

**PATRÍCIA EBERSBACH SILVA**

**REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DO GLUT4 INDUZIDA POR PALMITATO  
NÃO ENVOLVE ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO  
EM CÉLULAS MUSCULARES L6**

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

São Paulo  
2013

**PATRÍCIA EBERSBACH SILVA**

**REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DO GLUT4 INDUZIDA POR PALMITATO  
NÃO ENVOLVE ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO  
EM CÉLULAS MUSCULARES L6**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana.

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado.

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

São Paulo  
2013

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Patricia Ebersbach.

Redução da expressão do GLUT4 induzida por palmitato não envolve estresse de retículo endoplasmático em células musculares L6 / Patricia Ebersbach Silva. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. 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: Endocrinologia.

Versão do título para o inglês: Decreased expression of GLUT4 palmitate-induced does not involve endoplasmic reticulum stress in L6 muscle cells.

1. Palmitato 2. Estresse de retículo endoplasmático 3. GLUT4  
4. NFkB I. Machado, Prof. Dr. Ubiratan Fabres II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0179/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Patricia Ebersbach Silva.

Titulo da Tese: Redução da expressão do GLUT4 induzida por palmitato não envolve estresse de retículo endoplasmático em células musculares L6.

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)**

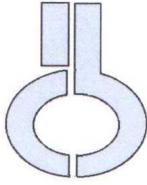
Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 354/10 referente ao projeto intitulado: “*Análise das vias da unfolded protein response (UPR) na regulação da expressão do GLUT4 em células musculares tratadas com palmitato*” sob a responsabilidade de **Patrícia Ebersbach Silva**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 22 de março de 2010.

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

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO  
Vice-Coodenador da CEPsh - ICB/USP

**Dedico este trabalho à:**

Benedito F. da Silva (*in memoriam*).

Pelo seu total apoio e confiança e por sempre acreditar que eu seria capaz de atingir mais este importante objetivo em minha vida.

Valdina Ebersbach Silva

Por seu amor incondicional e por suas orações que me ajudaram nesta minha caminhada acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

---

É com a escrita dos agradecimentos, que demonstro que o presente trabalho não é fruto apenas de meu esforço, mas também de várias pessoas com quem tenho convivido ao longo destes anos de doutorado e que, direta ou indiretamente, são responsáveis por este resultado final.

Agradeço primeiramente a **Deus**, por me dar forças, saúde, coragem, esperança e capacidade de realizar e enfrentar cada etapa de minha vida.

Ao meu Orientador Prof. **Dr. Ubiratan Fabres Machado** por ter me recebido como aluna de doutorado e por ter acreditado na minha capacidade. Obrigada pela paciência nos momentos mais difíceis durante o desenrolar do meu projeto de doutorado, pelo entusiasmo com que ensina a pesquisa e por sua orientação competente.

Ao meu marido **Clayton Soares**, amor da minha vida, por estar sempre ao meu lado. Pelo seu amor e carinho e grande estímulo para esta conquista.

A minha irmã **Carla**, por dividir comigo os problemas familiares destes últimos 2 anos.

As amigas e técnicas **Maristela Okamoto** e **Helayne Freitas**, meus agradecimentos por sua ajuda e apoio metodológico em todas as fases do projeto e por serem exemplos de capacidade, dedicação e caráter. Maris, obrigada por toda a ajuda para solucionar aqueles resultados de Western que eu tinha vontade de jogar no lixo!!! Helayne, obrigada pelas conversas espirituais que sempre me fizeram tão bem e por me aturar nos piores momentos!!!

Agradeço especialmente à minha querida amiga, confidente, companheira de laboratório e de descontração, **Aline David**. Obrigada pela amizade, pelas conversas, pelas muitas risadas e ajuda nos experimentos. Agradeço pela alegria

que você emana, por sua generosidade com todos ao seu redor e por ser uma amiga de verdade que levarei comigo por toda a vida.

Aos amigos de laboratório que fizeram parte da minha caminhada acadêmica: Ana Claudia Polleto, Ana Bárbara Alves, Bruna Lins, Caio Yogy, Daniela Furuya, Daniella Duque, Danilo Corrêa, Guilherme Lima, João Victor Esteves, Luciana Alves, Luciana Tocci, Milano Marques, Paulo Moraes, Raquel Campello, Robinson Sabino, Rosana Mori e Thaís Poças. Obrigada pela convivência, pelas risadas, por toda a ajuda e estímulo que me deram.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos, meu agradecimento pelas conversas, contribuições e empréstimo de materiais.

A todos os professores do departamento de Fisiologia e Biofísica, em especial à Maria Tereza Nunes, Silvana Bordin, Angelo Carpinelli e Fábio Bessa Lima, pelo excelente ensino, auxílio e amizade.

À todos os funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas, em especial ao José Maria e à Paloma, agradeço por toda a ajuda e dedicação.

À todos os funcionários da biblioteca, especialmente à Monica da Silva Amaral, agradeço pela atenção e revisão deste trabalho.

Aos professores da banca julgadora pela disponibilidade em contribuir para os acertos finais deste trabalho.

Agradeço também a todos que, involuntariamente foram omitidos, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo suporte financeiro que tornou concreta a possibilidade de realização desta pesquisa (Processo: 2010/09984-5).



“(...) porque admirados os homens das coisas que ignoram,  
inquirem e investigam as causas delas até as alcançar,  
e isto é o que se chama ciência.”

Pe. Antonio Vieira

## RESUMO

---

Silva PE. Redução da expressão do GLUT4 induzida por palmitato não envolve estresse de retículo endoplasmático em células musculares L6. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Altas concentrações de ácidos graxos saturados desencadeiam resistência à insulina no músculo esquelético por mecanismos ainda não completamente elucidados. Investigações recentes sugerem que o estresse de retículo endoplasmático (RE) possa estar envolvido neste processo. Estresse do RE resulta na ativação de vias celulares que compreendem uma resposta conhecida como *Unfolded Protein Response* (UPR), e diferentes estudos têm demonstrado a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B por meio destas vias. Dentro deste contexto, o objetivo do presente estudo foi investigar, em células musculares L6, os efeitos do tratamento com o ácido graxo palmitato sobre o estresse de RE e a ativação do NF- $\kappa$ B, relacionando-os com o prejuízo na expressão do GLUT4. Pelos resultados obtidos observou-se que o tratamento com palmitato na concentração de 0,75mM induziu redução importante no conteúdo da proteína GLUT4 e do RNAm *Slc2a4*, em diferentes tempos de incubação. Os marcadores de estresse como a chaperona GRP78, a via PERK/EIF2 $\alpha$  e a via IRE1 $\alpha$ /XBP-1/TRAF2 apresentaram pouca ativação sugerindo que o estresse de RE não participa da resistência à insulina palmitato-mediada. Foi verificado também que os fatores transcricionais C/EBP $\alpha$  e SREBP1 não parecem regular o *Slc2a4* mediante o tratamento com palmitato. Já o fator transcricional NF- $\kappa$ B apresentou-se aumentado em seu conteúdo proteico e em seu RNAm. A atividade de ligação do NF- $\kappa$ B à região promotora do gene *Slc2a4* mostrou aumento significativo pelo tratamento com palmitato independente do grau de fosforilação de IKK. Em suma, observou-se que o palmitato reprime a expressão do *Slc2a4* e que este ácido graxo induz pouca ativação das vias de estresse de retículo em células musculares L6. Por outro lado, sem excluir outros mecanismos regulatórios, a participação do NF- $\kappa$ B parece ser importante no controle deste fenômeno biológico reduzindo drasticamente a expressão do *Slc2a4* e prejudicando a homeostasia da glicose nas células musculares da linhagem L6.

**Palavras-chave:** Palmitato. Estresse de Retículo Endoplasmático. GLUT4. NF- $\kappa$ B.

## ABSTRACT

---

Silva PE. Decreased expression of GLUT4 palmitate-induced does not involve endoplasmic reticulum stress in L6 muscle cells. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

High concentrations of saturated fatty acids trigger insulin resistance in skeletal muscle by mechanisms not yet fully elucidated. Recent research suggests that the endoplasmic reticulum (ER) stress may be involved in this process. ER stress results in the activation of cellular pathways that comprise a response known as unfolded protein response (UPR), and different studies have demonstrated the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B through these pathways. Within this context, the aim of this study was to investigate the effects of palmitate treatment on ER stress pathways and activation of NF- $\kappa$ B, relating them to the GLUT4 expression in L6 muscle cells. The results indicated that the treatment with 0.75 mM of palmitate resulted in a significant reduction in protein content and mRNA of *Slc2a4* at different incubation times. Stress markers such as GRP78 chaperone, the PERK/EIF2 $\alpha$  pathway and IRE1 $\alpha$ /XBP-1/TRAF2 pathway showed little activation suggesting that ER stress does not participate in insulin resistance palmitate-mediated. It was also verified that the transcription factors C/EBP $\alpha$  and SREBP1 are not regulating *Slc2a4* by treatment with palmitate. The transcriptional factor NF- $\kappa$ B were increased in protein content and mRNA. The binding activity of NF- $\kappa$ B to the promoter region of the gene *Slc2a4* showed significant increase by treatment with palmitate independent from the phosphorylation of IKK. Finally, it was observed that palmitate represses the expression of *Slc2a4* and that this fatty acid induces little activation of reticulum stress pathways in L6 muscle cells. On the other hand, without excluding other regulatory mechanisms, the involvement of NF- $\kappa$ B appears to be important to control this biological phenomenon, reducing the expression of *Slc2a4* and impairing glucose homeostasis in L6 muscle cell.

**Keywords:** Palmitate. Endoplasmic Reticulum Stress. GLUT4. NF- $\kappa$ B.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

AGLs	ácidos graxos livres
Akt/PKB	proteína akt ou proteína cinase B
BiP	immunoglobulin heavy chain-binding protein
BSA	albumina bovina sérica
C/EBP	CAAAT enhancer binding protein
CT	ciclo <i>threshold</i>
DM2	diabetes mellitus do tipo 2
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EIF2 $\alpha$	eukaryotic translation initiation factor
EMSA	ensaio de mobilidade eletroforética
ERAD	degradação associada ao retículo endoplasmático
EROs	espécies reativas de oxigênio
GADD34	growth arrest and DNA damage-inducible protein-34
GADD 153	growth arrest and DNA damage-inducible protein-153
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLUT4	transportador de glicose isoforma 4
GRP78	glucose regulated protein 78kDa
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid
I $\kappa$ B	inibidor de NF- $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B cinase
IL6	Interleucina 6
Insig	<i>insulin-induced gene</i>
IRE1 $\alpha$	inositol-requiring enzyme-1
JNK	c-jun NH2-terminal cinase
NF- $\kappa$ B	fator nuclear kappa B
NONIDET	Octilfenoxipolietoxietanol
PBS	tampão fosfato salina

PERK	PKR-like endoplasmic reticulum kinase
PKC	proteína cinase C
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
TBE	tris-borato-EDTA
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TRAF2	tumor necrosis factor receptor-associated factor 2
TRIS	trizma base – tris(hidroximetil)aminometano
RE	retículo endoplasmático
RI	resistência a insulina
SCAP	<i>cleavage-activating protein</i>
<i>Slc2a4</i>	solute carrier family 2A4
S1P	Protease serina-1
S2P	Metaloprotease-2
SREBP	<i>Sterol regulatory element binding protein</i>
XBP-1	<i>X Box Protein-1</i>

## SUMÁRIO

---

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	31
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
<b>3.1 Linhagem Celular</b> .....	32
<b>3.2 Propagação e diferenciação das células</b> .....	32
<b>3.3 Tratamentos</b> .....	33
<b>3.4 Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT</b> .....	34
<b>3.5 Preparação das amostras para a quantificação da proteína de membrana GLUT4 por Western Blotting</b> .....	35
<b>3.6 Preparação das amostras para a quantificação de proteínas citosólicas e/ou fosforiladas por Western Blotting</b> .....	35
<b>3.7 Método Bradford para dosagem de proteínas</b> .....	35
<b>3.8 Ensaio de Western Blotting</b> .....	36
<b>3.8.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</b> .....	36
<b>3.8.2 Transferência eletroforética</b> .....	37
<b>3.8.3 Imunodeteção (Immunoblotting)- ECL (Enhanced Chemiluminescence)</b> ..	37
<b>3.8.4 Expressão dos resultados</b> .....	39
<b>3.9 Ensaio de RT-qPCR</b> .....	39
<b>3.9.1 Extração de RNA total</b> .....	39
<b>3.9.2 Transcrição reversa</b> .....	40
<b>3.9.3 PCR em tempo real</b> .....	40
<b>3.10 Ensaio de mobilidade eletroforética (Gel shift-EMSA)</b> .....	43
<b>3.10.1 Extração de proteínas nucleares</b> .....	43

3.10.2 Marcação da sonda.....	44
3.10.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante.....	45
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
4.1 Determinação da viabilidade celular por MTT.....	46
4.2 Quantificação da proteína GLUT4.....	47
4.3 Expressão do gene <i>Slc2a4</i> .....	48
4.4 Conteúdo proteico da chaperona GRP78 (BiP). ....	49
4.5 A via PERK/EIF2 $\alpha$ não está relacionada com a diminuição traducional de GLUT4 em células musculares L6.....	50
4.6 A via IRE1 $\alpha$ /XBP-1/TRAF2 parece não se relacionar com a ativação de IKK e consequente ativação de NF- $\kappa$ B.....	56
4.7 Grau de fosforilação da proteína IKK $\alpha/\beta$ .....	59
4.8 Expressão do RNAm de <i>Cebpa</i> .....	60
4.9. Expressão do RNAm de <i>Srebf1</i> .....	61
4.10 Expressão do RNAm de <i>Rela</i> (NF- $\kappa$ B) .....	62
4.11. Conteúdo proteico de NF $\kappa$ B p65 no núcleo e citoplasma das células L6....	63
4.12 Conteúdo proteico de NF $\kappa$ B p50 no núcleo e citoplasma das células L6.....	63
4.13 Ensaio de competição para a determinação da identidade das bandas para NF- $\kappa$ B.....	66
4.14 Palmitato aumenta a atividade de ligação do fator transcricional NF- $\kappa$ B à região promotora do gene <i>Slc2a4</i> .....	67
<b>5 RESUMO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>
<b>6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Ação e sinalização da insulina

Para realizar suas funções, as células precisam de um suprimento contínuo de glicose. Sua obtenção pode se dar pela dieta a partir dos polissacarídeos, bem como pela síntese endógena por meio da gliconeogênese no fígado e no rim (Kettelhut et al., 2012).

Em tecidos como o músculo, fígado e adiposo, a captação da glicose é estimulada pela insulina, um hormônio polipeptídico, composto por duas cadeias de aminoácidos, que através de complexos mecanismos é produzido pelas células B pancreáticas. A liberação do hormônio, que tem meia vida de seis minutos, é estimulada em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose, ácidos graxos e aminoácidos, entre outros reguladores (Youngren, 2007).

A insulina regula a homeostase da glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (diminuição da gliconeogênese e glicogenólise), bloqueando a lipólise e proteólise, aumentando a captação periférica de glicose (principalmente no músculo e tecido adiposo) e aumentando a síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio. Além disso, a insulina tem efeitos tardios na expressão de genes e síntese proteica, assim como na proliferação e na diferenciação celulares (Saltiel et al., 2001).

A via de sinalização da insulina envolve sua ligação ao receptor específico de membrana, denominado receptor de insulina (IR). Trata-se de, uma proteína tetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades alfa ( $\alpha$ ) e duas subunidades beta ( $\beta$ ), ligadas por pontes dissulfeto. As subunidades  $\alpha$  encontram-se extracelularmente, enquanto as subunidades  $\beta$  são proteínas transmembranas. A insulina liga-se a porção  $\alpha$ , levando a uma alteração conformacional que retira a ação inibitória da subunidade  $\alpha$  sobre a subunidade  $\beta$ , que se autofosforila em resíduos de tirosina. Uma vez ativa, a porção  $\beta$  fosforila substratos do receptor de insulina (IRS), que contêm múltiplos sítios de fosforilação em tirosina. Pelo menos 12 substratos para o IR já foram identificados (IRS1 a 6, Gab-1, Shc 1 a 3, p62, APS), sendo IRS-1 e IRS-2 os mais diretamente relacionados à resistência à insulina (Pessin et al., 2000; Saltiel et al., 2001).



A fosforilação das proteínas IRS leva a criação de sítios de ligação para outras proteínas como a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), promovendo sua ativação. A PI3K é um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A fosforilação dos sítios de tirosina das proteínas IRS leva a ativação da subunidade p85 da PI3K. A enzima catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol-3 fosfato, fosfatidilinositol-3,4 difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato. A ativação da PI3K aumenta a fosforilação em serina da proteína serina/treonina cinase B (Akt). A Akt/PKB por sua vez estimulará a translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana plasmática o que resulta em aumento da captação celular de glicose por difusão facilitada (Taniguchi et al., 2006; White et al., 1994; Zaid et al., 2008).

## 1.2 Transportadores de glicose

A glicose é uma molécula polar, insolúvel na membrana plasmática, e o seu transporte é realizado através de difusão facilitada, portanto a favor de seu gradiente de concentração, e dependente da presença de proteínas transportadoras (GLUTs) na superfície de todas as células. Além disso, em células epiteliais como as do intestino delgado e do túbulo renal, os processos de absorção e reabsorção respectivamente, ocorrem através de um processo de transporte acoplado ao íon sódio, o qual promove um transporte contra gradiente de concentração de glicose e a favor do gradiente de concentração de Na<sup>+</sup>, através de proteínas transportadoras (SGLTs) presentes no bordo em escova da célula epitelial (Machado, 1998).

