

PAULO ALEXANDRE DE CARVALHO MORAES

**A PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA CINASE mTOR
(MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN) E DO FATOR
TRANSCRICIONAL NF- κ B NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO
DO GLUT4 EM MÚSCULO SÓLEO DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

PAULO ALEXANDRE DE CARVALHO MORAES

**A PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA CINASE mTOR
(MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN) E DO FATOR
TRANSCRICIONAL NF- κ B NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO
DO GLUT4 EM MÚSCULO SÓLEO DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Ubiratan Fabres Machado

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

Moraes, Paulo Alexandre de Carvalho.

A participação da proteína cinase mTOR (Mammalian target of rapamycin) e do fator transcricional NF-kB na regulação da expressão do GLUT4 em músculo sóleo de ratos / Paulo Alexandre de Carvalho Moraes. -- 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: Participation of protein kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) and the transcriptional factor NF-kB in regulating the expression of GLUT4 in soleus muscle of rats

Descritores: 1. GLUT4 2. Insulina 3. MEF2 4. NF-kB 5. PI3K 6. AKT I. Machado, Ubiratan Fabres II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0211/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Paulo Alexandre de Carvalho Moraes.

Título da Tese: A participação da proteína cinase mTOR (Mammalian target of rapamycin) e do fator transcricional NF-kB na regulação da expressão do GLUT4 em músculo sóleo de ratos.

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): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **054** nas fls. **57** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Ubiratan Fabres Machado, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**A participação da proteína cinase mTOR (Mammalian Target of rapamycin) e do fator transcricional NF-kB na regulação da expressão do GLUT4 em músculo sóleo de ratos**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Paulo Alexandre de Carvalho Moraes** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **15.10.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 16 de outubro de 2008.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

À minha família, minha vida.

AGRADECIMENTO

Pela oportunidade.

Por confiar.

Por ensinar.

Por inspirar.

Por proporcionar tudo isso.

Agradeço a você querido Bira.

“Stay hungry. Stay foolish.”

The Whole Earth Catalog, 1974.

RESUMO

Moraes, PA. A participação da proteína cinase mTOR (mammalian target of rapamycin) e do fator transcricional NF- κ B na regulação da expressão do GLUT4 em músculo sóleo de ratos. [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

Aumentar a expressão de GLUT4 nos tecidos insulino-sensíveis em condições de resistência à insulina, leva a uma melhora na sensibilidade insulínica. Esse aumento tem sido considerado como uma possível medida terapêutica para doenças como diabetes tipo 2 e obesidade. Assim, ampliando o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na regulação da expressão de GLUT4, vislumbra-se a possibilidade de controlá-lo e assim, aliviar o quadro de resistência insulínica. A insulina regula a expressão de GLUT4, porém os mecanismos envolvidos nesta regulação não estão definidos. Em músculo, a captação de glicose é realizada pelo GLUT4, que é codificado pelo gene *Slc2a4*. Alguns fatores de transcrição e proteínas cinases estão relacionados à expressão desse gene. Assim, o objetivo desta pesquisa foi investigar a participação dos fatores de transcrição MEF2, HIF-1 α e NF- κ B, e das proteínas cinases mTOR, PI3K e AKT na regulação da expressão de *Slc2a4*/GLUT4 induzida pela insulina. Para isso, músculos sóleos de ratos wistar foram incubados em tampão Krebs-Henseleit, tratados ou não com insulina, wortmanina (inibidor da PI3K), rapamicina (inibidor da mTOR), ML-9 (inibidor da AKT) ou TNF- α . Nesses tecidos foram avaliados o conteúdo das proteínas GLUT4 e mTOR (*Western*), o conteúdo de mRNA de *Slc2a4*, *NF- κ B1*, *HIF-1 α* e *MEF2A/C/D* (PCR) e a atividade de ligação de proteínas nucleares no sítio de ligação de NF- κ B, *AT-rich element* (sítio de ligação dos MEFs) e E-Box (sítio de ligação de HIF-1 α e MyoD) do promotor do gene *Slc2a4* (EMSA).

A insulina aumentou o mRNA do *Slc2a4* (140%, $p < 0,001$ vs Controle) e a adição de wortmanina ou ML-9 à incubação evitou esse aumento ($p < 0,001$ vs Insulina). A insulina não alterou o mRNA de HIF-1a e MEF2C, mas aumentou o mRNA de MEF2A e MEF2D (70% e 65%, $p < 0,001$ vs Controle, respectivamente), além de diminuir o mRNA de NF- κ B1 (50%, $p < 0,001$ vs Controle). O aumento do mRNA de MEF2A/D induzido pela insulina não se alterou com a adição de wortmanina ou ML-9 à incubação. A insulina promoveu um aumento da atividade de ligação de proteínas nucleares aos sítios *AT-rich element* e E-Box (63%, $p < 0,05$ e 95%, $p < 0,001$ vs Controle, respectivamente) do promotor do gene *Slc2a4*. Esse efeito da insulina foi bloqueado com a adição de wortmanina ou ML-9 ($p < 0,001$). Além disso, a insulina diminuiu a atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do NF- κ B (45%, $p < 0,001$). O TNF- α aumentou (60%, $p < 0,01$) a atividade de ligação do NF- κ B, o que foi inibido por insulina. As alterações de mRNA do *Slc2a4*, induzidas pela insulina, com ou sem wortmanina ou ML-9, foram acompanhadas de variações paralelas na proteína GLUT4. Além disso, a insulina não alterou a expressão de mTOR e a rapamicina não alterou o aumento da proteína GLUT4 induzido pela insulina. Assim, mostramos que o tratamento de curto prazo com insulina aumentou a expressão *Slc2a4*/GLUT4 no músculo sóleo de ratos in vitro. Esse efeito envolve: a participação da via PI3K/AKT ativando os fatores de transcrição MEF2A/D e possivelmente MyoD, e a diminuição da expressão do NF κ B1 e da atividade de ligação no promotor do *Slc2a4*.

Palavras-chave: GLUT4. Insulina. MEF2. NF- κ B. PI3K. AKT.

ABSTRACT

Moraes, PA. Participation of protein kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) and the transcriptional factor NF- κ B in regulating the expression of GLUT4 in soleus muscle of rats. [Thesis (Doctor in Science)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Increase the expression of GLUT4 in insulin-sensitive tissues in conditions of insulin resistance, leads to an improvement in insulin sensitivity. So, this is regarded as a possible treatment for diseases such as type 2 diabetes and obesity. Thus, increasing knowledge about the mechanisms involved in regulating the expression of GLUT4, sees the possibility to control it and thereby relieve the context of insulin resistance. Insulin regulates the expression of GLUT4 protein, but the mechanisms involved in this regulation are not well defined. In muscle, glucose uptake by GLUT4 is performed, which is encoded by the gene *Slc2a4*. Some transcription factors and protein kinases are related to the expression of this gene. The objective of this research was to investigate the role of the transcription factors MEF2, HIF-1 α and NF- κ B, as well as the protein kinase mTOR, PI3K and AKT in the regulation of expression of *Slc2a4*/GLUT4 induced by insulin in soleus muscle of rats. To this end, soleus muscles of Wistar rats were incubated in vitro in Krebs-Henseleit buffer, treated or not with insulin, wortmanina (PI3K inhibitor), rapamycin (mTOR inhibitor), ML-9 (AKT inhibitor) or TNF - α . In these tissues were evaluated the GLUT4 and mTOR protein content (Western), the content of *Slc2a4*, *NF- κ B1*, *HIF-1 α* and *MEF2A/C/D* mRNAs (PCR) and the and the binding activity of protein nuclear in binding site of NF- κ B, AT-rich element (binding site of MEF2) and E-Box (binding site of HIF-1 α and MyoD) in the promoter of the gene *Slc2a4* (EMSA). Insulin increased the

mRNA of *Slc2a4* (140%, $p < 0.001$ vs. control) and the addition of ML-9 or wortmanina in the incubation prevented this increase ($p < 0.001$ vs. insulin). Insulin did not alter the mRNA of *HIF-1a* and MEF2C, but increased the mRNA of MEF2A and MEF2D (70% and 65%, $p < 0.001$ vs. control, respectively), and decrease the mRNA of NF- κ B1 (50%, $p < 0.001$ vs. control). The increase in mRNA of MEF2A/D induced by insulin did not change with the addition of ML-9 or wortmanina in the incubation. Insulin promoted an increased in binding activity of nuclear protein on sites for AT-rich element and E-Box (63%, $p < 0.05$ and 95%, $p < 0.001$ vs. control, respectively) of the *Slc2a4* gene promoter. This effect of insulin was blocked by the addition of wortmanina or ML-9 ($p < 0.001$). Moreover, insulin decreased the binding activity of nuclear protein to the binding site of NF- κ B (45%, $p < 0.001$). TNF- α increased (60%, $p < 0.01$) the binding activity of NF- κ B, which was inhibited by insulin. Changes in *Slc2a4* induced by insulin, with or without wortmanina or ML-9, were accompanied by parallel changes in GLUT4 protein. In addition, insulin did not alter the expression of mTOR and rapamycin did not alter the increase in GLUT4 protein induced by insulin. Thus, we show that short-term treatment with insulin increased the expression *Slc2a4*/GLUT4 in the soleus muscle of rats in vitro. These effects involve the participation of the PI3K/AKT pathway by activating the transcription factors MEF2A/D and possibly MyoD, and the decreased in NF κ B1 expression and binding activity in *Slc2a4* promoter.

Keywords: GLUT4. Insulin. MEF2. NF- κ B. PI3K. AKT.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	26
2.1 <i>Objetivo geral</i>	26
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 <i>Animais</i>	27
3.2 <i>Incubação dos tecidos</i>	27
3.3 <i>Quantificação do mRNA</i>	28
3.4 <i>Atividade de ligação dos fatores de transcrição</i>	30
3.5 <i>Quantificação de proteína GLUT4</i>	36
3.6 <i>Quantificação da proteína mTOR</i>	38
3.7 <i>Análise estatística dos resultados</i>	39
4 RESULTADOS	35
4.1 <i>Efeito da insulina no conteúdo proteico total de GLUT4</i>	35
4.2 <i>Efeito da wortmanina, ML-9 e rapamicina no conteúdo proteico total de GLUT4</i>	36
4.3 <i>Efeito da insulina no conteúdo proteico de mTOR</i>	39
4.4 <i>Efeito do TNF-α no conteúdo proteico total de GLUT4</i>	40
4.5 <i>Efeito da insulina na expressão do mRNA de Slc2a4</i>	41
4.6 <i>Efeito da wortmanina ou ML-9 na expressão do mRNA de Slc2a4 induzida pela insulina</i>	42
4.7 <i>Efeito da insulina na expressão do mRNA dos fatores de transcrição Hif-1α e Mef2a/c/d</i>	43
4.8 <i>Efeito da wortmanina ou ML-9 na expressão do mRNA de Mef2a/d induzida pela insulina</i>	47
4.9 <i>Efeito da insulina na expressão do mRNA de Nf-κb1</i>	48

<i>4.10 Efeito da insulina na atividade de ligação ao AT-rich element....</i>	49
<i>4.11 Efeito da wortmanina e ML-9 na atividade de ligação ao AT-rich element indizada pela insulina.....</i>	50
<i>4.12 Efeito da insulina na atividade de ligação ao E-Box.....</i>	51
<i>4.13 Efeito da wortmanina ou ML-9 na atividade de ligação ao E-Box.....</i>	52
<i>4.14 Efeito da insulina na atividade de ligação do NF-κB.....</i>	53
<i>4.15 Efeito do TNF-α na atividade de ligação de NF-κB.....</i>	54
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

A glicose é a principal fonte energética do organismo e possui um papel importante no metabolismo e homeostase celular. Muitas células são dependentes de um contínuo suprimento de glicose como fonte da geração de adenosina tri-fosfato (ATP), o principal substrato energético do organismo (Gould e Holmann, 1993). No entanto, a bicamada lipídica da membrana plasmática das células é impermeável a moléculas hidrofílicas como a glicose. Desta forma, o acesso da glicose as células não ocorre livremente, ele é dependente de proteínas transportadoras que deslocam a glicose através da membrana plasmática tanto para dentro quanto para fora da célula. Existem dois tipos de transportadores de glicose, os transportadores de glicose acoplada ao sódio (SGLT) e os transportadores de glicose por difusão (GLUT) (Scheepers et al., 2004).

Existe um importante deslocamento de glicose para dentro da célula muscular esquelética e adiposa no período pós-prandial. Neste período, o músculo esquelético é o principal território envolvido na captação de glicose e no seu armazenamento na forma de glicogênio. Neste processo, o transportador de glicose mais importante e abundante é o GLUT4 e, por isto, é considerado fundamental na manutenção da homeostase glicêmica (Zorzano et al., 2000). Em condições basais, o GLUT4 encontra-se em vesículas intracelulares, mas sob estímulo da insulina ou da contração muscular, essas vesículas translocam para a membrana plasmática onde se fundem, aumentando a quantidade de GLUT4 na membrana plasmática e permitindo agudamente um aumento da captação de glicose (Cortright e Dohm, 1997). Além da translocação, o conteúdo proteico de GLUT4 nos tecidos insulino-sensíveis é parte importante do funcionamento deste mecanismo, pois a eficiência do estímulo de translocação de GLUT4 é

altamente relacionada com o conteúdo celular de GLUT4 disponíveis para translocação (Ren et al., 1994).

Em algumas doenças como o diabetes tipo 2 e a obesidade a manutenção da homeostase glicêmica fica prejudicada. Isso ocorre por problemas relacionados com a expressão e translocação de GLUT4 nos tecidos insulino-sensíveis. (Garvey et al., 1998; Shepherd e Kahn., 1999). Nestas doenças, um quadro de resistência insulínica pode se estabelecer e níveis até supra-fisiológicos de insulina são insuficientes para uma captação normal de glicose. Este quadro é acompanhado ainda por uma intolerância a glicose e hiperglicemia que induzem o desenvolvimento de doenças degenerativas (Bonadonna e De Fronzo, 1991).

Assim, a fim de evitar as complicações associadas a essas doenças, iniciou-se uma série de pesquisas com o objetivo de encontrar abordagens preventivas ou terapêuticas para a resistência insulínica.

Sabe-se que a modificação da expressão de GLUT4 nos tecidos insulino-sensíveis afeta profundamente a ação da insulina e conseqüentemente, o metabolismo de glicose (Charron e Katz, 1998). É comum encontrar, por exemplo, uma diminuição no conteúdo proteico de GLUT4 no tecido adiposo nos estados de resistência insulínica como a obesidade e diabetes (Garvey et al., 1991; Shepherd e Kahn., 1999). Entretanto, o músculo esquelético apresenta o conteúdo proteico de GLUT4 muitas vezes preservado nesses estados (Friedman et al., 1992). Vale salientar que algumas pesquisas encontraram reduções mínimas no conteúdo proteico de GLUT4 no músculo esquelético nos estados de resistência insulínica (Dohm et al., 1991), sendo que uma delas encontrou redução apenas no tecido muscular com predominância de fibras de contração lenta (Gaster et al., 2001). Parece que a diminuição da captação de glicose no músculo esquelético em estados de resistência insulínica está mais relacionada com problemas na translocação de GLUT4 para membrana plasmática do que com a expressão (Shepherd e Kahn, 1999).

O conceito de que o conteúdo proteico de GLUT4 é importante para a manutenção da homeostase glicêmica e o fato do tecido muscular muitas vezes apresentar esse conteúdo preservado em condições de resistência insulínica faz com que o estudo do conteúdo proteico de GLUT4 no músculo esquelético nessas condições pareça antagônico. Entretanto, o entendimento do papel do conteúdo proteico de GLUT4 na homeostase glicêmica ficou evidente com o uso de animais modificados geneticamente nas pesquisas desta área. Animais modificados geneticamente para diminuir o conteúdo proteico de GLUT4 no tecido adiposo ou muscular apresentaram resistência insulínica, intolerância a glicose, diminuição da captação de glicose basal e estimulada pela insulina (Abel et al., 2001; Zisman et al., 2000). Já animais modificados geneticamente para superexpressar GLUT4 no tecido adiposo ou tecido muscular apresentaram melhorias na sensibilidade à insulina e maior captação de glicose tanto basal quanto estimulada pela insulina (Shepherd et al., 1993). Interessante notar que ratos modificados geneticamente para superexpressar GLUT4 tratados com estreptozotocina, apresentaram uma proteção parcial contra a hiperglicemia e resistência insulínica em relação aos camundongos não modificados geneticamente tratados com a mesma droga (Tozzo et al., 1997).

As melhorias na sensibilidade insulínica ocorrem tanto pela superexpressão de GLUT4 no tecido muscular quanto no tecido adiposo. Estudo com camundongos *knockout* para GLUT4 no tecido muscular e que superexpressavam GLUT4 no tecido adiposo mostrou uma resposta glicêmica normal à sobrecarga de glicose, ressaltando a importante participação do GLUT4 no tecido adiposo para a manutenção do controle glicêmico (Carvalho et al., 2005).

De forma surpreendente, camundongos modificados geneticamente para diminuir o conteúdo proteico de GLUT4 tanto no tecido adiposo como no muscular, não apresentaram agravamento da resistência insulínica em relação aos camundongos com baixo conteúdo proteico seletivo no tecido adiposo ou no

muscular. Aparentemente, esses animais desenvolveram mecanismos adaptativos como maior utilização de ácidos graxos como fonte energética e maior captação de glicose pelo fígado (Kotani et al., 2004).

Outra informação importante apresentada em camundongos que superexpressam GLUT4 é que o aumento deste transportador, *per se*, induz maior quantidade de proteína presente na membrana plasmática em condições basais (Liu et al., 1993). Portanto, parece que a quantidade de proteína transportadora presente na membrana celular depende fundamentalmente do conteúdo celular total, determinado pelo padrão de expressão do gene.

