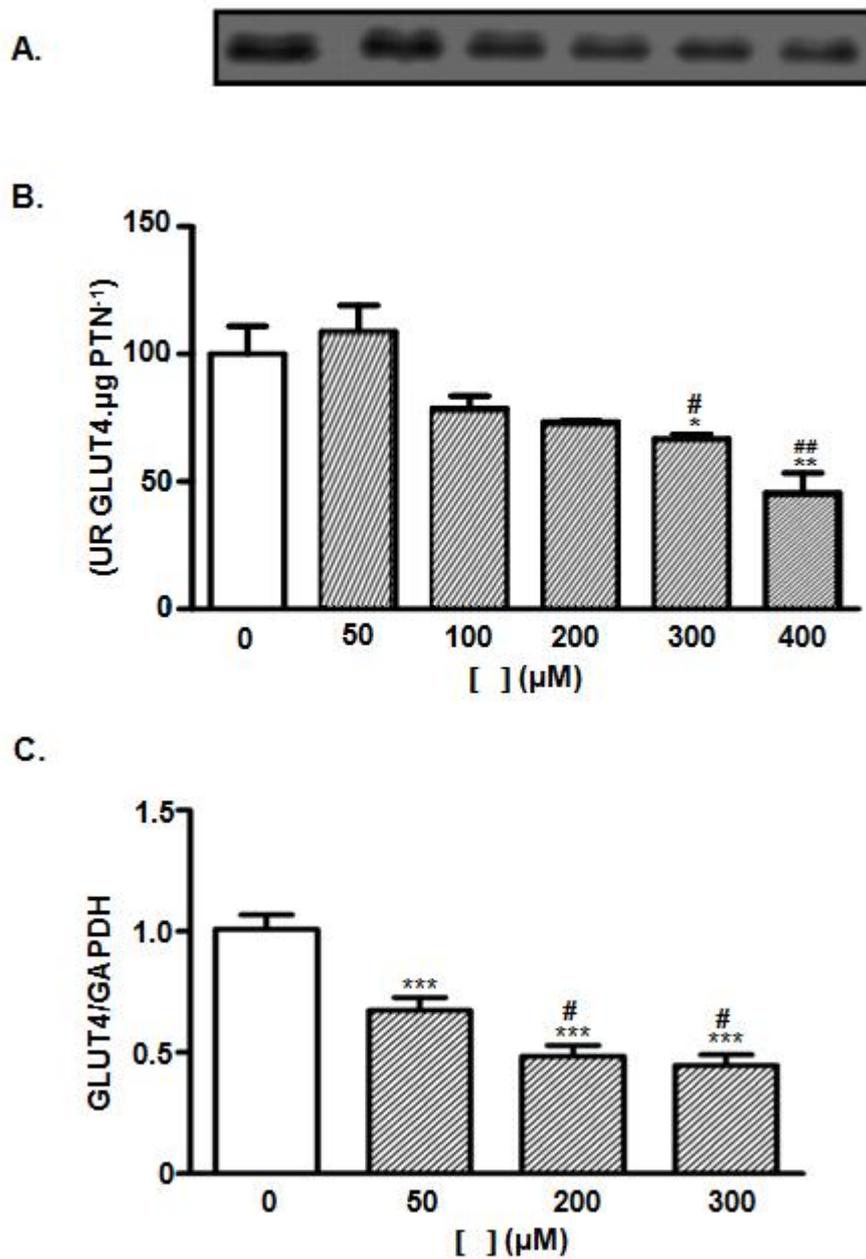


Figura 2 - Quantificação da expressão da proteína e do mRNA do GLUT4 em células musculares L6 incubadas na presença de diferentes concentrações de ácido graxo linoléico (LFA). Em **A**, autoradiografia típica da proteína GLUT4. Em **B**, gráfico representando o conteúdo da proteína GLUT4 ($n=4-9$). Em **C**, gráfico representando o conteúdo do mRNA do GLUT4 ($n=7-9$). Os valores são média \pm EPM, onde $^*P<0,05$, $^{**}P<0,01$ e $^{***}P<0,001$ vs. controle (0 μM); $^{\#}P<0,05$, $^{\#\#}P<0,01$ vs. 50 μM . ANOVA one-way, pós-teste, Student-Newman-Keuls.

4.3 Ácidos graxos oléico e linoléico aumentam a expressão gênica do fator transcricional NF-κB

Após 16 horas de tratamento foi observado aumento significativo ($*P < 0,05$) na expressão do NF-κB na presença de 200 μM (~49%) de OFA quando comparado ao observado em controle (0 μM), 25 e 50 μM (Figura 3A).

Na presença de LFA (Figura 3B), foi observado um aumento na expressão do NF-κB em 200 μM (~67%) ($*P < 0,05$) e 300 μM (~136%) ($***P < 0,001$), quando comparado ao observado em controle (0 μM). Semelhante aumento foi verificado ao comparar 300 μM a 50 e 200 μM.

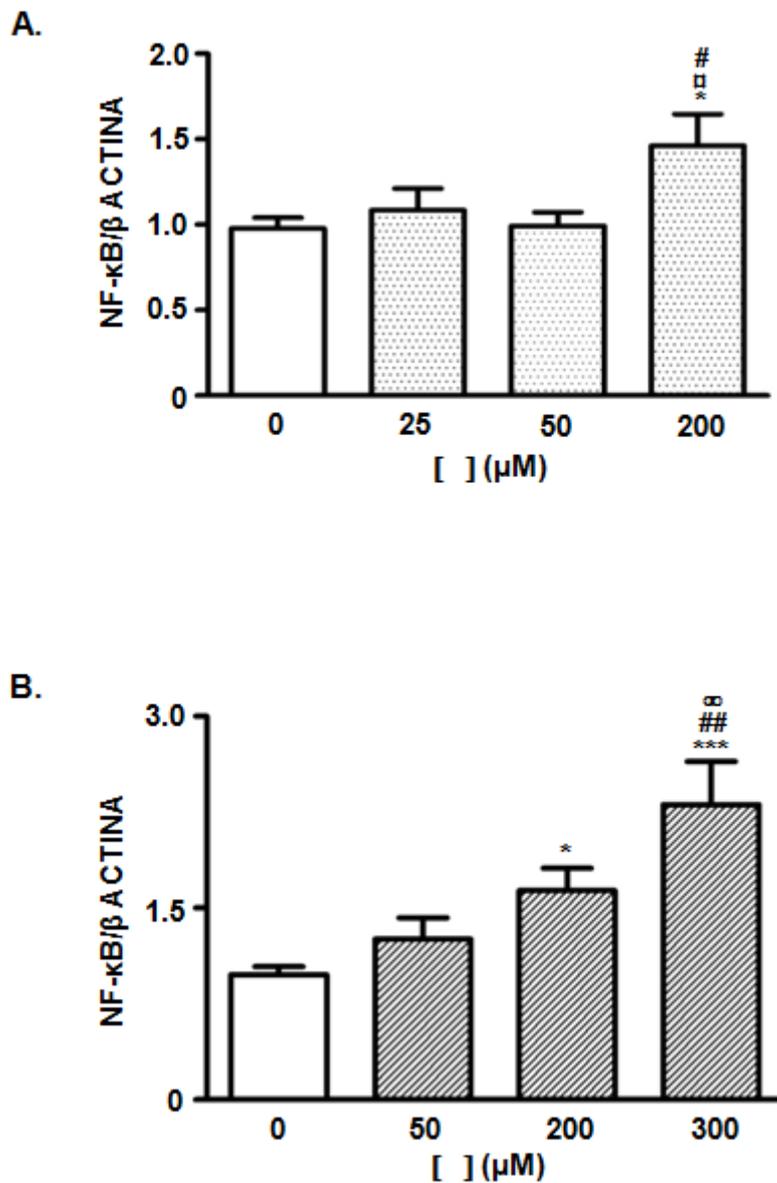


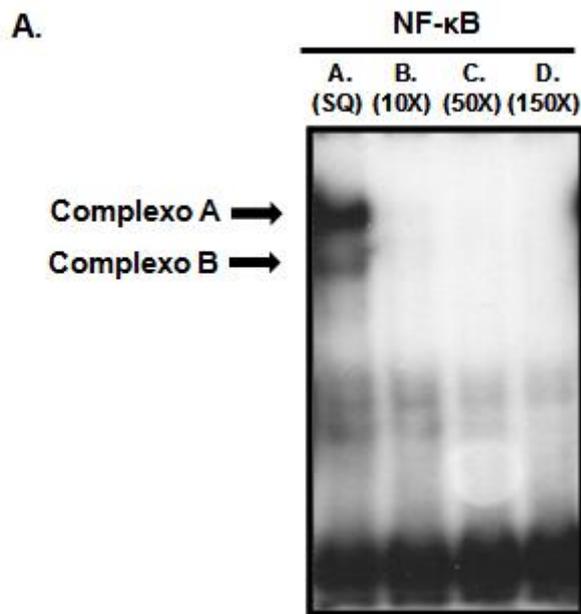
Figura 3 - Quantificação da expressão do mRNA do fator transcricional NF-κB em células musculares L6 na presença diferentes concentrações do ácido graxos, oléico (OFA) e linoléico (LFA). Em **A**, gráfico representando o conteúdo do mRNA do NF-κB na presença de OFA ($n=5-10$). Em **B**, gráfico representando o conteúdo do mRNA do NF-κB na presença de LFA ($n=7-10$). Os valores são média \pm EPM, sendo * $P<0,05$ e *** $P<0,001$ vs. controle (0 μ M); ° $P<0,05$ vs. 25 μ M; # $P<0,05$ e ## $P<0,01$ vs. 50 μ M e ∞ $P<0,05$ vs. 200 μ M. ANOVA one-way, pós-teste, Student-Newman-Keuls.

4.4 Determinação da especificidade da sonda e da identidade da banda de NF- κ B

Baseado na sequência -166/-147 foi utilizado oligonucleotídeo para avaliar a ligação do NF- κ B a região promotora no gene *Slc2a4*.

Primeiramente foi realizado um ensaio de competição com excesso (Figura 4A) de 10X (B), 50X (C) e 150X (D) de sonda não radioativa. Duas bandas para NF- κ B, denominadas complexos A e B, foram observadas com clareza.

Posteriormente, utilizou-se anticorpo anti-p65 (NF- κ B) (ensaio de *Supershift*), observando-se o desaparecimento dos complexos A e B (Lane 1 e 2), assim mostrando que a p65 NF- κ B participa desses complexos (Figura 4B).



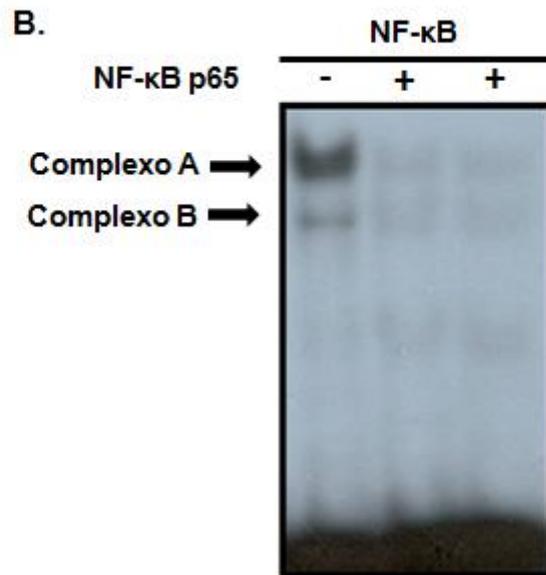


Figura 4 - Ensaio de mobilidade eletroforética revelando a ligação de proteínas nucleares, pertencentes a amostras de células musculares L6, ao domínio de ligação do NF-κB localizado na região promotora do gene *Slc2a4*. Em **A**, autorradiografia do ensaio de competição para NF-κB. Amostras contendo proteínas nucleares foram acrescidas de oligonucleotídeo NF-κB marcado com radioativo (trilha A) e excesso de oligonucleotídeo não marcado com radioativo (trilhas B-D), compondo uma curva de deslocamento da ligação com concentrações crescentes. Em **B**, autorradiografia do ensaio de *Supershift* para NF-κB. Amostras contendo proteínas nucleares foram incubadas com oligonucleotídeo marcado na presença (+) ou ausência (-) de anticorpo específico anti - p65 (NF-κB).

4.5 Ácido graxo oléico aumenta a atividade de ligação do fator transcricional NF-κB a região promotora do gene *Slc2a4*

Conforme mostrado na figura 5B, ao analisar o complexo A, foi observado um aumento na ligação de NF-κB na presença de 200 μM (~25%) de OFA, quando comparado ao observado em controle (0 μM) (** $P < 0,001$) e 25 e 50 μM de OFA.

Quanto ao complexo B, aumento na ligação de NF-κB a região promotora do gene em questão foi detectado em todas as concentrações de OFA: 25 μM (~17%) (** $P < 0,01$), 50 μM (~21%) (** $P < 0,001$) e 200 μM (~12%) (** $P < 0,001$), quando comparadas ao controle (0 μM) (Figura 5B).