Em meados dos anos oitenta, foi clonada a primeira proteína transportadora de glicose. Desde então, várias isoformas foram caracterizadas em diferentes tecidos e, atualmente, segundo as últimas revisões sobre a nomenclatura dos GLUTs, são conhecidas 12 diferentes isoformas destes transportadores, denominadas de GLUT1 a GLUT12, e mais um transportador de próton mioinositol (HMIT), que são codificadas por uma mesma família de genes de proteínas facilitadoras do transporte de solutos, SLC2A (*Solute Carriers 2A*) (Huang et al., 2007; Joost et al., 2001)

A isoforma GLUT4, cujo gene é denominado *Slc2a4*, é considerado transportador de glicose insulino-sensível, cujo principal papel é proporcionar a

captação de glicose insulino-mediada em tecidos adiposo e muscular. Nestas células, no estado basal, isto é sem estímulo com insulina, boa parte do GLUT4 localiza-se no compartimento intracelular. O estímulo insulínico determina a movimentação do GLUT4 deste compartimento em direção à membrana plasmática, e agudamente aumenta a captação de glicose, participando de forma importante no controle da homeostasia glicêmica, especialmente no estado pós-prandial (Joost et al., 2001; Machado et al., 2006).

### **1.3 Resistência periférica à insulina**

A resistência à insulina é um estado metabólico no qual concentrações fisiológicas de insulina produzem menor resposta biológica, reduzindo drasticamente a captação de glicose em tecidos periféricos e resultando em aumento de produção de glicose hepática. Cronicamente, a combinação de resistência à insulina e hiperinsulinemia reflete em alterações metabólicas e cardiovasculares que resultam em diabetes do tipo 2, dislipidemia, doença coronariana e hipertensão (DeFronzo, 2004; Kashyap et al., 2007).

Estudos apontam a relação da resistência à insulina à diversos fatores, como: hormônios derivados dos adipócitos, aumento da concentração circulante de ácidos graxos, atividade inflamatória e, mais recentemente, estresse de retículo endoplasmático (Bastard et al., 2006; Hotamisligil, 2010; Özcan et al., 2004; Ron et al., 2007).

Sabe-se que no nível celular, a resistência à insulina está associada a uma piora na via de sinalização insulínica com ou sem alteração na translocação do GLUT4 para a membrana plasmática (Shulman, 2000), associada invariavelmente a uma redução na expressão do GLUT4 (Corrêa-Giannella; Machado, 2013). Estes eventos, em última instância, provocam menor utilização de glicose pelo tecido, e alteração da homeostasia glicêmica.

Contudo, a relação entre ácidos graxos, resistência à insulina e GLUT4 é complexa, e o preciso mecanismo ainda não foi completamente elucidado, sobretudo no que se refere a provável participação do estresse de retículo endoplasmático.

#### **1.4 Sinalização em resposta ao acúmulo de proteínas não-enoveladas no retículo endoplasmático – UPR (“unfolded protein response”)**

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela importante, composta por uma membrana contínua onde ocorrem a síntese, o enovelamento e a maturação de proteínas destinadas às vias secretórias. Também está relacionado com translocação de proteínas através da membrana do RE, integração de proteínas transmembranas, síntese de fosfolípidios e esteróis e estocagem de íons cálcio que serão liberados para o citosol e exercerão controle em diversos processos intracelulares (Voeltz et al., 2002).

Agentes estressores que alterem a homeostase dos processos ocorridos no RE podem resultar no aumento da síntese de proteínas imaturas, também conhecidas como proteínas *unfolded* (não enoveladas) e *misfolded* (mal enoveladas), que podem levar a célula à disfunção e morte (Araki et al., 2003; Kaufman, 2002).

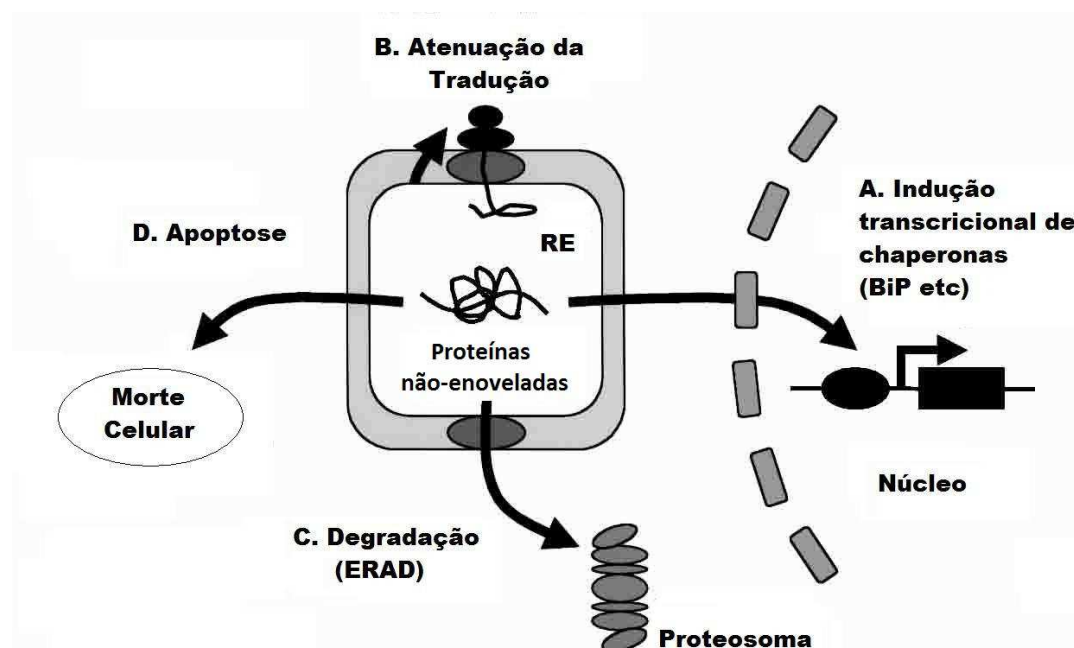
Várias condições podem perturbar as funções do RE, tais como, inibição da glicosilação de proteínas, redução da formação de pontes dissulfeto, depleção de cálcio no lúmen do RE, prejuízo no transporte de proteínas do RE para o Golgi, acúmulo de proteínas mal enoveladas, hipóxia, toxinas, excesso de ácidos graxos livres, infecções virais, etc. Tais disfunções no RE causam proteotoxicidade, e geram um estresse conhecido como estresse de RE (Malhotra et al., 2007; Scheuner et al., 2008).

O estresse do RE resulta na ativação de vias adaptativas conhecidas coletivamente como resposta a proteínas não-enoveladas (UPR, unfolded protein response). Esta é uma via de transdução de sinal que permite a comunicação entre o RE e o núcleo, ativando a expressão de diversos genes-alvos, envolvidos na manutenção da homeostase celular, por meio dos processos de translocação, glicosilação, degradação e transporte protéico (Ron et al., 2007; Schroder et al., 2005).

As células utilizam basicamente quatro respostas protetoras para sobreviverem em condições de estresse. A primeira resposta envolve a regulação positiva de genes codificando chaperonas incluindo Bip/GRP78 e GRP94, as quais aumentam a atividade de dobramento de proteínas. A segunda resposta consiste na atenuação da tradução para reduzir a síntese de novas proteínas e prevenir o

acúmulo de proteínas desdobradas. A terceira resposta, denominada sistema de degradação associado ao RE (ERAD), consiste na detecção das proteínas mal-dobradas, retro-transporte do RE para o citosol e degradação destas proteínas pelo sistema proteossoma 26S. A quarta e última resposta é a apoptose, que ocorre quando o grave e prolongado estresse de RE prejudica extensivamente o funcionamento do RE (Araki et al., 2003; Scheuner et al., 2008; Xu et al., 2005).

**Figura 1** – Esquema representativo das quatro respostas frente ao acúmulo de proteínas não enoveladas (Adaptado de Araki et al., 2003).



A proteína GRP78 (proteína regulada por glicose 78) também conhecida como Bip (proteína de ligação de imunoglobulinas) apresenta em sua porção C-terminal a sequência KDEL (Lisina – Acido aspártico – Acido glutâmico – Leucina), a qual opera como sinal de retenção no RE. Quando polipeptídeos mal enovelados se acumulam abundantemente no RE ocorre a ligação das chaperonas a estes polipeptídeos. A função de GRP78 não é, entretanto, realizar o enovelamento das proteínas, mas mantê-las no RE num estado favorável ao enovelamento (Lee, 2005).

A resposta ao estresse do RE é principalmente regulada por três proteínas transmembranas: cinase do retículo endoplasmático *PKR-like* (PERK), fator de

ativação transcricional 6 (ATF6) e enzima dependente de inositol-1 (IRE1). No estado basal, a chaperona GRP78, se liga ao domínio amino-terminal da PERK e IRE1, e ao domínio carboxi-terminal da proteína ATF6 mantendo-as inativas. O acúmulo de proteínas mal formadas no lúmen do RE leva ao recrutamento da GRP78 que se desconecta e libera as proteínas transmembranas que são sensores de UPR, e desta forma, tornam-se ativas (Scheuner et al., 2008; Schröder et al., 2005).

A ativação da PERK é a resposta mais imediata disparada pela UPR. A PERK é uma cinase serina-treonina que, quando liberada da GRP78, oligomeriza-se e induz, por autofosforilação, ativação de seu domínio cinase. A cinase PERK fosforila a EIF2 $\alpha$  (fator de iniciação da tradução subunidade alfa), causando inibição da síntese de proteínas, reduzindo a taxa de tradução de mRNA e consequente redução do aporte de proteínas no RE (Wali et al., 2009).

Em mamíferos são quatro as proteínas cinases que fosforilam EIF2 $\alpha$ : a proteína *PKR-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK), a proteína cinase R (PKR), *Heme-regulated EIF2 $\alpha$  kinase* (HRI) e a proteína cinase *general control nonrepressed-2* (GCN2). Entretanto, a via PERK/EIF2 $\alpha$  é a que possui maior significância biológica (Kaufman et al., 2002).

Algumas fosfatases que desfosforilam o fator EIF2 $\alpha$  e reconstituem a síntese global proteica foram caracterizadas: GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein-34) e *CreP* (constitutive repressor of EIF2 $\alpha$  phosphorylation). Estas fosfatases regulam a atividade da proteína fosfatase 1 (PP1), por meio de seus domínios C-terminais homólogos, e desfosforilam EIF2 $\alpha$ . CreP é um regulador constitutivo de PP1, enquanto GADD34 é induzido por ATF4 à jusante da via da PERK (Schroder et al., 2005).

O fator de iniciação eucariótico 2 (EIF2) desempenha um papel central na tradução do RNAm e em sua regulação. Neste processo, o iniciador-metionil tRNA (Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>) é transferido para a subunidade 40S ribossomal num complexo ternário consistindo de Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, EIF2 e GTP. Na sequência, o GTP ligado a EIF2 é hidrolisado a GDP e o complexo EIF2-GDP é liberado do ribossomo. O complexo EIF2-GDP é inativo e deve ser convertido em EIF2-GTP para regenerar o complexo ternário. Esta reação de reciclagem é estimulada pelo fator de troca do nucleotídeo guanina (GEF) EIF2B que é o alvo principal do controle traducional por um mecanismo conservado envolvendo fosforilação de EIF2. A fosforilação em

serina 51 da subunidade alpha de EIF2 (p-EIF2 $\alpha$ ) é um inibidor competitivo de EIF2B impedindo a reação de troca GDP-GTP. Assim, a fosforilação de EIF2 $\alpha$  efetivamente evita a formação do complexo EIF2-GTP-Met-tRNA<sup>i</sup> e inibe a síntese proteica global. (Kimball, 1999).

Embora a fosforilação de EIF2 $\alpha$  iniba a iniciação da tradução, paradoxalmente ela é requerida para a tradução seletiva de alguns mRNAs, como o do fator de transcrição ATF4 (fator de ativação transcricional 4). O ATF4 é um fator de transcrição que modula a expressão de diversos genes envolvidos em apoptose como o CHOP10/GADD153 (C/EBP-homologous protein / growth arrest and DNA damage-inducible protein-153), respostas anti-estresse oxidativo como o ERO1 (endoplasmic reticulum oxidoreductin), e ainda é responsável pela liberação do feedback negativo de eIF2 $\alpha$  por meio de GADD34 (growth arrest and DNA damage 34) (Kaufman, 2002; Malhotra et al., 2007). Ainda que a maior via de sinalização da PERK seja a fosforilação de EIF2 $\alpha$ , estudos sugerem que o fator NRF2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) pode também ser um substrato para a atividade da PERK. Este fator participa do mecanismo de defesa anti estresse oxidativo, ativando a transcrição de genes que codificam enzimas desintoxicantes como as subunidade A1 e A2 da glutathione S-transferase, NAD(P)H:quinona oxidoreductase,  $\gamma$ -glutamylcisteina sintetase, Heme oxigenase-1 (HO-1) e UDP-glucuronosyl transferase (Malhotra et al., 2007).

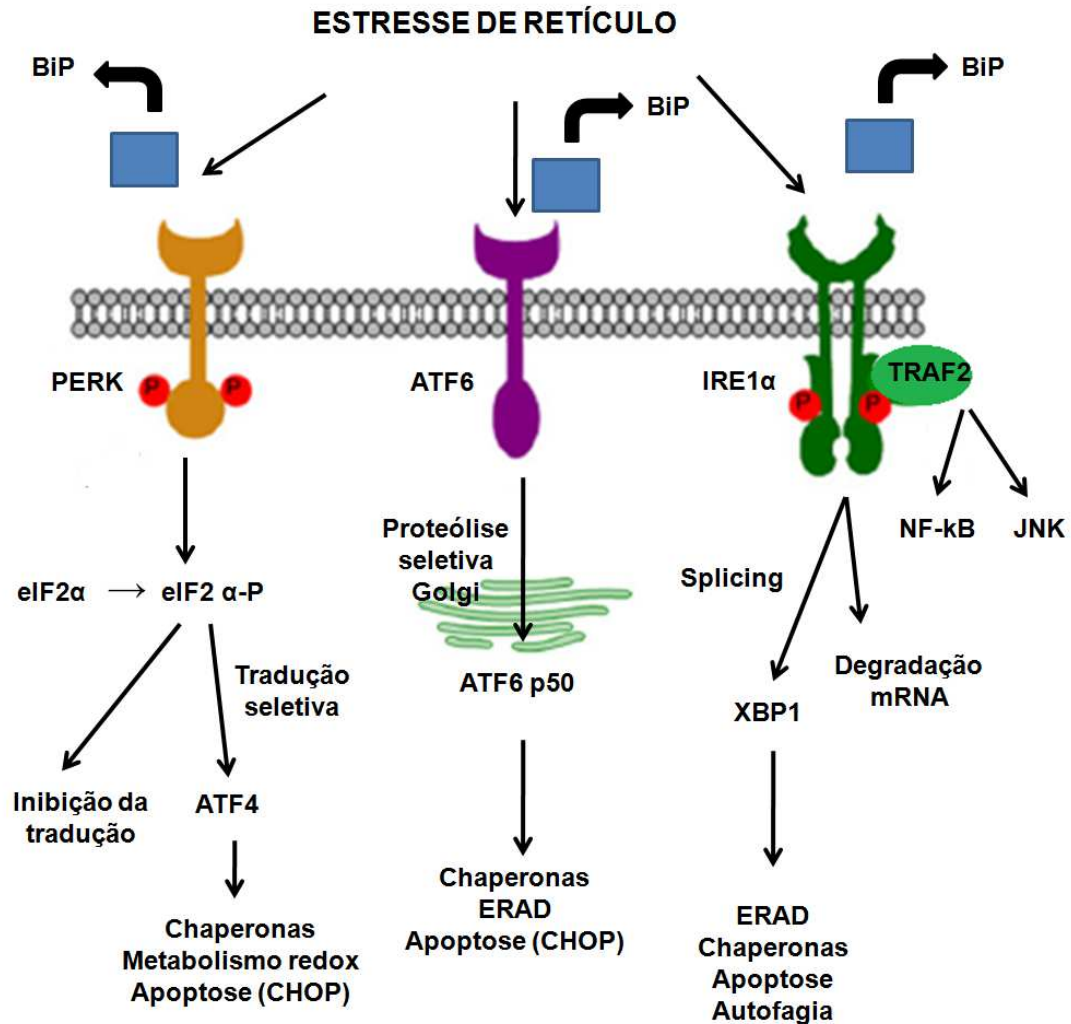
Num segundo momento, a liberação da GRP78 do ATF6 dispara um mecanismo de ativação distinto do anteriormente descrito. O ATF6 desligado da GRP78 transloca-se para o aparato de Golgi, onde proteases residentes (S1P e S2P) o clivam e liberam o fator de transcrição ativo no citosol. ATF6 atua aumentando indução dos genes que codificam processos proteolíticos. ATF6 é um co-ativador da UPR que interage com o fator nuclear Y (NF-Y) e com a proteína 1 ligante do domínio X-box (XBP-1) e é capaz de ligar os elementos responsivos do estresse de RE (ERSE) para ativar genes alvo (Scheuner et al., 2008). Interessantemente, este braço da UPR tem ganhado mais complexidade desde que estudos recentes identificaram uma série de homólogos ao ATF6 que são modulados pelo estresse de RE. Até a presente data, cinco proteínas foram descritas por apresentar uma região de grande similaridade com ATF6: Luman (CREB3), Oasis (CREB3L1), BBF2H7 (CREB3L2), CREBH (CREB3L3), e Tisp40 (CREB4, CREB3L4). Todos estes fatores bZip ATF6- relacionados são processados

no Golgi, de maneira semelhante ao próprio ATF6, mas suas funções na UPR não são completamente compreendidas (Hotamisligil, 2010).