As informações citadas acima reforçam o papel principal da expressão do GLUT4 na regulação da sensibilidade à insulina nos tecidos insulino-sensíveis e, portanto na regulação da homeostase glicêmica. O desafio que se apresenta de posse desta informação é conhecer e controlar os mecanismos envolvidos na regulação da expressão de GLUT4 para que se consiga aumentar o conteúdo proteico de GLUT4 nos tecidos insulino-sensíveis em estado de resistência insulínica a fim de melhorar o controle da homeostase glicêmica.

É sabido que a expressão de GLUT4 sofre regulação hormonal. O promotor do gene do *Slc2a4* possui um elemento responsivo hormônio tireóideo, o TRE, onde se liga o TR- α 1 (Santalucia et al., 2001). O tratamento de ratos obesos ou diabéticos com o hormônio triiodotironina (T3) resultou em aumento da expressão de GLUT4 no músculo esquelético (Torrance et al., 1997). O tratamento por longo período com T3 estimulou a expressão de GLUT4 e a captação de glicose pelo tecido muscular esquelético (Casla et al., 1990; Weinstein et al., 1994) e o hipotireoidismo é associado com diminuição da expressão de GLUT4 no tecido muscular (Castelló et al., 1994).

A insulina, tão importante no controle da homeostase glicêmica e na translocação do GLUT4, também está envolvida no controle da expressão gênica e síntese protéica de GLUT4, embora este controle ainda não esteja claramente estabelecido. Em pesquisa com células adiposas em cultura, a

insulina diminuiu a expressão de GLUT4 (Flores-Riveros et al., 1993). Em situações de resistência insulínica é comum encontrar um quadro de hiperinsulinemia e invariavelmente, repressão da expressão de GLUT4 (Machado et al., 1993). Entretanto, a insulina também é capaz de aumentar a expressão de GLUT4. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram claramente um papel estimulador da expressão de GLUT4 (Al-Khalili et al., 2005; Hernandez et al., 2001; Mora e Pessin, 2000; Silva et al., 2005; Yu et al., 2001). Desta forma, é preciso identificar as situações em que a insulina se torna repressora ou indutora da expressão de GLUT4 assim como os mecanismos envolvidos nesses processos.

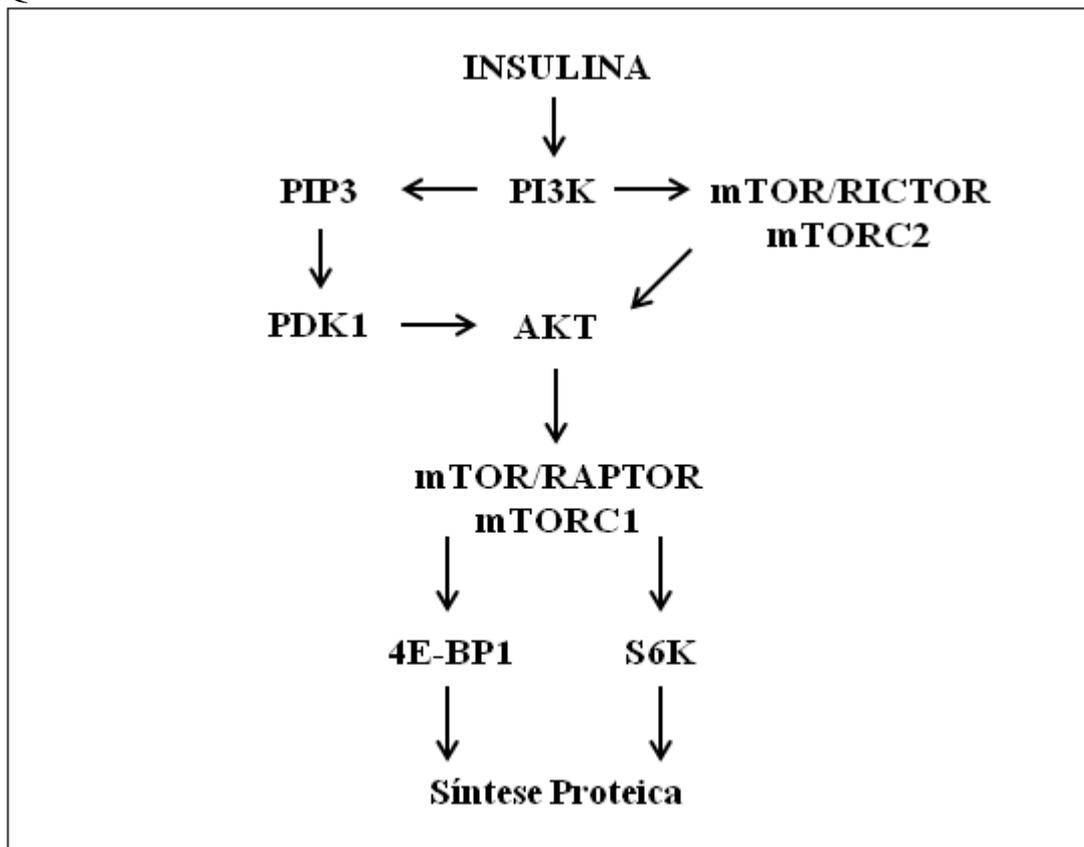
Já está bem estabelecido na literatura que a ativação da PI3K pela insulina medeia a translocação de GLUT4 para membrana plasmática. Experimentos que utilizaram inibidores da PI3K, observaram um grande prejuízo nessa translocação (Cheatham et al., 1994). É sabido que as proteínas cinases podem regular a transcrição gênica, mas se a PI3K atua como regulador da expressão de GLUT4 ainda é incerto. Em pesquisa com células adiposas tratadas cronicamente com insulina, houve um aumento da expressão gênica e protéica de GLUT4. A adição de inibidores da PI3K (LY294002 e wortmanina) neste protocolo, evitou parcialmente a expressão de GLUT4 (Valverde et al., 1999).

Após a ativação da PI3K pela insulina, uma proteína que pode fazer parte de uma via que resulte na expressão de GLUT4 é a AKT. O envolvimento da AKT na indução da expressão dos transportadores de glicose GLUT1 em hepatócitos (Barthel et al., 1999) e GLUT3 no tecido muscular (Hajdich et al., 1998) já foi descrito na literatura. Além disso, a inibição da AKT pelo ML-9 em adipócitos impede o aumento da expressão do mRNA de GLUT4 induzido pela insulina (Hernandez et al., 2001).

Condições de deficiência insulínica como o jejum e o diabetes são associadas com um declínio da taxa de síntese protéica em músculo esquelético (Pain e Garlick, 1974), provavelmente porque a insulina é fundamental para

manter a síntese protéica no músculo, independentemente da quantidade de mRNA disponível (Crozier et al., 2003). Isso ocorre através do controle da atividade da maquinaria ribossomal de tradução, por meio da via que envolve a ativação da PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*) e posteriormente da mTOR (quadro 1), aumentando a atividade traducional em geral (Bolster et al., 2004).

Quadro1- Via da PI3K/AKT/mTOR



FONTE: Adaptado de Hresko e Mueckler, 2005.

A via da mTOR está relacionada com a diferenciação e regeneração das células musculares (Ge et al., 2009), que são processos associados com aumento do conteúdo proteico de GLUT4 (Moreno et al., 2003). Em pesquisa recente, verificou-se que o treinamento aeróbio provocou um aumento do conteúdo proteico de GLUT4 no músculo e que esse aumento coincidiu com maior ativação da via da mTOR (Stuart et al., 2010). Assim, é possível conjecturar que a mTOR participe da regulação da expressão da proteína GLUT4, seja por

efeitos diretos ou indiretos. Talvez, a ativação da PI3K pela insulina esteja envolvida com uma via de sinalização que resulte no aumento da expressão da proteína GLUT4 e um possível passo desta via de sinalização seria através da mTOR.

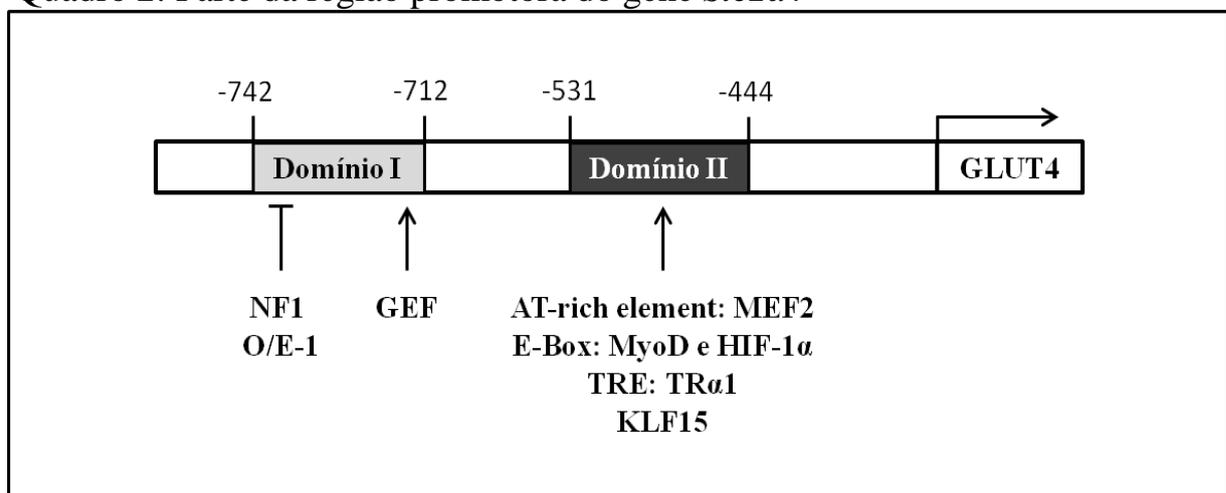
A mTOR é uma proteína cinase, identificada e clonada em 1994, com alto peso molecular (289 kDa) com 2549 aminoácidos, membro da família das PIKKs (*phosphoinositide-3 kinase related kinase*) (Hay e Sonenberge, 2004). A mTOR possui dois complexos funcionais distintos, o complexo mTOR 1 e 2 (mTORC1, mTORC2 respectivamente), que foram originalmente definidos pela sua sensibilidade e insensibilidade, respectivamente, à rapamicina. No complexo formado pela mTORC1 existe uma proteína chamada raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*) que medeia a sensibilidade inicial à rapamicina. Já no complexo formado pela mTORC2, a presença da proteína rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) a torna insensível à rapamicina. Entretanto, o tratamento em longo prazo com rapamicina leva a inibição da formação de mTORC2 (Sarbasov et al., 2006).

A mTOR é uma espécie de central integradora de sinais intra e extracelulares como fatores de crescimento, hormônios, nutrientes, energia e estresse. Sua função está associada com o crescimento e desenvolvimento das células participando dos processos anabólicos e catabólicos em geral, e, portanto, considerada elemento chave da chamada via mitogênica. A mTORC1 está envolvida com o crescimento celular em resposta ao estímulo anabólico. Um estímulo de crescimento é acompanhado pela ativação da mTORC1, resultando em um aumento da capacidade de síntese protéica da célula, por meio da ativação de processos chaves que resultam em aumento da massa, do tamanho e da proliferação celular. Os principais efetores da mTORC1 são a S6K (proteína cinase 6) e a 4E-BP1 (*4E-binding protein 1*) e suas ações apontam para maquinaria traducional (Wang e Proud, 2006). Já o complexo da mTORC2 modula a ativação da AKT (Tremblay et al., 2005), que está envolvida com a

regulação do metabolismo da glicose e lipídios no tecido adiposo, muscular e hepático (Whiteman et al., 2002). A ativação da AKT passa pela fosforilação do seu resíduo Thr-308 pela PDK1 e Ser-473 pela mTORC2 (Alessi et al., 1996).

Outro mecanismo importante para análise é a ativação ou inibição da expressão gênica de GLUT4 pela insulina, mediada por fatores transcripcionais que se ligam a elementos responsivos presentes no promotor do gene *Slc2a4* (quadro 2). Numa região do promotor *Slc2a4* denominada domínio I e localizada entre as bases -742 e -712 (Zorzano et al., 2005), encontram-se sítios de ligação para os fatores de transcrição NF1 (*nuclear factor 1*) e O/E-1 (*Olf-1/early B cell factor*). Essa região medeia uma ação repressora sobre o gene *Slc2a4* induzida pelo AMPc e pela ação crônica da insulina (Cooke e Lane, 1998; Cooke e Lane, 1999; Dowell e Cooke, 2002). O fator transcripcional GEF (*GLUT4 enhancer factor*) também se ancora nessa região, porém este é descrito como ativador da transcrição de GLUT4 (Knight et al., 2003).

Quadro 2: Parte da região promotora do gene *Slc2a4*



FONTE: Adaptado de Zorzano, 2005.

Na região localizada entre as bases -526 e -412 está o domínio II ou domínio MEF2 (Thai et al., 1998). Entre os pares de base -466 e -457 se encontra o elemento responsivo *AT-rich element* (Liu et al., 2004). É nesta região que os MEF2 (*myocyte enhancer factors2*), descritos como ativadores da

transcrição do gene do GLUT4, se ligam (McLean et al., 2000). É numa parte dessa região que se encontra o elemento responsivo E-Box. Os fatores de transcrição MyoD (Santalucia et al., 2001) e HIF-1 α (*hypoxia inducible factor-1 α*) (Royer et al., 2000) que são descritos como ativadores da transcrição de GLUT4 (Silva et al., 2005) se ligam nessa região. Próximo a essa região encontram-se os sítios de ligação de outros ativadores, o KLF15 (*Krüppel-like factor 15*) (Gray et al., 2002) e o TR α 1 (*thyroid hormone receptor alpha-1*), este último parece se ligar com baixa afinidade na seqüência localizada entre as bases -457 e -426 (Santalucia et al., 2001).

A família do fator transcricional MEF2 é composta por 4 isoformas: MEF2A, MEF2C e MEF2D que são expressos em grande quantidade no músculo esquelético e cardíaco (Brand, 1997), e MEF2B cuja expressão é restrita ao período embrionário (Morisaki et al., 1997). Os MEFs são muito importantes na diferenciação e manutenção muscular (Ornatsky et al., 1997), incluindo um papel chave na expressão de GLUT4 (Thai et al., 1998). Esses fatores de transcrição se ligam ao DNA na forma de homodímeros, heterodímeros ou ainda através de interação com outros fatores de transcrição como GEF (Knight et al., 2003). Condições associadas à deficiência insulínica diminuem a atividade de ligação do MEF2 ao DNA (Thai et al., 1998). Em estado basal, MEF2 está associado com histonas deacetilases classe 2 (HDAC). Essas proteínas são repressoras transcricionais por inibirem o acesso do fator transcricional ao DNA (McGee e Hardgreaves, 2004). A dissociação de HDAC/MEF2 ocorre quando há uma fosforilação de HDAC (Lu et al., 2000), liberando o MEF2 para exercer sua atividade transcricional.

Outro fator de transcrição envolvido na regulação da expressão gênica de GLUT4 pela insulina é o NF- κ B (*nuclear factor -kappa B*). Este é descrito como um fator transcricional que atua na inibição do gene do GLUT4 (Ruan et al., 2002). Trata-se de um fator transcricional mediador da atividade de citocinas inflamatórias, que regula a expressão de mais de 150 genes, envolvidos numa

série de processos celulares. Na forma ativa é um dímero, que pode ser formado por distintos monômeros pertencentes à família das proteínas Rel/NF- κ B. Essa família é constituída por cinco proteínas: p50, p52, p65 (RelA), RelB e c-Rel que formam vários homodímeros e heterodímeros, sendo p50/RelA a forma mais comum. Elas apresentam na região N-terminal um domínio comum chamado RHD (*Rel-homology domain*) com aproximadamente 300 aminoácidos que é responsável pela dimerização, ligação ao DNA e interação com a proteína inibitória I κ B (Kumar et al., 2004).

A proteína NF- κ B está presente no citoplasma de forma inativa associada a uma proteína inibidora de NF- κ B, a I κ B. A família I κ B de proteínas inclui I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3 e as proteínas precursoras p105 e p100, as formas mais comuns são I κ B α e I κ B β . A proteína I κ B interage com a porção amino-terminal (RHD) das subunidades de NF- κ B, inibindo a translocação do fator de transcrição do citoplasma para o núcleo e a ligação do NF- κ B ao DNA de genes alvos (Baldwin, 1996).

O NF- κ B possui importante papel no controle do sistema imunológico e processos inflamatórios, sua ativação ocorre por vários estímulos como: exposição das células à LPS ou citocinas inflamatórias como TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) ou IL-1 (interleucina-1), infecção viral ou expressão de certos produtos gênicos virais, radiação UV, ativação dos linfócitos B ou T e por outros estímulos fisiológicos e não fisiológicos (Baldwin, 1996). Assim, após estímulo, o complexo I κ B cinase (IKK) é ativado. O complexo IKK é formado por duas subunidades catalíticas IKK- α e IKK- β , além do modulador essencial NF- κ B (NEMO) ou IKK- γ . Após ativação, IKK recruta e fosforila I κ B em serina, essa fosforilação inicia o processo de degradação, desfazendo o complexo NF- κ B/I κ B e permitindo a translocação do NF- κ B para o núcleo com subsequente ligação em sítios específicos do DNA para regular a transcrição de um grande número de genes (Li e Verma, 2002).

Estudos com a ativação da PI3K mostram que esta se correlaciona, dependendo do tipo de tecido, positivamente (Reddy et al., 2000) ou negativamente (Ajuwon e Spurlock, 2005) com a atividade de ligação do NF- κ B. Sendo a PI3K peça chave na cascata de reação provocada pela insulina, é possível que a esta participe da modulação da atividade de ligação do fator transcricional NF- κ B.

A possível repressão do NF- κ B na expressão do gene do GLUT4 foi descrita em sóleos de ratos jejuados por 48 horas em pesquisa realizada pelo nosso laboratório (Silva et al., 2005). No entanto, não foi demonstrado até o presente momento a ligação direta do NF- κ B na região promotora do gene do GLUT4, embora a região promotora do gene do GLUT4 possua 2 domínios com alta homologia às sequências de ligação do NF- κ B já descritas na literatura.