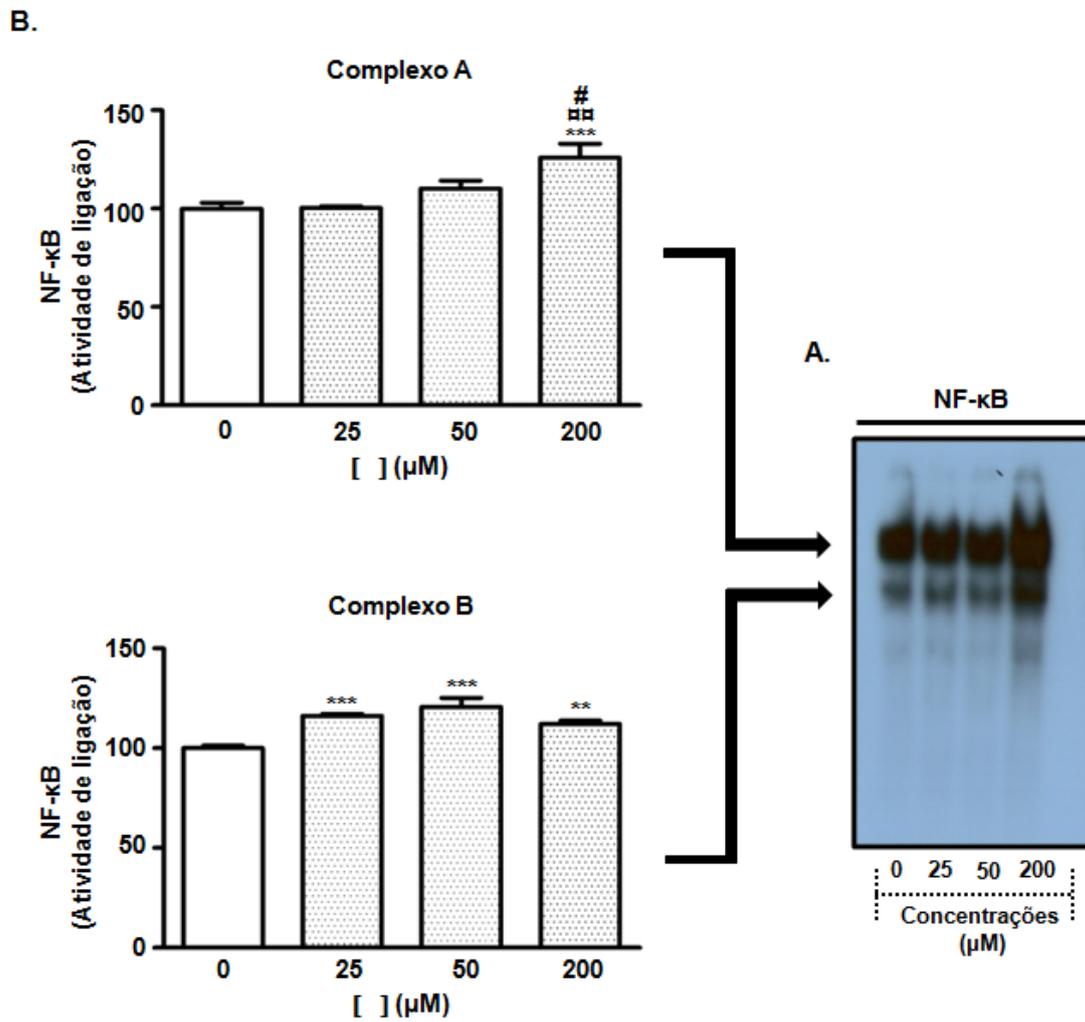


Figura 5 - Análise da atividade de ligação de proteínas nucleares provenientes de amostras de células musculares L6 tratadas com diferentes concentrações do ácido graxo oléico (OFA). Em **A**, autoradiografia mostrando a ligação de proteínas nucleares ao domínio de ligação do NF-κB localizado na região promotora do gene *Slc2a4*. Em **B**, gráficos representando a quantificação relativa dos complexos A e B (proteína/DNA), respectivamente. Os valores são média ± EPM, $n = 4-10$ amostras, sendo $**P < 0,01$, $***P < 0,001$ vs. controle (0 μM); $^{□□}P < 0,01$ vs. 25 μM; $^{\#}P < 0,05$ vs. 50 μM. ANOVA one-way, pós-teste, Student-Newman-Keuls.

4.6 Ácido graxo linoléico aumenta a atividade de ligação do fator transcricional NF- κ B à região promotora do gene *Slc2a4*

Conforme apresentado na figura 6B, a ligação de NF- κ B no complexo A aumentou na presença de 200 μ M (~12%) (* P <0,05) e 300 μ M (~24%) de OFA (** P <0,001), comparada ao observado em 0 μ M (controle) e em 50 μ M.

Ao analisar o complexo B, verificou-se aumento na atividade de ligação nas concentrações de 200 μ M (~42%) (** P <0,001) e 300 μ M (~35%) (** P <0,001) *versus* controle (0 μ M) e 50 μ M (Figura 6B).

B.

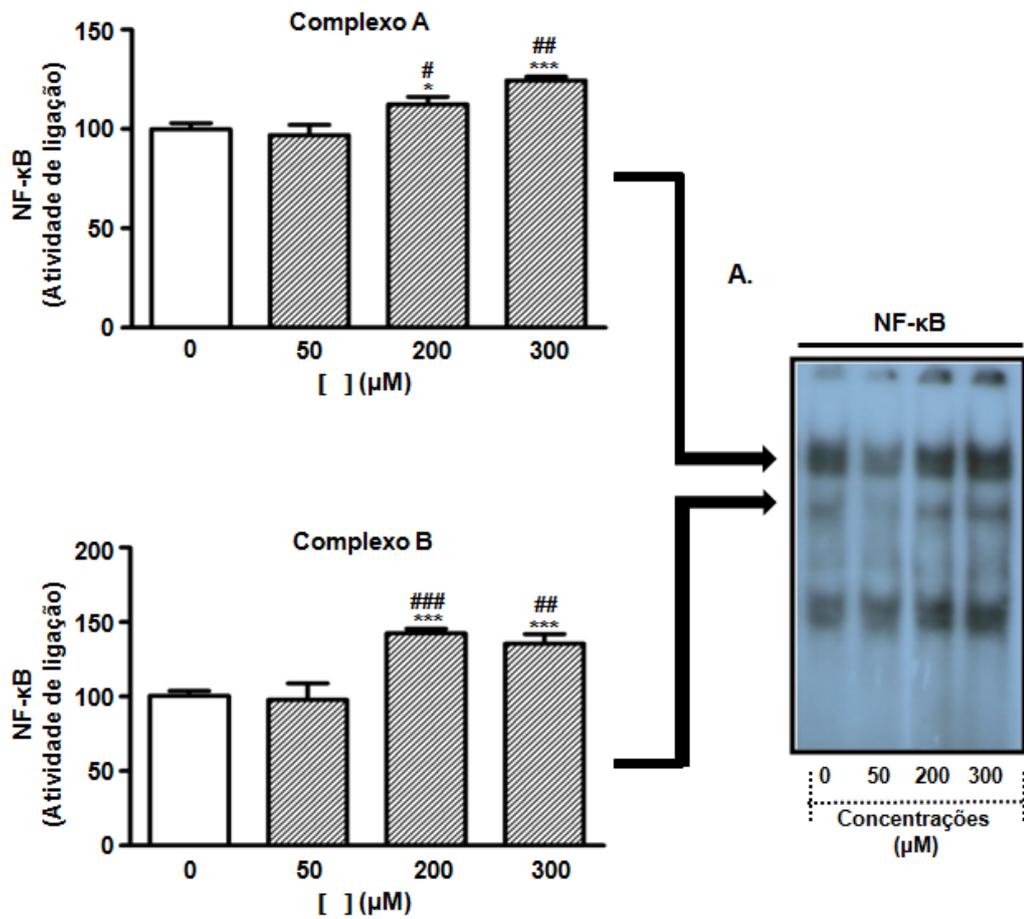


Figura 6 - Análise da atividade de ligação de proteínas nucleares provenientes de amostras de células musculares L6 tratadas com diferentes concentrações do ácido graxo linoléico (LFA). Em **A**, autoradiografia mostrando a ligação de proteínas nucleares ao domínio de ligação do NF-κB na região promotora do gene do *Slc2a4*. Em **B**, gráficos representando a quantificação relativa dos complexos A e B (proteína/DNA). Os valores são média ± EPM, $n= 4-12$ amostras, sendo * $P<0,05$, *** $P<0,001$ vs. controle (0 μM); # $P<0,05$; ## $P<0,01$; ### $P<0,001$ vs. 50 μM. ANOVA one-way, pós-teste, Student-Newman-Keuls.

4.7 Ácidos graxos oléico e linoléico estimulam a fosforilação das proteínas IKK α/β

A figura 7B mostra um aumento ($P < 0.001$) na fosforilação de IKK α/β na presença de 200 μM (~346%) de OFA, quando comparada ao observado em 0, 25 e 50 μM . Já na presença de LFA, foi verificado aumento na fosforilação destas proteínas em todas as concentrações analisadas (50 μM ~95%; 200 μM , ~125% e 300 μM , ~178%) *versus* 0 μM (Figura 7D).

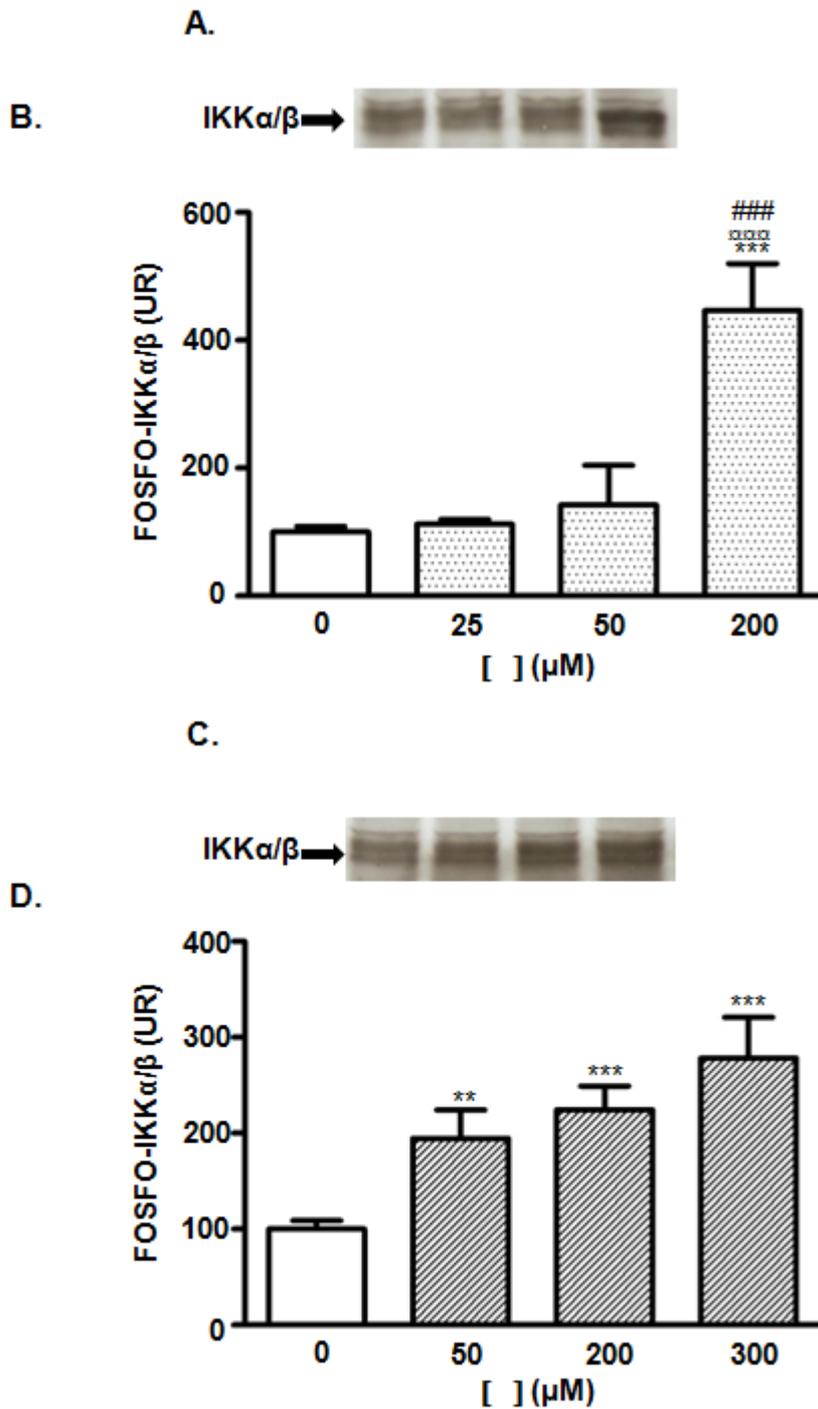


Figura 7 - Grau de fosforilação das proteínas IKK α/β em amostras de células musculares L6 na presença de diferentes concentrações dos ácidos graxos, oléico (OFA) e linoléico (LFA). Em **A** e **C** autorradiografias típicas. Em **B** e **D**, gráficos representando o grau de fosforilação de IKK α/β na presença de OFA ($n=3-10$) e LFA ($n=6-10$), respectivamente. Os valores são média \pm EPM, sendo ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ vs. controle (0 μ M); **** $P<0,001$ vs. 25 μ M; ### $P<0,001$ vs. 50 μ M. ANOVA one-way, pós-teste, Student-Newman-Keuls.

4.8 Altas concentrações dos ácidos graxos oléico e linoléico aumentam a expressão do mRNA do fator transcricional HIF-1 α

No presente estudo, um aumento na expressão de HIF-1 α foi verificado na presença de 200 μ M de OFA (~125%) quando comparado ao observado no controle (0 μ M) ($^{***}P<0,001$) e nas concentrações de 25 e 50 μ M (Figura 8A). Já na presença de 200 μ M (~43%) e 300 μ M (~56%) de LFA, foi detectado um aumento ($^{*}P<0.05$) quando comparado ao observado no controle (0 μ M) e em 50 μ M (Figura 8B).