Por fim, ocorre a participação da IRE1, que reside em sua atividade endoribonuclease (RNAse) e, a exemplo da via da PERK, tem um resultado final reparador que visa adaptar a célula ao acúmulo de proteínas mal-enoveladas. IRE1 $\alpha$  é a via mais conservada da UPR, entretanto pouco ainda é conhecido sobre sua regulação. A IRE1 $\alpha$  é uma serina/treonina proteína cinase e endoribonuclease que, sob ativação, inicia o splicing do mRNA codificando o fator transcricional X-Box-binding protein 1 (XBP-1). Em células de mamíferos, um íntron de 26 nucleotídeos é removido do XBP-1 mRNA, levando a um desvio no códon de leitura. A tradução deste novo quadro de leitura resulta na conversão do XBP-1 da forma “não-spliced” de 267 aminoácidos para a forma “spliced” com 371 aminoácidos que compreende o domínio de ligação ao DNA N-terminal original e adicionalmente um potente domínio C-terminal de trans-ativação (Malhotra et al., 2007). O XBP-1s (spliced) controla a regulação positiva de chaperonas, metabolismo redox e ERAD (Hetz et al., 2009).

Em adição ao *splicing* do RNAm de XBP-1, a ativação de IRE1 resulta no recrutamento da proteína TRAF2 (fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral do tipo 2). A formação deste complexo resulta na ativação da proteína cinase c-jun N terminal (JNK) (Schröder et al., 2005; Urano et al., 2000) e também participa na ativação de NF- $\kappa$ B (Hu et al., 2006; Zangh et al., 2011).

**Fig. 2** – Esquema representativo das três vias de sinalização da UPR: PERK, ATF6 e IRE1 $\alpha$  (Adaptado de Hetz et al., 2009).



### 1.5 Ácidos graxos, estresse de RE e resistência à insulina

Ácidos graxos livres (AGLs) são ácidos carboxílicos compostos por uma cadeia hidrocarbônica longa, não ramificada e com número par de átomos de carbono. Os AGLs podem ser saturados ou conter uma ou mais insaturações (duplas ligações) e são classificados como AGLs de cadeia curta (2 a 4 carbonos), média (6 a 10 carbonos) e longa (acima de doze carbonos) (Curi et al., 2002).

Os AGLs são nutrientes essenciais para o crescimento e o desenvolvimento do organismo. Além de importante substrato energético para o trabalho celular, estas biomoléculas atuam na composição estrutural da membrana plasmática, na acilação



de proteínas e no fornecimento de sinalizadores intracelulares, como eicosanóides, diacilglicerol, ceramidas e ácido fosfatídico que regulam a atividade de proteínas, como as pertencentes à via de sinalização da insulina (Savage et al., 2007) e à expressão de genes envolvidos no controle do metabolismo, crescimento e diferenciação celular (Jump, 2004).

Já foi demonstrado que a alteração nos níveis de alguns ácidos graxos livres circulantes, provenientes da ingestão excessiva de gordura e/ou dos estoques de gordura corporal, pode estar relacionada com o surgimento de desordens metabólicas como redução na sensibilidade à ação da insulina em adipócitos, músculo esquelético e hepatócitos assim como afeta a capacidade secretora de ilhotas pancreáticas (Kennedy et al., 2009; Ragheb et al., 2009; Wan et al., 2009).

Randle e colaboradores foram os primeiros a propor a existência de competição entre os substratos lipídeo e carboidrato, onde o aumento da concentração plasmática de AGLs reduz a captação e metabolismo da glicose estimulada pela insulina. Ele sugeriu que o aumento da oxidação de AGLs seria responsável pela elevação de acetil CoA mitocondrial com consequente inativação da piruvato desidrogenase. Isto causaria um aumento de citrato, levando à inibição da fosfofrutoquinase e o acúmulo de glicose-6-fosfato. Esta elevação de glicose-6-fosfato inibe a hexocinase o que resultaria na diminuição da captação de glicose (Boden et al., 2002).

Porém, estudos posteriores mostraram que a exposição crônica aos AGLs livres prejudicava a via de sinalização da insulina, reduzindo a fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) e a atividade da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e com provável redução da síntese e da translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana plasmática (Boden et al., 2002; Lorenzo et al., 2008)

O palmitato (C16:0) é um dos ácidos graxos saturados mais abundantes no plasma de humanos e roedores (Lambertucci et al., 2008). Este tem sido relatado como importante causa de resistência insulínica periférica caracterizada por prejudicada captação/disponibilidade de glicose no músculo esquelético (Tsuchiya et al., 2010).

A exposição aos AGLs leva a ativação de mecanismos inflamatórios via cinases estresse-relacionadas, tais como, a I $\kappa$ B cinase (IKK), c-Jun N terminal cinase (JNK) e proteína cinase C (PKC), que provocam a fosforilação em

serina e degradação do IRS-1 (De Luca et al., 2008). Os AGLs aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e ativação dos receptores Toll-like (TLRs) (Bloch-Damti et al., 2005; Senn, 2006; Wellen et al., 2005).

Os AGLs aumentam a produção celular de ceramidas e/ou diacilgliceróis (DAG), e estes segundos mensageiros lipídicos, por sua vez, reduzem a sensibilidade à insulina através da fosforilação do IRS-1 em serina/treonina (Peng et al., 2011).

Os AGLs também afetam as respostas celular ao estresse causando elevação das espécies reativas de oxigênio (EROS), disfunção mitocondrial e, provavelmente, estresse de retículo endoplasmático. Tem sido proposto que os AGLs saturados induzem estresse de RE alterando os estoques de cálcio luminal e pela alteração da morfologia da membrana do RE devido a uma maior incorporação de fosfolípidos nesta membrana (Peng et al., 2011). A literatura aponta também que o acúmulo de AGLs de cadeia longa, como o palmitato, está associado com disfunção e morte celular (Listenberger et al., 2001), provavelmente em resposta ao estresse de RE, em vários tipos de célula e no tecido muscular (Bachar et al., 2009; Hommelberg et al., 2009; Liu et al., 2009).

Tem sido verificado que o palmitato pode causar estresse de RE em células B-pancreáticas (Green et al., 2011), hepatócitos (Achard et al., 2010), adipócitos (Guo et al., 2007), células-tronco mesenquimais (Lu et al., 2012), células neuronais (Mayer et al., 2010) e em células musculares C2C12 (Deldicque et al., 2010; Peng et al., 2011; Rieusset et al., 2012; Salvadó et al., 2013).

No entanto, o exato mecanismo molecular relacionando ácidos graxos, resistência à insulina e estresse de retículo endoplasmático no músculo esquelético ainda não está completamente elucidado.

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

Desta forma, acredita-se que o estudo dos efeitos do palmitato na regulação da expressão do GLUT4 pode ajudar na prevenção e/ou tratamento de doenças relacionadas com o quadro de estresse de retículo endoplasmático e resistência à insulina no músculo esquelético.

### **1.6 As vias do estresse de RE relacionadas à resistência à insulina**

Özcan e colaboradores (2004) propuseram que o estresse de RE era uma ligação molecular entre a obesidade, a ação da insulina e o diabetes. A obesidade está associada com inflamação crônica, acúmulo excessivo de lípidos e disponibilidade excessiva de nutrientes que impõem sinais de estresse ao RE, que por sua ligação com as vias metabólicas, pode prejudicar a sinalização da insulina e, assim, promover a resistência ao hormônio e eventual desenvolvimento de diabetes do tipo 2. Os mesmos autores mostraram que ratos deficientes em XBP-1, um fator transcricional que modula a resposta ao estresse do RE, desenvolviam resistência à insulina por mecanismos que envolvem a ativação de JNK e fosforilação em serina do IRS1 (Özcan et al., 2004).

Nakatani e colaboradores (2005) mostraram que pelo aumento da expressão de ORP150, uma chaperona que protege as células do estresse RE, houve melhora da resistência à insulina e melhora da tolerância à glicose em fígado de camundongos diabéticos. Por outro lado, já foi evidenciado (Araki et al., 2003) o envolvimento do estresse de RE na apoptose de células B pancreáticas via CHOP em camundongos do tipo Akita.

As duas principais vias inflamatórias que interferem na ação da insulina, IKK e JNK, são ativadas em resposta ao estresse de RE (Zhang et al., 2008). A via IKK/NFκB pode ser ativada tanto por IRE1α, que interage com o IKK através da molécula adaptadora TRAF2, quanto pela ativação da PERK e ATF6, que leva à degradação do IκB, deixando livre a migração do fator de transcrição NFκB para o núcleo (Hotamisligil, 2010). A ativação de JNK pode se dar pela sinalização de IRE1α que se liga à TRAF2 (TNF-receptor-associated factor 2) e ativa ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1). A JNK ativada induz a expressão de genes inflamatórios pelo acionamento do fator transcricional AP1 (activator protein 1) e participa de processos de morte celular (Lin, et al., 2008).

## 1.7 Elementos reguladores do gene *Slc2a4* modulados por ácidos graxos e estresse de RE

Ácidos graxos e/ou seus metabólitos bioativos podem controlar a transcrição gênica de maneira positiva ou negativamente, regulando a estabilidade de mRNAs e a ativação de fatores transcricionais (Duplus et al., 2000). Esta regulação é atingida pela ligação direta do ácido graxo ao fator transcricional ou por mecanismos indiretos nos quais os ácidos graxos regulam a via de sinalização, a fosforilação, a ubiquitinação ou a clivagem proteolítica do fator transcricional (Jump et al., 2013).

Em resposta ao estresse de RE, as vias PERK, IRE1 e ATF6 também são capazes de ativar a transcrição gênica, regulando positivamente chaperonas, componentes do sistema proteosoma e apoptótico. A UPR é orquestrada pela coordenada ativação transcricional de múltiplos genes e uma concomitante mudança conformacional de mRNAs que são traduzidos (Kaufman, et al., 2002).

Há relatos na literatura que alguns fatores de transcrição descritos como reguladores do gene *Slc2a4* sejam modulados por ácidos graxos e também pelas vias da UPR. Dentre estes podemos citar o sterol regulatory element-binding protein (SREBP), o nuclear factor kappa B (NF-κB) e o CCAAT/enhancer-binding protein-α (C/EBPα).

Diversos estudos apontam SREBP-1 (gene *Srebf1*) como um regulador positivo do *Slc2a4* (Im et al., 2006; Furuya et al., 2012). A família de fatores de transcrição SREBPs possui 3 isoformas: SREBP-1a e SREBP-1c que são provenientes de um único gene o *Srebf1*, e SREBP-2 derivado do gene *Srebf2*. SREBP-1c está envolvido na síntese de ácidos graxos e lipogênese, o SREBP-2 na síntese de colesterol e a isoforma SREBP-1a em ambos os mecanismos. O SREBP-1a e SREBP-1c são produzidos por meio de um sítio alternativo de início de transcrição onde diferem em seu primeiro exon (exon 1a e 1c), já os outros exons são comuns para ambas as isoformas. Os SREBPs ficam retidos no RE por meio de sua interação com SCAP (proteína ativadora de clivagem) e INSIG (gene induzido pela insulina). Em resposta a baixas concentrações de esteróis ou insulina a ligação entre INSIG-SCAP/SREBP é rompida e desta forma o complexo SCAP/SREBP é transportado ao complexo de golgi. Neste local por ação das proteases S1P (protease serina-1) e S2P (Metaloprotease-2) há a liberação do domínio amino-terminal de SREBP, responsável pela sua atividade transcricional, levando à ligação,

na forma de dímero, ao seu elemento responsivo localizado em genes envolvidos no controle do metabolismo lipídico, de colesterol e glicídico (Colgan et al., 2007).

O efeito dos AGs insaturados, reduzindo a degradação da proteína INSIG, e conseqüentemente diminuindo a geração da forma ativa de SREBP-1, já foi descrito na literatura (Lee et al., 2008), mas a participação dos AGs saturados ainda é pouco estudada.

Estudos têm demonstrado que a ativação de SREBP também ocorre durante o estresse de retículo. As três grandes vias da UPR têm sido implicadas na regulação da lipogênese celular, e o RE desempenha papel importante na síntese de ácidos graxos e metabolismo do colesterol (Hotamisligil, 2010). É presumível também que a UPR resulte no aumento da expressão de enzimas relacionadas à síntese lipídica de modo a aumentar a área de superfície do retículo endoplasmático no estresse (Tsai et al. 2011).

Condições que causam estresse de RE ou apoptose induzem a ativação de SREBP independentemente do conteúdo intracelular de colesterol (Colgan et al., 2007). Como pode ser evidenciado por alguns trabalhos, o estresse de RE induz a clivagem de ATF6 pelas mesmas proteases (S1P e S2P) que processam o SREBP e há evidências que o processamento de SREBP é também regulado por PERK/EIF2 $\alpha$  (Zha et al., 2012).

Estudos têm demonstrado que ácidos graxos saturados como o palmitato induzem resistência à insulina em células musculares, e isto envolveria a ativação de NF- $\kappa$ B (Hommelberg et al., 2009; Sinha, et al., 2004; Zhang et al., 2010). Vários trabalhos têm demonstrado também que ocorre ativação do NF- $\kappa$ B em resposta ao estresse de retículo via IRE1/ TRAF2 e via PERK/ EIF2 $\alpha$  (Hu et al., 2006; Jiang et al., 2003; Kaneko et al., 2003; Kitamura, 2009; Pahl et al., 1997).

O NF- $\kappa$ B é um complexo homo ou heterodimérico formado pelas proteínas contendo o domínio Rel, as quais são denominadas como *Rela* (p65), *Nfkb1* (p50/p105), *Nfkb2* (p52/p100), *c-Rel* e *Relb* (Ghosh et al., 2002).

Ambas as subunidades p50 e p52 são sintetizadas como proteínas precursoras longas, p105 e p100, as quais agem no citosol similarmente à proteína inibidora I $\kappa$ B, inibindo a atividade de NF- $\kappa$ B. A forma ativada do NF- $\kappa$ B é, em geral, um heterodímero composto pela subunidade p65 associada à outra subunidade, p50 ou p52, sendo o heterodímero p65-p50 o complexo mais comum e abundante. Na

maioria das células, NF- $\kappa$ B reside no citosol na forma de heterodímero ligado ao inibidor proteico, I $\kappa$ B. Em mamíferos, há três principais I $\kappa$ Bs: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ . A ativação de NF- $\kappa$ B tipicamente envolve a fosforilação de I $\kappa$ B pelo complexo I $\kappa$ B cinase, composto por IKK[1]- $\alpha$ , IKK[2]- $\beta$  e IKK[3]- $\gamma$ , sendo esta última conhecida por regulador essencial de NF- $\kappa$ B (NEMO). I $\kappa$ B ao ser fosforilado fica susceptível à ação da ubiquitina ligase, sendo a seguir degradado e por fim, dissocia-se das subunidades heterodiméricas de NF- $\kappa$ B. O NF- $\kappa$ B migra para o núcleo, liga-se a sequências de DNA, conhecidas como sítios  $\kappa$ B, em regiões promotoras de genes alvos de seu controle (Hayden et al., 2008).

É sabido que o NF- $\kappa$ B regula genes relacionados à apoptose, adesão celular, resposta imune inata e adaptativa, inflamação, estresse celular, remodelamento tecidual e resistência à insulina (Perkins, 2007).

O NF- $\kappa$ B atua na transcrição de citocinas pró inflamatórias como o TNF- $\alpha$  (Glezer et al., 2000), que por sua vez, estão relacionadas a prejuízos na via de sinalização insulínica e diminuição da translocação dos transportadores de glicose GLUT4 (Hotamisligil et al., 1993). Além disso, o próprio NF- $\kappa$ B tem efeito negativo sobre a expressão do transportador de glicose GLUT4, diminuindo a transcrição do gene *Slc2a4* (Furuya et al., 2013; Silva et al., 2005).

Os CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs) compreendem uma família de fatores de transcrição b-zip (domínio básico de ligação do DNA), que contém um domínio *zipper* de leucina necessário para a sua dimerização. Sua expressão é regulada em muitos níveis durante condições fisiológicas e/ou patológicas pela ação de fatores que incluem hormônios, citocinas, nutrientes, toxinas e agentes que causam estresse celular (Ranji et al., 2002).

Estes fatores transcricionais regulam uma variedade de genes envolvidos em uma ampla gama de processos fisiológicos, incluindo as funções imunológicas bem como a diferenciação e proliferação celular.

Atualmente, existem 6 diferentes isoformas descritas: C/EBP $\alpha$  (alpha),  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gama),  $\delta$  (delta),  $\epsilon$  (épsilon) e  $\zeta$  (zeta) (White et al., 2010).

O fator de transcrição C/EBP $\alpha$  (gene *Cebpa*) é expresso predominantemente no fígado, tecido adiposo e músculo esquelético e é um fator importante para a diferenciação dos adipócitos. É sabido que o *Slc2a4* tem sítios de ligação para C/EBP $\alpha$  em seu promotor e que este último o regula positivamente (Im et al., 2007).

O C/EBP $\zeta$  é mais conhecido como proteína homóloga ao C/EBP (CHOP10) e também chamado por muitos autores de *growth arrest and DNA damage-inducible gene 153* (GADD153). O gene que codifica esta proteína é denominado *Ddit3* (DNA-damage-inducible transcript 3). Este é outro membro da família C/EBP caracterizado por fazer parte das vias de apoptose mediada pelo estresse de RE. GADD153/CHOP10 não apresenta um domínio de transativação amino-terminal e contém duas prolínas no domínio de ligação ao DNA, e em virtude disso, o heterodímero de CHOP10/GADD153 com outras isoformas da família C/EBP age como um inibidor endógeno. A ligação de GADD153/CHOP10 a outros C/EBPs, atua como um inibidor endógeno de sua ativação, mas também tem importante papel na ativação de certos genes envolvidos nas respostas de estresse de RE (Miller et al., 2007).

Há indícios de que GADD153/CHOP10 poderia proporcionar a diminuição do GLUT4 pela formação de heterodímeros com C/EBP $\alpha$ , diminuindo a sua função e sua disponibilidade para ativar o gene *Slc2a4* (Miller et al., 2007).