Em estudo anterior desenvolvido durante o mestrado foi demonstrado que a insulina *in vitro* induz aumento do mRNA do GLUT4 com paralela redução da atividade de ligação de proteínas nucleares na sequência consenso de ligação do NF- κ B, a qual não se encontra representada em homologia completa com o promotor do GLUT4. Além disso, observou-se resposta rápida no aumento da proteína, o que sugere que este efeito não dependia apenas do aumento prévio do mRNA do GLUT4, mas que ele poderia estar envolvendo também uma resposta direta no aumento de atividade traducional, dependente de mTOR. Considerando que a ativação da via mitogênica (mTOR) envolve a PI3K, e que a inibição do NF- κ B também envolve a PI3K (alvo de controle insulínico), é possível conjecturar que a insulina esteja atuando no processo transcricional e traducional ao mesmo tempo, e assim regulando a expressão do GLUT4.

Desta forma, este estudo investigou a regulação induzida pela insulina na expressão gênica e proteica de GLUT4, assim como a participação da mTOR e do NF- κ B neste processo. Para melhor análise do efeito da insulina foram utilizados ratos jejuados, pois nessa condição existe há uma diminuição da

atividade da via mitogênica, por redução dos substratos energéticos e redução do estímulo insulínico prévio, favorecendo assim a indução de aumento da expressão “in vitro”.

Ampliando o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica e protéica de GLUT4, vislumbra-se a possibilidade futura de controlá-los, contribuindo assim para se corrigir alterações de sensibilidade à insulina que ocorrem na obesidade e / ou diabetes mellitus.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Investigar a regulação da expressão do GLUT4 induzida pela insulina em músculo sóleo de ratos.

2.2 *Objetivos específicos*

Investigar em músculo sóleo incubados in vitro:

- a) o efeito da insulina na expressão da proteína GLUT4 (Western blotting) e do *Slc2a4* (RT-PCR);
- b) a participação da proteína mTOR na regulação do conteúdo proteico de GLUT4 por incubação com inibidores da via;
- c) a participação da via inflamatória ativadora de NF-kB (incubação com TNF- α);
- d) o conteúdo de mRNA (RT-PCR) e a atividade de ligação no promotor do gene do GLUT4 (EMSA) de fatores de transcrição potencialmente envolvidos;
- e) a participação da PI3K e da AKT (incubação com inibidores) e os fatores transcripcionais envolvidos (EMSA) nos efeitos da insulina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Utilizou-se ratos Wistar machos com dois meses de idade, peso entre 200-220 g, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica sob condições padronizadas de temperatura (23 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias) e foram submetidos a 48 horas de jejum antes da retirada dos músculos para o estudo *in vitro*. Esta pesquisa está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de ética em experimentação animal (CEEA), protocolo n° 054 nas fls. 57 do livro 02.

3.2 Incubação dos tecidos

Após extração do músculo sóleo dos ratos, os tendões do músculo foram fixados em suporte inoxidável e em seguida incubado por 180 minutos em 25 mL de solução Krebs-Henseleit Buffer (KHB), pH de 7,4, acrescida de 0,1% de albumina sérica bovina (controle), suplementada ou não com insulina regular, wortmanina (inibidor da atividade da PI3K, 100 nM), rapamicina (inibidor da atividade da mTOR, 25 nM), ML-9 (inibidor da atividade da AKT, 50 μ M) e TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α* - 25ng/mL), mantida em banho-maria a 37° C e oxigenada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Durante a incubação a solução foi trocada a cada 45 minutos. Após o período de incubação, os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido para análise posterior.

3.3 Quantificação do mRNA

Para extração do RNA total foi utilizado 1mL de Trizol Reagente® (Life Technologies, Gibco Brl, Gaithersburg, USA) para homogeneização de 0,1g de tecido. Após 5 minutos de incubação em temperatura ambiente e centrifugação a 10.000g por 15 minutos a 4 °C, adicionou-se clorofórmio ao sobrenadante. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada 10.000g por 15 minutos a 4 °C, adicionou-se isopropanol, seguido de incubação de 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugação a 10.000g por 15 minutos a 4 °C. O pellet foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 10.000g por 15 minutos a 4 °C. Removido o sobrenadante, secou-se o *pellet* que foi solubilizado em água tratada com DEPC. A concentração de RNA total foi determinada por leitura espectrofotométrica.

A quantificação do mRNA foi realizada por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semi-quantitativa conforme descrito em Silva *et al.*, 2005 e está sumarizada a seguir.

O RNA total foi extraído das amostras. Eventuais contaminações por DNA genômico foram evitadas pelo tratamento com DNase, conforme o kit RQ1 RNase Free DNase (Promega, Madison, WI, USA). Após o tratamento, o produto final obtido foi destinado a síntese de DNA complementar (cDNA) pela reação de transcrição reversa conforme o kit Improm-II™ Reverse Transcriptase (Promega), com primers Oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e nucleotídeos 100mM dNTP Set, PCR Grade (Invitrogen) e água deionizada autoclavada.

A amplificação dos genes foi feita por RT-PCR conforme o kit GoTaq® DNA Polymerase (Promega). Os seguintes primers foram utilizados:

GLUT4

sense: 5'-CCCCTCCAGGGCAAAGGAT-3'

antisense: 5'-TCCTGGAGGGGAACAAGAA-3'

MEF2A

sense: 5'-ATGGGGCGAAAGAAAATACAA-3'

antisense: 5'-GACTGTGACAGACATAGAGAAGTT-3'

MEF2C

sense: 5'-GGCCATGGTACACCGAGTACAACGAGC-3'

antisense: 5'-GGGGATCCCTGTGTTACCTGAACTTGG-3'

MEF2D

sense: 5'-TCTCTGGCACTAAGGACCCC-3'

antisense: 5'-TCCGGCTCTGGGCTGTCACA-3'

NF-κB

sense: 5'-CTCAAGAACAGCAAGGCAAGCAC-3'

anti-sense: 5'-AGAGGTGTCGTCCCATCGTTAGGG-3'

HIF-1α

sense: 5'-CCCATCCATGTGACCATGAGG-3'

antisense: 5'-TCAGCACCAAGCACGTCATAGG-3'

β-actina

sense: 5'-ATG AAG ATC CTG ACC GAG CGT G-3'

antisense: 5'-CTT GCT GAT CCA CAT CTG CTG G-3'

As amostras foram desnaturadas a 95 °C por 2 minutos e em seguida foram realizados ciclos de PCR a 95 °C (desnaturação) por 30 segundos, a temperatura de anelamento foi de 56 °C para *HIF-1α*, 58 °C para *Slc2a4*, *β-actina* e *Nf-κb1*, 62 °C para *Mef2a*, *Mef2c* e *Mef2d*, por 30 segundos e 72 °C (extensão) por 30 segundos. Em seguida as amostras foram mantidas a 72 °C por 5 minutos e finalmente a 4 °C por tempo indeterminado. Utilizou-se 40 ciclos de PCR para *Slc2a4*, 31 ciclos para *β-actina*, 38 para *Nf-κb1*, 36 para *Hif-1a*, 37 para *Mef2A*, *Mef2c* e *Mef2d*.

O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio. As imagens foram adquiridas em equipamento de

fotovideodocumentação (UVP Biomagin System, Upland, CA), onde as bandas foram visualizadas com iluminação UV e quantificadas por densitometria utilizando o programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA).

Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA) a partir dos valores de GLUT4 normalizados pelos respectivos valores de β -actina e considerando 100 o valor obtido em cada experimento para os controles.

3.4 Quantificação da atividade de ligação dos fatores transcricionais

A extração de proteínas nucleares foi realizada pelo método descrito em Andrews e Faller (1991). Resumidamente, as amostras são trituradas em suporte de cerâmica com nitrogênio líquido, colocadas em 1mL de PBS 1x e centrifugadas a 1000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se ao pellet 500 μ L de tampão de lise e foi mantido a 4 °C por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000g por 30 segundos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, 100 μ L de tampão de extração foi adicionado e mantido a 4 °C por 20 minutos. Então, as amostras foram centrifugadas a 12000g por 2 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi aliquoteado e armazenado a -70 °C. A quantificação de proteínas nucleares foi realizada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Para determinar a atividade de ligação na região promotora do gene GLUT4, utilizou-se as seguintes sondas: para NF- κ B (-134/-112) (5'-GGGTGGGGGCGTGGCCTTTTGG-3'-dupla fita), *AT-Rich element*: (5'-TAGGTTCGATCGCTCTAAAAATAACCCTGT-3' - dupla fita) e E-Box: (5'-GGGACCTGACATTTGGCGGA-3'-dupla fita). Para a reação foi utilizada 250 ng do oligonucleotídeo de dupla fita, 2 μ L do tampão de enzima, 2 μ L da enzima fosfatase de camarão (Boehringer Mannheim) e água destilada autoclavada até completar o volume de 20 μ L. Incubação por 30 minutos a 37 °C e inativação da

reação a 65 °C por 15 minutos. O produto então foi purificado por meio do *Kit QIAquick Nucleotide Removal* (Quiagen, Duesseldorf, Germany.) para posterior marcação radioativa.

As sondas foram marcadas com γ -³²P ATP numa solução contendo 50ng do oligonucleotídeo, 1 μ L da enzima T₄ PNK (Promega), 4 μ L de *Exchange reaction buffer*, 4 μ L de radioativo e 3 μ L de água bidestilada autoclavada. Uma alíquota do produto (1 μ L) foi utilizada para contagem em contador β .

O ensaio de mobilidade eletroforética (Electrophoretic mobility shift assay -EMSA) foi realizado através de alíquotas contendo 20 μ g de proteínas nucleares onde foi adicionado 6 μ L de tampão de ligação, 1,5 μ g de Poli dI-dC, 1 μ L de sonda marcada radioativamente (100.000 cpm) e água bidestilada para completar o volume em 15 μ L. A especificidade da reação foi verificada através de ensaios de competição utilizando sonda competidora fria em excesso (100x molar).

Para eletroforese foi utilizado um gel de poliacrilamida 4% submetido a uma pré-corrida a 90 V por 60 minutos a 4 °C em tampão TBE 0,5x. Após esse período o tampão foi trocado por um novo e as amostras aplicadas no gel. A eletroforese ocorre numa voltagem inicial de 90 V durante 30 minutos seguidos por 150 V durante 2 horas.

Após a eletroforese o gel foi transferido para uma folha de papel filtro Whatman 3MM e secado a vácuo por 75 minutos a 80 °C para em seguida ser exposto a um filme de RX Hyperfilm® (Amersham, Buckinghamshire, UK) em cassete a -70 °C por 4 dias.

A intensidade dos “blots” foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se o programa ImageQuant TL (Amersham) e o resultado numérico foi expresso em unidades arbitrárias (UA), considerando-se o controle de cada experimento como 100.

3.5 Quantificação do conteúdo proteico de GLUT4

Para extração protéica, os tecidos foram homogeneizados no Polytron PT 3000 (KINEMÁTICA AG, Lucerne, Switzerland) em 20.000rpm durante 30s em tampão de homogenização (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, sacarose 250mM) numa proporção peso/volume de 1:6. Posteriormente, foi centrifugado a 1000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi reservado e o precipitado foi ressuspenso e centrifugado novamente a 1000g por 10 minutos a 4 °C. Os dois sobrenadantes foram somados e centrifugados a 41.000g por 75 minutos a 4 °C. O pellet resultante foi ressuspenso em tampão de homogenização e sonicado até a sua dissolução total.

A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). E após determinação das concentrações de proteínas das amostras, seguiu-se a quantificação do conteúdo proteico de GLUT4. Para isso, utilizou-se o método desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin (Garfin, 1990) que envolve um sistema de dois géis contíguos, o gel de empacotamento e o de separação.

Aplicou-se 30µg de proteínas totais de cada amostra acrescidas de Laemmli com 6% de 2-mercaptoetanol no gel de empacotamento com voltagem constante de 70V até que ocorra a transição dos géis para então aplicar uma corrente constante de 65mA por aproximadamente 5 horas.

Realizou-se então uma transferência eletroforética para uma membrana de nitrocelulose Hybond™-ECL™ (Amersham) sob corrente constante de 42 mA durante 16 horas a 4 °C. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi submetida ao procedimento de imunodeteção de proteínas específicas, seguido de quantificação por quimioluminescência.

Para isso, realizou-se um bloqueio inespecífico da membrana com leite em pó desnatado 5% diluído em PBS por 1 hora sob agitação constante. Seguiu-se a incubação com anticorpo primário específico anti-GLUT4 (Cat. 07-

1404/Millipore) diluído em PBS1x/BSA 8% por 3 horas a 37 °C sob agitação constante, seguido de lavagens em solução PBS-T para retirada do excesso de anticorpo primário. Incubou-se com anticorpo secundário com HRP (Horse Radish Peroxidase) em PBS 1x/BSA 1% por 1 hora sob agitação constante e temperatura ambiente, seguido de novas lavagens de PBS-T para retirada do excesso de anticorpo secundário.

Incubou-se a membrana com solução de detecção por 2 minutos e então a membrana foi exposta a um filme de RX Hyperfil (Amersham) por aproximadamente 5 minutos. O filme foi revelado com solução reveladora e fixadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, BR).

A intensidade dos “blots” foi avaliada por densitometria óptica e o resultado foi expresso em unidades arbitrárias (UA) em relação a quantidade de proteína aplicada para a eletroforese e considerando-se o controle de cada experimento como 100.

3.6 Quantificação do conteúdo proteico de mTOR

A quantificação de mTOR ocorreu de forma semelhante a de GLUT4. Entretanto, a eletroforese ocorreu no sistema de mini gel Hoefer®, miniVE Vertical Electrophoresis System (Amersham). Aplicou-se 200µg de proteínas totais de cada amostra acrescidas de Laemmli e 2-mercaptoetanol. A eletroforese ocorre com voltagem constante de 75V por aproximadamente 2 horas. Realizou-se então uma transferência eletroforética para uma membrana de nitrocelulose Hybond™-ECL™ (Amersham) sob corrente constante de 320mA durante 2 horas. Após a transferência eletroforética a membrana de nitrocelulose foi submetida ao procedimento de imunodeteção de proteínas específicas, seguido de quantificação por quimioluminescência.

Para isso, realizou-se um bloqueio inespecífico da membrana com leite em pó desnatado 5% diluído em TBS-T por 2 horas sob agitação constante.

Seguiu-se a incubação com anticorpo primário específico anti-mTOR AHO1212 (Invitrogen) diluído em TBS-T com BSA 5% *overnight* a 4 °C sob agitação constante, seguido de lavagens em solução TBS-T para retirada do excesso de anticorpo primário. Incubou-se com anticorpo secundário com HRP (Horse Radish Peroxidase) em TBS-T por 1 hora sob agitação constante e temperatura ambiente, seguido de novas lavagens de TBS-T para retirada do excesso de anticorpo secundário.

3.7 Análise estatística dos resultados

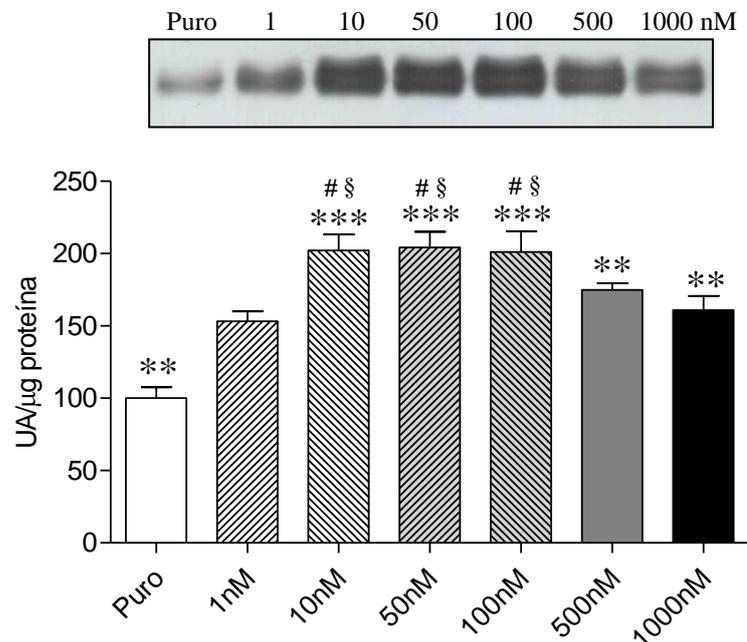
Os resultados foram expressos como média \pm EPM. A avaliação dos resultados foi realizada através da comparação das médias, utilizando o teste-t de Student ou One-Way ANOVA, com pós-teste quando necessário (Student-Newman-Keuls). As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

4.1 Efeito da insulina no conteúdo proteico total de GLUT4

A figura 1 retrata o efeito da insulina no conteúdo protéico total de GLUT4 no músculo sóleo de ratos nos grupos: incubado por 180 minutos em solução KHB ou adicionado de 1, 10, 50, 100, 500 e 1000 nM de insulina. A insulina teve seu efeito máximo no conteúdo proteico total de GLUT4 entre as concentrações de 10, 50 e 100 nM, com aumento de aproximadamente ~100% ($p < 0,001$) em relação ao controle e ainda 40 e 50% ($p < 0,05$) em relação as concentrações de 1 e 1000 nM, respectivamente.