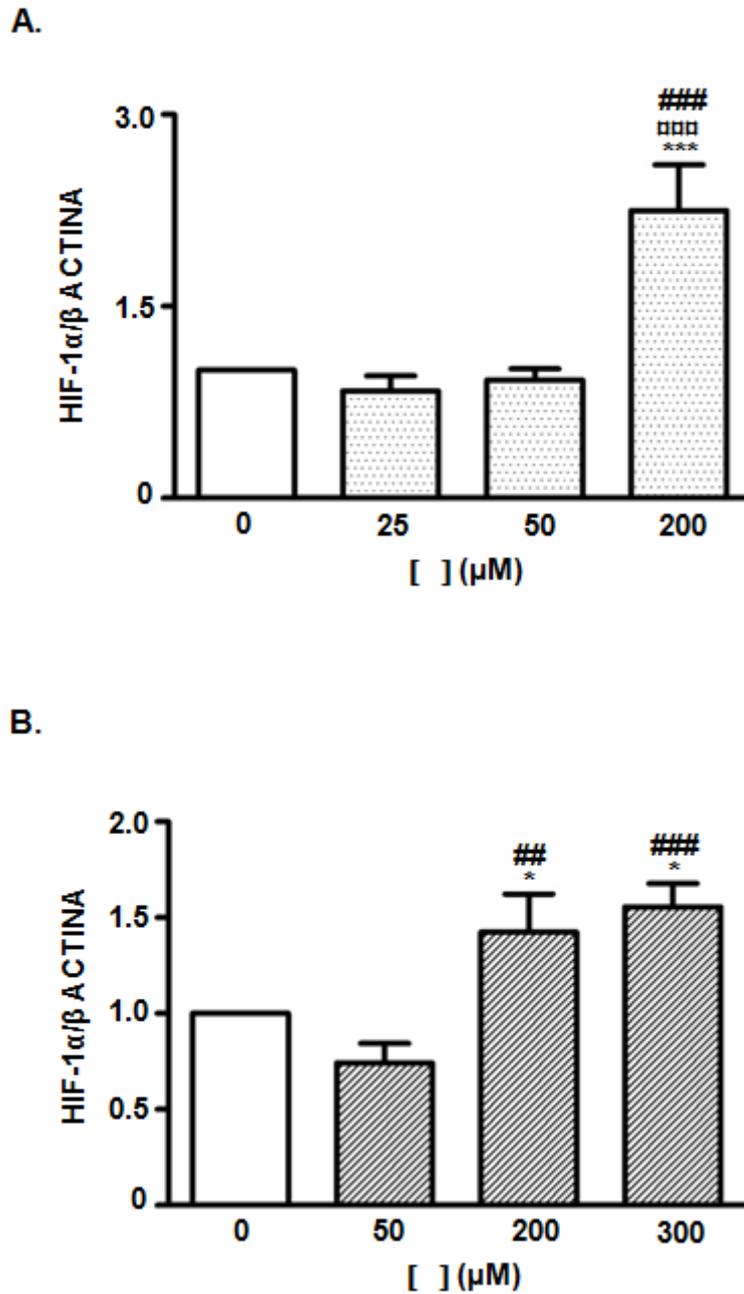


Figura 8 - Quantificação da expressão do mRNA do fator transcricional HIF-1 α em células musculares L6 na presença diferentes concentrações do ácido graxo oléico (OFA) e do ácido graxo linoléico (LFA). Em **A**, gráfico representando o conteúdo do mRNA do HIF-1 α na presença do OFA ($n=5$). Em **B**, gráfico representando o conteúdo do mRNA do HIF-1 α na presença do LFA ($n=4-6$). Os valores são média \pm EPM, sendo * $P<0,05$ e *** $P<0,001$ vs. controle (0 μM); **** $P<0,001$ vs. 25 μM ; ## $P<0,01$ e ### $P<0,001$ vs. 50 μM . ANOVA one-way, pós-teste, Student-Newman-Keuls.

4.9 Avaliação da atividade de ligação ao domínio E-box

O domínio E-box é sítio de ligação do HIF-1 α além de outras proteínas. Baseado em Silva et al. (2005) a atividade de ligação foi avaliada utilizando sondas para a sequência -499/-480 na região do gene *Slc2a4*.

A especificidade da ligação foi primeiramente testada por ensaio de competição utilizando concentrações elevadas de sonda não radioativa. A presença do HIF-1 α nesta banda já foi determinada em ensaios realizados por nosso grupo.

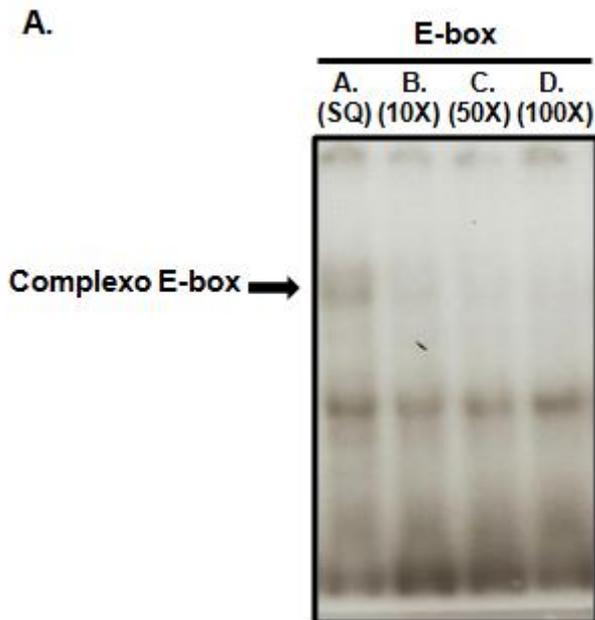


Figura 9 - Ensaio de mobilidade eletroforética revelando a ligação de proteínas nucleares, pertencentes a amostras de células musculares L6, ao domínio de ligação para HIF-1 α (E-box) localizado na região promotora do gene do *Slc2a4*. A autorradiografia ilustra a realização do ensaio de competição. Amostras contendo proteínas nucleares foram acrescidas de oligonucleotídeo E-box marcado (trilha A) e excesso de oligonucleotídeo não marcado (trilhas B-D), compondo uma curva de deslocamento da ligação com concentrações crescentes.

4.10 Ácidos graxos oléico e linoléico não alteram a atividade de ligação do fator transcricional HIF-1 α a região promotora do gene *Slc2a4*

Embora um aumento na expressão de HIF-1 α tenha sido detectado em concentrações específicas para ambos AGs estudados nenhuma alteração quanto a sua ligação ao promotor do gene *Slc2a4* foi identificada, na presença de OFA e LFA (Figura 10B).

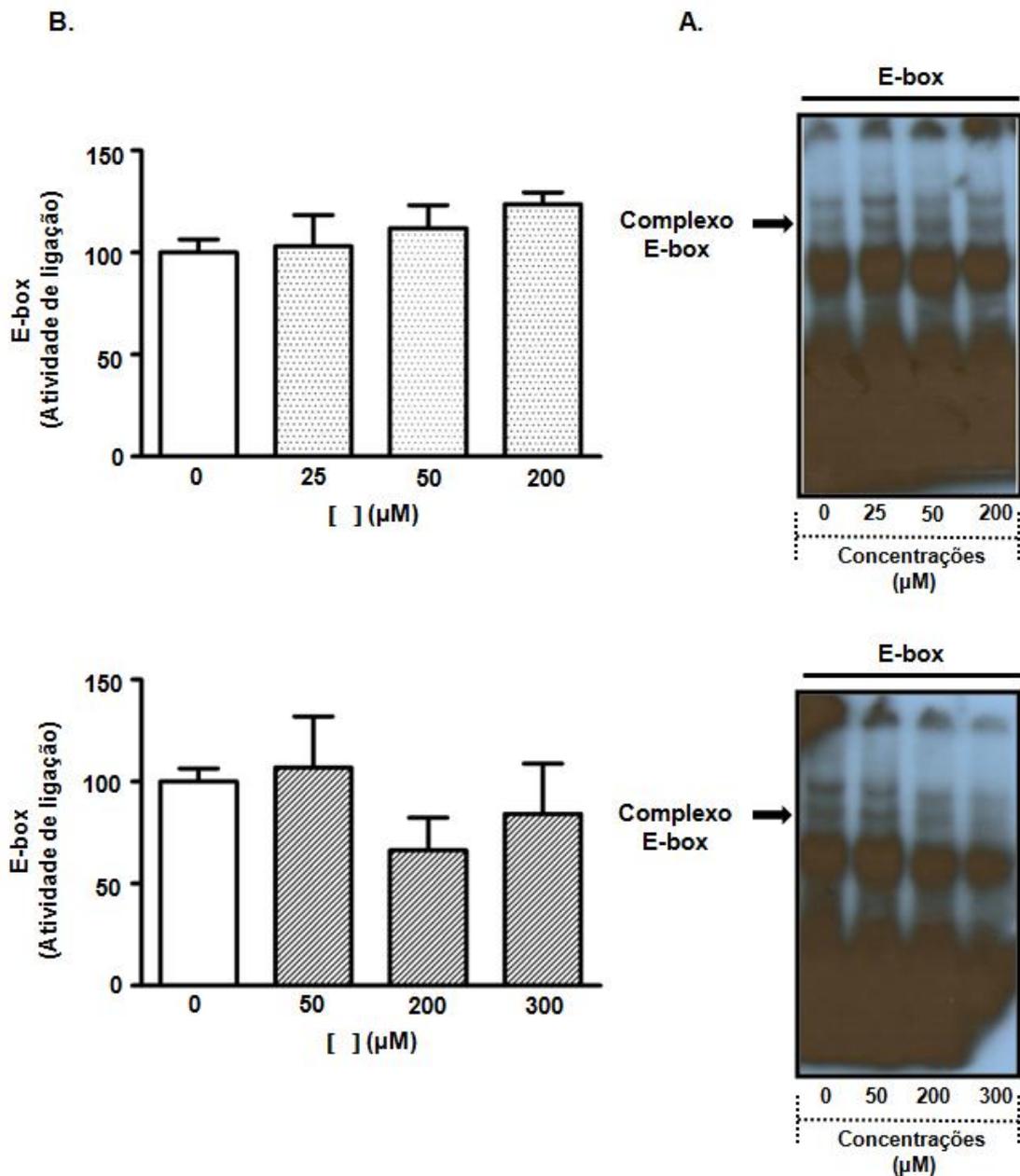


Figura 10 - Análise da atividade de ligação de proteínas nucleares provenientes de amostras de células L6 tratadas com diferentes concentrações do ácido graxo oléico e linoléico. Em **A**, autorradiografias mostram a ligação de proteínas nucleares ao domínio de ligação do HIF-1 α (E-box) localizado na região promotora do gene do *Slc2a4*. Em **B**, gráficos representam a quantificação relativa do complexo HIF-1 α /DNA na presença de OFA e LFA, respectivamente. Os valores são média \pm EPM, $n = 4-13$ amostras. ANOVA one-way.

4.11 Redução da expressão de SREBP-1c na presença dos ácidos graxos, oléico e linoléico

Conforme mostra a figura 11A, redução na expressão do mRNA do SREBP-1c foi observada na presença de 25 μM (~38%) (** $P < 0,01$), 50 μM (~74%) e 200 μM (~62%) (** $P < 0,001$) de OFA, quando comparadas ao observado no controle (0 μM). Diminuição na expressão do mRNA deste fator transcricional também foi verificada na presença de 50 μM quando comparada a 25 μM . Redução no conteúdo do mRNA do SREBP-1c foi também observada na presença de 50 μM (66~%), 200 μM (~80%) e 300 μM (~59%) de LFA quando comparadas ao controle (0 μM) (** $P < 0,001$) (Figura 11B).