## 1.8 Justificativa

Diante dos fatos apresentados, torna-se relevante investigar a participação do estresse de retículo na gênese da resistência à insulina, com foco na regulação da expressão de *Slc2a4*/GLUT4, uma vez que este transportador é etapa chave final para a disponibilização de glicose à célula muscular. Assim, investigar a contribuição das vias PERK/EIF2 $\alpha$  e IRE1/XBP-1/TRAF2 na ativação do NF- $\kappa$ B e também de outros fatores transcricionais que atuam sobre a expressão do *Slc2a4*/GLUT4 seria uma ferramenta de grande utilidade clínica, uma vez que, conhecendo os mecanismos moleculares que envolvem a expressão da proteína transportadora de glicose podemos planejar o desenvolvimento de novas medidas terapêuticas para as doenças metabólicas como o diabetes tipo 2 e obesidade.

## 2 OBJETIVOS

---

### Objetivo geral:

O presente trabalho teve em vista a investigação da ativação de vias de estresse de RE, e a possível ativação de fatores transcricionais reguladores da expressão de *Slc2a4*, em resposta ao tratamento de células musculares L6 com ácido palmítico.

### Estratégias experimentais:

Investigar em células L6 tratadas com ácido palmítico:

- O conteúdo proteico de GLUT4 e a expressão do gene *Slc2a4*;
- O conteúdo do mRNA do NF- $\kappa$ B e sua atividade de ligação na região promotora do gene *Slc2a4*;
- O conteúdo proteico das subunidades p50 e p65 de NF- $\kappa$ B no núcleo e citoplasma celular.
- A ativação das vias PERK/EIF2 $\alpha$  e IRE1 $\alpha$ /TRAF2;
- A expressão de C/EBP $\alpha$  e de SREBP1;
- O grau de ativação/fosforilação da proteína cinase IKK $\alpha$ / $\beta$ ;
- Outras possíveis vias envolvidas na redução da proteína transportadora de glicose GLUT4 e relacionadas à resistência à insulina palmitato-mediada.



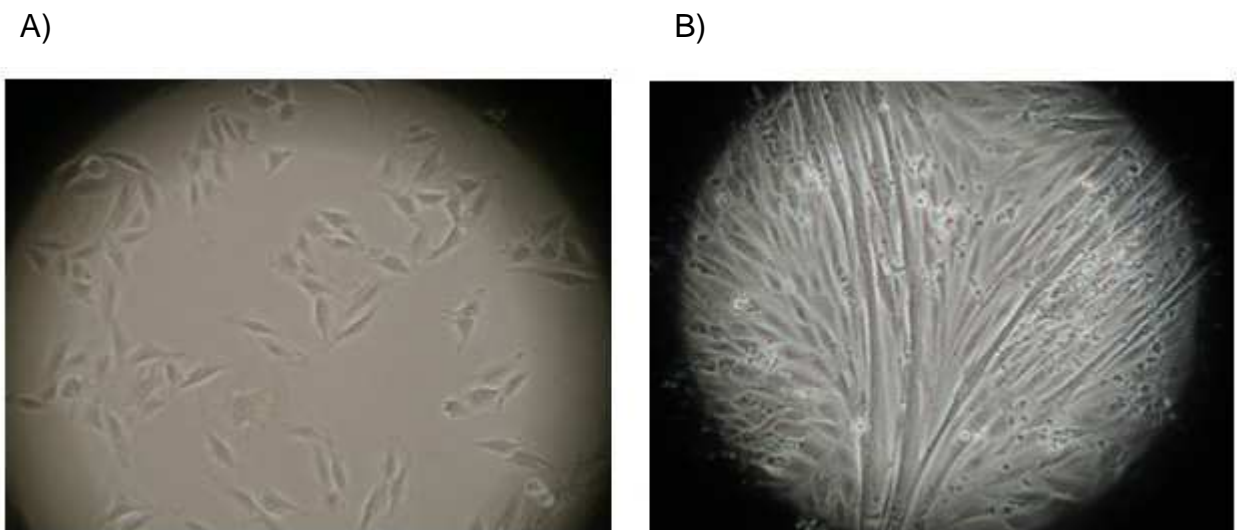
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 3.1 Linhagem Celular

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

**Fig. 3** – Imagem obtida por microscópio invertido dos mioblastos em (A) e da confluência desejada dos miotubos em (B) após 6 dias de diferenciação



#### 3.2 Propagação e diferenciação das células

Alíquotas de células foram descongeladas e cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> utilizando-se o meio de propagação Dulbecco MEM (DMEM) (25 mM de glicose, Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, BR) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, BR), 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (Mitsumoto; Klip, 1992). Permaneceram em incubadora Nuair a 5% de CO<sub>2</sub>, 37 °C até atingirem confluência de cerca de 70%. Neste ponto, o meio de propagação foi substituído por

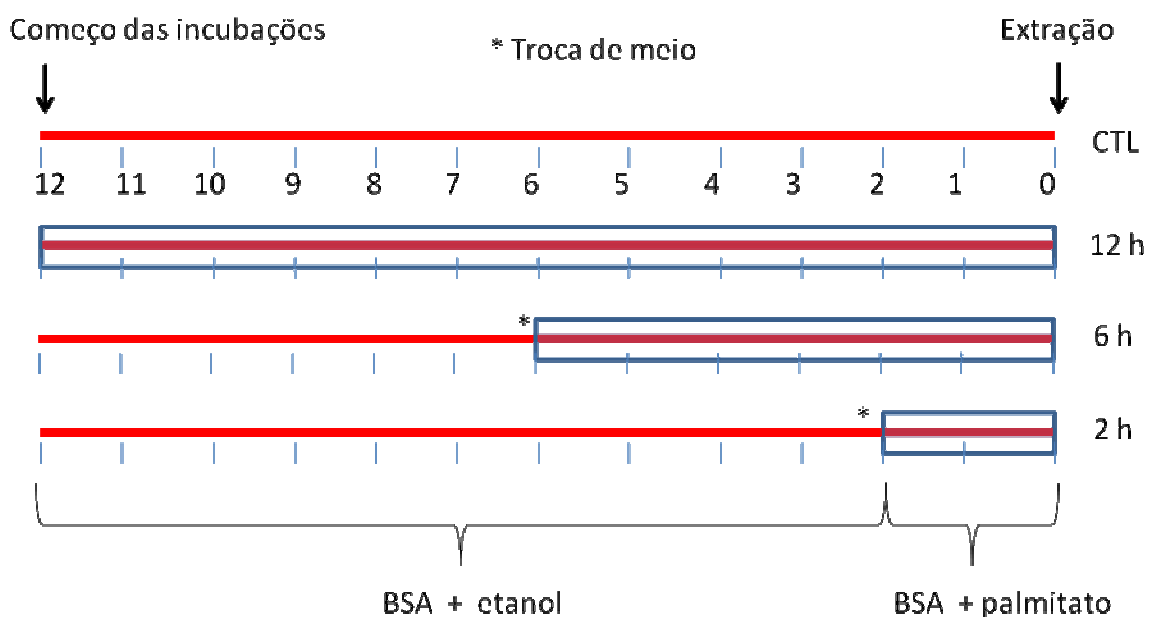
meio de diferenciação contendo, DMEM (25 mM de glicose) suplementado com 2% de SFB e 1% de antibiótico (penicilina/ estreptomicina).

Após seis dias de diferenciação (Yonemitsu et al., 2001) as células foram restringidas de soro usando DMEM (5,5 mM de glicose) suplementado com 1% de albumina bovina sérica (BSA) e de antibiótico (Karaskov et al., 2006; Hommelberg et al., 2009) por 12 horas. Posteriormente, os tratamentos com palmitato foram iniciados (Figura 4).

### 3.3 Tratamentos

O palmitato (Sigma-Aldrich, P5585, St. Louis, MO, USA) foi dissolvido em etanol numa solução estoque de 150 mM antes da adição ao meio. Dessa solução estoque foi pipetado 25 uL em cada garrafa contendo 5 mL de meio DMEM (5,5 mM de glicose) suplementado com 1% de BSA, de forma que a concentração final de palmitato foi de 0,75 mM. Os tempos de incubação seguiram conforme o esquema apresentado abaixo:

**Fig. 4** – Esquema das incubações realizadas com o palmitato ao longo de 12 horas.



As amostras controle (CTL), também foram incubadas na presença do veículo etanol na concentração de 0,5% e experimentos prévios demonstraram que essa dose não é tóxica para as células (Haber et al., 2003; Lambertucci et al., 2008).

### **3.4 Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT**

A citotoxicidade foi avaliada através do método que se baseia na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, a qual quando ativa, é capaz de metabolizar o reagente MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) em um composto colorido denominado formazan (Mosmann, 1983).

Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de *formazan* de cor azul púrpura que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Sendo a endocitose um mecanismo fundamental das células vivas, o ensaio do MTT tem sido usado frequentemente como ensaio de viabilidade celular.

Para o ensaio de viabilidade as células L6 foram cultivadas em placas de 12 poços e os tratamentos com palmitato foram realizados conforme descrito anteriormente. Na sequência, o meio de tratamento foi removido e substituído por meio sem soro e sem anti-biótico acrescido de 10% de solução de MTT (5 mg/ml) em PBS, durante 4 horas, a 37 °C e na ausência de luz. Após esta incubação, os cristais de *formazan*, resultantes da redução do MTT, foram dissolvidos numa solução de HCL 0,04 N em isopropanol e para isso as placas ficaram em agitação vigorosa em shaker durante 15 minutos ao abrigo da luz. Por fim a absorbância foi medida em espectrofotômetro ( $\mu$ Quant – Biotek Instruments) a um comprimento de onda de 570 nm, com um filtro de referência de 690 nm. Os valores da viabilidade celular foram expressos em porcentagem relativamente à absorbância determinada nas células sem tratamento.

### **3.5 Preparação das amostras para a quantificação da proteína de membrana GLUT4 por Western Blotting**

Para a quantificação da proteína GLUT4 as células L6 foram extraídas das placas de 25 cm<sup>2</sup> com tampão de homogeneização TRIS 10 mM; EDTA 1 mM, sacarose 250 mM, pH 7,4, para obtenção de um conjunto de membranas totais (MT), que envolve, resumidamente, uma centrifugação a 2350 rpm durante 10 minutos, 4 °C. O sobrenadante foi guardado e o precipitado ressuspensão em mesmo tampão (1/3 do volume inicial) e submetido novamente à centrifugação (2350 rpm) por 10 minutos, à 4 °C. Os dois sobrenadantes foram somados e então submetidos à uma ultra-centrifugação à 41000 rpm durante 75 minutos, à 4 °C. O sedimento correspondendo à fração de membranas totais (MT) foi ressuspensão com o mesmo tampão de homogeneização e estocado a -20 °C até a utilização.

### **3.6 Preparação das amostras para a quantificação de proteínas citosólicas e/ou fosforiladas por Western Blotting**

Para a extração de proteínas citosólicas as células L6 foram removidas das placas com PBS 1X (NaCl 0,8%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>[12H<sub>2</sub>O] 0,115%, KCl 0,02%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,02%) e submetidas a uma centrifugação de 1500 g. Em seguida, o pellet foi ressuspensão em de tampão de extração SDS 1%, Tris (pH 7,4) 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 100 mM e as amostras foram sonicadas, submetidas a uma banho de 96 °C por 10 minutos e na centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, parte do sobrenadante das amostras foi utilizado para determinação do conteúdo protéico pelo método de Bradford e outra parte foi solubilizada em tampão Laemmli para a Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

### **3.7 Método Bradford para dosagem de proteína**

A concentração de proteínas totais na amostra foi determinada pelo emprego de reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate - Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A ligação à proteína ocorre quando absorção máxima da solução ácida Coomassie Brilliant Blue G-250 muda de 465 para 595 nm.

Foram pipetados 6  $\mu\text{L}$  de amostra e 294  $\mu\text{L}$  de solução de Bradford nas placas e a leitura foi feita por espectrofotômetro (595 nm), utilizando-se uma curva de calibração de albumina bovina sérica (BSA) de 0,05 a 1,0 mg / mL.

### **3.8 Ensaio de Western Blotting**

Conhecidas as concentrações protéicas das diferentes amostras de tecido, estas foram submetidas ao método de “Western Blotting”. O método envolve os seguintes passos:

#### **3.8.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Amostras de frações de membrana (30  $\mu\text{g}$  de proteína / lane) foram solubilizadas em tampão de Laemmli (glicerol 15%, Tris 0,05 M, Bromophenol Blue 0,05%, SDS 9%, 2-Mercaptoetanol 6%) e, então, submetidas a fervura durante 5 minutos. Após fervura as amostras foram resfriadas e aplicadas no sistema de corrida (gel). Para a proteína GLUT4 (55 kDa), TRAF2 (50 kDa), XBP-1 (56 kDa), NFkB p50 e NFkB p65 foi utilizado gel de poliacrilamida com malha de 10%T e 2,7%C, para p-PERK (125 kDa), PERK (125 kDa) e IRE1 $\alpha$  (120 kDa) gel de 6,5%T e 2,7%C, para GADD153 (31 kDa), p-eIF2 $\alpha$  (36 kDa) e eIF2 $\alpha$  (36 kDa) gel com malha de 12%T e 2,7%C, para p-IKK $\alpha/\beta$  (85-87 kDa), GRP78 (78 kDa) e GADD34 (73 kDa) gel com malha de 8%T e 2,7%C.

A eletroforese vertical foi iniciada sob voltagem constante em 40 mV até que ocorresse o empacotamento das amostras, o que podia ser observado na transição dos dois géis (aproximadamente 1 hora e 30 minutos). Posteriormente, foi aplicada uma corrente constante de 40 mA para a corrida no gel de separação (aproximadamente 4 horas e 30 minutos), utilizando-se como tampão de corrida Tris 25 mM, Glicina 190 mM, SDS 0,1%, EDTA 2 mM, pH 8,3. Juntamente com as amostras sempre foi colocado um padrão de proteínas de conhecidos pesos moleculares (marcadores), o que facilitava a localização da proteína desejada para o estudo.

### 3.8.2 Transferência eletroforética

Após a separação das frações protéicas em gel de poliacrilamida, foi realizada a transferência eletroforética para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE healthcare, AMERSHAM Biosciences, UK).

A transferência das proteínas GLUT4, eIF2 $\alpha$ , TRAF2, GADD153, XBP-1, NF-kB p50 e 65 foi realizada sob corrente constante de 40 mA, em temperatura de 4 °C por 16 horas, utilizando-se como tampão de transferência Tris 12,5 mM, Glicina 95 mM, metanol 20%, pH 8,3. Para p-PERK, IRE1 $\alpha$ , GADD34, IKK $\alpha/\beta$  e GRP78 a transferência foi feita em corrente de 250 mA, a 4 °C por 1 hora. A qualidade da transferência foi verificada corando-se o gel pós-transferência com azul brilhante de Comassie.

### 3.8.3 Imunodeteção (Immunoblotting) - ECL (Enhanced Chemiluminescence)

Após a transferência eletroforética, iniciou-se o processo de imunodeteção. Primeiramente, realizou-se um bloqueio inespecífico com leite durante 12 horas a 4 °C e, em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos a seguir descritos:

- GLUT4 (anticorpo comercial de coelho – Millipore – cat#07-1404) com diluição de 1:3000 em PBS 1X + BSA 8%), durante 12 h a 4 °C.
- Phospho-PERK (Thr 981) (anticorpo comercial de coelho policlonal e fosforilado em tirosina – Santa Cruz Biotechnology, Incorporation – sc-32577) com diluição de 1:1000 em TBS 1X + BSA 3%), durante 12 h a 4 °C.
- PERK (H-300) (anticorpo comercial de coelho policlonal – Santa Cruz Biotechnology, Incorporation – sc13073) com diluição de 1:1000 em TBS 1X + BSA 3%), durante 12 h a 4 °C.
- Phospho-eIF2 $\alpha$  (Ser 51) (anticorpo comercial de coelho policlonal e fosforilado em serina 51 – Abcam – ab 32157) com diluição de 1:2000 em TBS 1X + BSA 3%), durante 12 h a 4 °C.

- eIF2 $\alpha$  (FL-315) (anticorpo comercial de coelho policlonal – Santa Cruz Biotechnology, Incorporation – sc11386) com diluição de 1:500 em TBS 1X, durante 12 h a 4 °C.
- IRE1 $\alpha$  (H-190) (anticorpo comercial de coelho polyclonal - Santa Cruz Biotechnology, Incorporation – SC-20790) com diluição de 1:1000 em TBS 1X + BSA 3%), durante 12 h a 4 °C.
- GADD34 (C-19) (anticorpo comercial de coelho polyclonal - Santa Cruz Biotechnology, Incorporation – sc-825) com diluição de 1:1000 em TBS 1X + BSA 3%), durante 12 h a 4 °C.
- GADD 153 (F-168) - (anticorpo comercial de coelho polyclonal - Santa Cruz Biotechnology, Incorporation – sc-575) com diluição de 1:500 em TBS 1X, durante 12 h a 4 °C.
- TRAF2 (C-20) (anticorpo comercial de coelho policlonal – Santa Cruz Biotechnology, Incorporation – sc-876) com diluição de 1:1000 em TBS 1X + BSA 3%), durante 12 h a 4 °C.
- Phospho-IKK $\alpha/\beta$  (Ser 180/181) (anticorpo comercial de coelho policlonal – Cell Signaling Technology - #2681) com diluição de 1:500 em TBS 1X + BSA 5%), durante 12 h a 4 °C.
- XBP-1 (anticorpo comercial de coelho policlonal – Abcam – ab37152) com diluição de 1:1000 em TBS 1X + BSA 3%), durante 12 h a 4 °C.
- NFkB p50 (C-19) (anticorpo comercial de cabra policlonal – Santa Cruz Biotechnology, Incorporation – sc-1190) com diluição de 1:500 em TBS 1X + BSA 1%), durante 12 h a 4 °C.
- NFkB p65 (anticorpo comercial de coelho policlonal – Abcam – ab7970) com diluição de 1:500 em TBS 1X + BSA 1%), durante 12 h a 4 °C.
- GRP78 BiP (anticorpo comercial de coelho monoclonal – Abcam – ab108615) com diluição de 1:500 em TBS 1X + BSA 3%), durante 12 h a 4 °C.