Figura1 - Efeito da insulina no conteúdo proteico total de GLUT4



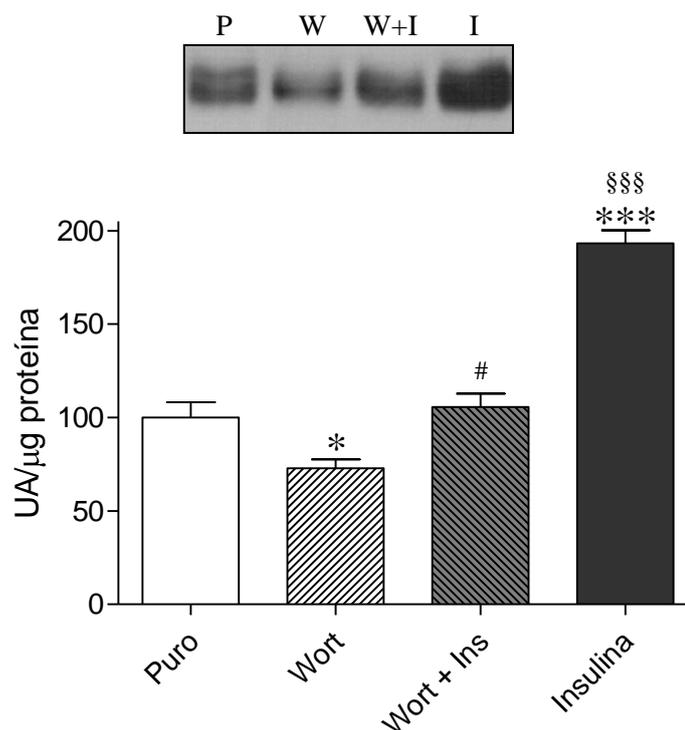
Análise por Western Blotting do conteúdo protéico total de GLUT4 no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB (Puro) ou adicionada de 1, 10, 50, 100, 500 e 1000 nM de insulina. No alto, imagem típica dos *blots* referentes ao GLUT4. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) por μg de proteína e foram corrigidos em relação ao controle. Os valores são média ± E.P.M. de 6 animais por grupo. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs Puro; § $p < 0,01$ vs 1 nM, # $p < 0,05$ vs 1000 nM, One-Way ANOVA com Student-Newman-Keuls.

FONTE: Moraes, 2011.

4.2 Efeito da wortmanina, ML-9 e rapamicina no conteúdo proteico total de GLUT4

A figura 2 retrata o efeito da wortmanina e/ou insulina no conteúdo proteico total de GLUT4 no músculo sóleo incubado por 180 minutos nos diferentes grupos. A wortmanina provocou uma diminuição no conteúdo proteico total de GLUT4 de 27% ($p < 0,05$) em relação ao controle e de 87% ($p < 0,001$) em relação ao grupo tratado com insulina. A adição de insulina aumentou em 32% ($p < 0,05$) o conteúdo proteico de GLUT4 entre os grupos tratados com wortmanina.

Figura 2 - Efeito da wortmanina no conteúdo proteico total de GLUT4

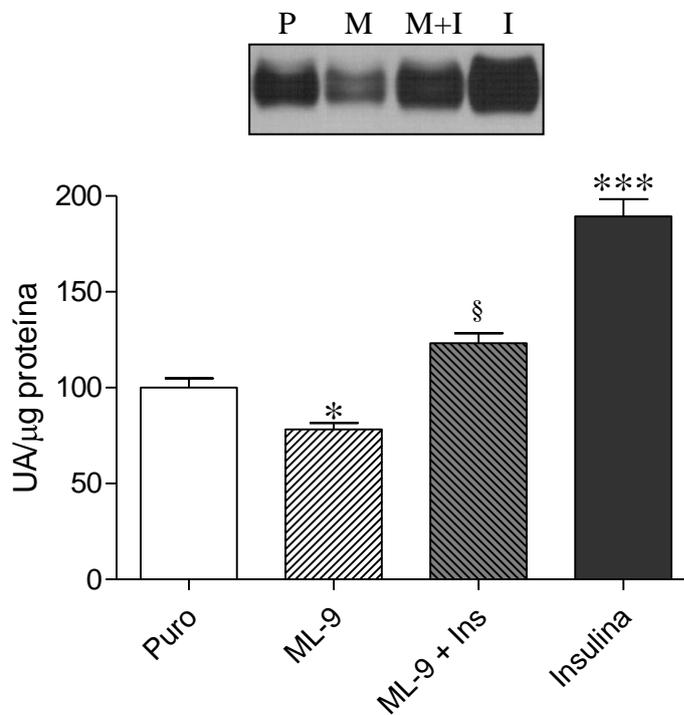


Análise por *Western Blotting* do conteúdo proteico total de GLUT4 no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB (Puro), adicionada de wortmanina (100 nM), wortmanina + insulina e somente insulina (15 nM). No alto, imagem típica dos *blots* referentes ao GLUT4. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) por μg de proteína e foram corrigidos em relação ao controle. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. Algumas comparações entre os grupos não foram mostradas. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs Puro; # $p < 0,05$ vs Wort; §§§ $p < 0,001$ vs Wort+Insulina. One-Way ANOVA com Student-Newman-Keuls.

FONTE: Moraes, 2011.

A figura 3 retrata o efeito da ML-9 e/ou insulina no conteúdo proteico total de GLUT4 no músculo sóleo incubado por 180 minutos nos diferentes grupos. A ML-9 provocou uma diminuição no conteúdo proteico total de GLUT4 de 21% ($p < 0,05$) em relação ao controle e de 66% ($p < 0,001$) em relação ao grupo tratado com insulina. A adição de insulina aumentou em 45% ($p < 0,05$) o conteúdo proteico de GLUT4 entre os grupos tratados com ML-9.

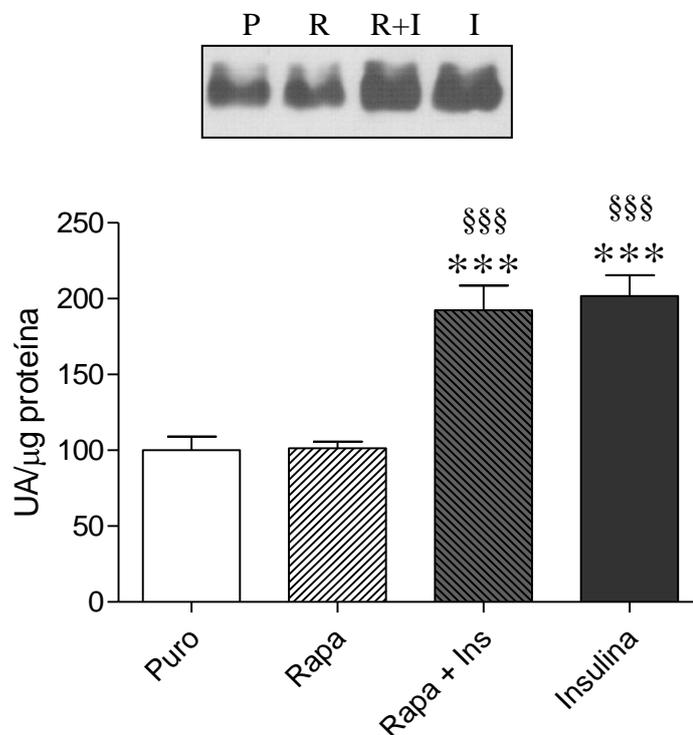
Figura 3 - Efeito da ML-9 no conteúdo proteico total de GLUT4



Análise por Western Blotting do conteúdo proteico total de GLUT4 no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB (Puro), adicionada de ML-9 (50 μ M), ML-9 + insulina e somente insulina (15 nM). No alto, imagem típica dos *blots* referentes ao GLUT4. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) por μ g de proteína e foram corrigidos em relação ao controle. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. Algumas comparações entre os grupos não foram mostradas. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs Puro; § $p < 0,05$ vs ML-9; One-Way ANOVA com Student-Newman-Keuls.
 FONTE: Moraes, 2011.

A figura 4 retrata o efeito da rapamicina no conteúdo proteico total de GLUT4 no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB adicionada ou não com insulina (15 nM). Observa-se que a rapamicina (25nM) não alterou o conteúdo proteico total de GLUT4, tanto na ausência como na presença da insulina.

Figura 4 - Efeito da rapamicina no conteúdo proteico total de GLUT4



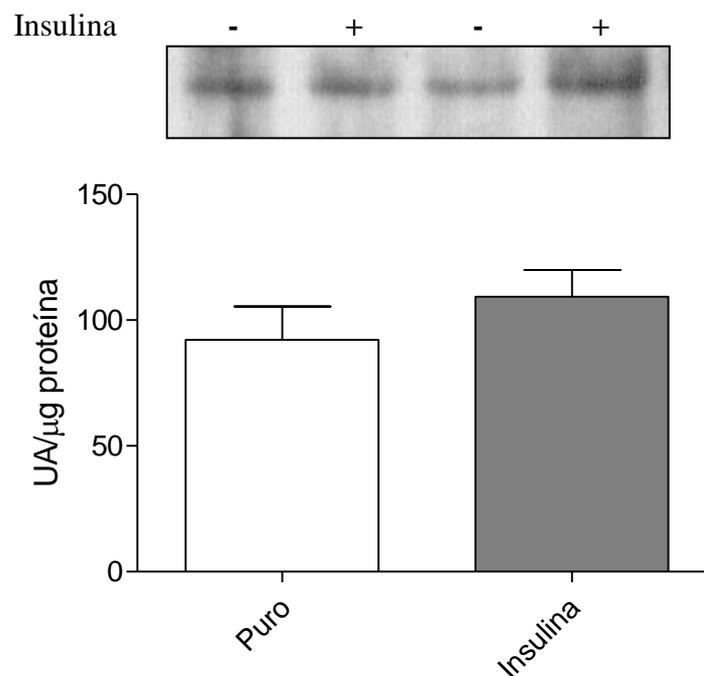
Análise por Western Blotting do conteúdo proteico total de GLUT4 no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB (Puro), adicionada de rapamicina (Rapa), rapamicina + insulina (Rapa + Ins) e somente insulina. No alto, imagem típica dos *blots* referentes ao GLUT4. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) por μg de proteína e foram corrigidos em relação ao controle. Os valores são média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs Puro; §§§ $p < 0,001$ vs Rapa. One-Way ANOVA com Student-Newman-Keuls.

FONTE: Moraes, 2011.

4.3 Efeito da insulina no conteúdo proteico de mTOR

A figura 5 retrata o efeito da insulina no conteúdo proteico de mTOR no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB acrescida ou não de 15 nM de insulina. A incubação com insulina não alterou a expressão de mTOR em relação a incubação com tampão puro.

Figura 5 - Efeito da insulina no conteúdo proteico de mTOR



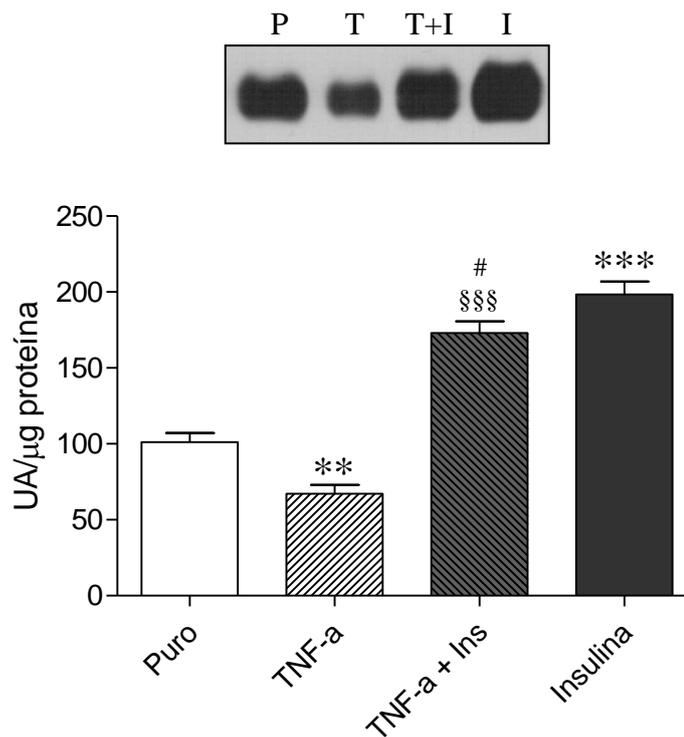
Análise por Western Blotting do conteúdo proteico de mTOR no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB (Puro) e adicionada de 15 nM de insulina. No alto, imagem típica dos *blots* referentes a mTOR. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) por μg de proteína e foram corrigidos em relação ao controle. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo.

FONTE: Moraes, 2011.

4.4 Efeito do TNF- α no conteúdo proteico total de GLUT4

A figura 6 retrata o efeito do TNF- α no conteúdo proteico total de GLUT4 no músculo sóleo de ratos incubados por 180 minutos em solução KHB adicionado ou não de TNF- α (25ng/mL) e/ou insulina (15 nM). A adição de TNF- α resultou em uma diminuição da proteína GLUT4 de 33% ($p < 0,01$) em tampão puro e de 25% ($p < 0,05$) na presença de insulina.

Figura 6 - Efeito do TNF- α no conteúdo proteico total de GLUT4

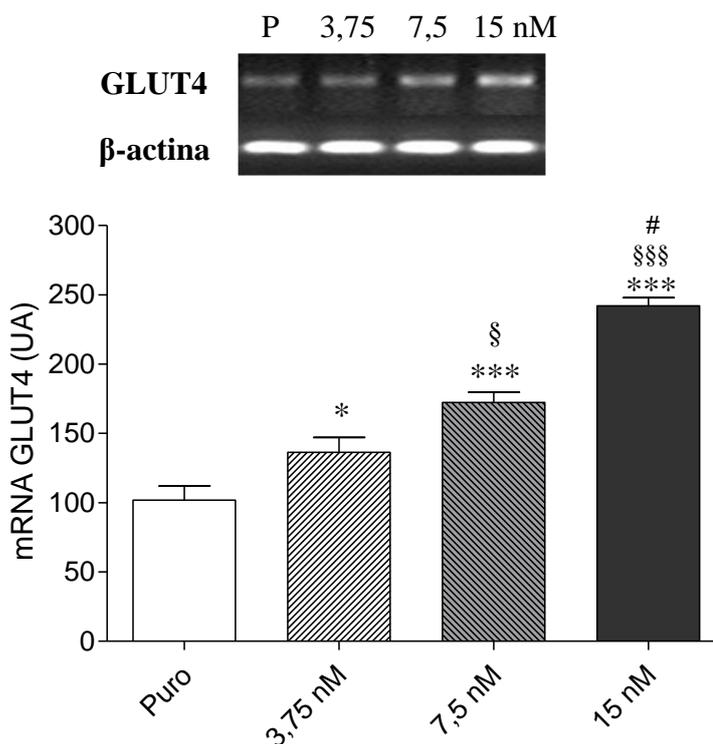


Análise por Western Blotting do conteúdo proteico total de GLUT4 no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB (Puro), adicionada de TNF- α , TNF- α + insulina (TNF- α + Ins) e somente insulina. No alto, imagem típica dos *blots* referentes ao GLUT4. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) por μ g de proteína e foram corrigidos em relação ao controle. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. Algumas comparações entre os grupos não foram mostradas. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs Puro; §§§ $p < 0,001$ vs TNF- α ; # $p < 0,05$ vs Insulina, One-Way ANOVA com Student-Newman-Keuls. FONTE: Moraes, 2011.

4.5 Efeito da insulina na expressão do mRNA de GLUT4

A figura 7 retrata a análise da expressão do mRNA de GLUT4 em músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura ou na presença de insulina. Verificou-se que músculos incubados em solução KHB acrescida de 3,75, 7,5 e 15 nM de insulina aumentaram a expressão do mRNA de GLUT4 em 34% ($p < 0,05$), 70% ($p < 0,001$) e 140% ($p < 0,001$) respectivamente, em relação ao incubado em solução KHB pura. Os resultados sugerem tratar-se de um efeito dose-dependente.

Figura 7 - Efeito da insulina na expressão do mRNA de GLUT4



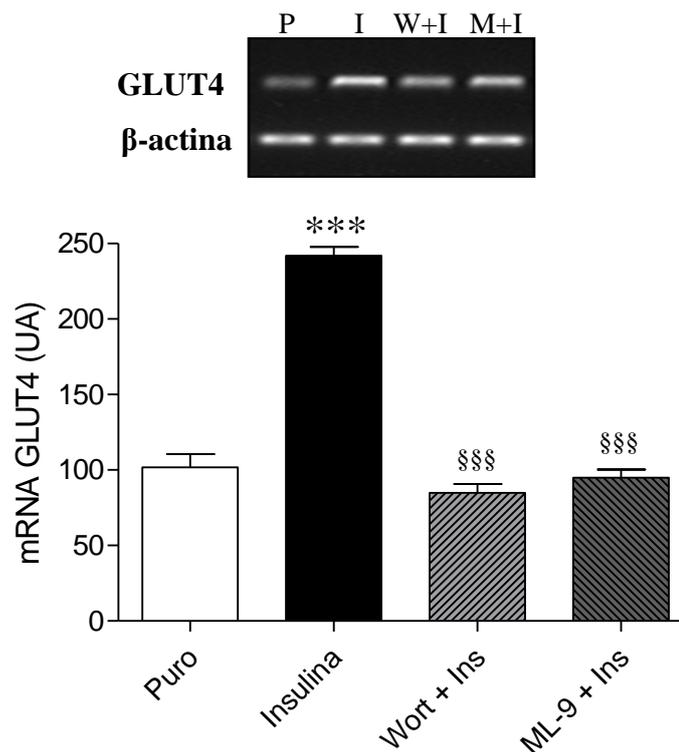
Análise por RT-PCR semi-quantitativo do conteúdo do mRNA de GLUT4 no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB (Puro), adicionada de 3,25, 7,5 e 15 nM de insulina. No alto, imagem típica dos blots referentes ao mRNA de GLUT4 e da β -actina. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) e foram corrigidos pela expressão de β -actina. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs Puro; § $p < 0,05$ e §§§ $p < 0,001$ vs 3,25 nM e # $p < 0,001$ vs 7,5 nM, One-Way ANOVA com Student-Newman-Keuls.

FONTE: Moraes, 2011.

4.6 Efeito da wortmanina ou ML-9 na expressão do mRNA de GLUT4 induzida pela insulina

A figura 8 retrata a análise da expressão do mRNA de GLUT4 em músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura ou na presença de insulina, adicionada ou não de wortmanina e ML-9. Verificou-se que tanto a adição da wortmanina quanto da ML-9 impediu o aumento da expressão do mRNA de GLUT4 induzido pela insulina.