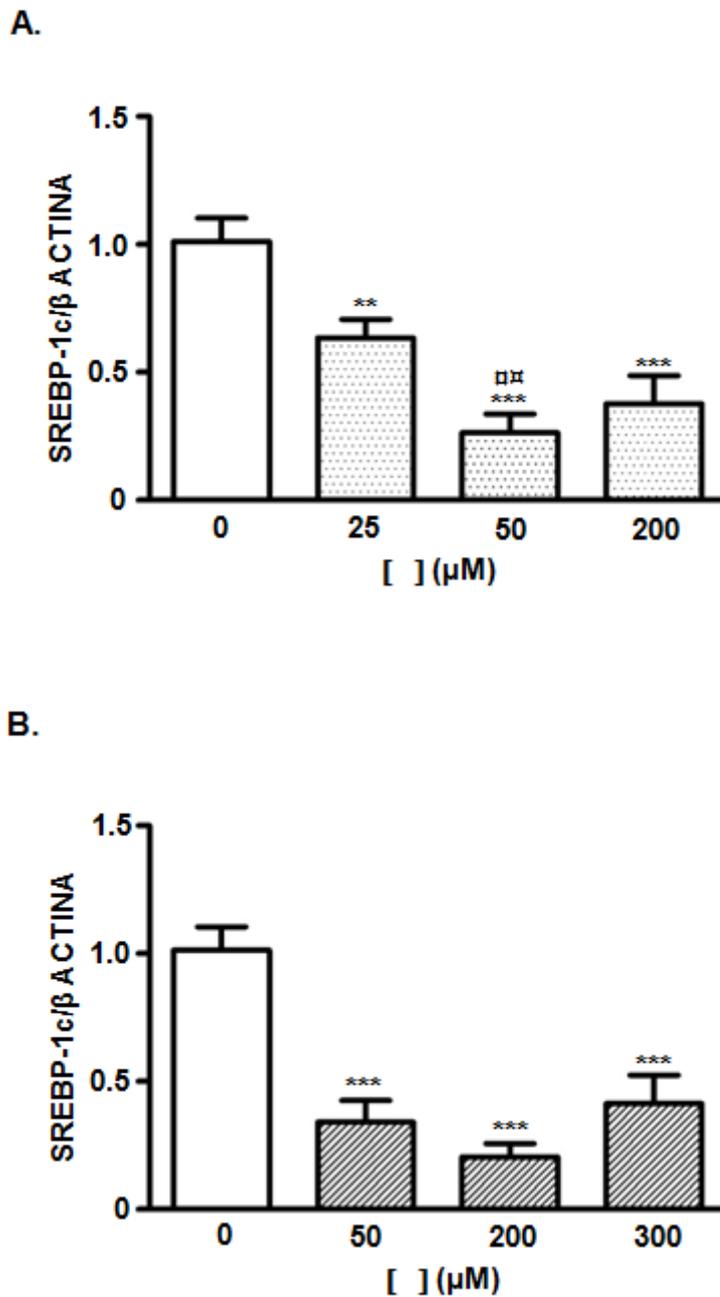


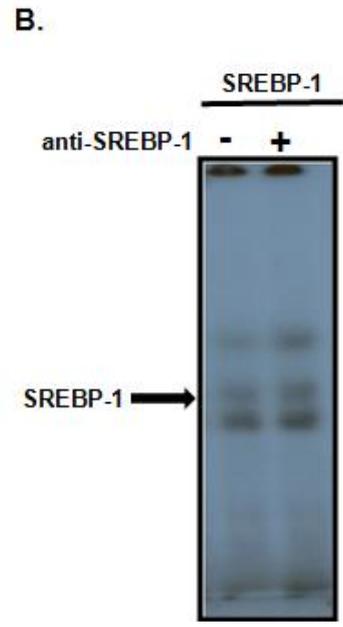
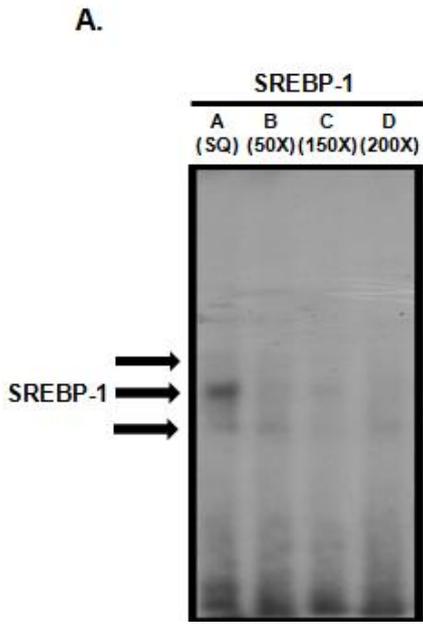
Figura 11 - Quantificação da expressão do mRNA do fator transcricional SREBP-1c em células musculares L6 na presença diferentes concentrações do ácido graxo oléico (OFA) e do ácido graxo linoléico (LFA). Em **A**, gráfico representando o conteúdo do mRNA do SREBP-1c na presença do OFA ($n=6-12$). Em **B**, gráfico representando o conteúdo do mRNA do SREBP-1c na presença do LFA ($n=6-12$). Os valores são média \pm EPM, sendo ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$ vs. controle (0 μM), ### $P<0,01$ vs. 25 μM . ANOVA one-way, pós-teste, Student-Newman-Keuls.

4.12 Efeito dos ácidos graxos oléico e linoléico na atividade de ligação do fator transcricional SREBP-1 na região promotora do gene *Slc2a4*

A partir da seqüência -153/-134 na região promotora GLUT4 como modelo, foi desenhado um oligonucleotídeo para avaliar a ligação específica do fator transcricional SREBP-1 ao promotor do gene em questão. O ensaio de competição com concentrações altas de sonda não radioativa confirmou a especificidade da ligação (12A). Três bandas foram detectadas, mas a adição de anticorpo específico para o fator transcricional em questão não resultou em desaparecimento das bandas. A figura 12B, mostra um, dos inúmeros ensaios de *Supershift* realizados com o objetivo de determinar a identidade da banda. Variações quanto ao tempo de incubação, concentração de proteína nuclear e anticorpo não alteraram esta resposta.

Considerando a ineficácia da técnica de *Gel shift*, foi decido realizar o ensaio de imunoprecipitação de cromatina (*ChIP assay*). A figura 12D mostra que a ligação do fator transcricional SREBP-1 à região promotora do gene *Slc2a4* diminuiu na presença de 25 μM (~42%) e 200 μM (~67%) de OFA quando comparadas à ligação observada em 0 μM e 50 μM (** $P < 0,001$).

Na presença de LFA a ligação reduziu em 50 μM (~68%) (** $P < 0,01$), 200 μM (~49%) (* $P < 0,05$) e 300 μM (~49%) (* $P < 0,01$), quando comparada ao observado em 0 μM (Figura 12E).



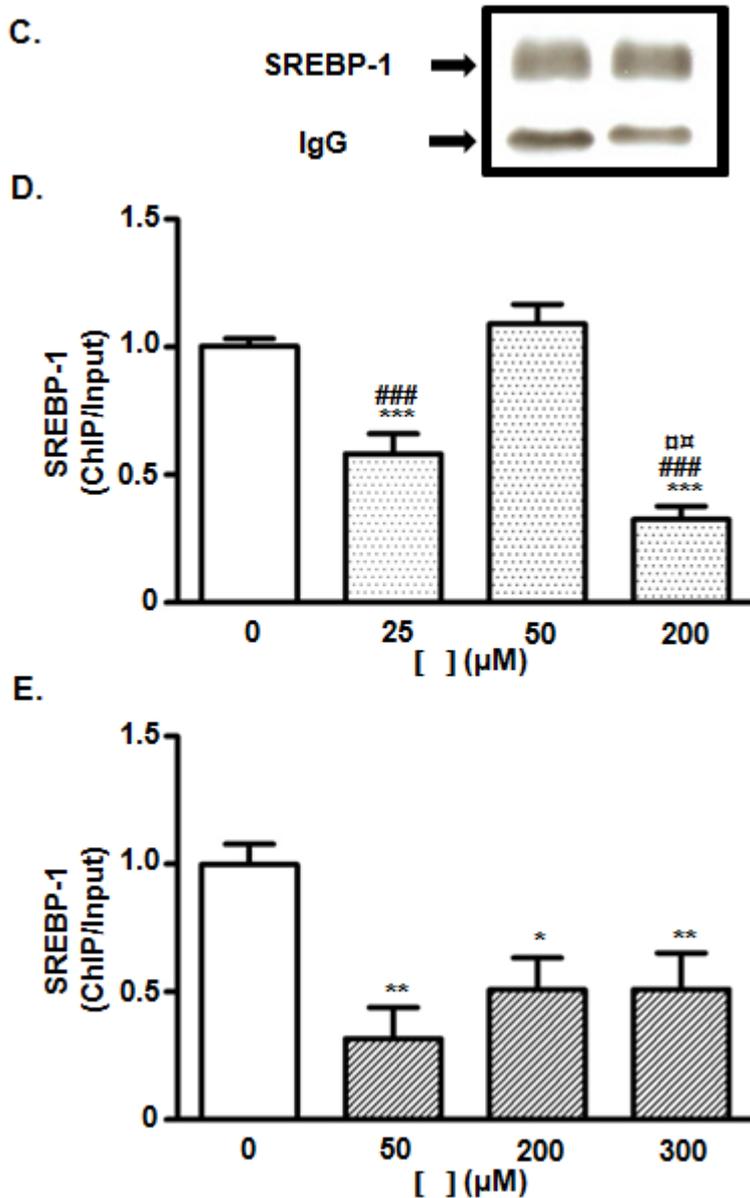


Figura 12 - Análise de ligação do SREBP-1 ao gene *Slc2a4* em células musculares L6, na presença de diferentes concentrações dos ácidos graxos, oléico (OFA) e linoléico (LFA). Em **A** autorradiografia do ensaio de competição para SREBP-1; amostras contendo proteínas nucleares foram acrescidas de oligonucleotídeo SREBP-1 marcado (trilha A) e excesso de oligonucleotídeo não marcado (trilhas B-D), compondo uma curva de deslocamento da ligação com concentrações crescentes. Em **B**, autorradiografia do ensaio de *Supershift* para SREBP-1; amostras contendo proteínas nucleares foram incubadas com oligonucleotídeo marcado, na presença (+) ou ausência (-) de anti-SREBP-1. Em **C**, autorradiografia comprovando a imunoprecipitação realizada para *ChIP* assay na presença de anti-SREBP-1. Em **D** e **E**, gráficos representando a quantificação do complexo SREBP-1/DNA na presença de OFA e LFA, respectivamente. Os valores são média \pm EPM, $n=4-9$ amostras, sendo * $P<0,05$, ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$ vs. controle (0 μ M); ## $P<0,01$ vs. 25 μ M; ### $P<0,001$ vs. 50 μ M. ANOVA one-way, pós-teste, Student-Newman-Keuls.

4.13 Aumento da expressão de LXR α na presença dos ácidos graxos, oléico e linoléico

A Figura 13A mostra que a expressão do mRNA do LXR α aumentou na presença de 50 μ M (~66%) (** P <0,001) e 200 μ M (~50%) (* P <0,05) de OFA, quando comparado ao observado no controle (0 μ M). Aumento também foi verificado na presença de 300 μ M de LFA (~103%), quando comparada ao observado no controle (0 μ M) (** P <0,01), e as concentrações de 50 e 200 μ M (Figura 13B).

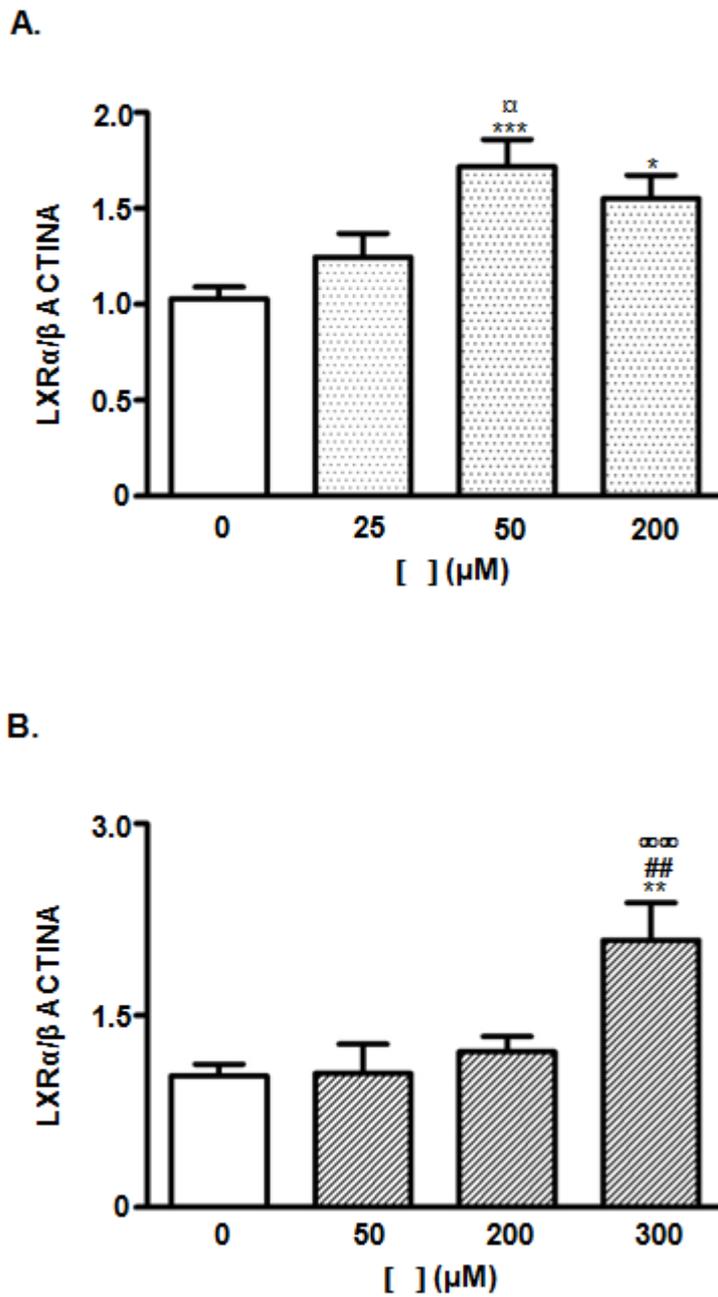


Figura 13 - Quantificação da expressão do mRNA do fator transcrricional LXRα em células musculares L6 na presença diferentes concentrações do ácido graxo oléico (OFA) e do ácido graxo linoléico (LFA). Em **A**, gráfico representando o conteúdo do mRNA do LXRα na presença de OFA ($n=4-8$) expresso. Em **B**, gráfico representando o conteúdo do mRNA do LXRα na presença de LFA ($n=6-8$) expresso. Os valores são média \pm EPM, sendo * $P<0,05$, ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$ vs. controle (0 μM); $^{\square}P<0,05$ vs. 25 μM ; $^{\#}P<0,01$ vs. 50 μM ; $^{\infty\infty}P<0,01$ vs. 200 μM . ANOVA one-way, pós-teste, Student-Newman-Keuls.

4.14 Participação dos ácidos graxos oléico e linoléico no controle da ligação do fator transcricional LXR α à região promotora do gene *Slc2a4*

A ligação do fator transcricional LXR α no promotor do gene *Slc2a4* (Figura 14A), mostra que as ligações específicas, deslocadas com excesso de sonda não marcada (Lane B), não se alteraram com a adição de anticorpo anti-LXR α (Lane D), indicando que não se conseguiu avaliar essa ligação por meio de *Gel shift*.

Mediante estes resultados foi realizado o ensaio de imunoprecipitação de cromatina (*ChIP assay*). As figuras 14B e 14C mostram que nem OFA nem LFA alteraram significativamente a ligação do LXR α no promotor *Slc2a4*.

A.