Posteriormente as membranas receberam uma série de lavagens com 10 ml de solução de lavagem (TBS 1X + 0,05% Tween 20). Em seguida, foi feita uma incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (GE Healthcare, USA), marcado com peroxidase (HRP), diluído 1:10000, em solução bloqueadora (1% de

leite em pó em TBS-Tween 0,05%) durante 1 hora. A membrana foi lavada vigorosamente com solução de lavagem e colocada em contato com solução de detecção (H<sub>2</sub>O destilada + Luminol + Ác. P-Cumárico + Tris 1M [pH 8,5] + Peróxido de Hidrogênio) por 1 minuto.

Por fim, a membrana foi exposta a Hyperfilm® (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) por períodos de 1,5 a 3 minutos para detecção das bandas resultantes. Após este período o filme foi revelado com solução reveladora e reforçadora (KODAK), sendo evidenciados os “blots” correspondentes à proteína transportadora GLUT4.

#### **3.8.4 Expressão dos resultados**

O Filme foi escaneado e as imagens foram analisadas por densitometria utilizando-se o software Image Master1D® (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido).

A intensidade dos “blots” e os resultados em cada membrana foram normalizados considerando-se 100% o valor obtido pelo controle (CTL).

Os resultados obtidos a partir desta análise densitométrica foram então expressos em unidades arbitrárias por micrograma de proteína (UA/μg), calculado a partir da divisão entre área estimada do blot (cálculo do número de pixels da imagem) pela quantidade de proteína aplicada na eletroforese.

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA com pós-teste de Bonferroni quando apropriado). Em todos os resultados foram adotados 5% como limite de significância estatística ( $p < 0,05$ ).

### **3.9 Ensaio de RT-qPCR**

#### **3.9.1 Extração de RNA total**

Amostras de células musculares L6 cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> foram inicialmente lavadas com PBS, para retirar o excesso de meio de cultura e, posteriormente, destinadas a extração de RNA total, com reagente Trizol®



(Invitrogen Life Technologies, USA), conforme instruções do fabricante. Após esta etapa, a concentração de RNA total das amostras e o grau de pureza destas, determinado pela razão  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ , foi avaliado por espectrofotometria (Gene Quant II, Pharmacia Biotech, UK). A integridade do RNA extraído foi avaliada pela visualização das bandas 28 e 18 S, sob luz ultravioleta após corrida em gel de agarose (1%).

### **3.9.2 Transcrição reversa**

Após etapa sobredita foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese de cDNA. Brevemente, foi adicionado à 1 µg de RNA total: 1 µL de ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, USA), 1 µL *primers* Oligo dT (0,5 µg) (Life Technologies, USA), 1 µL nucleotídeos dNTP mix (0,5 mM) (Invitrogen Life Technologies, USA), 2,4 µL MgCl<sub>2</sub> (3 mM) (Promega, USA), 4 uL de Improm-II 5X™ reaction buffer (1X) (Promega, USA) e água deionizada 0,01%, para volume final de 20 µL. Os cDNAs foram armazenados a -20°C.

### **3.9.3 PCR em tempo real**

Após transcrição reversa os cDNAs sintetizados foram utilizados à realização da PCR em tempo real.

Para tanto foi usado o sistema *TaqMan Two Step RT-PCR* (Applied Biosystems, CA, USA) com *Inventoried TaqMan gene expression assays* para análise do mRNA do gene *Slc2a4*, *Srebf1*, *Cebpa* (Tabela 1). Diferentemente a verificação da expressão de *Rela* (*NF-kB*), (Tabela 2) foi realizada com Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen Life Technologies, USA), cujos iniciadores foram selecionados de acordo com sequencias disponíveis no Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (*NIH*) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

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

GENES		INICIADORES	FRAGMENTO
<i>Slc2a4</i>	Sense	5' GGCTGTGCCATCTTGATGAC 3'	75 bp
	Anti-sense	5'CACGATGGACACATAACTCATGGAT3'	
	Sonda	FAM AACCCGCTCCAGCAGC MGB3'	
<i>Gapdh</i>		Sequência não fornecida pela Applied Biosystems (código Rn99999916_s1)	87 pb
<i>Sreb1</i>		Sequência não fornecida pela Applied Biosystems (código Rn01495769_m1)	79 pb
<i>Cebpa</i>		Sequência não fornecida pela Applied Biosystems (código Rn00560963_s1)	79pb

**Tabela 2.** Iniciadores para PCR em tempo real - sistema de amplificação Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green

GENES		INICIADORES	FRAGMENTO
<i>Rela(NFkB)</i>	Sense	5'CCATGGACGATCTGTTTCC3'	116 bp
	Anti-sense	5'CGCACTTGTAACGGAAACG3'	
<i>Gapdh</i>	Sense	5'GAACATCATCCCTGCATCC 3'	97bp
	Anti-sense	5'CCTGCTTCACCACCTTCTT3'	

A quantidade de cDNA para cada gene foi otimizada a partir de curva-padrão que permite avaliar a linearidade e a eficiência da amplificação. Para essa finalidade, foram utilizadas as diluições (1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) de cDNA de amostras usadas apenas para teste nos ensaios de PCR em tempo real. As diluições de cDNA e os respectivos valores de Ct foram colocados em gráfico que permite verificar a relação entre essas duas variáveis (Ct x log da diluição de cDNA). O ajuste na concentração dos *primers* utilizados nas reações, também foi realizado.

A eficiência da reação foi calculada de acordo com a inclinação da curva gerada pela seguinte fórmula:  $E = 10^{-1/\alpha} - 1 \times 100$ , onde  $\alpha$  é a inclinação da curva (Pfaffl, 2001). Segundo Livak e Schmittgen, 2001, para um ensaio de PCR em tempo real ter alta eficiência (90% a 110%), a inclinação (*slope*) da curva-padrão deve ser próximo de -3,3. Na Tabela 3 são apresentados os resultados de inclinações (*slopes*) das curvas e as respectivas eficiências dos ensaios.

**Tabela 3.** Valores de inclinação da curva e eficiência das RT-PCR em tempo real.

<b>GENE</b>	<b>INCLINAÇÃO DA CURVA</b>	<b>EFICIÊNCIA</b>
<i>Slc2a4</i> (TaqMan)	- 3,18	103 %
<i>Gapdh</i> (TaqMan)	- 3,43	96 %
<i>Cepba</i> (TaqMan)	-3,72	85%
<i>Sreb1</i> (TaqMan)	-3,95	82%
<i>Rela</i> (SYBR® Green)	-3,28	101%
<i>Gapdh</i> (SYBR® Green)	-3,22	103%

Brevemente, o programa da PCR em tempo real foi constituído:

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

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

Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos foram detectados pelo equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os dados foram analisados pelo próprio software do equipamento. A partir do sinal de

fluorescência detectado, fase exponencial de amplificação, foi gerado um valor numérico que é denominado *ciclo threshold* ( $C_t$ ) (WONG & MEDRANO, 2005). Para cada amostra de cDNA, o  $C_t$  de cada gene alvo é registrado e comparado com o  $C_t$  do controle endógeno *Gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

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

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

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

$$\Delta\Delta C_t = (\Delta C_{t \text{ amostra}} - \Delta C_{t \text{ controle}})$$

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

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

### **3.10 Ensaio de mobilidade eletroforética (Gel shift-EMSA)**

#### **3.10.1 Extração de proteínas nucleares**

A extração de proteínas nucleares foi realizada baseada em Kawamoto et al. (2008), e Sinhá et al. (2004). Todavia, pequenas modificações foram realizadas. Brevemente, amostras de células foram homogeneizadas em 1 mL PBS gelado (0,8% (140 mM) NaCl; 0,115% (8 mM)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot (12\text{H}_2\text{O})$ ; 0,02% (3 mM) KCl; 0,02%

(1,5 mM)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,2), com inibidores de proteases (aprotinina (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )/leupeptina (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )), seguindo-se de uma centrifugação à 2.000 x g, 10 minutos, 4°C. O sobrenadante foi descartado e a etapa supracitada foi repetida. Posteriormente, o “pellet” foi ressuspensão em 400  $\mu\text{L}$  de tampão de lise gelado (10mM HEPES-KOH pH: 7,9, 1,5mM  $\text{MgCl}_2$  10mM KC, 0,5mM PMSF, 0,5mM DTT, 0,1mM EDTA, com inibidores de proteases (aprotinina (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )/leupeptina (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )), homogeneizado, mantido em repouso no gelo por 15 minutos e adicionado de 2,5% NONIDET-40 a 10%. À seguir as amostras foram centrifugadas a 11.000 x g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante ressuspensão em 60  $\mu\text{L}$  de tampão de extração gelado (20mM HEPES pH: 7,9, 25% Glicerol, 300mM NaCl, 1,5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,25mM EDTA, 0,5mM DTT e 0,5mM PMSF e inibidores de proteases (aprotinina (12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )/leupeptina (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )), seguindo-se incubação no gelo por 20 minutos e centrifugação a 11.000 x g, 20 minutos, 4°C. O sobrenadante, contendo as proteínas nucleares, foi alíquotado e armazenado a – 70° C. A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford utilizando o reagente Bio-Rad protein Assay (Bio-Rad Laboratories, CA) como descrito anteriormente no item 4.6.

### **3.10.2 Marcação da sonda**

De acordo com Lima et al. (2009), e Silva et al. (2005), oligonucleotídeos pareados (Tabela 4) foram marcados com ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ) ATP (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, USA), na presença da enzima T4 poliquinase (Invitrogen Life Technologies, USA), e incubados a 37° C por 1 h 30 minutos. Posteriormente, foram acrescidos de água MiliQ autoclavada e purificados em coluna Sephadex. Uma alíquota do produto (1  $\mu\text{l}$ ) foi utilizada para contagem em contador  $\beta$  (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, USA)

**Tabela 4.** Iniciadores utilizados para EMSA.

<b>OLIGO</b>	<b>SEQUÊNCIA</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
NF-κB (-134)	5`GGGTGGGGGCGTGGCCTTTTGG3`	Rato	Furuya et al. (2008)

### 3.10.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante

De acordo Lima et al. (2009) e Silva et al. (2005) alíquotas contendo 5 µg de proteínas nucleares, foram preparadas e mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos (para permitir a ligação das proteínas nucleares às sondas). Em seguida as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida de 4% e submetidas à eletroforese em tampão TBE 0,5X (44,5 mM TRIS, 44,5mM Ácido bórico e 1mM EDTA). Foi utilizada corrente de 100 V à 4°C por 2 horas.

Ao final da eletroforese o gel foi transferido cuidadosamente para uma folha de papel Whatman (Whatman, BR), seco a vácuo por 60 minutos, a 70°C e exposto a um filme IBF RX-A (IBF Indústria de filmes brasileiros, BR) em cassete a -70°C por 2 dias.

A atividade de ligação foi calculada utilizando os resultados numéricos obtidos com a realização da densitometria dos “blots” de NF-κB. O grupo controle foi considerado como 100%.

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

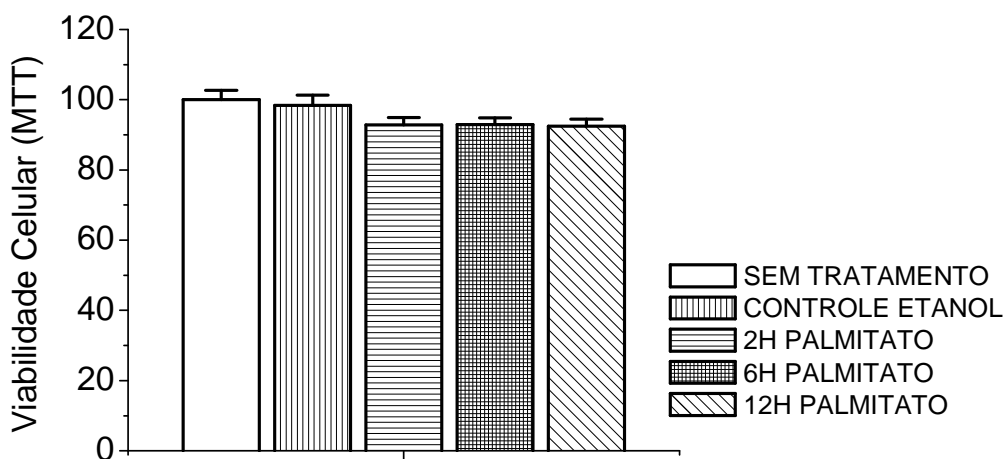
## 4 RESULTADOS

---

### 4.1 Determinação da viabilidade celular por MTT

Para avaliar os possíveis efeitos citotóxicos do palmitato e do etanol usados nos meios de incubação, os ensaios de viabilidade celular pela técnica do MTT foram realizados. O ensaio colorimétrico foi realizado em poços cujas células não foram submetidas a nenhum tratamento (apenas com meio de cultura), poços cujo meio de cultura havia 0,5% etanol e poços cujas células foram incubadas com 0,75mM de palmitato nos períodos de 2, 6 e 12 horas. Pela análise dos dados, verificou-se que não houve diferença estatística entre os grupos analisados e que as placas tratadas com palmitato apresentaram 92% de viabilidade celular.

**Figura 5** – Análise da viabilidade celular em células tratadas e não tratadas com o palmitato e etanol.

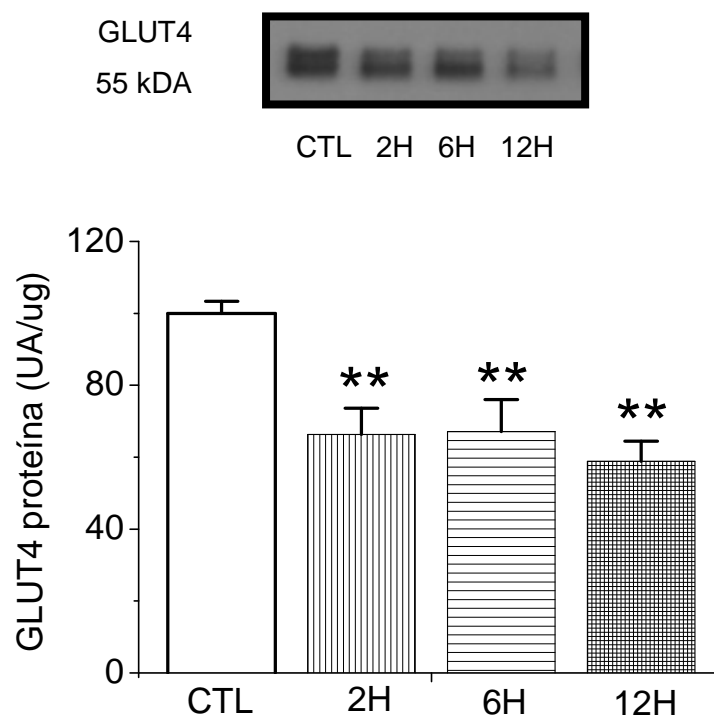


(Sem tratamento:  $99,99 \pm 2,71$ , Controle Etanol:  $98,43 \pm 2,88$ , 2H:  $92,85 \pm 2,05$ , 6H:  $92,95 \pm 1,94$ , 12H:  $92,43 \pm 2,02$ ). Resultados expressos em unidades arbitrárias (UA), apresentados como média e erro padrão da média (EPM),  $n=12$  a 20 amostras diferentes (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).

## 4.2 Quantificação da proteína GLUT4.

Os resultados obtidos com a dose de 0,75mM mostraram uma significativa redução do conteúdo proteico de GLUT4 desde a segunda hora de tratamento com palmitato.

**Figura 6** – Conteúdo de proteína GLUT4 na fração de membrana total (MT) ao longo de 24 horas de tratamento com 0,75mM de palmitato.



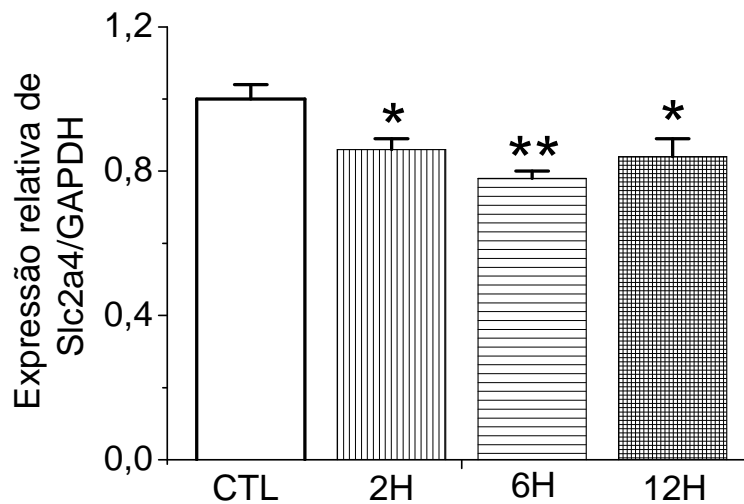
(CTL:  $99.99 \pm 3.39$ , 2H:  $66.37 \pm 7.20^{**}$ , 6H:  $67.73 \pm 6.52^{**}$ , 12H:  $58.88 \pm 5.56^{**}$ ). Resultados expressos em unidades arbitrárias por micrograma de proteína (UA/ug), apresentados como média e erro padrão da média (EPM),  $n=6$  a 10 amostras, sendo  $^{**}P < 0,001$  vs. CTL (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).



### 4.3 Expressão do gene *Slc2a4*.

Pela análise do RNAm do *Slc2a4* o tratamento com palmitato reduziu a expressão do gene em todos os períodos estudados.

**Figura 7** - Conteúdo de RNAm do gene *Slc2a4* normalizado por glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*).