Figura 8 - Efeito da wortmanina e ML-9 na expressão do mRNA de GLUT4 induzido pela insulina



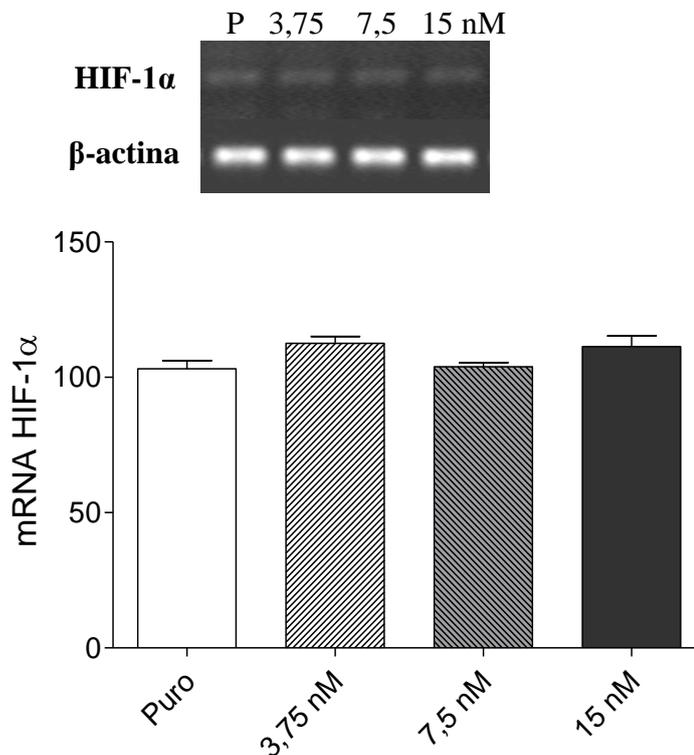
Análise por RT-PCR semi-quantitativo do conteúdo do mRNA de GLUT4 no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB ou tratada com 15 nM de insulina e adicionada ou não de wortmanina (100 nM) e ML-9 (50 µM). No alto, imagem típica dos *blots* referentes ao mRNA de GLUT4 e da β-actina. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) e foram corrigidos pela expressão de β-actina. Os valores são média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs Puro; §§§ $p < 0,001$ vs Insulina, One-Way ANOVA com Student-Newman-Keuls.

FONTE: Moraes, 2011.

4.7 Efeito da insulina na expressão do mRNA de *HIF-1a* e *Mef2a/c/d*

A figura 9 retrata a análise da expressão do mRNA de *HIF-1a* em músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura ou acrescida de 3,75, 7,5 e 15 nM de insulina. Não houve diferença significativa na expressão do mRNA de *HIF-1a* entre os grupos ($p > 0,05$).

Figura 9 - Efeito da insulina na expressão do mRNA de *HIF-1a*

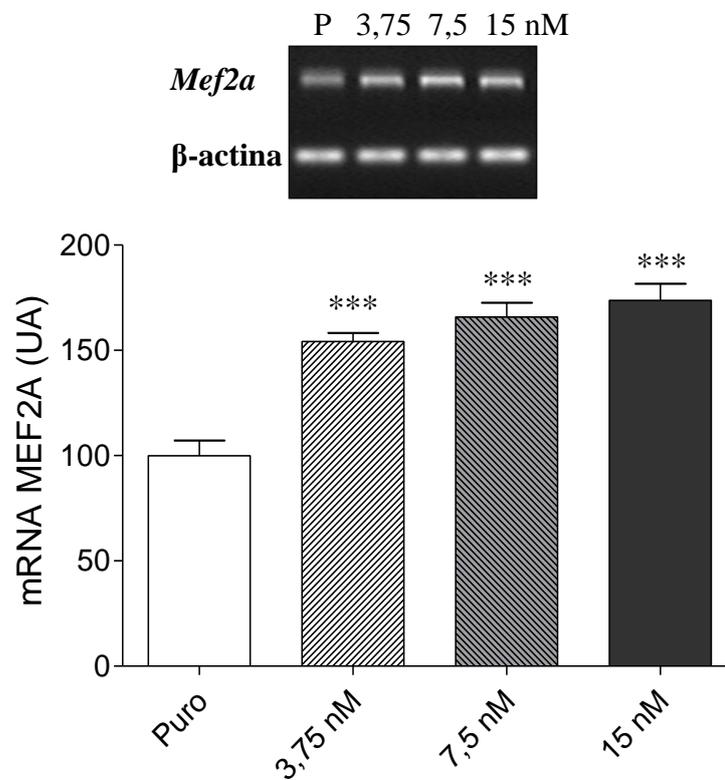


Análise por RT-PCR semi-quantitativo do conteúdo do mRNA de *HIF-1a* no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB (Puro), adicionada de 3,75, 7,5 e 15 nM de insulina. No alto, imagem típica dos *blots* referentes ao mRNA de HIF-1a e da β -actina. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) e foram corrigidos pela expressão de β -actina. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. One-Way ANOVA.

FONTE: Moraes, 2011.

A figura 10 retrata a análise da expressão do mRNA de Mef2a em músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura ou acrescida de insulina. Verificou-se que na presença de 3,75, 7,5 e 15 nM de insulina a expressão do mRNA de MEF2A aumentou semelhantemente em ~70%% (p<0,001).

Figura 10 - Efeito da insulina na expressão do mRNA de *Mef2a*

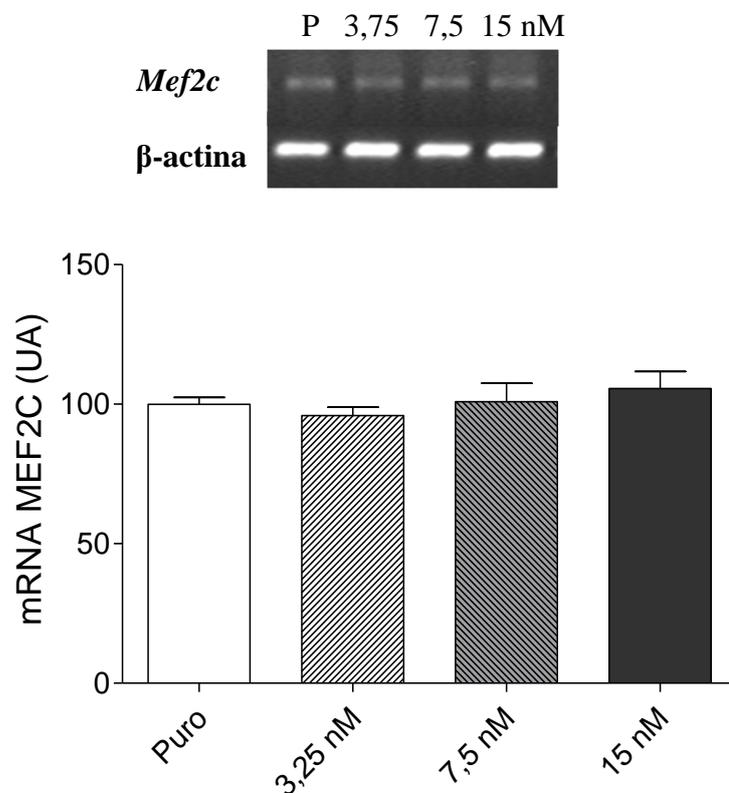


Análise por RT-PCR semi-quantitativo do conteúdo do mRNA de MEF2A no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB (Puro), adicionada de 3,75, 7,5 e 15 nM de insulina. No alto, imagem típica dos *blots* referentes ao mRNA de MEF2A e da β -actina. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) e foram corrigidos pela expressão de β -actina. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. ***p<0,001 vs Puro; One-Way ANOVA com Student-Newman-Keuls.

FONTE: Moraes, 2011.

A figura 11 retrata a análise da expressão do mRNA de *Mef2c* em músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura ou acrescida de insulina. Não houve diferença significativa na expressão do mRNA de MEF2C entre os grupos ($p>0,05$).

Figura 11 - Efeito da insulina na expressão do mRNA de *Mef2c*

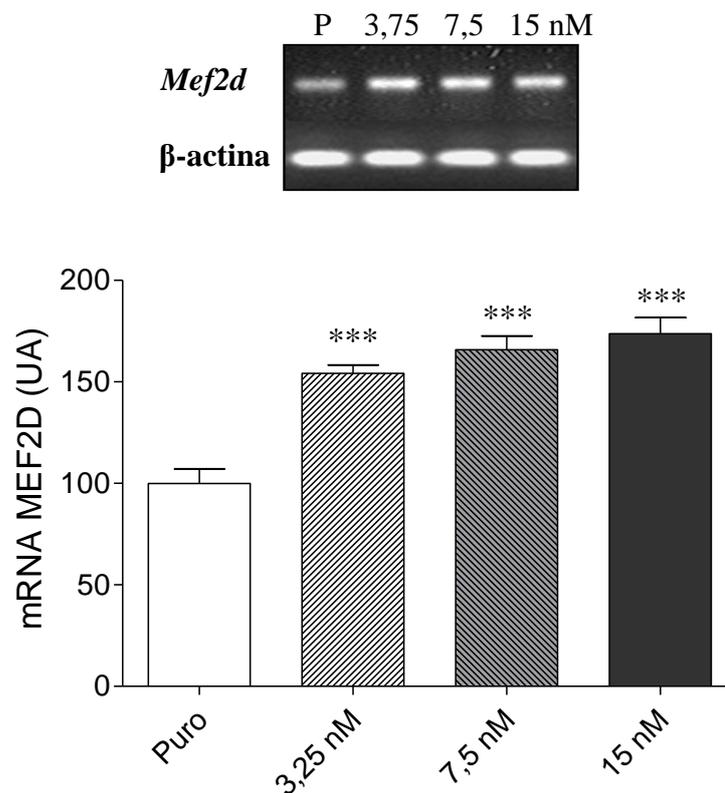


Análise por RT-PCR semi-quantitativo do conteúdo do mRNA de *Mef2c* no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB (Puro), adicionada de 3,25, 7,5 e 15 nM de insulina. No alto, imagem típica dos *blots* referentes ao mRNA de MEF2C e da β -actina. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) e foram corrigidos pela expressão de β -actina. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. One-Way ANOVA.

FONTE: Moraes, 2011.

A figura 12 retrata a análise da expressão do mRNA de *Mef2d* em músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura ou acrescida de insulina. Verificou-se que na presença de insulina o mRNA do *Mef2d* aumentou ~65%, independentemente da concentração de insulina.

Figura 12 - Efeito da insulina na expressão do mRNA de *Mef2d*



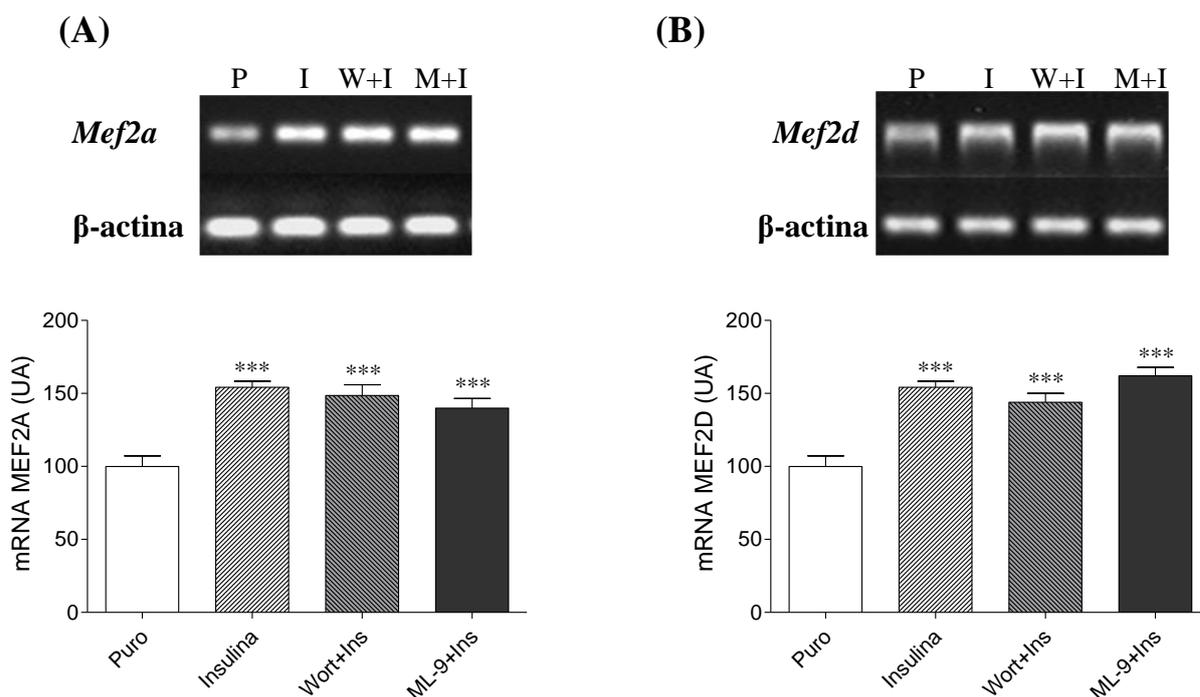
Análise por RT-PCR semi-quantitativo do conteúdo do mRNA de *Mef2d* no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB (Puro), adicionada de 3,25, 7,5 e 15 nM de insulina. No alto, imagem típica dos *blots* referentes ao mRNA de MEF2D e da β -actina. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) e foram corrigidos pela expressão de β -actina. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs P; One-Way ANOVA com Student-Newman-Keuls.

FONTE: Moraes, 2011.

4.8 Efeito da wortmanina ou ML-9 na expressão do mRNA de *Mef2a* e *Mef2d* induzida pela insulina

A figura 13 retrata a análise da expressão do mRNA de *Mef2a* (A) e *Mef2d* (B) em músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura ou na presença de insulina, adicionada ou não de wortmanina e ML-9. Verificou-se que tanto a adição da wortmanina quanto da ML-9 não alterou o aumento da expressão do mRNA de GLUT4 induzido pela insulina.

Figura 13 - Efeito da wortmanina ou ML-9 na expressão do mRNA de *Mef2a* e *Mef2d* induzida pela insulina



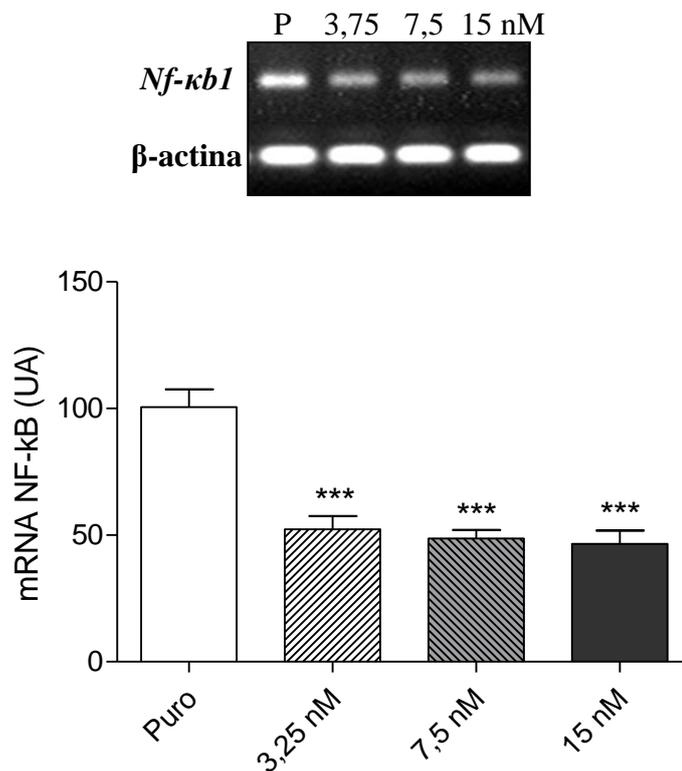
Análise por RT-PCR semi-quantitativo do conteúdo do mRNA de *Mef2a* (A) e *Mef2d* (B) no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB ou tratada com 15 nM de insulina e adicionada ou não de wortmanina e ML-9. No alto, imagem típica dos *blots* referentes ao mRNA de *Mef2* e da β -actina. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) e foram corrigidos pela expressão de β -actina. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs Puro; One-Way ANOVA com Student-Newman-Keuls.

FONTE: Moraes, 2011.

4.9 Efeito da insulina na expressão do mRNA de NF- κ B1

A figura 14 retrata a análise da expressão do mRNA de NF- κ B1 em músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura ou acrescida de insulina. Verificou-se que o músculo incubado na presença de insulina diminuiu a expressão do mRNA de *Nf- κ b1* em ~50% ($p < 0,001$).