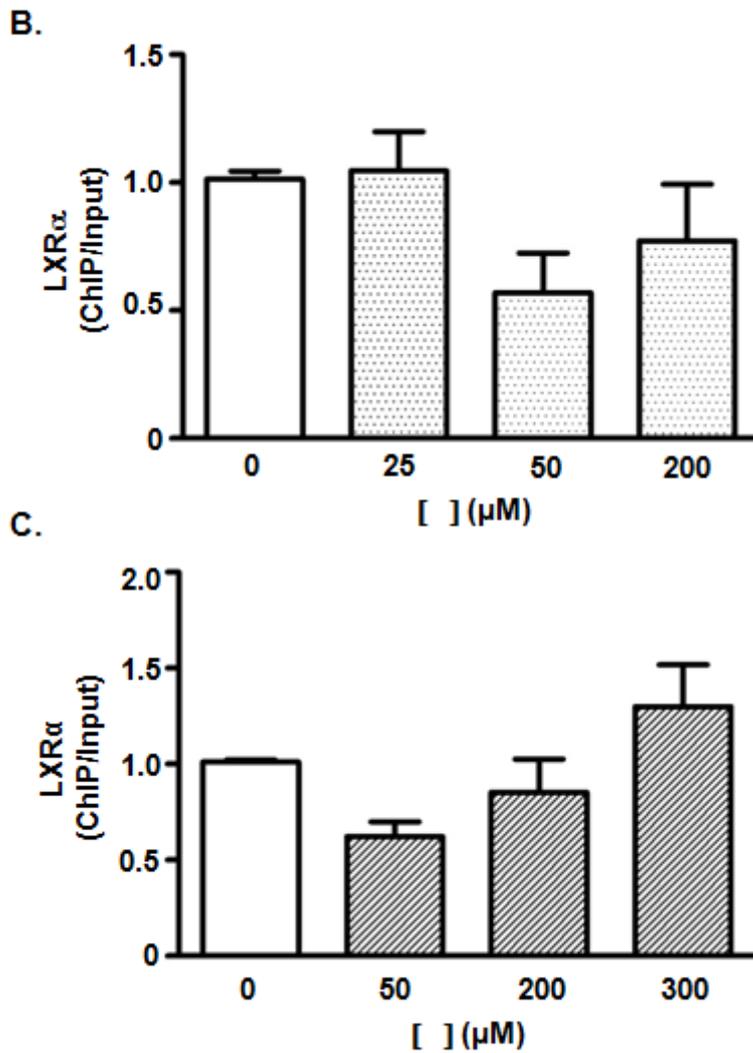


Figura 14 - Análise de ligação do LXR α ao gene *Slc2a4* em células musculares L6, na presença de diferentes concentrações dos ácidos graxos, oléico (OFA) e linoléico (LFA). Em **A** autorradiografia mostrando ensaio de competição e *Supershift* para LXR α ; amostras contendo proteínas nucleares foram acrescidas de oligonucleotídeo LXR α marcado (Lane A) e excesso de oligonucleotídeo não marcado (Lane B); amostras contendo proteínas nucleares foram incubadas com oligonucleotídeo marcado na ausência (-) (Lane C) e presença (Lane D) de anti LXR α . Em **B** e **C**, gráficos representam a quantificação do complexo LXR α /DNA na presença de OFA e LFA, respectivamente. Os valores são média \pm EPM, $n=4-6$ amostras. ANOVA one-way, pós-teste, Student-Newman-Keuls.

4.15 Ácido graxo linoléico aumenta a expressão do fator transcricional PPAR γ

Conforme mostrado na Figura 15A, nenhuma alteração quanto à expressão deste fator transcricional foi detectada na presença de OFA. Entretanto um aumento ~ 128% (* $P < 0,05$) foi verificado na presença de 300 μM de LFA, comparado ao observado em 0, 50 e 200 μM (Figura 15B).

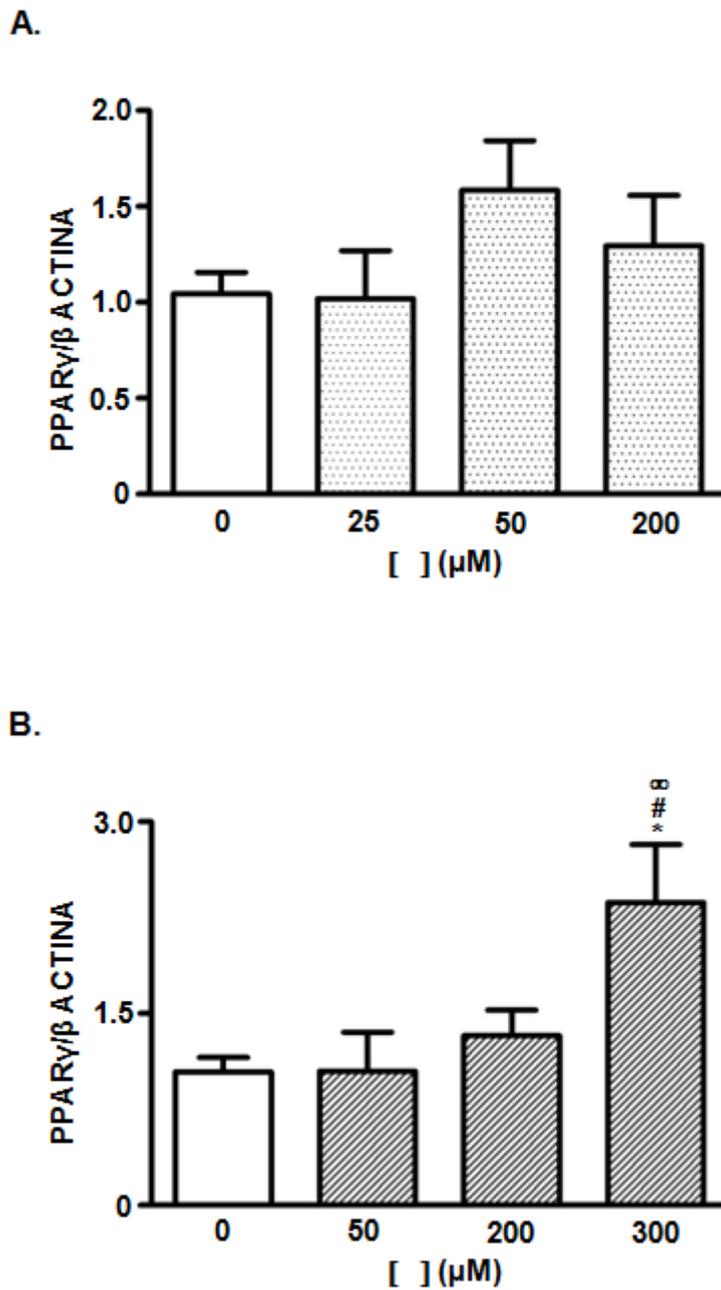


Figura 15 - Quantificação da expressão do mRNA do fator transcricional PPAR γ em células musculares L6 na presença diferentes concentrações do ácido graxo oléico (OFA) e do ácido graxo linoléico (LFA). Em **A**, gráfico representando o conteúdo do mRNA do PPAR γ na presença de OFA ($n=6-8$). Em **B**, gráfico representando o conteúdo do mRNA do PPAR γ na presença de LFA ($n=6-8$). Os valores são média \pm EPM, sendo * $P<0,05$ vs. controle (0 μ M); # $P<0,05$ vs. 50 μ M; $\infty P<0,05$ vs. 200 μ M. ANOVA one-way, pós-teste, Student-Newman-Keuls.

4.16 Participação do ácido graxo linoléico no controle da atividade de ligação do fator transcricional PPAR γ à região promotora do gene *Slc2a4*

Conforme apresentado na figura 16B, nenhuma alteração quanto a ligação de PPAR γ foi detectada na presença de OFA. Todavia, na presença de LFA (Figura 16C) foi verificada uma diminuição da ligação do fator transcricional à região promotora do gene *Slc2a4* na presença de 50 μ M (~61%) (* P <0,05), 200 μ M (~73%) (** P <0,01) e 300 μ M (~58%) (* P <0,01) quando comparada ao observado em 0 μ M (controle).

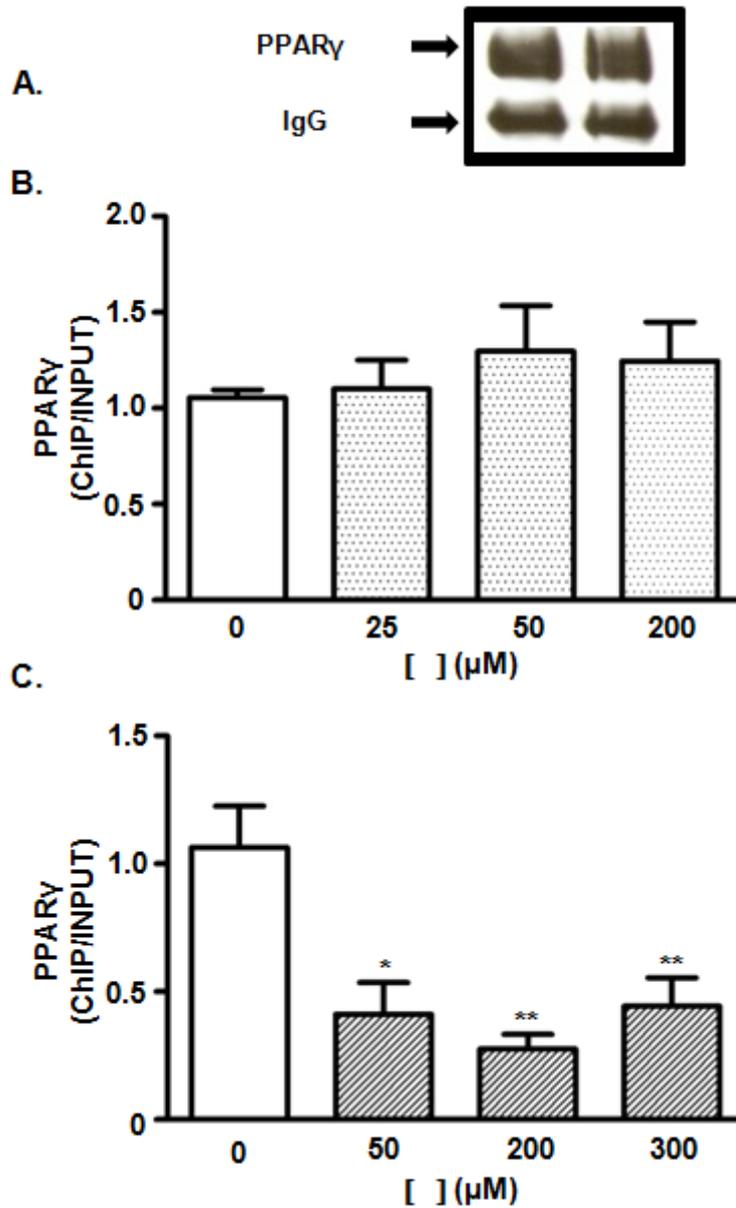


Figura 16 - Análise de ligação do PPAR γ ao gene *Slc2a4* em células musculares L6, na presença de diferentes concentrações dos ácidos graxos, oléico (OFA) e linoléico (LFA). Em **A**, autorradiografia comprovando a imunoprecipitação realizada para ChIP assay na presença de anti-PPAR γ . Em **B** e **C**, gráficos representam a quantificação do complexo PPAR γ /DNA na presença de OFA e LFA, respectivamente. Os valores são média \pm EPM, $n=4-8$ amostras, sendo * $P<0,05$, ** $P<0,01$ vs. controle (0 μ M). ANOVA one-way, pós-teste, Student-Newman-Keuls.

5 DISCUSSÃO

O aumento nos níveis circulantes de alguns ácidos graxos (AGs) (HAN et al., 2008; STORLIEN et al., 1991), a alteração na oxidação (HIRABARA; CURI; MAECHLER; 2010; ZHANG et al., 2010) e o acúmulo intracelular (CHAVEZ et al., 2003; MONTELL et al., 2001) de produtos oriundos do metabolismo destas biomoléculas estão relacionados com o desenvolvimento da resistência à insulina no músculo esquelético, tanto na obesidade quanto no *diabetes mellitus*.

Ensaio *in vitro* (AAS et al., 2006; JOVÉ et al., 2006) e *in vivo* (FABRIS et al., 2001; VETOR et al., 2002) sugerem a participação dos diferentes tipos de AGs na modulação do gene *Slc2a4*. O efeito repressor dos ácidos graxos saturados (AGSs), como o palmítico (C16:0), sobre a expressão do GLUT4 já foi descrito na literatura (JOVÉ et al., 2006), entretanto a atuação dos ácidos graxos insaturados (AGIs) ainda é controversa (AAs et al., 2006; LONG e PEKALA, 2006; NUGENT et al., 2002).

Ambos AGIs oléico (OFA) e linoléico (LFA), além de muito consumidos na dieta ocidental, nos óleos vegetais, são também administrados em soluções parenterais e enterais à pacientes enfermos, e encontram-se em abundância no soro (FÉRNANDEZ-REAL et al., 2003) e no meio intracelular (GÓRSKI et al., 1998). Em excesso, AGIs contribuem para o acúmulo ectópico de gordura e consequente inibição da atividade de proteínas envolvidas na ação da insulina (BELL et al., 2008; YU et al., 2002). Todavia, o efeito destas biomoléculas na regulação de genes relacionados à resistência à insulina ainda não está elucidado.