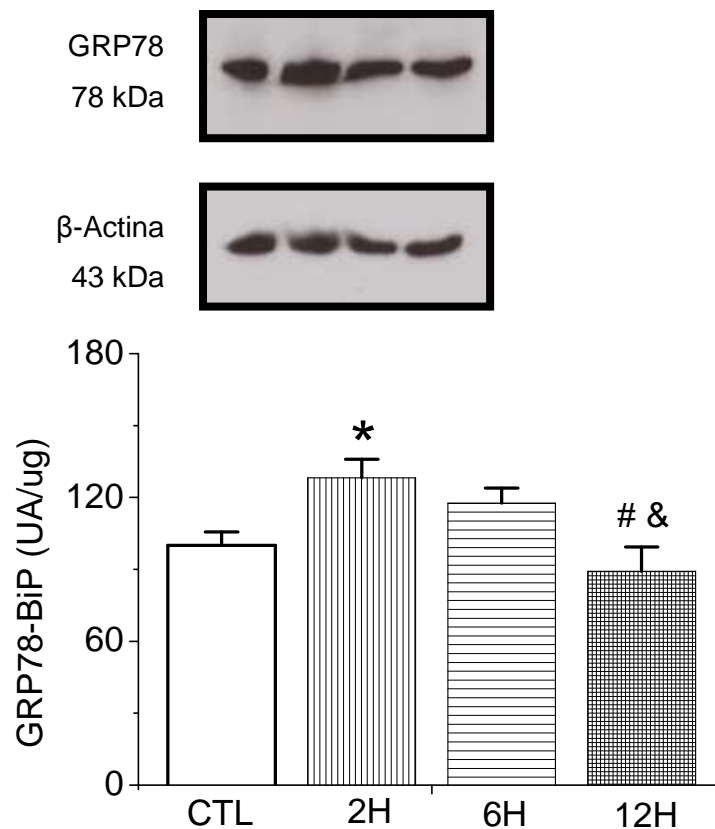


(CTL: 1,00±0,04; 2H: 0,86±0,03\*; 6H: 0,78±0,02\*\*; 12H: 0,84±0,05\*). Resultados obtidos pelo ensaio de PCR em tempo real, expressos em *Slc2a4*/*Gapdh* ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), apresentados como média e erro padrão da média (EPM),  $n=5$  à 8 amostras, sendo \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,05$  vs. controle (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).

#### 4.4 Estimulação transitória da chaperona GRP78 (BiP) pelo tratamento com palmitato.

A principal chaperona do RE é a GRP78 (BiP) e muitos trabalhos consideram esta proteína como um importante marcador de estresse. Pelo tratamento com palmitato, observa-se que GRP78 apresentou aumento transitório no período de 2 horas de incubação com o ácido graxo.

**Figura 8** – Conteúdo de GRP78 (BiP) ao longo de 12 horas de tratamento com 0,75mM de Palmitato

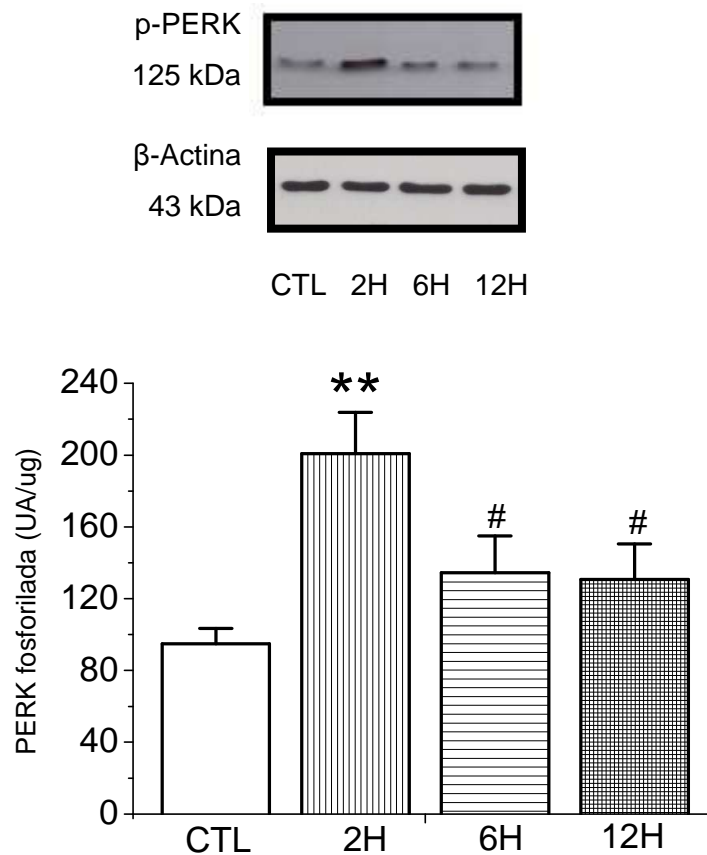


(CTL: 100,00±5,58, 2H: 128,23±7,76\*, 6H: 117,63±6,26, 12H: 89,16±10,19<sup>#&</sup>). Resultados expressos em UA/ug, já corrigidos pela proteína constitutiva  $\beta$ -Actina, apresentados como média e EPM,  $n= 7$  a 8, sendo \* $P<0,05$  vs. CTL, <sup>#</sup> $P<0,05$  vs. 2H, <sup>&</sup> $P<0,05$  vs. 6H (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste)

#### 4.5 A via PERK/EIF2 $\alpha$ não está relacionada com a diminuição traducional de GLUT4

A resposta mais imediata ao estresse de RE, no geral, é a diminuição traducional sinalizada pela proteína cinase PERK que fosforila o fator de iniciação EIF2 $\alpha$ . Como pode ser verificado na figura 9, a proteína PERK em seu estado fosforilado (p-PERK), apresentou aumento significativo somente no período de duas horas de tratamento com Palmitato.

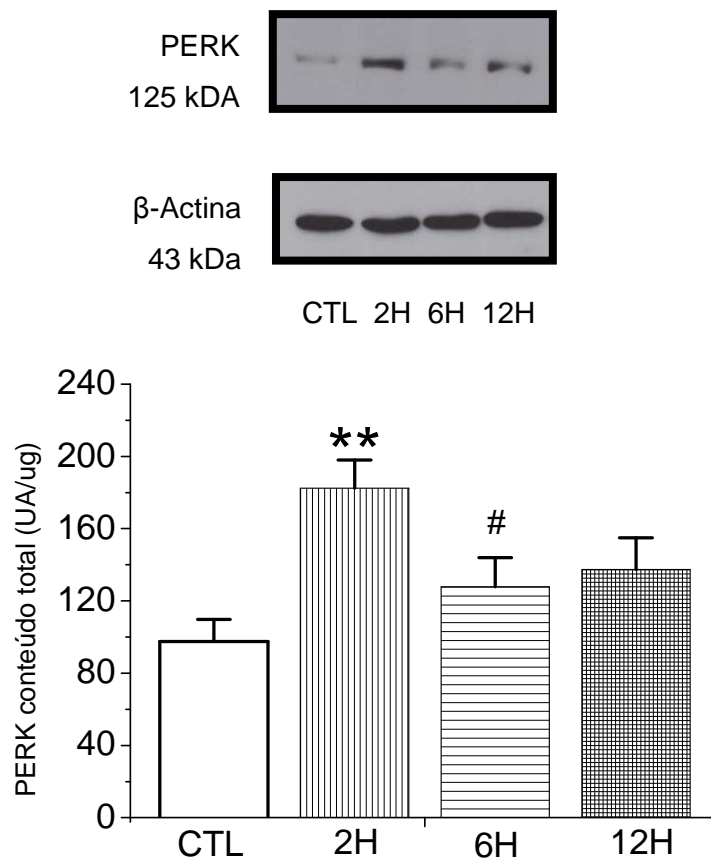
**Figura 9** – Conteúdo de PERK fosforilada ao longo de 12 horas de tratamento com 0,75mM de Palmitato.



(CTL: 94,87±8,59, 2H: 200,75±23,08\*\*, 6H: 134,41±20,55#, 12H: 130,67±19,87#). Resultados expressos em UA/ug, já corrigidos pela proteína constitutiva β-Actina, apresentados como média e EPM,  $n= 8$  a 12, sendo, \*\* $P<0,001$  vs. CTL, # $P<0,05$  vs. 2H (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste)

Ensaio para a quantificação do conteúdo total de PERK foram realizados. Como pode ser visto na figura 10, também houve aumento do conteúdo total de PERK na segunda hora de tratamento com palmitato, justificando seu aumento de fosforilação no mesmo período analisado.

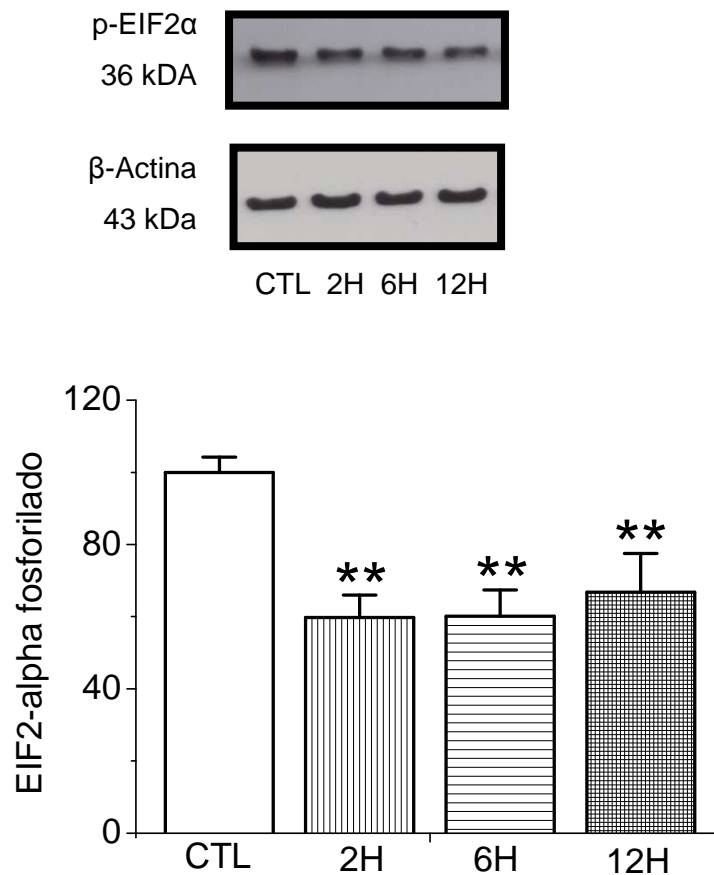
**Figura 10** – Conteúdo total da proteína PERK ao longo de 12 horas de tratamento com 0,75mM de Palmitato.



(CTL: 97,47±12,34, 2H: 182,41±15,59\*\*, 6H: 127,76±16,19#, 12H: 137,31±17,73). Resultados expressos em UA/ug, já corrigidos pela proteína constitutiva  $\beta$ -Actina, apresentados como média e EPM,  $n= 6$  a 7 amostras, sendo \*\* $P<0,01$  vs. CTL, # $P<0,05$  vs. 2H (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).

Já os resultados obtidos com o fator de iniciação EIF2 $\alpha$  fosforilado (p-EIF2 $\alpha$ ) mostraram redução importante pelo tratamento com ácido graxo.

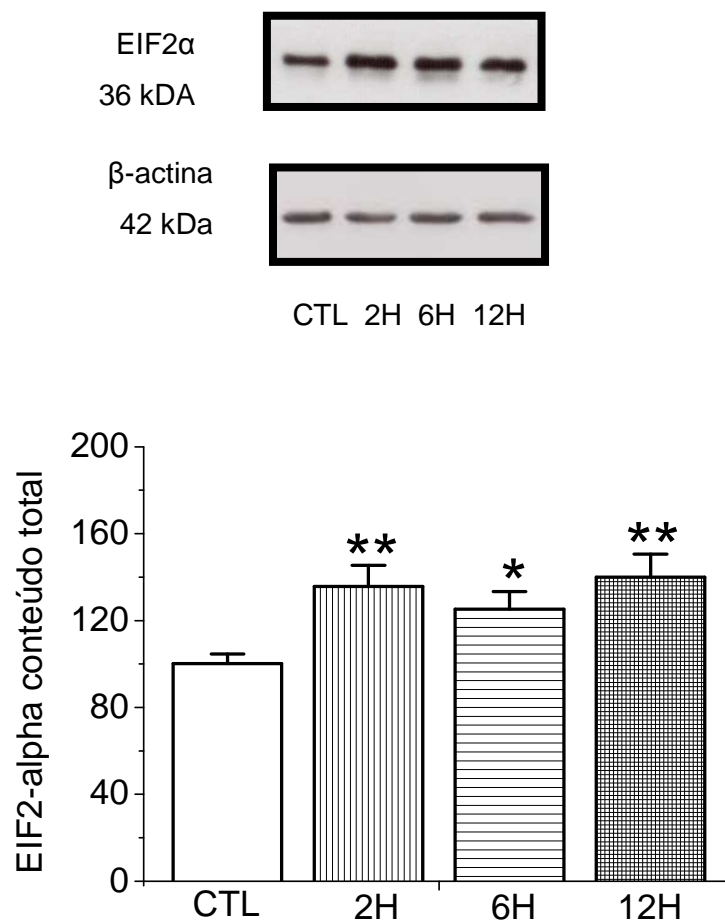
**Figura 11** – Conteúdo de EIF2 $\alpha$  fosforilado ao longo de 12 horas de tratamento com 0,75mM de Palmitato.



(CTL: 100,00 $\pm$ 4,22, 2H: 59,75 $\pm$ 6,27\*\*, 6H: 60,11 $\pm$ 7,25\*\*, 12H: 66,78 $\pm$ 10,70\*\*). Resultados expressos em UA/ug, já corrigidos pela proteína constitutiva  $\beta$ -Actina, apresentados como média e erro padrão da média (EPM),  $n=7$  a 8 amostras, sendo \*\* $P<0,01$  vs. CTL (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).

Ensaio para a quantificação do conteúdo total de EIF2 $\alpha$  foram realizados e os resultados mostraram que houve aumento significativo desta proteína contrariando os achados da mesma em seu estado fosforilado.

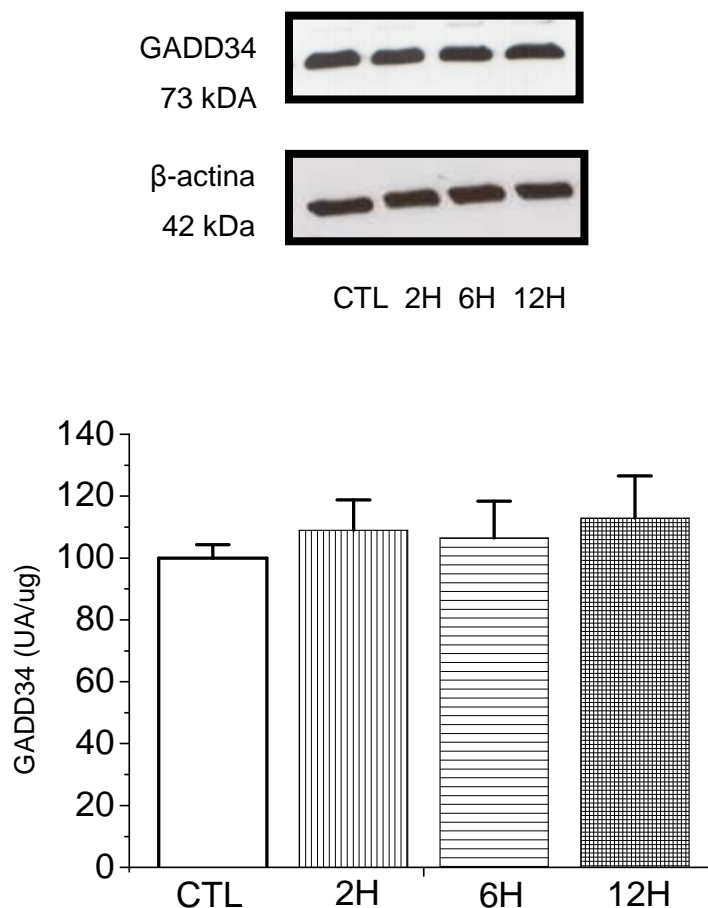
**Figura 12** – Conteúdo total do fator de iniciação EIF2 $\alpha$  ao longo de 12 horas de tratamento com 0,75mM de Palmitato.



(CTL: 100,24 $\pm$ 4,45, 2H: 135,65 $\pm$ 9,77\*\*, 6H: 125,22 $\pm$ 8,12\*, 12H: 139,97 $\pm$ 10,58\*\*). Resultados expressos em UA/ug, já corrigidos pela proteína constitutiva  $\beta$ -Actina, apresentados como média e EPM,  $n= 10$  a 11 amostras, sendo \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  vs. CTL (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).

Devido a discrepância entre conteúdo total e grau de fosforilação do fator de iniciação e EIF2 $\alpha$ , foram realizados ensaios com a proteína GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein-34), que é uma importante fosfatase que defosforila o fator de iniciação EIF2 $\alpha$  e reconstitui a síntese global proteica. Pela análise desta proteína, verifica-se que a mesma não sofreu alteração pelo tratamento com palmitato.