Figura 14: Efeito da insulina na expressão do mRNA de *Nf- κ b1*



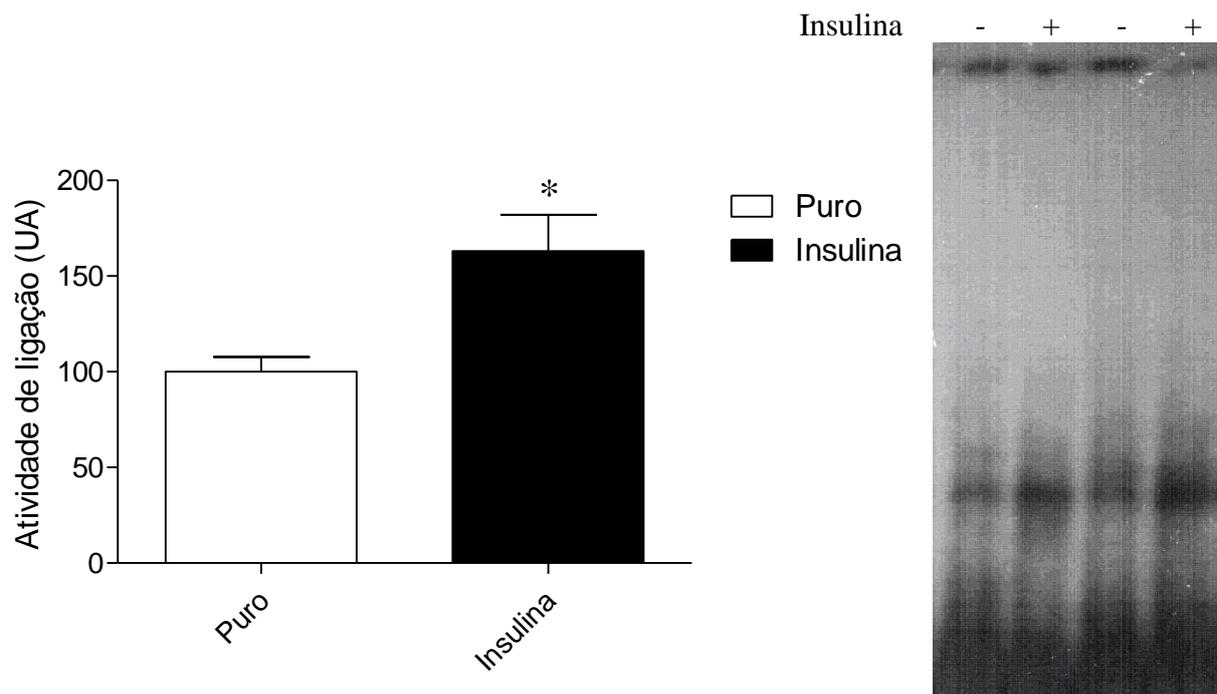
Análise por RT-PCR semi-quantitativo do conteúdo do mRNA de NF- κ B no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB (Puro), adicionada de 3,25, 7,5 e 15 nM de insulina. No alto, imagem típica dos blots referentes ao mRNA de NF- κ B e da β -actina. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) e foram corrigidos pela expressão de β -actina. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs Puro; One-Way ANOVA com Student-Newman-Keuls.

FONTE: Moraes, 2011.

4.10 Efeito da insulina na atividade de ligação ao AT-rich element

A figura 15 retrata a atividade de ligação de proteínas nucleares no elemento responsivo *AT-rich element* (sítio de ligação de MEF2) do promotor do GLUT4, em músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura ou acrescida de 15 nM de insulina. Verificou-se que a adição de insulina aumentou a atividade de ligação em 63% ($p < 0,05$).

Figura 15: Efeito da insulina na atividade de ligação ao AT-rich element



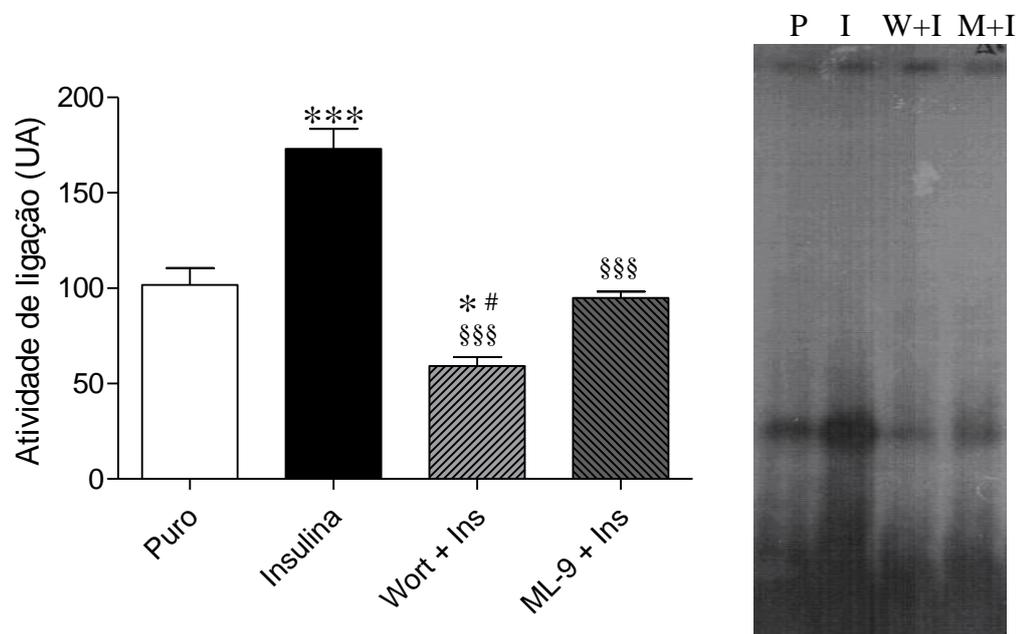
Análise por EMSA da atividade de ligação de proteínas nucleares ao elemento responsivo *AT-rich element* no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura (-) e adicionada de 15 nM de insulina (+). Ao lado, imagem típica dos blots referentes ao complexo *AT-rich/proteína*. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs Puro. Teste-t de Student.

FONTE: Moraes, 2011.

4.11 Efeito da wortmanina e ML-9 na atividade de ligação ao AT-rich element induzida pela insulina

A figura 16 retrata a atividade de ligação de proteínas nucleares no elemento responsivo *AT-rich element* (sítio de ligação de MEF2) do promotor do GLUT4, em músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura ou tratada com 15 nM de insulina, adicionado ou não de wortmanina e ML-9. Verificou-se que a adição de wortmanina diminuiu a atividade de ligação em 42% ($p < 0,05$) em relação ao controle e ainda em 35% em relação ao ML-9, que evitou o efeito da insulina na atividade de ligação.

Figura 16: Efeito da wortmanina e ML-9 na atividade de ligação ao AT-rich element induzida pela insulina



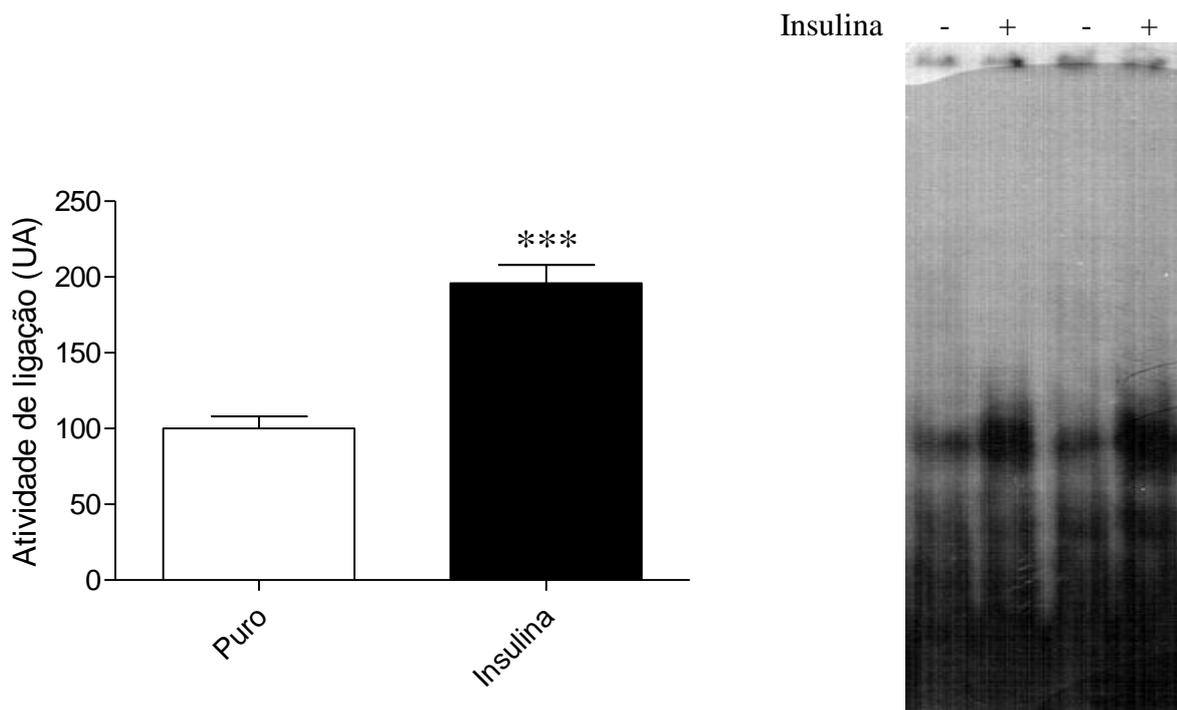
Análise por EMSA da atividade de ligação de proteínas nucleares ao elemento responsivo *AT-rich element* no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura no músculo sóleo ou tratada com 15 nM de insulina e adicionada ou não de wortmanina e ML-9. Ao lado, imagem típica dos blots referentes ao complexo *AT-rich*/proteína. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs Puro, §§§ $p < 0,001$ vs Insulina; # $p < 0,05$ vs ML-9. One-Way ANOVA com Student-Newman-Keuls.

FONTE: Moraes, 2011.

4.12 Efeito da insulina na atividade de ligação ao E-Box

A figura 17 retrata a atividade de ligação de proteínas nucleares ao elemento responsivo E-Box do promotor do GLUT4 em músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura ou acrescida de 15 nM de insulina. Observa-se que a insulina aumentou a atividade de ligação ao E-Box em 95% ($p < 0,001$).

Figura 17: Efeito da insulina na atividade de ligação ao E-Box

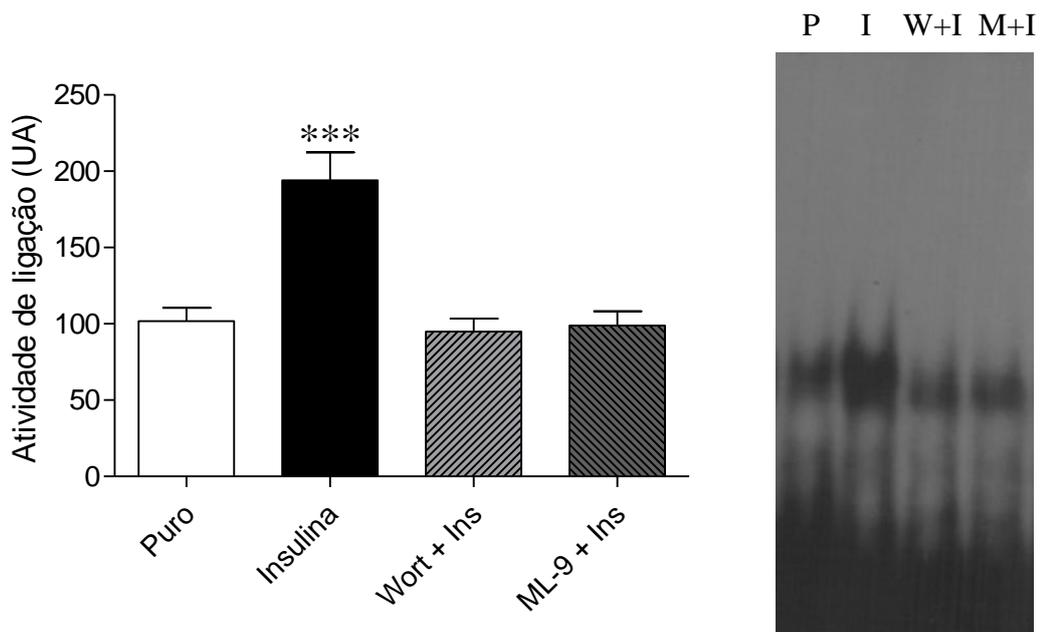


Análise por EMSA da atividade de ligação de proteínas nucleares ao domínio E-Box no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura (-) e adicionada de 15 nM de insulina (+). Ao lado, imagem típica dos blots referentes ao complexo E-Box/proteína. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs Puro. Test-t de Student. FONTE: Moraes, 2011.

4.13 Efeito da wortmanina ou ML-9 na atividade de ligação ao E-Box

A figura 18 retrata a atividade de ligação de proteínas nucleares ao elemento responsivo E-Box do promotor do GLUT4 em músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura ou tratado com 15 nM de insulina, adicionado ou não de wortmanina e ML-9. Observa-se que o aumento da atividade de ligação ao E-Box provocada pela insulina, foi evitado tanto na presença de wortmanina quanto ML-9.

Figura 18: Efeito da wortmanina ou ML-9 na atividade de ligação ao E-Box



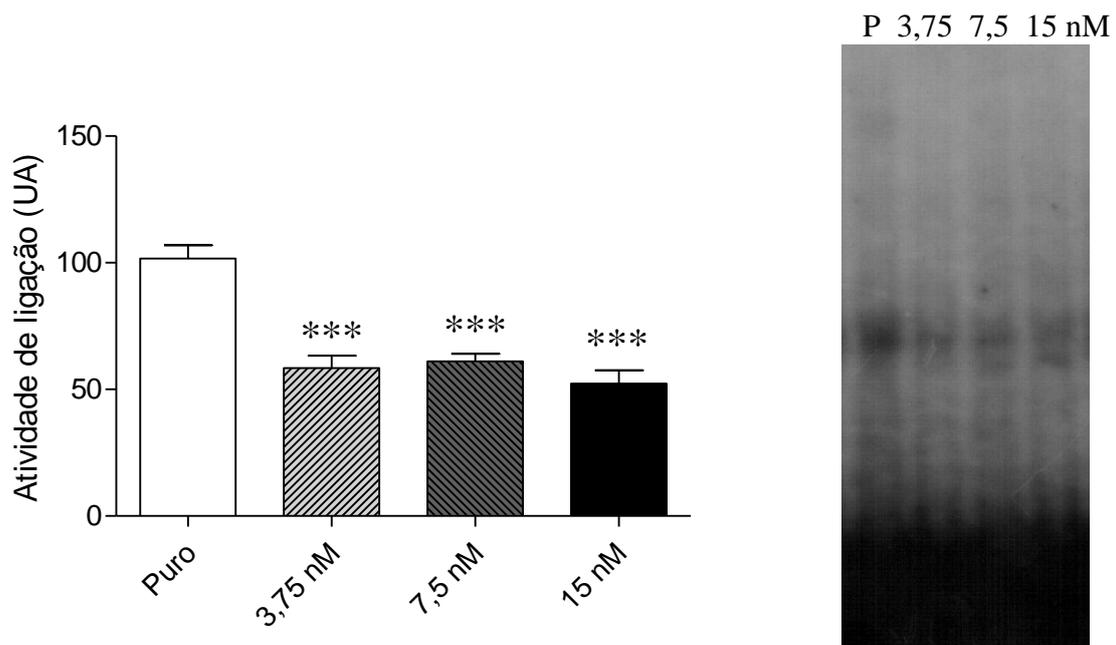
Análise por EMSA da atividade de ligação de proteínas nucleares ao domínio E-Box no músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura ou tratado com 15 nM de insulina, adicionado ou não de wortmanina e ML-9. Ao lado, imagem típica dos blots referentes ao complexo E-Box/proteína. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs Puro. One-Way ANOVA com Student-Newman-Keuls.

FONTE: Moraes, 2011.

4.14 Efeito da insulina na atividade de ligação do NF- κ B

A figura 19 retrata a atividade de ligação de proteínas nucleares no sítio de ligação do fator de transcrição NF- κ B na região promotora do gene GLUT4 em músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura ou acrescida de insulina. Observa-se que independentemente da concentração de insulina a atividade de ligação diminuiu em ~45% ($p < 0,001$).

Figura 19: Efeito da insulina na atividade de ligação do NF- κ B

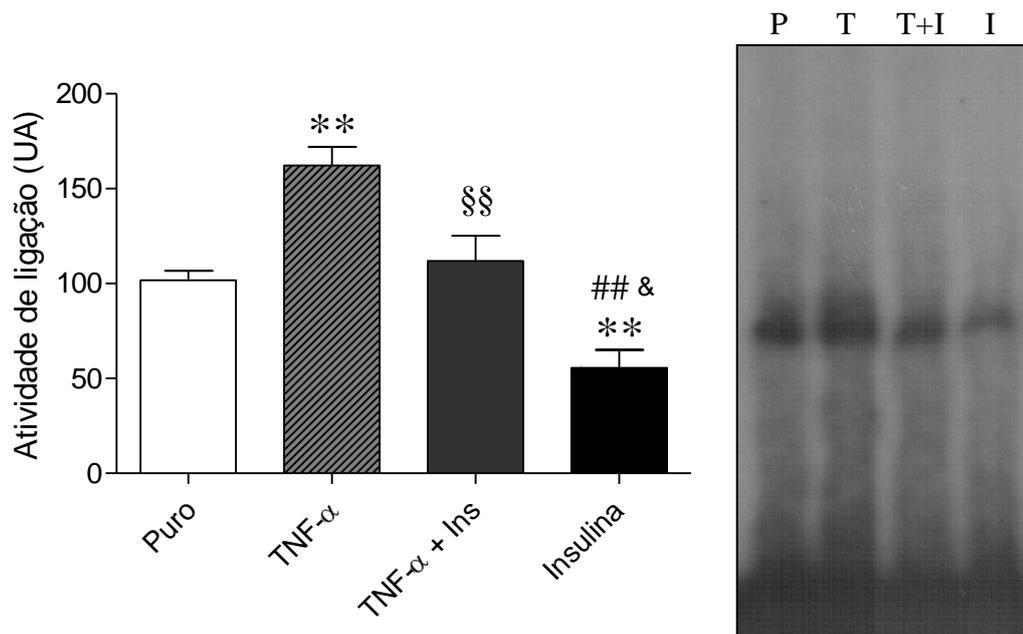


Análise por EMSA da atividade de ligação de proteínas nucleares no sítio de ligação do NF- κ B na região promotora do gene GLUT4 do músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura (P), adicionada de 3,25, 7,5 e 15 nM de insulina. Ao lado, imagem típica dos blots referentes a atividade de ligação. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs Puro. One-Way ANOVA com Student-Newman-Keuls.
 FONTE: Moraes, 2011.