Considerando estes fatores, o presente estudo buscou evidenciar, em modelo de células musculares L6, a atuação dos AGIs oléico e linoléico na regulação dos mecanismos transcricionais envolvidos no controle da expressão do gene *Slc2a4*, que codifica a proteína GLUT4, responsável pela captação de glicose induzida por insulina no músculo esquelético. Inicialmente, foram realizadas curvas dose resposta para os AGIs e GLUT4, a partir das quais três concentrações para OFA (25, 50 e 200 μ M) e LFA (50, 200 e 300 μ M) foram selecionadas para o prosseguimento das análises. Nestas concentrações verificou-se redução significativa na expressão do mRNA do GLUT4. Cabe ressaltar que as diminuições na expressão do mRNA observadas em 25 μ M para OFA e em 50 e 200 μ M para LFA, não se refletiram em alteração no conteúdo da proteína, no tempo estudado.

A discrepância entre o conteúdo do mRNA e da proteína GLUT4 já foi descrita na literatura (KLIP et al., 1994), e recentemente, alterações observadas na adenilação da cauda poli-A foram relacionadas às diferenças detectadas entre o conteúdo do mRNA e da proteína GLUT4 em músculo de ratos (ALVES-WAGNER et al., 2009). Uma semelhante resposta foi mostrada em músculo gastrocnêmio de animais obesos (SERAPHIM et al., 2005).

A relação direta entre comprimento da cauda poli-A e a estabilidade do transcrito já foi citada na literatura (SALLÉS; RICHARDS; STRICKLAND, 1999). Os transcritos com cauda poli-A reduzida se tornam susceptíveis a ação de RNases que acabam por degradá-los mais rapidamente, reduzindo a meia vida deste mRNA (GALLIE, 1998). Da mesma forma, mesmo em menor quantidade, os transcritos com cauda poli-A aumentada possibilitam uma melhor eficiência na tradução (ALVES-WAGNER et al., 2009).

Pouco é descrito sobre a atuação dos ácidos graxos e/ou de seus metabólitos na regulação da “maquinaria transcricional”. Em modelo de adipócitos 3T3-L1, na presença do ácido graxo araquidônico (C20:4, *n*6) foi verificada uma redução no conteúdo e na estabilidade do mRNA do GLUT4, entretanto os mecanismos envolvidos neste controle não foram elucidados (TEBBEY et al., 1994).

Diferentemente do acima descrito, é bem mais conhecido o fato de os AGs e/ou seus metabólitos atuarem direta e/ou indiretamente na regulação de fatores transcricionais, tais como: NF- κ B (do inglês, *nuclear factor-kappaB*), SREBP-1c (do inglês, *sterol regulated element binding protein-1*), HIF-1 α (do inglês, *hipoxia inducible factor-1 α*), LXRA (do inglês, *liver X receptor α*) e PPAR γ (do inglês, *peroxisome proliferator activated receptor γ*) (JUMP, 2004), todos já relacionados de alguma forma com a regulação do gene *Slc2a4*.

Por ser considerado um importante repressor da expressão do *Slc2a4* (RUAN et al., 2002; SILVA et al., 2005), inicialmente foi investigada a participação do fator transcricional NF- κ B.

Um aumento no conteúdo do mRNA da subunidade p65 NF- κ B foi detectado na presença de OFA (200 μ M) e de LFA (200 e 300 μ M), o que se acompanhou de maior atividade de ligação de proteínas nucleares ao domínio de ligação do NF- κ B no promotor do *Slc2a4*. Até o momento, não estão claros os mecanismos pelos quais os AGs regulam a expressão deste fator transcricional. Em modelo de células musculares L6 incubadas com ácido palmítico (C16:0) o aumento detectado na

expressão de NF- κ B foi atribuído a participação da isoforma PKC ϵ (BARMA et al., 2009).

Além de agirem na regulação transcricional de proteínas envolvidas na via de sinalização de citocinas inflamatórias, que na maioria das situações culmina com a ativação do NF- κ B (ITANI et al., 2002; PARK et al., 2003), os AGIs e/ou produtos derivados do seu metabolismo celular, como Acil-CoA de cadeia longa, triacilglicerol (TAG), diacilglicerol (DAG), ácido fosfatídico, ceramidas e espécies reativas de oxigênio (EROS), podem também alterar a atividade das cinases JNK (do inglês, *JUN NH₂ – terminal kinase*), IKK (do inglês, *inhibitory kappa B kinase*) e PKC (do inglês, *protein kinase C*), ou ainda suas interrelações (BLOCH-DAMTI e BASHAN, 2005; CHAVEZ et al., 2003; FURUKAWA et al., 2004; MONTELL et al., 2001; WORGALL et al., 2008). Estudos com infusões agudas com Lyposyn II, rico em ácidos graxos insaturados, evidenciaram a participação das isoformas de PKCs, β II e δ em humanos (ITANI et al., 2002) e PKC θ em ratos (GRIFFIN et al., 1999; YU et al., 2002), na regulação da atividade de IKK. Em adipócitos 3T3-L1 incubados com o ácido graxo linoléico, e em tecido adiposo proveniente de animais submetidos à dieta hiperlipídica, a ativação de IKK e JNK foi relacionada com o aumento da fosforilação de PKC θ (GAO et al., 2004). Ácido palmítico já foi descrito como capaz de induzir resistência à insulina por regular, via IKK, a expressão do GLUT4 (JOVÉ et al., 2005; JOVÉ et al., 2006; ZHANG et al., 2010), entretanto, a atuação dos AGIs como OFA e LFA não está clara.

No presente estudo, o aumento na fosforilação de IKK foi observado na presença de 200 μ M de OFA e de, 200 e 300 μ M de LFA, situações em que também se detectou aumento significativo na formação de ambos os complexos moleculares (complexos A e B). Adicionalmente, duas situações discrepantes entre a atividade de ligação de NF- κ B e a fosforilação do IKK α/β foram observadas, em concentrações específicas dos AGIs: 1) em 25 e 50 μ M de OFA, a formação de complexo B aumentou isoladamente, sem alteração da fosforilação do IKK α/β ; e 2) 50 μ M de LFA, a fosforilação do IKK α/β aumentou sem alterar a atividade de ligação do NF- κ B.

Tradicionalmente a ativação de IKK promove a fosforilação, em resíduos de serina, de I κ B (do inglês, *inhibitor of NF- κ B*) com consequente degradação proteossomal e dissociação do homo ou heterodímero de NF- κ B que migra ao núcleo associando-se ao DNA (LI e VERMA, 2002; PERKINS, 2007). Todavia, outras vias

descritas como “não clássicas” envolvem a fosforilação e ativação de I κ B em resíduos específicos de tirosina, por ação de tirosina cinases. Imbert et al. (1996) mostraram em linfócitos T incubados com pervanádio, aumento na fosforilação de I κ B em resíduos de tirosina com conseqüente ativação de NF- κ B. Além destes aspectos, embora a atenção primária sempre esteja direcionada a ação de cinases envolvidas na fosforilação de I κ B, algumas proteínas como p65 também podem ser diretamente fosforiladas por PKC e PKA (BARMA et al., 2009; ZHONG et al., 1997).

Além da participação de cinases como acima descrito, processos nucleares envolvidos no controle de NF- κ B que envolvem a ação de proteínas co-ativadoras ou co-repressoras fundamentais no controle da sua atividade transcricional, também devem ser considerados. Desta forma, experimentos futuros são necessários para identificar os mecanismos envolvidos nas diferenças verificadas no presente estudo, visto que repressão na expressão do GLUT4 foi observada.

Embora estes dados indiquem a participação de NF- κ B na inibição do GLUT4 induzida por OFA e LFA em célula muscular, a atuação de outros fatores transcricionais neste processo não deve ser descartada.

A participação do HIF-1 α na regulação da expressão do gene *Slc2a4* foi sugerida em músculo esquelético, relacionada à redução da PO₂ intracelular induzida pela atividade contrátil aguda (SILVA et al., 2005). Além da hipóxia, fatores de crescimento, insulina, citocinas e produtos derivados do metabolismo lipídico, podem regular a expressão e/ou ativação de HIF-1 α (KE et al., 2006). Este fator transcricional é composto por uma subunidade “ α ” citosólica, altamente regulável, e uma subunidade “ β ” nuclear e constitutiva. É na forma de heterodímero HIF1 α / β que este fator transcricional se liga ao elemento responsivo no DNA e regula a expressão de diferentes genes relacionados com metabolismo da glicose, eritropoiese, angiogênese, entre outros (KE et al., 2006; TEMES et al., 2004).

No presente estudo, aumento na expressão gênica da isoforma 1 α foi detectado na presença de OFA (200 μ M) e LFA (200 e 300 μ M), o qual pode estar relacionado à ativação de PKCs sensíveis a DAG, conforme mostrado em célula muscular lisa vascular (PAGÉ et al., 2002). Entretanto, o aumento no conteúdo do mRNA de HIF-1 α observado na presença dos AGIs não se refletiu em alteração na ligação deste fator transcricional ao seu domínio de ligação no gene *Slc2a4*; pelo contrário, uma tendência à diminuição da ligação foi observada em 200 e 300 μ M de LFA. Esta aparente discrepância poderia ser compreendida uma vez que, em

situações de normóxia, a hidroxilação em resíduos de prolina desta proteína proporciona um rápido reconhecimento e direcionamento da proteína à degradação proteosomal (KE et al., 2006; REGAZZETTI et al., 2009; TEMES et al., 2004). Assim, apesar de dos AGIs induzirem um aumento no mRNA do HIF-1 α , a condição de normóxia está impedindo a geração de maior quantidade de proteína, e consequentemente maior atividade transcricional.

A atuação do LXR α na regulação do gene *Slc2a4* foi sugerida em adipócitos 3T3-L1 e SGBS na presença de um agonista sintético (T0901317) para este fator transcricional (DALEN et al., 2003). Kase et al. (2003) mostraram aumento na expressão de GLUT4 em células musculares após incubação com T0901317.

No presente modelo, um aumento na expressão do mRNA de LXR α foi detectado na presença de OFA (50 e 200 μ M) e de LFA (300 μ M), o que já foi mostrado, *in vitro*, em cultura primária de hepatócitos na presença de diferentes AGIs, e, *in vivo*, em fígado de animais alimentados com dieta hiperlipídica rica em AGs poliinsaturados (TOBIN et al., 2002). Entretanto, os mecanismos pelos quais os AGs regulam a expressão gênica do LXR α não estão esclarecidos. Estudo em macrófagos (WHITNEY et al., 2001) descreve a existência de um possível mecanismo de auto-regulação de LXR α sobre a sua própria expressão gênica. Além deste aspecto, alterações relacionadas com a estabilidade do transcrito (TOBIN et al., 2002), bem como a participação de PPAR γ (WÓJCICKA et al., 2007) na regulação da expressão gênica de LXR α também já foram descritas.

Além de ativadores sintéticos, produtos oriundos da oxidação do colesterol são considerados importantes ligantes endógenos de LXR α (BARANOVSKI, 2008). Após ligação ao seu agonista, é como heterodímero, junto a RXR α , que este fator transcricional, se liga ao LXRE (elemento responsivo para LXR α) modulando a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo e transporte de colesterol (WÓJCICKA et al., 2007), metabolismo lipídico e glicídico (KASE et al., 2003). Ácidos graxos poliinsaturados inibem a atividade transcricional de LXR α por impedirem a ligação dos agonistas endógenos ao LBD (domínio de ligação do ligante) deste fator transcricional, e modificarem a ligação do heterodímero ao seu elemento responsivo (YOSHIKAWA et al., 2002). Porém, não foi observada alteração na ligação de LXR α ao promotor do gene *Slc2a4* tanto na presença de OFA quanto LFA. A atuação dos AGs na regulação deste mecanismo parece ser dependente de aspectos relacionados ao tamanho da cadeia e grau de insaturação

destas biomoléculas. Em células HEK293 a atividade do promotor do SREBP-1c regulado por LXR α mostrou-se, diminuída na presença dos ácidos graxos insaturados (araquidônico > eicosapentaenóico > docosaexaenóico \geq oléico), e inalterada na presença do ácido graxo saturado esteárico (YOSHIKAWA et al., 2002).

Além dos fatores já descritos, foi também investigada a atuação de SREBP-1c, na presença de OFA e LFA, na regulação do gene *Slc2a4* (IM et al., 2006), tendo sido observada redução no conteúdo do mRNA deste fator com ambos os AGIs, e em todas as concentrações analisadas. A ação repressora de diferentes ácidos graxos insaturados sobre a expressão do mRNA do SREBP-1c, já foi descrita na literatura (HANNAH et al., 2001; MATER et al., 1999; XU et al., 1999), mas os mecanismos envolvidos ainda não estão esclarecidos. Já foi proposto que os AGIs seriam capazes de inibir a expressão do SREBP-1c, de forma indireta, via ativação do LXR α (OU et al., 2001). No presente estudo, a atividade de ligação de LXR α ao gene *Slc2a4* não se alterou, entretanto, a possibilidade de sua ligação ter aumentado no promotor do gene que codifica a proteína SREBP-1c não pode ser descartada.

Em concordância com a regulação do mRNA do SREBP-1, diminuição da ligação de proteínas nucleares no domínio de ligação do SREBP-1 da região promotora do foi verificada na presença de OFA (25 e 200 μ M) e LFA (todas as concentrações analisadas), destacando sua contribuição à regulação da expressão do GLUT4 pelos AGIs.

A proteína SREBP-1, quando imatura, encontra-se aderida a membrana do retículo endoplasmático (RE), associada a um complexo protéico denominado Insig/SCAP. Com a diminuição de esteróis na membrana há a transferência de SREBP-1 ao complexo de golgi (CG) onde é ativado por ação de proteases, translocando ao núcleo e regulando genes relacionados com metabolismo lipídico e glicídico (DÉSVERGENE et al., 2006; ESPENSHADE, 2006; HORTON, 2002). O efeito dos ácidos graxos insaturados reduzindo a degradação da proteína Insig, e consequentemente diminuindo a geração da forma ativa de SREBP-1, já foi descrito na literatura (LEE et al., 2008), e poderia estar ocorrendo na presente situação.