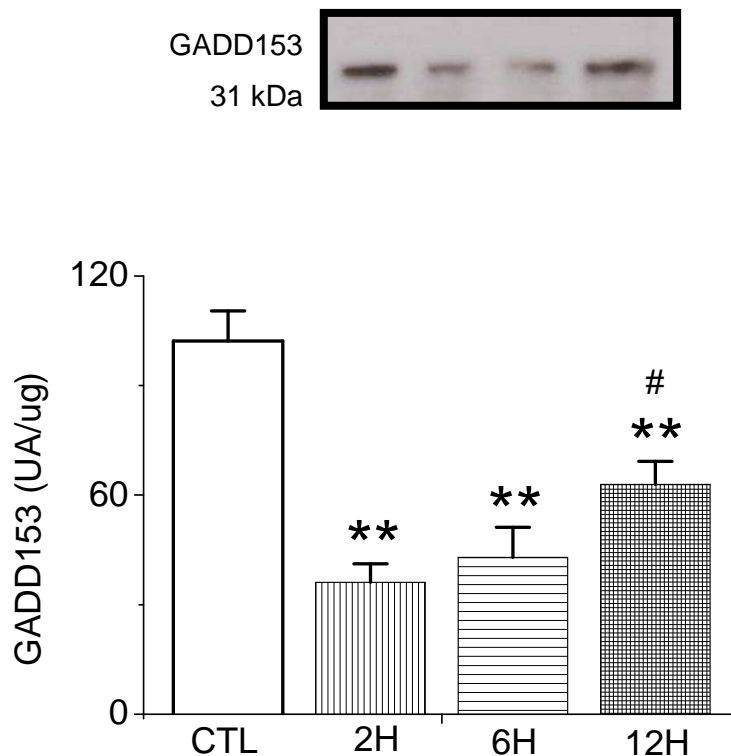
**Figura 13** – Conteúdo de GADD34 ao longo de 12 horas de tratamento com 0,75mM de Palmitato.



(CTL: 100,00±4,29, 2H: 109,01±9,79, 6H: 106,45±11,97, 12H: 112,83±13,72). Resultados expressos em UA/ug, já corrigidos pela proteína constitutiva β-Actina, apresentados como média e EPM,  $n= 4-6$  amostras (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).

Um dos componentes marcadores de apoptose mediada pelo estresse de retículo é o fator C/EBP homologous protein (CHOP), também conhecido como GADD153 (growth arrest and DNA damage-inducible gene-153), que é induzido pela via da PERK. Pela análise desta proteína, verifica-se que a mesma apresentou diminuição pelo tratamento com palmitato no núcleo celular.

**Figura 14** – Conteúdo de GADD153/CHOP no núcleo ao longo de 12 horas de tratamento com 0,75mM de Palmitato.



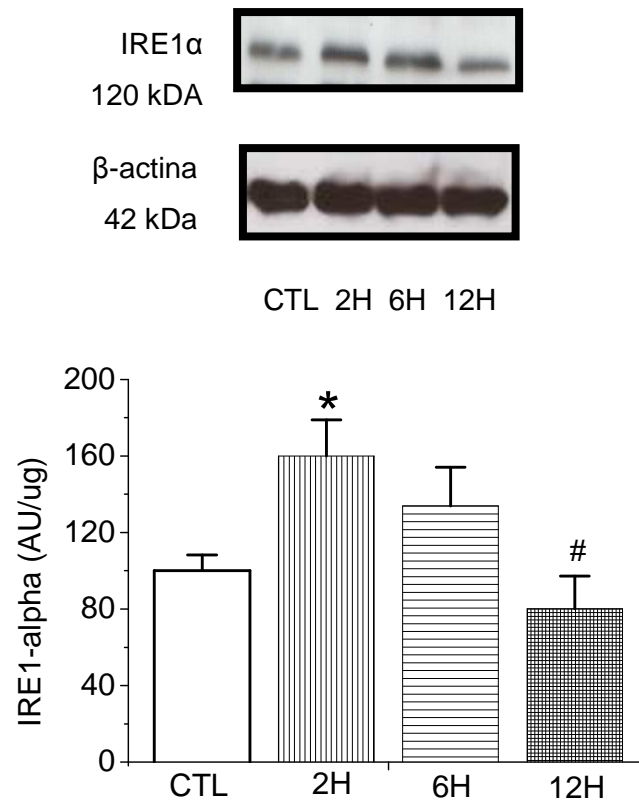
(CTL: 102,15±8,28, 2H: 36,14±5,04\*\*, 6H: 42,92±8,22\*\*, 12H: 62,87±6,38\*\*#). Resultados expressos em UA/ug, já corrigidos pela proteína constitutiva  $\beta$ -Actina, apresentados como média e EPM, n=8 a 12, sendo \*\*P<0,01 vs. CTL, #P<0,05 vs. 2H (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).



#### 4.6 A via IRE1 $\alpha$ /XBP-1/TRAF2 parece não se relacionar com a ativação de IKK e consequente ativação de NF- $\kappa$ B

Os resultados da proteína IRE1 $\alpha$  mostraram que houve aumento significativo pelo tratamento com Palmitato no período de 2 horas de incubação.

**Figura 15** – Conteúdo de IRE1 $\alpha$  ao longo de 12 horas de tratamento com 0,75mM de Palmitato.

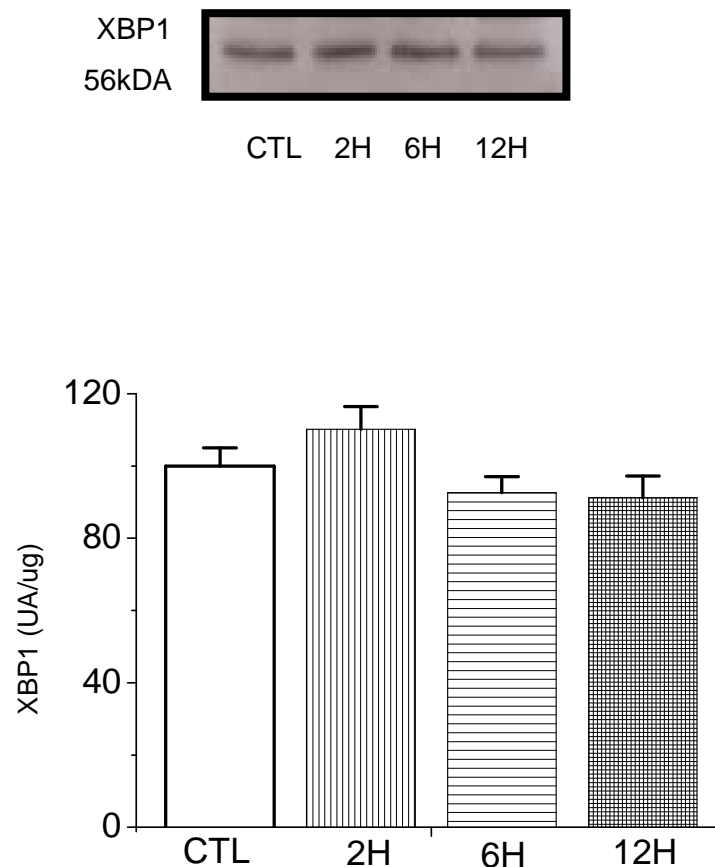


(CTL: 100,00 $\pm$ 8,33, 2H: 160,00 $\pm$ 18,87\*, 6H: 133,96 $\pm$ 20,12, 12H: 80,18 $\pm$ 17,00#). Resultados expressos em UA/ug, apresentados como média e EPM, n=6 a 9, sendo \*P<0,05 vs. CTL, #P<0,05 vs 2H (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).

A IRE1 é uma serina/treonina proteína cinase que ativa o fator de transcrição XBP-1 ( X-box binding protein 1). A forma spliced de XBP-1 controla a regulação positiva de genes relacionados ao sistema de degradação no RE (ERAD).

Pelos dados obtidos, verifica-se que não houve diferença no conteúdo proteico de XBP-1 no núcleo.

**Figura 16** – Conteúdo nuclear de XBP-1 ao longo de 12 horas de tratamento com 0,75mM de Palmitato.

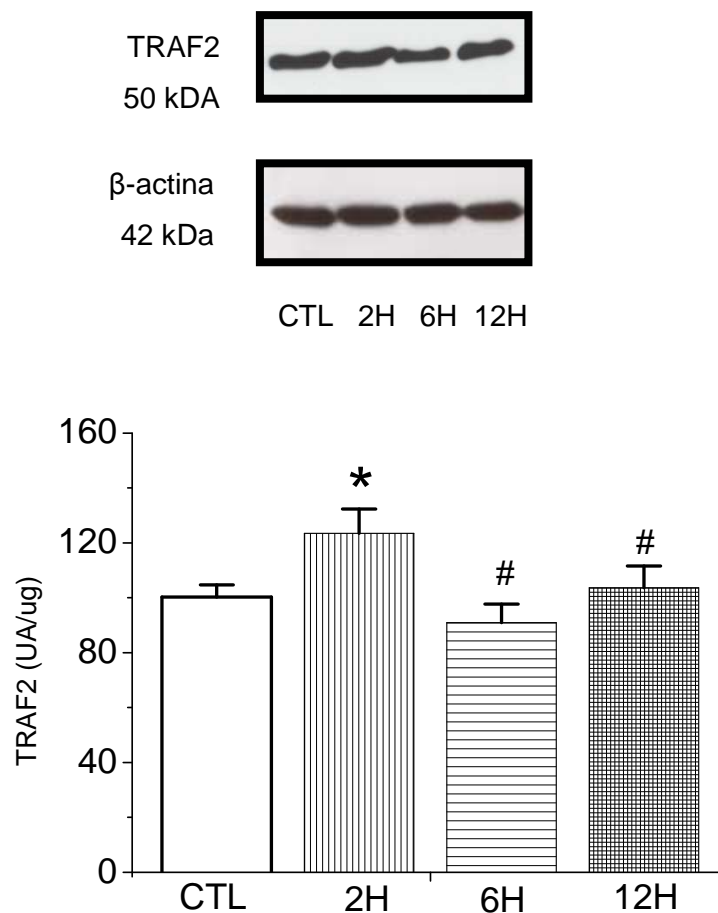


(CTL: 99,99±5,07, 2H: 110,20±6,30, 6H: 92,61±4,47, 12H: 91,26±6,01). Resultados expressos em UA/ug, apresentados como média e EPM, n=9 a 10 (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).

No estresse persistente, IRE1 $\alpha$  pode interagir com as proteínas TRAF2 (fator associado ao receptor de TNF) e a literatura indica que IRE1 $\alpha$  forma um complexo com as I $\kappa$ B cinases por meio de TRAF2, evidenciando a participação desta proteína na ativação de NF- $\kappa$ B (Hu et al., 2006).

Pelos resultados obtidos verifica-se que TRAF2 apresenta aumento de 23% pelo tratamento com o ácido graxo no período de 2 horas

**Figura 17** – Conteúdo de TRAF2 ao longo de 12 horas de tratamento com 0,75mM de Palmitato.

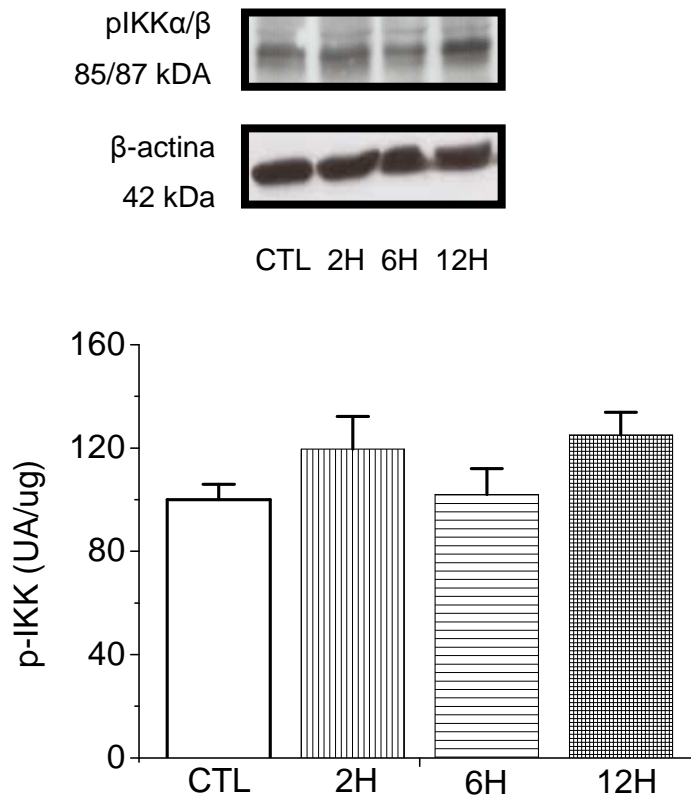


(CTL: 100,28 $\pm$ 4,37, 2H: 123,46 $\pm$ 8,92\*, 6H: 90,91 $\pm$ 3,89<sup>#</sup>, 12H: 103,63 $\pm$ 7,93<sup>#</sup>). Resultados expressos em UA/ug, apresentados como média e EPM, n=5 a 7 amostras, sendo \*P<0,05 vs. CTL e <sup>#</sup>P<0,05 vs. 2H (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).

#### 4.7 Grau de fosforilação da proteína IKK $\alpha/\beta$

A ativação de NF- $\kappa$ B tipicamente envolve a fosforilação, em resíduos de serina, de I $\kappa$ B pelo complexo IKK, composto por IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\gamma$  (NEMO). Pelos resultados obtidos com as proteínas p-IKK $\alpha/\beta$  fosforiladas observa-se que o palmitato induz uma tendência de aumento de 19% no período de 2 horas de incubação e de 25% em 12 horas de tratamento.

**Figura 18** – Conteúdo de pIKK $\alpha/\beta$  ao longo de 12 horas de tratamento com 0,75mM de Palmitato.

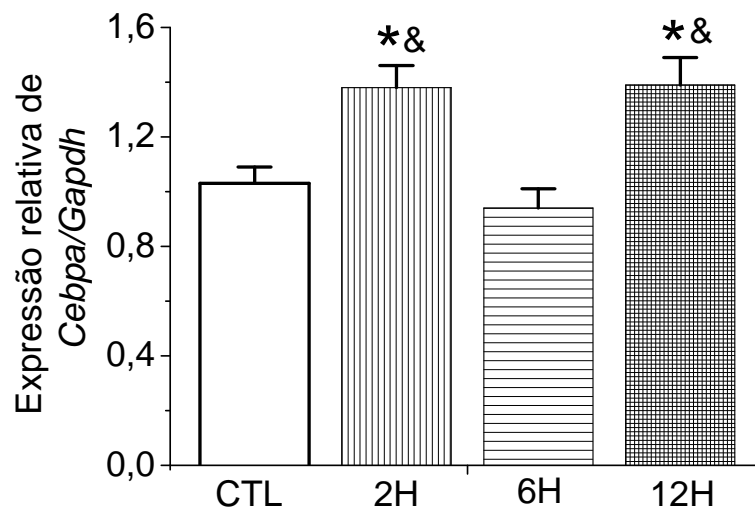


(Controle: 100,00 $\pm$ 6,02, 2H: 119,58 $\pm$ 12,71, 6H: 101,97 $\pm$ 10,05, 12H: 125 $\pm$ 8,87). Resultados expressos em UA/ug, apresentados como média e EPM, n=8 a 9 (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).

#### 4.8 Expressão do RNAm de *Cebpa*

O *Cebpa* é o gene que codifica a proteína C/EBP $\alpha$ , e constitui um importante regulador positivo do *Slc2a4*. Pela análise da expressão deste gene, verifica-se que o mesmo apresentou aumento nos tempos de 2 e 12 horas de tratamento com o palmitato.

**Figura 19** - Conteúdo de RNAm do fator transicional *Cebpa* normalizado por glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*).

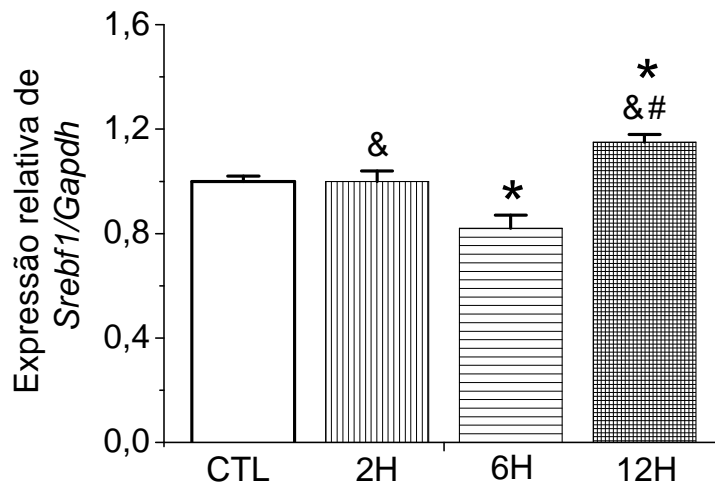


(CTL: 1,03±0,06, 2H: 1,38±0,08\* $\&$ , 6H: 0,94±0,07, 12H: 1,39±0,1\* $\&$ ). Resultados obtidos pelo ensaio de PCR em tempo real, expressos em Delta Delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Os valores são média  $\pm$  EPM, n=8-10 amostras, sendo \*P<0,05 vs. CTL,  $\&$ P<0,05 vs.6H (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).

#### 4.9 Expressão do RNAm de *Srebf1*

*Srebf1* é o gene que codifica a proteína SREBP-1. Pela análise da expressão deste gene, verifica-se que o mesmo apresentou redução no período de 6 horas e aumento no período de 12 horas de tratamento com o palmitato.

**Figura 20** - Conteúdo de RNAm do fator transicional *Srebf1* normalizado por glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*).

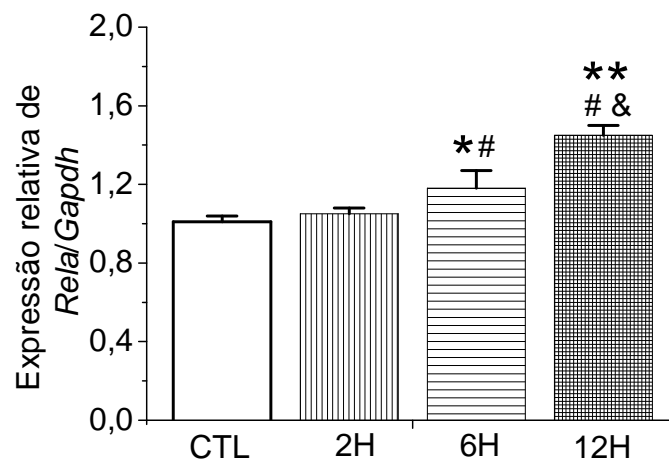


(CTL:  $1,00 \pm 0,02$ , 2H:  $1,00 \pm 0,04^{\&}$ , 6H:  $0,82 \pm 0,05^*$ , 12H:  $1,15 \pm 0,03^{*\&\#}$ ). Resultados obtidos pelo ensaio de PCR em tempo real, expressos em Delta Delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Os valores são média  $\pm$  EPM, n=8-10 amostras, sendo \*P<0,05 vs. CTL, #P<0,05 vs 2H, &P<0,05 vs. 6H. (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).