4.15 Efeito do TNF- α na atividade de ligação de NF- κ B

A figura 20 retrata o efeito do TNF- α na atividade de ligação de proteínas nucleares no sítio de ligação do fator de transcrição NF- κ B na região promotora do gene GLUT4 em músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB pura ou acrescida de insulina. Observou-se que o TNF- α aumentou a atividade de ligação do fator transcrricional NF- κ B ao gene do GLUT4 em ~60%, tanto na ausência como na presença de insulina.

Figura 20: Efeito do TNF- α na atividade de ligação de NF- κ B



Análise por EMSA da atividade de ligação no sítio de NF- κ B na região promotora do gene GLUT4 do músculo sóleo incubado por 180 minutos em solução KHB (Puro), adicionada de TNF- α (25ng/mL), TNF- α + insulina (TNF- α + Ins) e somente com insulina. Ao lado, imagem típica dos blots referentes a atividade de ligação. Os valores são média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. ** $p < 0,01$ vs Puro; §§ $p < 0,01$ e & $p < 0,001$ vs TNF- α ; ## $p < 0,01$ vs TNF- α + Ins. One-Way ANOVA com Student-Newman-Keuls.

FONTE: Moraes, 2011.

5 DISCUSSÃO

A insulina é um importante regulador da expressão de GLUT4, entretanto, a influência de inúmeras alterações metabólico-hormonais observadas *in vivo* não permitiu, até o momento, que se defina claramente esse papel. Além disso, à semelhança do que ocorre com outras ações da insulina, é possível que os efeitos da hiperinsulinemia crônica sejam distintos dos efeitos rápidos consequentes às elevações de insulina intermitentes que ocorrem ao longo do dia. O isolamento dessas variáveis metabólico-hormonais através da pesquisa *in vitro* e em curto prazo é um caminho para determinar os efeitos fisiológicos diretos da insulina na regulação da expressão do GLUT4. Poucos estudos existem com estas abordagens, e a maioria em linhagens celulares, principalmente em adipócitos 3T3L1. Considerando o papel chave do tecido muscular na homeostase glicêmica, o presente estudo buscou investigar a expressão do GLUT4 neste tecido, *in vitro* e durante curto prazo, buscando determinar o papel da insulina na manutenção da expressão do GLUT4.

Neste estudo, em músculo sóleo *in vitro* a insulina promoveu aumento do conteúdo proteico total de GLUT4. A regulação da expressão de GLUT4 pela insulina tem mostrado resultados conflitantes, com efeito, ora indutor, ora repressor (Al-Khalili et al., 2005; Flores-Riveros et al., 1993; Koivisto et al., 1991; Yu et al., 2001). O tratamento com insulina por curto período resultou em um efeito indutor na expressão de GLUT4 (Yu et al., 2001), enquanto por longo período, um efeito repressor (Koivisto et al., 1991). Além disso, concentrações maiores que a utilizada em nossos estudos mostraram um efeito repressor da insulina na expressão de GLUT4 (Flores-Riveros et al., 1993). Estudo realizado, *in vivo* em ratos diabéticos tratados com insulina, observou que o tratamento com 3 U/dia de insulina durante uma semana promoveu aumento do conteúdo proteico total de GLUT4 no músculo esquelético desses ratos, alcançando níveis

similares aos de ratos não diabéticos. Entretanto, o tratamento com 9U/dia de insulina não promoveu aumento no conteúdo proteico de GLUT4 no músculo esquelético de ratos diabéticos, mantendo níveis similares aos ratos diabéticos que não foram tratados (Okamoto et al., 2011). Esses dados confirmam que diferenças no tempo de exposição e na concentração do hormônio influenciam o efeito da insulina na expressão de GLUT4, determinando resultados aparentemente conflitantes.

Em nosso estudo, a PI3K se mostrou como uma reguladora da expressão de GLUT4 induzida pela insulina. A presença de wortmanina na incubação reduziu a expressão da proteína GLUT4 no tampão puro e evitou parte do efeito indutor da insulina na expressão de GLUT4. A redução do GLUT4 em tampão puro adicionado com wortmanina indica que a PI3K medeia um efeito estimulador da expressão de GLUT4 independente da insulina ou que a inibição da PI3K ative algum inibidor da expressão de GLUT4. De fato, algumas pesquisas apontam que a inibição da PI3K pode ativar a via do NF- κ B, um repressor da expressão de GLUT4 (Hu, 2009). Na presença de wortmanina os níveis do conteúdo proteico de GLUT4 induzido pela insulina foram maiores que o observado em tampão somente com o inibidor, indicando que a insulina tem um efeito indutor na expressão de GLUT4 que é parcialmente dependente da PI3K. Esse efeito parcial da PI3K também foi observado em pesquisa com adipócitos (Valverde et al., 1999). Deve-se ressaltar que esse resultado encontrado em adipócitos, não era suficiente para indicar o mesmo efeito em tecido muscular, visto que o efeito da insulina na expressão de GLUT4 tem sido descrita como tecido-específica. Em pesquisa recente, o tratamento crônico de ratos diabéticos com 9U/dia de insulina por uma semana não alterou a expressão de GLUT4 no músculo, porém o conteúdo proteico de GLUT4 no tecido adiposo aumentou (Okamoto et al., 2011).

Deve-se destacar o fato de que a grande redução do efeito da insulina pelo inibidor, evidencia que a ativação da PI3K por esse hormônio é um passo chave na determinação do efeito da insulina sobre a expressão de GLUT4.

A AKT é ativada à jusante da PI3K, é ativada pela insulina e sua inibição crônica está associada com diminuição na expressão do mRNA de GLUT4 em adipócitos (Hernandez, 2001). Em nosso estudo, a inibição da AKT pelo ML-9, levou a diminuição da expressão protéica de GLUT4. Esses resultados reforçam a participação da via PI3K/AKT na regulação da expressão de GLUT4. Entretanto, o mecanismo pelo qual a AKT modula a expressão de GLUT4 ainda é incerto. Um possível passo nesta via de sinalização após ativação da via PI3K/AKT seria a ativação da mTOR. Entretanto, a presença de rapamicina (inibidor da mTOR) não alterou o efeito da insulina no conteúdo proteico de GLUT4 no músculo sóleo. Além disso, a insulina não alterou o conteúdo proteico de mTOR no músculo. Estes resultados refutaram nossa hipótese de um efeito traducional da insulina, via mTOR, pelo menos nas condições estudadas. Semelhante, aos nossos resultados, a ausência de efeito da rapamicina na expressão de GLUT4 já foi observada em adipócitos (Taha et al., 1999; Valverde et al., 1999).

Em consonância com os efeitos no conteúdo da proteína GLUT4, a insulina promoveu aumento na expressão do mRNA de GLUT4, o que também foi inibido tanto por wortmanina como por ML-9. Esses resultados indicam que, nas condições experimentais estudadas, o efeito da insulina na estimulação da expressão de GLUT4, mediado por PI3K/AKT, é transcricional. Assim, de posse desta informação, esta pesquisa passou a focar em prováveis mecanismos transcricionais que estivessem associados com o aumento da expressão do mRNA de GLUT4. Vários fatores de transcrição que poderiam estar envolvidos com este aumento foram investigados.

A hipóxia é ativadora do fator transcricional HIF-1 α e já foi descrita como capaz de promover um aumento da expressão de GLUT4 (Royer et al., 2000).

Pesquisa realizada em nosso laboratório demonstrou a participação do HIF-1 α no aumento de expressão de GLUT4 induzido pela contração muscular *in vitro* (Silva et al., 2005). No presente estudo, a incubação dos músculos não alterou a expressão do mRNA de HIF-1 α , sugerindo que não houve diferença significativa no suprimento de oxigênio aos tecidos durante a incubação, ou seja, manteve-se um estado de normóxia (Huang et al., 1998).

Entretanto, embora a expressão do mRNA de HIF-1 α não tenha se alterado, o ensaio de *gel shift* mostrou um aumento na atividade de ligação de proteínas nucleares no elemento responsivo E-Box, domínio em que se ligam tanto HIF-1 α quanto MyoD. Considerando que a expressão do HIF-1 α não se alterou, o que é um marcador da atividade de ligação do próprio fator, provavelmente o aumento da atividade de ligação ao E-Box induzido pela insulina foi devido a ativação do MyoD, também, reconhecido como indutores da transcrição do gene de GLUT4.

Outros fatores transcricionais que poderiam estar envolvidos neste aumento da expressão gênica de GLUT4 são os MEF2s. A insulina não alterou a expressão do mRNA de MEF2C. O MEF2C aumenta a expressão de GLUT4 na presença de seu co-ativador PGC1- α , coativador transcricional de PPAR- γ (Michael et al., 2001). Em ratos diabéticos insulino-deficientes foi relatada uma diminuição na expressão gênica de MEF2C, a qual não foi suficiente para diminuir seu conteúdo proteico (Mora e Pessin, 2000). Nossos resultados indicam que MEF2C não tem participação no aumento da expressão de GLUT4 induzido por insulina em músculo.

Entretanto, a insulina aumentou a expressão do mRNA das isoformas MEF2A e MEF2D. Esse resultado indicou uma possível participação deste fator transcricional na regulação da expressão gênica de GLUT4. Essa possibilidade ficou ainda mais evidente com o aumento provocado pela insulina na atividade de ligação de proteínas nucleares ao elemento responsivo *AT-rich element*, onde o MEF2 se liga. Essa relação entre a insulina, MEF2A/D e indução da expressão

de GLUT4 é bem documentada na literatura. Animais diabéticos insulino-deficientes apresentam uma diminuição na expressão gênica de MEF2A, acompanhada de diminuição do conteúdo proteico e da atividade de ligação de proteínas nucleares ao elemento responsivo para MEF2 (Mora e Pessin, 2000). Vale salientar que usualmente MEF2A heterodimeriza com MEF2D para interagir com seu elemento responsivo no promotor dos genes alvos, incluindo o do GLUT4 (Mora e Pessin, 2000). Além dos efeitos diretos de MEF2A e MEF2D, outras interações destes fatores têm sido relacionadas ao controle da expressão de GLUT4. Um fator que interage com MEF2A e aumenta a expressão de GLUT4 é o KLF15 (Gray et al., 2002), e portanto, não podemos descartar a participação dessas interações, junto com o aumento da ligação de MEF2 no estímulo transcricional do gene do GLUT4.

Uma dúvida corrente é como a insulina leva a um aumento da atividade de ligação de MEF2 ao gene *Slc2a4*. A adição de wortmanina e ML-9 não alteraram o aumento da expressão gênica de MEF2A e MEF2D induzida pela insulina. Isso sugere que outra via de sinalização induzida pela insulina que não a da PI3K/AKT estaria envolvida nesta regulação. Entretanto, a adição desses inibidores evitou o aumento, induzido pela insulina, da atividade de ligação de proteínas ao elemento responsivo *AT-rich element* do promotor do *Slc2a4*. Esses resultados indicam que a insulina ativa a via da PI3K/AKT e que essa via regula a atividade de ligação de MEF2A/D ao promotor do gene *Slc2a4* para aumentar a expressão de mRNA de GLUT4. Pesquisa com neurônios já havia demonstrado que IGF-1 depende da via da PI3K/AKT para ativar MEF2 (Wiedmann et al., 2005).

Existe importante interação, promovendo efeito sinérgico, entre MEF2A, MyoD e TR α 1 na ativação da expressão de GLUT4. (Santalucia et al., 2001). Assim, estendemos a investigação ao efeito da insulina na atividade de ligação ao sítio E-Box do promotor do gene *Slc2a4*, onde HIF-1 α e MyoD ligam. Inicialmente, verificamos que a insulina promoveu um aumento na atividade de

ligação de proteína nucleares ao sítio E-Box do promotor do gene *Slc2a4*. Levando-se em consideração que em condições de normóxia o HIF-1 α fica inativo, é possível conjecturar a participação o MyoD nesta regulação.

Outro possível mecanismo envolvido no controle da insulina sobre a expressão de GLUT4 envolve o fator transcricional NF- κ B que tem sido proposto como um inibidor da expressão de GLUT4. Estudos realizados em nosso laboratório já sugeriram que a insulina *in vitro* diminui a expressão gênica e atividade de ligação do fator transcricional NF- κ B (Silva et al., 2005). Entretanto, nesse estudo utilizou-se uma sonda representando um sítio consenso de ligação do NF- κ B ao DNA, cuja sequência de bases não está presente no promotor do GLUT4, o que não permite, de fato, confirmar a ligação do NF- κ B no promotor do gene GLUT4. No presente estudo, utilizou-se uma sonda de NF- κ B com sequência específica da região do promotor do GLUT4, com alta homologia aos domínios consenso, agora sim demonstrando pela primeira vez a ligação de proteínas nucleares neste potencial domínio de ligação do NF- κ B na região promotora do gene do GLUT4.

Nas condições aqui estudadas a insulina atuou diminuindo a expressão do mRNA do NF- κ B e a atividade de ligação no gene do GLUT4. Sendo o NF- κ B um repressor da atividade transcricional do GLUT4, esses resultados indicam uma “desrepressão” da atividade transcricional, favorecendo o aumento da expressão gênica de GLUT4 induzido pela insulina.

O controle transcricional do NF- κ B sobre os genes alvo depende de uma via que envolve IKK- α , responsável pela fosforilação de I κ B, o que dá início ao processo de ubiquitinação e degradação do I κ B e consequente ativação e migração nuclear do NF- κ B. Neste sentido, já foi descrito que o silenciamento de IKK- α , reduzindo a atividade do NF- κ B resultou em um aumento no conteúdo proteico de GLUT4 em adipócitos (Tang et al., 2005).

Quanto a participação da insulina na via do NF- κ B, já foi proposto que a insulina aumenta a expressão do I κ B, o inibidor de NF- κ B e assim, teria uma

ação inibidora da atividade de ligação do NF- κ B ao DNA tanto in vivo (Dandona et al., 2001) como in vitro (Aljada et al., 2001).

Além disso, pesquisas em obesos tratados com tiazolinedionas (Ghanim et al., 2001, Mohanty et al., 2004) e sulfoniluréias (Schiekofer et al., 2003), que induzem aumento da sensibilidade à insulina, já evidenciaram inibição do NF- κ B via aumento da expressão de I κ B. Essa modulação pela insulina indica uma atividade anti-inflamatória do hormônio (Aljada et al., 2001). Vale lembrar que na obesidade associada a resistência insulínica, já foi descrita a ativação da via IKK/NF- κ B (Cai et al., 2005), ativação esta que foi relacionada à maior expressão da citocina TNF- α (Kern e Ranganathan, 2001) cujos efeitos são mediados pelo NF- κ B.

Uma vez que TNF- α está relacionado com aumento da expressão e atividade de NF- κ B, foi investigado o efeito desta citocina em músculos incubados. Verificou-se que na presença de TNF- α a atividade de ligação do NF- κ B no gene do GLUT4 aumentou e a adição de insulina reduziu o aumento da atividade de ligação induzida pelo TNF- α . Com essa informação, o passo seguinte foi verificar se esse processo acarretaria em alguma mudança na expressão de GLUT4 no músculo sóleo. A incubação do músculo com TNF- α na presença de insulina levou a uma redução do conteúdo proteico total de GLUT4, efeito este que também ocorreu no tampão puro. Entretanto, na presença de insulina, o efeito inibitório do TNF- α não chegou aos níveis observados em tampão com TNF- α , fica evidente que parte dos efeitos da insulina independe desta via. A participação do NF- κ B já havia sido proposta em outras pesquisas (Ruan et al., 2002; Silva et al., 2005; Stephens et al., 1997), podendo representar o elo entre o processo inflamatório causado pela obesidade e a resistência insulínica (Furuya et al., 2010).

6 CONCLUSÕES

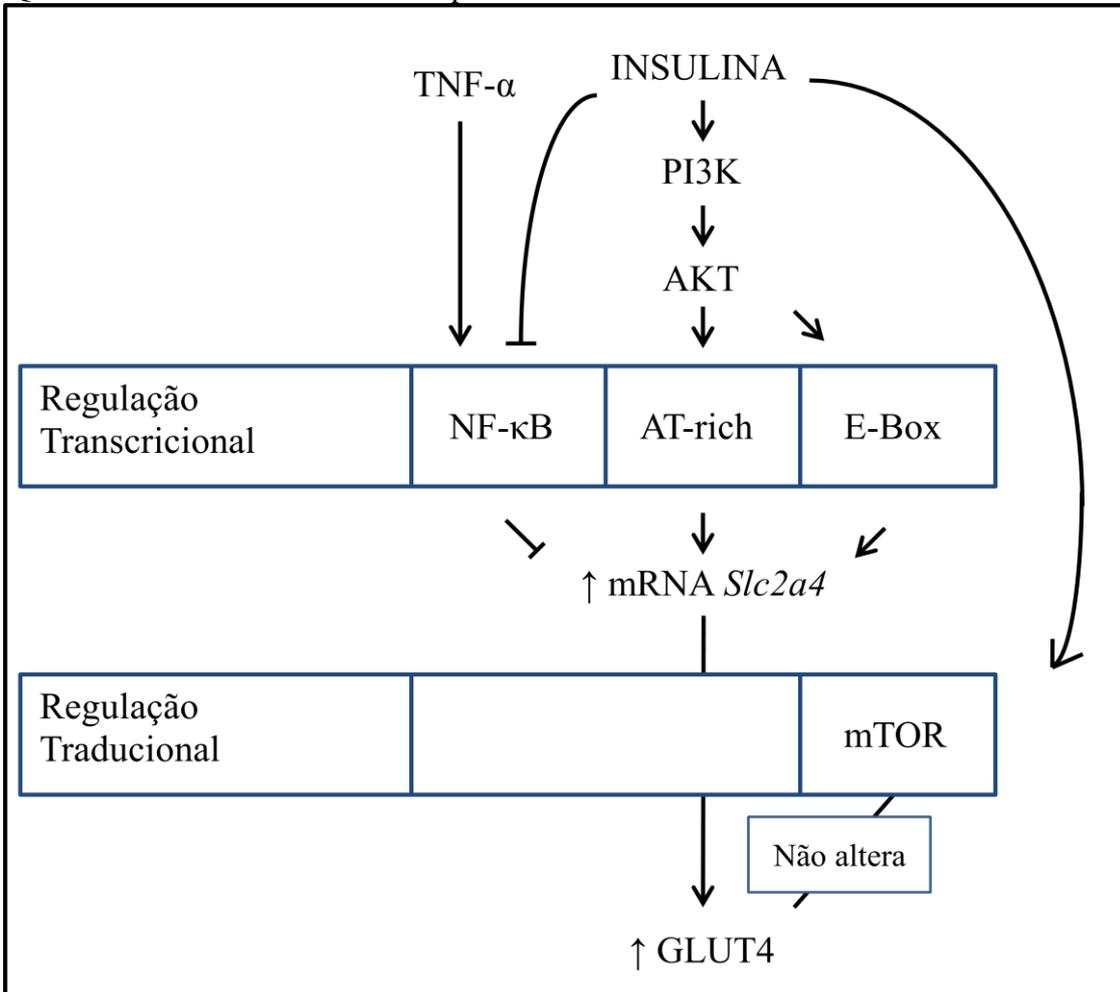
Baseado em nossos objetivos, os principais resultados apresentados acima estão resumidos na figura abaixo.