Além deste mecanismo diretamente relacionado à atividade das proteínas envolvidas na síntese/ativação de SREBP-1, alterações quanto ao *pool* intracelular de colesterol também já foram descritas como capazes de alterar a sua atividade

transcricional. Por ativarem a enzima esfingomielinase, ácidos graxos insaturados (como oléico) são capazes de aumentar a concentração intracelular de colesterol, permitindo sua incorporação à membrana do RE. O aumento no conteúdo de colesterol na membrana do RE prejudica a capacidade de rompimento do complexo Scap-Insig/SREBP-1, diminuindo a liberação/ativação de SREBP-1 para alcançar sua forma nuclear ativa (WORGALL et al., 2008).

Finalmente, este estudo investigou se o efeito dos ácidos graxos OFA e LFA na regulação transcricional do gene *Slc2a4* poderia envolver o PPAR γ . Além de um efeito sobre a síntese deste fator transcricional (ZHOU; SUN; ZHAO, 2008), ácidos graxos como, araquidônico (C20:4 *n*6) e eicosapentaenóico (C22:5 *n*3), são capazes de se ligar ao PPAR γ (KLIEWER et al., 1997; XU et al., 1999).

No presente estudo não foi verificada alteração quanto à expressão do mRNA de PPAR γ na presença de OFA, todavia, na presença de 300 μ M LFA, foi detectado aumento na expressão gênica deste fator transcricional.

Dois mecanismos de ação são propostos para explicar a ação do PPAR γ na regulação da expressão do GLUT4. Classicamente é sabido que o aumento na expressão do GLUT4 pode ser mediado pela ligação do heterodímero ativado PPAR γ /RXR α ao seu elemento responsivo (PPRE) localizado no gene *Slc2a4* (DESVERGE e WAHLI, 1999; KLIEWER et al., 2001). Entretanto em meados de 2003, Armoni e colaboradores propuseram a existência de outra forma de regulação do PPAR γ . Segundo consta, no estado basal o dímero PPAR γ /RXR α se encontra associado ao DNA reprimindo a expressão do GLUT4. Com a adição de um ligante há a dissociação do heterodímero de seu PPRE no gene *Slc2a4* havendo como consequência aumento na expressão do GLUT4.

A avaliação da atividade de ligação deste fator transcricional ao gene *Slc2a4* se tornou possível após a identificação da região -66/+163bp (ARMONI et al., 2003). Considerando o tamanho do fragmento proposto (~100bp), a realização da técnica de *Gel shift* seria pouco eficaz, visto que a excelência de seu uso é indicada para análise apurada de sequências com até 20bp. Considerando estes aspectos, foi decidido realizar a análise da atividade de ligação de PPAR γ ao gene *Slc2a4* por meio do ensaio de imunoprecipitação de cromatina (*ChIP assay*).

Na presença de OFA, não foi observada alteração quanto à ligação de PPAR γ ao seu PPRE no gene *Slc2a4*. Surpreendentemente na presença de LFA, foi verificada uma redução na ligação do PPAR γ ao gene *Slc2a4* em todas as

concentrações analisadas. Embora a capacidade de ligação a PPAR γ de diferentes AGIs já tenha sido descrita (KLIEWER et al., 1997; XU et al., 1999) os efeitos sobre a regulação da atividade deste fator transcricional ainda não estão muito claros, todavia alguns trabalhos mostram a existência de um efeito inibidor destes ligantes endógenos. A ação repressora da atividade do promotor do GLUT4 em cardiomiócitos H9C2 já foi sugerida na presença de diferentes tipos de AGIs, como oléico, linoléico e araquidônico (ARMONI et al., 2005). Armoni et al. (2003) mostraram, em cultura primária de adipócitos, efeito repressor na regulação do gene *Slc2a4* na presença do mais importante agonista endógeno 15 Δ -PGJ₂. Considerando estes aspectos, para determinar se há a participação de PPAR γ na regulação do GLUT4 no presente projeto, estudos futuros são necessários para avaliar a localização celular deste fator transcricional. Considerando o mecanismo de ação clássico acima descrito, um menor conteúdo protéico decorrente de efeitos dos AGs na estabilidade do transcrito (PÉRGORIER, 1998) poderia explicar a menor ligação ao gene *Slc2a4* mesmo na presença de agonista. Além disto, alterações envolvidas na síntese e mobilização do ácido araquidônico e da 15 Δ -PGJ₂, ambos derivados do LFA, podem estar envolvidos em uma menor ativação de PPAR γ . Outro aspecto envolve a competição entre os receptores nucleares pela interação com RXR α (ARMONI et al., 2003). Em relação à interação entre os receptores nucleares a supressão da ligação do heterodímero PPAR γ /RXR α ao DNA mediada por NF- κ B também já foi sugerida (SUZAWA et al., 2003).

Em suma, o presente projeto mostra que ambos os AGs estudados, OFA e LFA, em concentrações específicas, além de modularem a expressão gênica dos diferentes fatores transcpcionais estudados, são capazes de diminuir a expressão do GLUT4. Este efeito repressor sobre o gene *Slc2a4* se deve à diminuição e aumento na ligação de SREBP-1 e NF- κ B respectivamente, a região promotora do gene em questão.

6 CONCLUSÃO

Os ácidos graxos monoinsaturado oléico e poliinsaturado linoléico reprimem cronicamente a expressão do GLUT4. Este efeito advém de um aumento e diminuição na ligação dos fatores transcricionais NF- κ B e SREBP-1 respectivamente, aos seus sítios de ligação específicos localizados na região promotora do gene *Slc2a4*.

REFERÊNCIAS¹

- AAS, V.; ROKLING-ANDERSEN, M. H.; KASE, E. T.; THORESEN, G. H.; RUSTAN, A. C. Eicosapentaenoic acid (20:5 n-3) increases fatty acid and glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells. **J. Lip. Res.**, v. 47, p. 366-374, 2006.
- ALVES-WAGNER, A. B.; DE FREITAS, H. S.; DE SOUZA, P. B.; SERAPHIM, P. M.; MORI, R. C.; MACHADO, U. F. Beta-adrenergic activity preserves GLUT4 protein in glycolytic fibers in fasting. **Muscle Nerve**, v. 40, p. 847-854, 2009.
- ARMONI, M.; KRITZ, N.; HAREL, C.; YOSEPH-BAR, F.; CHEN, H.; QUON, M. J.; KARNIELI, E. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ represses GLUT4 promoter activity in primary adipocytes, and rosiglitazone alleviates this effect. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 3, p. 30614-30623, 2003.
- ARMONI, M.; HAREL, C.; YOSEPH-BAR.; MILO, S.; KARNIELI, E. Free fatty acids repress the GLUT4 gene expression in cardiac muscle via novel response elements. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n.41, p. 34786-34795, 2005.
- ARMONI, M.; HAREL, C.; KARNIELI, E. Transcriptional regulation of the GLUT4 gene: from PPAR γ and FOXO1 to FFA and inflammation. **TRENDS Endocrinol. Metab.**, v.18, n. 3, p. 100-107, 2007.
- BARANOWSKI M. Biological role of liver X receptors. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 59, p. 31-55, 2008.
- BARMA, P.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, A.; KUNDU, R.; DASGUPTA, S.; BISWAS, A.; BHATTACHARYA, S.; ROY, S. S.; BHATTACHARYA, S. Lipid induced overexpression of NF-kappaB in skeletal muscle cells is linked to insulin resistance. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1792, n. 3, p. 190-200, 2009.
- BARROS, R. P.; MORANI, A.; MORISCOT, A.; MACHADO, U. F. Insulin resistance of pregnancy involves estrogen-induced repression of muscle GLUT4. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 295, p. 24-31, 2008.
- BELL, M.; WANG, H.; CHEN, H.; McLENITHAN, J. C.; GONG, D. W.; YANG, R. Z.; YU, D.; FRIED, S. K.; QUON, M. J.; LONDOS, C.; SZTALRYD, C. Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. **Diabetes**, v. 57, n. 8, p. 2037-2045, 2008.
- BLOCH-DAMTI A.; BASHAN N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 7, n. 11-12, p. 1553-1567, 2005.

¹ De acordo:

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

BODEN, G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v. 111, n. 3, p. 121-124, 2003.

BRADY, M. J.; PESSIN, J. E.; SALTIEL, R. Spatial compartmentalization in the regulation of glucose metabolism by insulin. **T. E. M.**, v. 10, p. 408-413, 1999.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Via de Sinalização da Insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 4, p. 419-423, 2002.

CHAVEZ, J. A.; KNOTTS, T. A.; WANG, L. P.; LI, G.; DOBROWSKY, R. T.; FLORANT, G. L.; SUMMERS, S. A. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 12, p. 10297-10303, 2003.

CHIARELLI, F.; MARZIO, D. D. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists and diabetes: Current and evidence and future perspectives. **Vascular Health and Risk and Management**, v. 4, n. 2, p. 297-304, 2008.

COMMERFORD, S. R.; PENG, L.; DUBÉ, J. J.; O'DOHERTY, R. M. In vivo regulation of SREBP-1c in skeletal muscle: effects of nutritional status, glucose, insulin and leptin. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 287, p. 218-227, 2004.

DALEN, K. T.; ULVEN, S. M.; BAMBERG, K.; GUSTAFSSON, J-A; NEBB, H. I. Expression of the insulin responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor α . **J. Biol. Chem.**, v. 278, n.48, p. 48283-48291, 2003.

DESVERGENE B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocr. Rev.**, v. 20, n. 5, p. 649-688, 1999.

DESVERGENE, B.; IJPENBERG, A.; DEVCHAND, P. R.; WAHLI, W. The peroxisome proliferator-activated receptors at the cross-road of diet and hormonal signaling. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 65, p. 65-74, 1999.

DIMOPOULOS, N.; WATSON, M.; SAKAMOTO, K.; HUNDAL, H. S. Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. **Biochem. J.**, v. 399, p. 473-481, 2006.

DRESNER, A.; LAURENT D.; MARCUCCI, M.; GRIFFIN, M. E.; DUFOUR, S.; CLINE, G. W.; SLEZAK, L. A.; ANDERSEN, D. K.; HUNDAL, R. S.; ROTHMAN, D. L.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1 associated phosphatidylinositol 3-Kinase activity. **J. Clin. Invest.**, v. 103, p. 253-259, 1990.

EBERT, B. L.; GLEADLE, J. M.; O'ROURKE, J.; BARTLETT, S. M.; POUTON, J.; RATCLIFFE, P. J. Isoenzyme specific regulation of genes involved in energy metabolism by hypoxia: similarities with the regulation of erythropoietin. **Biochem. J.**, v. 313, p. 809-8147, 1996.

ESPENSHADE, P. J. SREBPs: sterol-regulated transcription factors. **J. Cell Sci**, v. 119, p. 973-976, 2006.

FABRIS R.; ENZO, N.; LOMBARDI, A. M.; TONELLO, C.; SERRA, R.; GRANZOTTO, M.; CUSIN, I.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; FEDERSPIL, G.; CARRUBA, M. O.; VETTOR, R. Preferential channeling of energy fuels toward fat rather than muscle during high free fatty acid availability in rats. **Diabetes**, v. 50, p. 601-608, 2001.

FAJAS, L.; AUBOEUF, D.; RASPÉ, E.; SCHOONJANS, K.; LEFEBVRE, A-M.; SALADIN, R.; NAJIB, J.; LAVILLE, M.; FRUCHART, J-C.; DEEB, S.; VIDAL-PUIG, A.; FLIER, J.; BRIGGS, M. R.; STAELS, B.; VIDAL, H.; AUWERX, J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 30, p. 18779-18789, 1997.

FAJAS, L.; FRUCHART, J-C.; AUWERX, J. PPAR γ 3 mRNA: a distinct PPAR γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. **FEBS**, v. 438, p. 55-60, 1998.

FERNÁNDEZ-REAL, J. M.; BROCH, M.; VENDRELL, J.; RICART, W. Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. **Diabetes Care**, v. 26, n. 5, p. 1362-1368, 2003.

FURUKAWA, S.; FUJITA T.; SHIMABUKURO, M.; MASANORI, I.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NAKAYAMA, O.; MAKISHIMA, M.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2004.

FURUYA, D. T.; POLETTO, A. C.; MACHADO, U. F. Obesidade x Resistência à insulina x Inflamação. Identificação de dois sítios de ligação de NF κ B na região promotora do gene do GLUT4. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 52, p. S171, 2008. Suplemento.

GALLIE D. R. A tale of two termini: A functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. **Gene**, v. 216, p. 1-11, 1998.

GAO, Z.; ZHANG, X.; ZUBERI, A.; HWANG, D.; QUON, M. J.; LEFEVRE, M.; YE, J. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. **Mol. Endocrinol.**, v. 18, n. 8, p. 2024-2034, 2004.

GARFIN, D. E. One-dimensional gel electrophoresis. **Methods Enzimol.**, v. 182, p. 425-441, 1990.

GORSKI, J.; NARWROCKI, A.; MURTHY, M. Characterization of free and glyceride-esterified long chain fatty acids in different skeletal muscle types of the rat. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 178, n. 1-2, p. 113-118, 1998.

GRIFFIN, M. E.; MARCUCCI, M. J.; CLINE, G. W.; BARUCCI, N.; LEE, D.; GOODYEAR, L. J.; KRAEGEN, E. W.; WHITE, M. F.; SHULMAN, G. I. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activity of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. **Diabetes**, v. 48, p. 1270-1274, 1999.

HAN, P.; ZHANG, Y.-Y.; LU, Y.; HE, B.; ZHANG, W.; XIA, F. Effects of different free fatty acids on insulin resistance in rats. **Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.**, v. 7, n. 1, p. 91-96, 2008.

HANNAH, V. C.; OU, J.; LUONG, A.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 6, p. 4365-4372, 2000.

HIRABARA, S. M.; CURI, R.; MAECHLER, P. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 222, p. 187-194, 2010.

HOMMELBERG, P. P.; PLAT, J.; LANGEN, R. C.; SCHOLS, A. M.; MENSINK, R. P. Fatty acid-induced NF-kappaB activation and insulin resistance in skeletal muscle are chain length dependent. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 296, n. 1, p. 114-120, 2009.

HORTON, J. D. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 30, p. 1091-1095, 2002.

IM, S. S.; KWON, S. K.; KANG, S. Y.; KIM, T. H.; KIM, H. I.; HUR, M. W.; KIM, K. S.; AHN, Y. H. Regulation of GLUT4 gene expression by SREBP-1c in adipocytes. **Biochem. J.**, v. 399, p. 131-139, 2006.

IM, S-S.; KWON, S-K.; KIM, T-H.; KIM, H-il.; AHN, Y-H. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. **IUBMB Life**, v. 59, n. 3, p. 134-145, 2007.

IMBERT, V.; RUPEC, R. A.; LIVOLSI, A.; PAHL, H. L.; TRAENCKNER, E. B.; MUELLER-DIECKMANN, C.; FARAHIFAR, D.; ROSSI, B.; AUEBERGER, P.; BAEUERLE, P. A.; PEYRON, J. F. Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha. **Cell**, v. 86, n. 5, p. 787-798, 1996.

ITANI, S. I.; RUDERMAN, N. B.; SCHMIEDER, F.; BODEN, G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I kappa B-alpha. **Diabetes**, v. 51, n. 7, p. 2005-2011, 2002.

JOVÉ, M.; PLANAVILA, A.; LAGUNA, J. C.; VÁZQUEZ-CARRERA, M. Palmitate induced interleukin 6 production is mediated by protein kinase C and Nuclear Factor kB activation and leads to glucose transporter 4 down-regulation in skeletal muscle cells. **Endocrinology**, v. 146, n. 7, p. 3087-3095, 2005.

JOVÉ, M.; PLANAVILA, A.; SÁNCHEZ, R. M.; MERLOS, M.; LAGUNA, J. C.; VÁZQUEZ-CARRERA, M. Palmitate induces tumor necrosis factor- α expression in C2C12 skeletal muscle cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor- κ B activation. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 552-561, 2006.

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

JUMP, D. B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 13, p. 155-164, 2002.

JUMP, D. B. Fatty acid regulation of gene expression. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 41, n. 1, p. 41-78, 2004.

KASE, E. T.; WENSAAS, A. J.; AAS, V.; HOJLUND, K.; LEVIN, K.; THORESEN, G. H.; BECK-NIELSEN, H.; RUSTAN, A. C.; GASTER, M. Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the Liver X Receptor pathways. **Diabetes**, v. 54, p. 1108-1115, 2005.

KAWAMOTO, E. M.; LEPSCH, L. B.; BOAVENTURA, M. F.; MUNHOZ, C. D.; LIMA, L. S.; YSHII, L. M.; AVELLAR, M. C.; CURI, R.; MATTSON, M. P.; SCAVONE, C. Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. **J. Neurosci.**, v. 28, p. 845-860, 2008.

KE, Q.; COSTA, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). **Mol. Pharmacol.**, v. 70, n. 5, p. 1469-1480, 2006.

KLIEWER, S. A.; SUNDSETH, S. S.; JONES, S. A.; BROWN, P. J.; WISELY, G. B.; KOBLE, C. S.; DEVCHAND, P.; WAHLI, W.; WILLSON, T. M.; LENHARD, J. M.; LEHMANN, J. M. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 4318-4323, 1997.

KLIEWER, S. A.; XU, H. E.; LAMBERT, M. H.; WILLSON, T. M. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. **Recent. Prog. Horm. Res.**, v. 56, p. 239-263, 2001.

KLIP A.; TSAKIRIDIS T.; MARETTE A.; ORTIZ P. A. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. **FASEB J.**, v. 8, p. 43-53, 1994.

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

LEE, J. N.; ZHANG, X.; FERAMISCO, J. D.; GONG, Y.; YE, J. Unsaturated fatty acids inhibit proteasomal degradation of Insig 1 at a postubiquitination step. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 48, p. 33772-33783, 2008.

LI, Q.; VERMA, I. M. NF- κ B regulation in the immune system. **Nature Reviews**, v. 2, p. 725-734, 2002.

LONG, S. D.; PEKALA, P. H. Regulation of GLUT4 gene expression by arachidonic acid. Evidence for multiple pathways, one of which requires oxidation to prostaglandin E2. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 2, p. 1138-1144, 1996.

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

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

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

MATER, M. K.; THELEN, A. P.; PAN, D. A.; JUMP, D. B. Sterol response element-binding protein 1c (SREBP-1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression hepatic S14 gene transcription. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 46, p. 32725-32732, 1999.

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

MONTELL, E.; TURINI, M.; MAROTTA, M.; ROBERTS, M.; NOÉ, V.; CIUDAD, C. J.; MACÉ, K.; GÓMEZ-FOIX, A. M. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 280, n. 2, p. E229-237, 2001.

NUGENT, C.; PRINS, J. B.; WHITEHEAD, J. P.; WENTWORTH, J. M.; CHATTERJEE, V. K. K.; O'RAHILLY, S. Arachidonic acid stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by increasing GLUT1 and GLUT4 levels at the plasma membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 12, p. 9149-9157, 2001.

OU, J.; TU, H.; SHAN, B.; LUK, A.; DEBOSE-BOYD, R. A.; BASHMAKOV, Y.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, n. 11, p. 6027-6032, 2001.

PAGÉ, E. L.; ROBITAILLE, G. A.; POUYSSÉGUR, J.; RICHARD, D. E. Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 50, p. 48403-48409, 2002.

PARK, J-Y.; KIM, Y. M.; SONG, H. S.; PARK, K. Y.; KIM, Y. M.; KIM, M. S.; PAK, Y. K.; LEE, I. K.; LEE, J. D.; PARK, S-J.; LEE, K-U. Oleic acid induces endothelin-1 expression through activation of protein kinase C and NF- κ B. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 303, p. 891-895, 2003.

PÉRGORIER, J. P.; LE MAY C.; GIRARD, J. Control of gene expression by fatty acids. **J. Nutr.**, v. 134, n. 9, p. 2444S-2449S, 2004.

PERKINS, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, p. 49-67, 2007.

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

REGAZZETTI, C.; PERALDI, P.; GRÉMEAUX, T.; NAJEM-LENDOM, R.; BEM-SAHRA, I.; CORMONT, M.; BOST, F.; BRUSTEL-MARCHAND, Y. L.; TANTI, J-F.; GIORGETTI-PERALDI, S. Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. **Diabetes**, v. 58, p. 95-103, 2009.

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

SALLÉS F. J.; RICHARDS W. G.; STRICKLAND S. Assaying the polyadenylation state of mRNAs. **Methods**, v. 17, p. 38-45, 1999.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799–805, 2001.

SAMPATH, H.; NTAMBI, J. M. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. **Nutr. Rev.**, v. 62, n. 9, p. 333-339, 2004.

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

SEMENZA, G. L. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. **Biochem. Pharmacol.**, v. 59, n. 1, p. 47-53, 2000.

SERAPHIM P. M.; NUNES M. T.; GIANNOCO G.; MACHADO U. F. Age related obesity-induced shortening of GLUT4 mRNA poly (A) tail length in rat gastrocnemius skeletal muscle. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 276, p. 80-87, 2007.

SESTI, G. Pathophysiology of insulin resistance. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 20, n. 4, p. 665-679, 2006.

SILVA, J. L. T.; GIANNOCO, G.; FURUYA, D. T.; LIMA, G. A.; MORAES, P. A. C.; NACHEF, S.; BORDIN, S.; BRITTO, R. G.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. NF- κ B, MEF2A and HIF1- α involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 240, n. 1-2, p. 1-12, 2005.

SINHÁ, S.; PERDOMO, G.; BROWN, N. F.; O'DOHERTY, R. M. Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of nuclear factor κ B. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 40, p. 41294-41301, 2004.

SPRECHER, H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acid. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1486, p. 219-231, 2000.

STORLIEN, L. H.; JENKINS, A. B.; CHISHOLM, D. J.; PASCOE, W. S.; KHOURI, S.; KRAEGER, E. W. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. **Diabetes**, v. 40, n. 2, p. 280-289, 1991.

SUZAWA, M.; TAKADA, I.; YANAGISAWA, J.; OHTAKE, F.; OGAWA, S.; YAMAUCHI, T.; KADOWAKU, T.; TAKEUCHI, Y.; SHIBUYA, H.; GOTOH, Y.; MATSUMOTO, K.; KATO, S. Cytokines suppress adipogenesis and PPAR- γ function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. **Nat. Cell Biol.**, v. 5, p. 224-230, 2003.

TAKAHASHI, N.; KAWADA, T. Physiological and pharmacological function of PPARs. **Nihon Yakurigaku Zasshi**, v. 117, n. 5, p. 319-327, 2001.

TEBBEY, P. W.; MCGOWAN, K. M.; STEPHENS, J. M.; BUTTKET, T. M.; PEKALA, P. H. Arachidonic acid down-regulates the insulin-dependent glucose transporter gene (GLUT4) in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting transcription and enhancing mRNA Turnover. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 639-644, 1994.

TEMES, E.; MARTÍN-PUIG, S.; ARAGONÉS, J.; JONES, D. R.; OLMOS, G.; MÉRIDA, I.; LANDÁZURI, M. O. Role of diacylglycerol induced by hypoxia in the regulation of HIF-1 α activity. **Biochem. and Biophys. Res. Commun.**, v. 315, p. 44-50, 2004.

THORENS, B.; CHARRON, M. J.; LODISH, H. F. Molecular physiology of glucose transporters. **Diabetes Care**, v. 13, p. 209-218, 1990.

TOBIN, K. A. R.; STEINEGER, H. H.; ALBERTI, S.; SPYDEVOLD, O.; AUWERX, J.; GUSTAFSSON, J.-A.; NEBB, H. I. Cross-talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptor - α . **Mol. Endocrinol.**, v. 14, n. 5, p. 741-752, 2000.

VETTOR, R.; FABRIS, R.; SERRA, R.; LOMBARDI, A. M.; TONELLO, C.; GRANZOTTO, M.; MARZOTO, M. O.; CARRUBA, M. O.; RICQUIER, D.; FEDERSPIL, G.; NISOLI, E. Changes in FAT/CD36, UCP2, UCP3 and GLUT4 gene expression during lipid infusion in rat skeletal and heart muscle. **Int. J. Obes. Metab. Disord.**, v. 26, n. 6, p. 838-847, 2002.

WHITNEY, K. D.; WATSON, M. A.; GOODWIN, B.; GALARDI, C. M.; MAGLICH, J. M.; WILSON, J. G.; WILLSON, T. M.; COLLINS, J. L.; KLIEWER, S. A. Liver X receptor (LXR) regulation of the LXR α in human macrophages. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 43509-43515, 2001.

WÓJCICKA, G.; JAMROZ-WISNIEWSKA, A.; HOROSZEWICZ, K.; BELTOWSKI, J. Liver receptors (LXRs). Part I: Structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. **Postepy. Hig. Med. Dosw.**, v. 61, p. 736-759, 2007.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v. 39, n. 1, p. 1-11, 2005.

WORGALL T. S.; STURLEY, S. L.; SEO, T.; OSBORNE, T. F.; DECKELBAUM, R. J. Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 40, p. 25537-25540, 1998.

XU, J.; NAKAMURA, M. T.; CHO, H. P.; CLARKE, S. D. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 33, p. 23577-23583, 1999.

YOKOYAMA, C.; WANG, X.; BRIGGS, M. R.; ADMON, A.; WU, J.; HUA, X.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. **Cell**, v. 75, n. 1, p. 187-197, 1993.

YONEMITSU, S.; NISHIMURA, H.; SHINTANI, M.; INOUE, R.; YAMAMOTO, Y.; MASUZAKI, H.; OGAWA, Y.; HOSODA, K.; INOUE, G.; HAYASHI, T.; NAKAO, K. Troglitazone induces GLUT4 translocation in L6 myotubes. **Diabetes**, v. 50, p. 1093-1101, 2001.

YOSHIKAWA, T.; SHIMANO, H.; YAHAGI, N.; IDE, T.; AMEMIYA-KUDO, M.; MATSUZAKA, T.; NAKAKUKU, N.; TOMITA, S.; OKAZAKI, H.; TAMURA, Y.; LIZUKA, Y.; OHASHI, K.; TAKAHASHI, A.; SONE, H.; OSUGA, J-I.; GOTODA, T.; ISHIBASHI, S.; YAMADA, N. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 3, p. 1705-1711, 2002.

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

ZELZER, E.; LEVY, Y.; KAHANA, C.; SHILO, B-Z.; RUBINSTEIN, M.; COHEN, B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 α /ARNT. **EMBO J.**, v. 17, n. 17, p. 5085-5094, 1998.

ZHANG L.; KEUNG W.; SAMOKHVALOV V.; WANG W.; LOPASCHUK G. D. Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1801, p. 1-22, 2010.

ZHONG, H.; SUYANG, H.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; GHOSH, S. The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. **Cell**, v. 89, n. 3, p. 413-424, 1997.

ZHOU, X. R.; SUN, C. H.; ZHAO, D. Dietary conjugated linoleic acid increases PPAR gamma gene expression in adipose tissue of obese rat, and improves insulin resistance. **Growth Horm. IGF Res.**, v. 18, n. 5, p. 361-368, 2008.

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