Os resultados obtidos evidenciaram que o tratamento de curto prazo com insulina aumentou a expressão de *Slc2a4*/GLUT4 em músculo sóleo de ratos *in vitro*. Entre os mecanismos envolvidos nessa regulação, revelou-se a participação da via da PI3K/AKT que parece ativar os fatores transcricionais MEF2 e MyoD para aumentar a expressão do *Slc2a4*. A expressão de HIF-1 α , não se alterou com o estímulo insulínico, indicando que este, não participa da regulação observada e revelando uma condição de normóxia nas condições experimentais utilizadas.

O fator transcricional NF- κ B teve sua expressão e atividade inibidas pela insulina, o que contribuiu para o aumento da expressão do *Slc2a4*/GLUT4, efeito este que foi confirmado na presença de TNF- α . Finalmente, a proteína cinase mTOR não teve efeito significativo na regulação da expressão da proteína GLUT4. Esses resultados estão resumidos no quadro 3.

Em resumo, os resultados indicam que a insulina é capaz de estimular direta e rapidamente a expressão do gene *Slc2a4*, *in vitro*, o que se reflete em aumento do conteúdo da proteína GLUT4. Este efeito é parcialmente mediado pela via PI3K/AKT, e envolve a ativação de MEF2A/D e a inibição do NF- κ B.

Quadro3 - Efeito da insulina na expressão do *Slc2a4/GLUT4*



Fonte: Moraes, 2011.

REFERÊNCIAS*

Abel ED, Peroni O, Kim JK *et al.* Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*. 2001;409(6821):729-733.

Ajuwon KM and Spurlock ME. Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutri*. 2005;135(8):1841-6.

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*. 1996;15:6541-6551.

Aljada A, Garg R, Guanin H, Saadeh R, Dandona P. Insulin inhibits NF-κB and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:450-453.

Al-Khalili L, Forsgren M, Kannisto K, Zierath JR, Lonqvist F, Krook A. Enhanced insulin-stimulated glycogen synthesis in response to insulin, metformin or rosiglitazone is associated with increased mRNA expression of GLUT4 and peroxisomal proliferator activator receptor gamma co-activator 1. *Diabetologia*, 2005;48(6):1173-9.

Andrews NC, Faller DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 1991;11;19(9):2499.

Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-83. Review.

Barthel A, Okino ST, Liao J, Nakatani K, Li J, Whitlock JPJ and Roth RA. Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *J Biol Chem*. 1999 Jul 16;274(29): 20281-6.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Bolster DR, Jefferson LS, Kimball SR. Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signalling. *Proc Nutr Soc.* 2004;63(2):351-6.

Bonadonna RC and De Fronzo RA. Glucose metabolism in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 1991;17:112-135.

Brand N J. Myocyte Enhancer Factor (MEF2). *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;12:1467-1470.

Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med.* 2005;11(2):183-90.

Casla A, Rovira A, Wells JA and Dohm GL. Increased glucose transporter (GLUT4) protein expression in hyperthyroidism. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;171:182-188.

Castelló A, Rodríguez-Manzaneque JC, Camps M, Pérez-Castillo A, Testar X, Palacín M, Santos A, Zorzano A. Perinatal hypothyroidism impairs the normal transition of GLUT4 and GLUT1 glucose transporters from fetal to neonatal levels in heart and brown adipose tissue. Evidence for tissue-specific regulation of GLUT4 expression by thyroid hormone. *J Biol Chem.* 1994;269(8):5905-12.

Carvalho E, Kotani K, Peroni OD and Kahn BB. Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;289:E551-61.

Charron MJ, Katz EB. Metabolic and therapeutic lessons from genetic manipulation of GLUT4. *Mol Cell Biochem.* 1998;182:143-152.

Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J and Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol.* 1994;14:4902-4911.

Cho H, Mu J, Kim JK et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science.* 2001;292:1728-1731.

Cooke DW, Lane MD. A sequence element in the GLUT4 gene that mediates repression by insulin. *J Biol Chem.* 1998;13; 273(11):6210-7.

Cooke DW, Lane MD. The transcription factor Nuclear Factor 1 mediates repression of the GLUT4 promoter by insulin. *J Biol Chem.* 1999;274(18):12917-24.

Cortright RN, Dohm GL. Mechanism by which insulin and muscle contraction stimulate glucose transport. *Can L Appl Physio.* 1997;22(6):519-530.

Crozier SJ, Anthony JC, Schworer CM, Reiter AK, Anthony TG, Kimball SR, Jefferson LS. Tissue-specific regulation of protein synthesis by insulin and free fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(4):E754-62.

Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Guanin H, Hamouda W, Assian E, Ahmad S. Insulin inhibits intranuclear factor κ B and stimulates I κ B in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:3257-6565.

Dohm GL, Elton CW, Friedman JE, Pilch PF, Pories WJ, Atkinson SM and Caro JF. Decreased expression of glucose transporter in muscle from insulin-resistant patients. *Am J Physiol.* 1991;260:E459-E463.

Dowell P, Cooke DW. Olf-1/early B cell factor is a regulator of GLUT4 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2002;18;277(3):1712-8.

Flores-Riveros JR, McLenithan JC, Ezaki O, Lane MD. Insulin down-regulates expression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene: Effects on transcription and mRNA turnover. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:512-516.

Friedman JE, Dohm GL, Leggett-Frazier N, Elton CW, Tapscott EB, Pories WP and Caro JF. Restoration of insulin responsiveness in skeletal muscle of morbidly obese patients after weight loss. Effect on muscle glucose transport and glucose transporter GLUT4. *J Clin Invest Chem.* 1992;89(2):701-705.

Furuya DT, Poletto AC, Favaro RR, Martins JO, Zorn TM, Machado UF. Anti-inflammatory effect of atorvastatin ameliorates insulin resistance in monosodium glutamate-treated obese mice. *Metabolism,* 2010;59(3):395-9.

Garfin D E. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 1990;182:425-41.

Garvey WT, Maianu L, Huecksteadt TP, Birnbaum MJ, Molina JM, Ciaraldi TP. Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J Clin Invest.* 1991;87:1072–1081.

Garvey WT, Maianu L, Zhu JH, Brechtel-Hook G, Wallace P, Baron AD. Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J Clin Invest.* 1998;101:2377–2386.

Gaster M, Staehr P, Beck-Nielsen H, Schroder HD and Handberg A. GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease? *Diabetes*, 2001;50:1324-1329.

Ge Y, Wu A, Warnes C, Liu J, Zhang C, Kawasome H, Terada N, Boppart MD, Schoenherr CJ and Chen J. mTOR regulates skeletal muscle regeneration in vivo through kinase-dependent and kinase-independent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;297:C1434-1444.

Ghanim H, Garg R, Aljada A, Mohanty P, Kumbkarni Y, Assian E, Hamouda W, Dandona P. Suppression of nuclear factor-kappaB and stimulation of inhibitor kappaB by troglitazone: evidence for an anti-inflammatory effect and a potential antiatherosclerotic effect in the obese. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(3):1306-12.

Gould GW, Holman GD. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J.* 1993;295:329-341.

Gray S, Feinberg MW, Hull S, Kuo CT, Watanabe M, Senbanerjee S, Depina A, Haspel R, Jain MK. The Krüppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J Biol Chem.* 2002;277(37): 34322-34328.

Hajdуч E, Alessi DR, Hemmings BA and Hundal HS. Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes*, 1998;47:1006-1013.

Hay N, Sonenberge N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 2004;18(16):1926-1945.

Hernandez R, Teruel T, Lorenzo M. Akt mediates insulin induction of glucose uptake and up-regulation of GLUT4 gene expression in brown adipocytes. *FEBS Lett.* 2001;494:225-231.

Hresko RC, Mueckler M. mTOR/RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2005;280(49):40406-16.

Hu W, Li F, Mahavadi S, Murthy KS. Upregulation of RGS4 expression by IL-1beta in colonic smooth muscle is enhanced by ERK1/2 and p38 MAPK and inhibited by the PI3K/Akt/GSK3beta pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;296(6):C1310-20.

Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitinproteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1998;95:7987-7992.

Kern PA, Ranganathan S. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280(5):E745-51.

Knight JB, Eyster CA, Griesel BA, Olson AL. Regulation of the human GLUT4 gene promoter: interaction between a transcriptional activator and myocyte enhancer factor 2A. *Biochem.* 2003;100(25):14725-14730.

Koivisto UM, Martinez-Valdez H, Bilan PJ, Burdett E, Ramlal T, Klip A. Differential regulation of the GLUT1 and GLUT4 glucose transport systems by glucose and insulin in L6 muscle cells in culture. *J Biol Chem.* 1991;266:2615-2621.

Kotani K, Peroni OD, Minokoshi Y, Boss O and Kahn BB. GLUT4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral lipid utilization. *J Clin Invest.* 2004;114:1666-1675.

Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med.* 2004;82(7):434-48.

Li Q, Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(12):975.

Liu A, Hoffman PW, Lu W, Bai G. NF- κ B site interacts with Sp factors and up-regulates the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J Biol Chem.* 2004;279:17449-17458.

Liu ML, Gibbs EM, McCoid SC, Milici AJ, Stukenbrok HA, McPherson RK, et al. Transgenic mice expressing the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter protein exhibit efficient glycemic control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993;90:11346-50.

Lowry O, Rosebroug NJ, Farr LA, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-275.

Lu J, McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with clasII histone deacetylase. *Mol Cell*. 2000;6(2):233-44.

Machado UF, Shimizu Y and Saito M. Decreased glucose transporter (GLUT4) content in insulin-sensitive tissues of obese aurothioglucose- and monosodium glutamate-treated mice. *Horm Metab Res*. 1993;25(9):462-5.

McGee SL, Hargreaves M. Exercise and myocyte enhancer factor 2 regulation in human skeletal muscle. *Diabetes*, 2004;53(5):1208-14.

McLean PS, Zheng D, Dohm GL. Muscle glucose transporter (GLUT4) gene expression during exercise. *Exerc Sport Sci*. 2000;28(4):148-152.

Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP and Spiegelman BM. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001;98:3820-3825.

Mohanty P, Aljada A, Ghanim H, Hofmeyer D, Tripathy D, Syed T, Al-Haddad W, Dhindsa S, Dandona P. Evidence for a potent antiinflammatory effect of rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2728-35.

Mora S, Pessin JE. The MEF2A isoform is required for striated muscle-specific expression of the insulin-responsive GLUT4 glucose transporter. *J Biol Chem*. 2000;273:14285-14292.

Moreno H, Serrano AL, Santalucia T, Canto C, Brand NJ, Palacin M, Schiaffino S, Zorzano A. Differential regulation of the muscle-specific GLUT4 enhancer in regenerating and adult skeletal muscle. *J Biol Chem*. 2003;278(42):40557-64.

Morisaki T, Sermsuvitayawong K, Byun S H, Matsuda Y, Hidaka K, Morisaki H and Mukai TJ. Mouse MEF2B gene: unique member of MEF2 gene family. *Biochem*. 1997;122:939-946.

Okamoto MM, Anhê GF, Sabino-Silva R, Ferreira Marques MF, Freitas HS, Mori RC, Melo KF, Machado U. Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver. *J Endocrinol.* 2011;211(1):55-64.

Ornatsky OI, Andreucci JJ and McDermott JC. A dominant-negative form of transcription factor MEF2 inhibits myogenesis. *Biol Chem.* 1997;272:33271–33278.

Pain VM, Garlick PJ. Effect of streptozotocin diabetes and insulin treatment on the rate of protein synthesis in tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem.* 1974;249:4510-4514.

Reddy SA, Huang JH, Liao O, WS. Phosphatidylinositol 3-kinase as a mediator of TNF-induced NF-kappa B activation. *J Immunol.* 2000;164(3):1355-63.

Ren JM, Semenkovich CF, Gulve EA, Gao J, Holloszy JO. Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. *J Biol Chem.* 1994;269:14396-14401.

Royer C, Lachuer J, Crouzoulon G, Roux J, Peyronnet J, Mamet J, Pequignot J, Dalmaz Y. Effects of gestational hypoxia on mRNA levels of GLUT3 and GLUT4 transporters, hypoxia inducible factor-1 and thyroid receptors in developing rat brain. *Brain Research,* 2000;856:119-128.

Ruan H, Hacohen N, Golub TR. Tumor necrosis factor suppress adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes. NF- κ B activation by TNF- α is obligatory. *Diabetes,* 2002;51:1319-1336.

Santalucia T, Moreno H, Palacin M, Yacoub MH, Brand NJ, Zorzano A. A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TR α 1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene expression. *J Mol Biol.* 2001;314:195–204.

Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell.* 2006;21;22(2):159-68.

Scheepers A, Joost HG, Schürmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *J Parent. Ent Nutr.* 2004;28(5):365-372.

Schiekofer S, Rudofsky GJ, Andrassy M, Schneider J, Isermann B, Kanitz M, Elsenhans S, Heinle H, Balletshofer B, Haring HU, Schleicher E, Nawroth PP, Bierhaus A. Glimepiride reduces mononuclear activation of the redox-sensitive transcription factor nuclear factor-kappa B. *Diabetes Obes Metab.* 2003;5(4):251-61.

Shepherd PR, Gnudi L, Tozzo E, Yang H, Leach F and Kahn BB. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J Biol Chem.* 1993;268:22243-22246.

Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action - implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1999;341:248-257.

Silva JL, Giannocco G, Furuya DT, Lima GA, Moraes PA, Nacheff S, Bordin S, Britto LR, Nunes MT, Machado UF. NF- κ B, MEF2A, HIF-1a involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;240(1-2):82-93.

Stephens JM, Lee J and Pilch PF. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem.* 1997;10;272(2):971-6.

Stuart CA, Howell ME, Baker JD, Dykes RJ, Duffourc MM, Ramsey MW, Stone MH. Cycle training increased GLUT4 and activation of mammalian target of rapamycin in fast twitch muscle fibers. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42(1):96-106.

Taha C, Liu Z, Jin J, Al-Hasani H, Sonenberg N, Klip A. Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *J Biol Chem.* 1999;12;274(46): 33085-91.

Tang X, Guilherme A, Chakladar A, Powelka AM, Konda S, Virbasius JV, Nicoloso SMC, Straubhaar J and Czech MP. An RNA interference-based screen identifies MAP4K4/NIK as a negative regulator of PPAR- γ , adipogenesis, and insulin-responsive hexose transport. *Biochem.* 2006;103(7),2087-2092.

Thai MV, Guruswamy S, Cao KT, Pessin JE, Olson AL. Myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-binding site is required for GLUT4 gene expression in transgenic mice. Regulation of MEF2 DNA binding activity in insulin-deficient diabetes. *J Biol Chem.* 1998; 273(23):14285-92.

Torrance CJ, Devente JE, Jones JP and Dohm GL. Effects of thyroid hormone on GLUT4 glucose transporter gene expression and NIDDM in rats. *Endocrinology*, 1997;138:1204-1214.

Tozzo E, Gnudi L and Kahn BB. Amelioration of insulin resistance in streptozotocin diabetic mice by transgenic overexpression of GLUT4 driven by an adipose-specific promoter. *Endocrinology*, 1997;138:1604-1611.

Tremblay F, Gagnon A, Veilleux A, Sorisky A, Marette A. Activation of mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. *Endocrinology*, 2005;146(3):1328-37.

Valverde AM, Navarro P, Teruel T, Conejo R, Benito M and Lorenzo M. Insulin and insulin-like growth factor I up-regulate GLUT4 gene expression in fetal brown adipocytes, in a phosphoinositide 3-kinase-dependent manner. *Biochem J*. 1999; 337:397-405.

Wang X, Proud CG. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology*, 2006;21:362-369.

Weinstein SP, O'Boyle E, Haber RS. Thyroid hormone increases basal and insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle. The role of GLUT4 glucose transporter expression. *Diabetes*, 1994;43:1185-1189.

Wiedmann M, Wang X, Tang X, Han M, Li M, Mao Z. PI3K/Akt-dependent regulation of the transcription factor myocyte enhancer factor-2 in insulin-like growth factor-1 and membrane depolarization mediated survival of cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res*. 2005;Jul15;81(2):226-34.

Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13:444-451.

Yu Z, Buren J, Enerback S, Nilsson E, Samuelsson L, Eriksson JW. Insulin can enhance GLUT4 gene expression in 3T3-F442A cells and this effect is mimicked by vanadate but counteracted by cAMP and high glucose-potential implications for insulin resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1535:174-185.

Zisman A, Peroni OD, Abel ED *et al*. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med*. 2000;6:924-928.

Zorzano A, Fandos C, Palacin M. Role of plasma membrane transporters in muscle metabolism. *Biochem J.* 2000;349:667-688.

Zorzano A, Palacin M, Guma A. Mechanism regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 2005;183:43-58.