#### 4.10 Expressão do RNAm de *Rela* (NF- $\kappa$ B)

Pela análise do RNAm de *Rela*, que codifica a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B, verifica-se aumento significativo da expressão deste fator transcricional nos períodos de 6 e 12 horas de incubação com ácido graxo

**Figura 21** - Conteúdo de RNAm do fator transcricional *Rela* normalizado por glyceraldehide-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*).



(CTL: 1,02±0,03, 2H: 1,05±0,04, 6H: 1,18±0,3<sup>#</sup>, 12H: 1,45±0,05<sup>\*\*#&</sup>). Resultados obtidos pelo ensaio de PCR em tempo real, expressos em Delta Delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Os valores são média ± EPM, n=5-10 amostras, sendo \*P<0,05, \*\*P<0,01 vs. CTL, <sup>#</sup>P<0,05 vs. 2H, <sup>&</sup>P<0,05 vs. 6H. (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).

#### 4.11 Conteúdo proteico de NFkB p65 no núcleo e citoplasma das células L6

Como pode ser observado na figura 22 parte A, houve aumento no conteúdo proteico de NF-kB subunidade p65 no citoplasma em 12 horas de incubação com palmitato (CTL:  $99,99 \pm 10,15$ , 2H:  $89,60 \pm 10,49$ , 6H:  $111,64 \pm 9,08$ , 12H:  $142,77 \pm 17,25^*$ , unidades arbitrárias por micrograma de proteína (UA/ug),  $n=5-6$ ,  $*P < 0.05$ ).

Já no núcleo celular (Figura 22-B) houve aumento significativo em todos os períodos analisados (CTL:  $100,00 \pm 6,02$ , 2H:  $130,59 \pm 6,96^*$ , 6H:  $123,13 \pm 3,85^*$ , 12H:  $132,10 \pm 8,17^*$ , UA/ug,  $n=5$ ).

#### 4.12 Conteúdo proteico de NF-kB p50 no núcleo e citoplasma das células L6

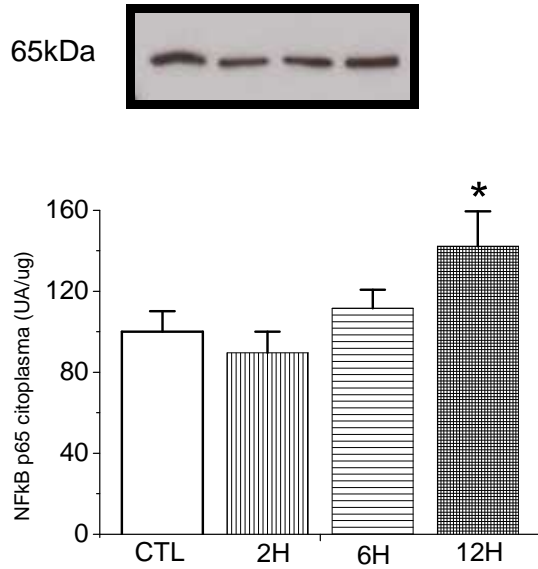
Os resultados obtidos por meio dos ensaios com NF-kB p50 no citoplasma celular (Figura 23-A) mostraram que houve aumento significativo na sexta hora de incubação com o ácido graxo (CTL:  $100,00 \pm 10,16$ , 2H:  $116,54 \pm 10,81$ , 6H:  $155,85 \pm 9,63^{* \# \#}$ , 12H:  $138,98 \pm 10,40^*$ , resultados expressos em UA/ug,  $n=7$ ,  $*P < 0.05$ ).

No núcleo (Figura 23-B) houve aumento também no mesmo período de 6 horas (CTL:  $100,00 \pm 14,40$ , 2H:  $101,67 \pm 12,33$ , 6H:  $135,31 \pm 12,61^{* \# \&}$ , 12H:  $105,55 \pm 8,22$ , UA/ug,  $n=8$ ).

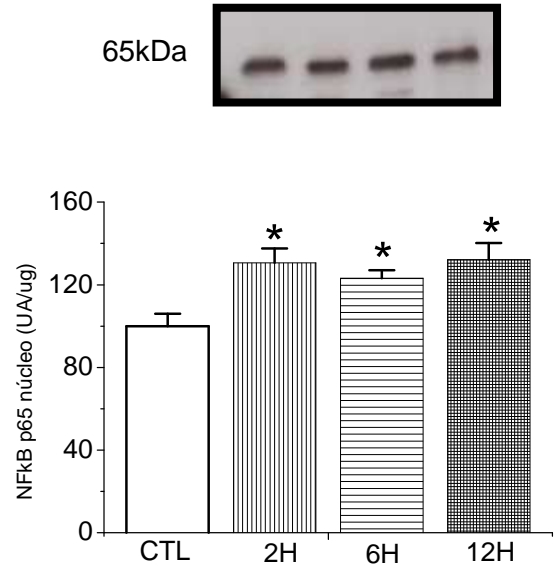


**Figura 22** – Conteúdo proteico de NF-kB p65 ao longo de 12 horas de tratamento com 0,75mM de Palmitato.

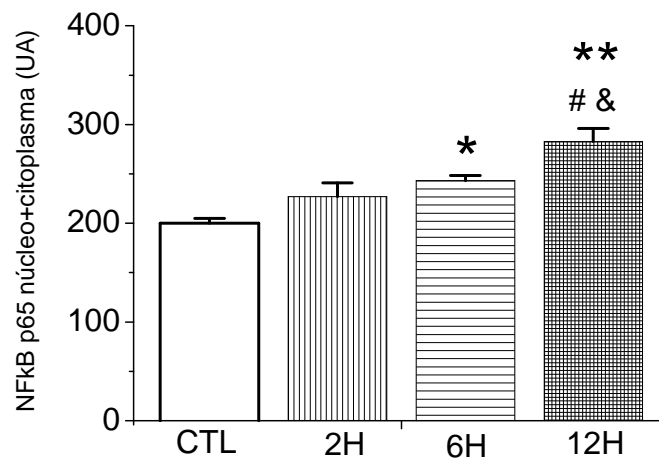
**A) Citoplasma**



**B) Núcleo**

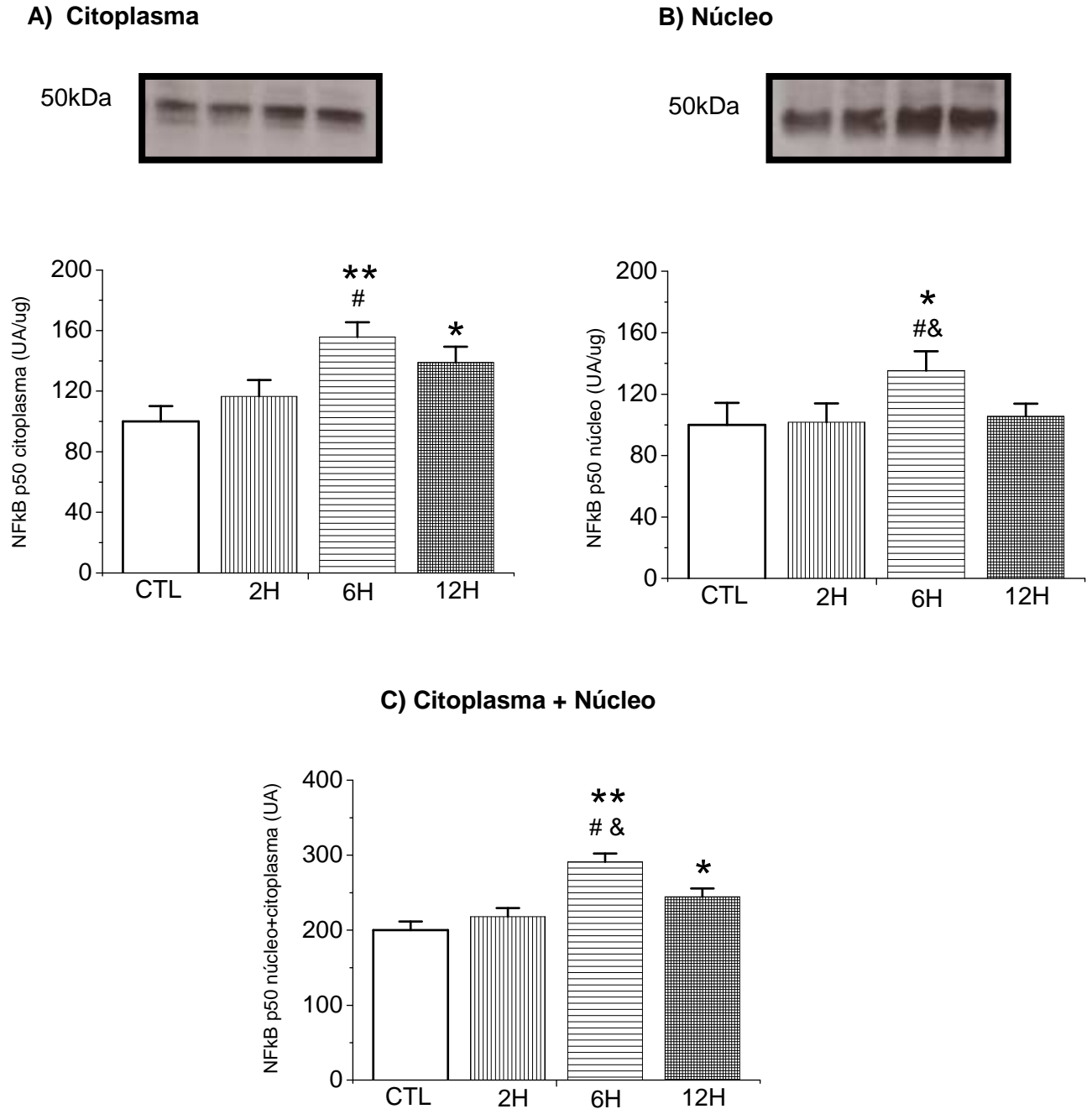


**C) Citoplasma + Núcleo**



Em **A**: gráfico de NF-kB p65 no citoplasma celular; em **B**: valores de NF-kB no núcleo e em **C**, soma dos valores do citoplasma e núcleo. Resultados expressos em UA/ug, apresentados como média  $\pm$  EPM, sendo \* $P < 0,05$  vs. CTL, \*\* $P < 0,01$  vs. CTL, # $P < 0,05$  vs. 2H, & $P < 0,05$  vs. 6H (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).

**Figura 23** – Conteúdo proteico de NF-kB p50 ao longo de 12 horas de tratamento com 0,75mM de Palmitato.

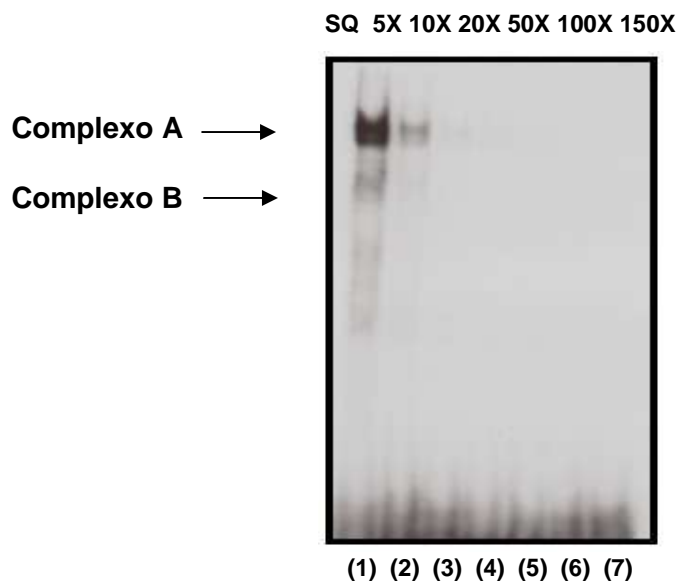


Em **A**: gráfico de NF-kB p50 no citoplasma celular; em **B**: valores de NF-kB no núcleo e em **C**, soma dos valores do citoplasma e núcleo. Resultados expressos em UA/ug, apresentados como média  $\pm$  EPM, sendo \* $P < 0,05$  vs. CTL, \*\* $P < 0,01$  vs. CTL, # $P < 0,05$  vs. 2H, & $P < 0,05$  vs. 6H (ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste).

#### 4.13 Ensaio de competição para determinação da identidade das bandas para NF- $\kappa$ B

Para verificar se o palmitato altera a atividade de ligação do fator transcricional NF- $\kappa$ B à região promotora do *Slc2a4* foi realizado o ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA). Inicialmente para determinar a especificidade das bandas foi efetuado um ensaio de competição. Conforme apresentado na figura 17, a adição de sonda não marcada à reação (oligonucleotídeo específico para NF- $\kappa$ B pareado e não marcado com ( $\gamma$ - $^{32}$ P) ATP) em relação à sonda marcada (oligonucleotídeo específico para NF- $\kappa$ B pareado e marcado com ( $\gamma$ - $^{32}$ P) ATP) foi suficiente para deslocar a ligação da sonda marcada, e assim determinar a especificidade de duas bandas, denominadas **A** e **B**, para NF- $\kappa$ B.

**Figura 24** - Ensaio de mobilidade eletroforética revelando a atividade de ligação de proteínas nucleares, pertencentes a amostras de células musculares L6, ao domínio de ligação do NF- $\kappa$ B na região promotora do gene *Slc2a4*.



Na lane 1 indicada sonda quente (SQ) identificam-se duas bandas, designadas como **A** e **B**, para NF- $\kappa$ B. Nas lanes de 2 à 7, curva de deslocamento da ligação com com adição de oligonucleotídeo não marcado em excesso nas concentrações de 5X (lane 2), 10X (lane 3), 20X (lane 4), 50X (lane 5), 100X (lane 6) e 150X (lane 7).

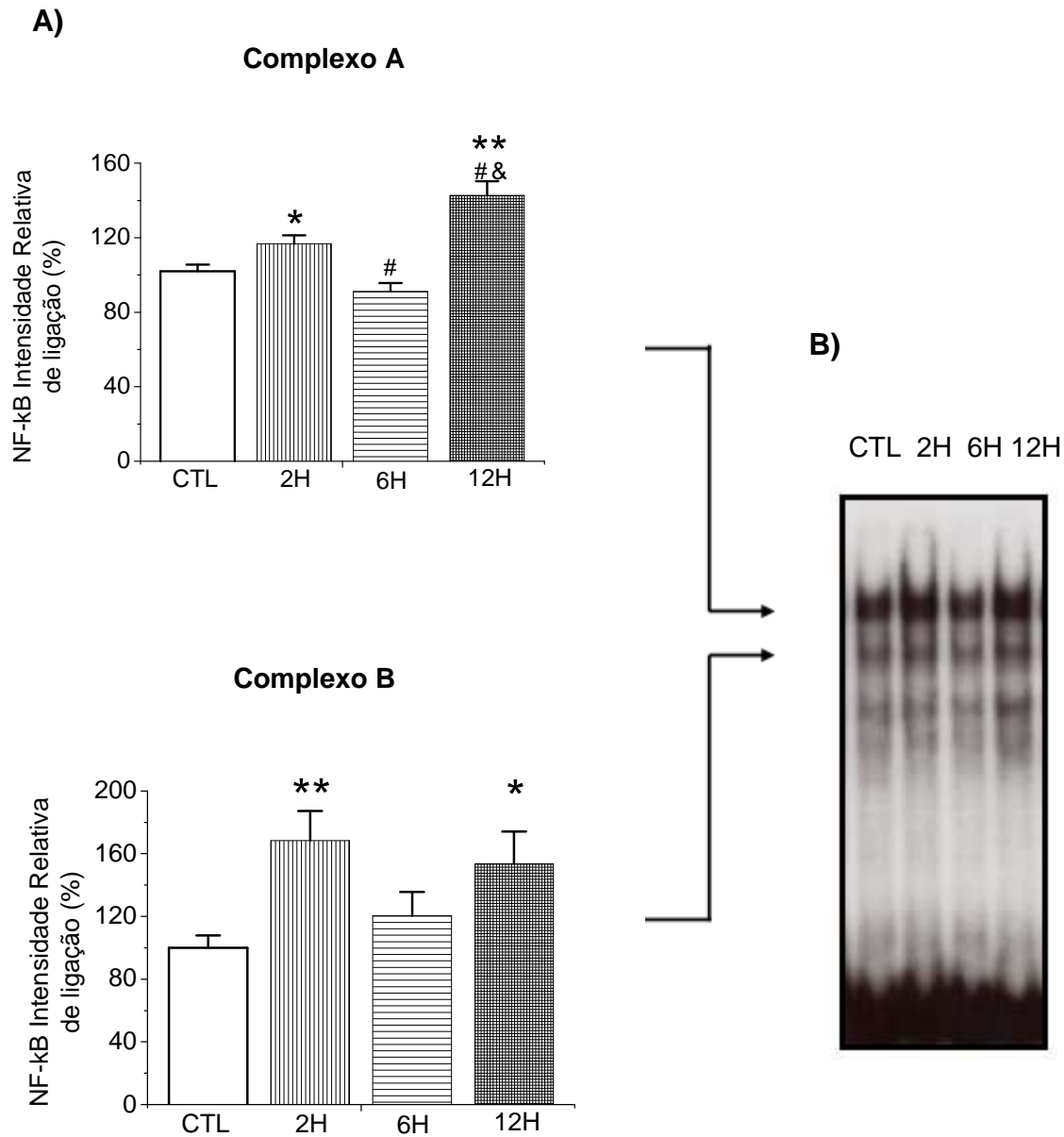
#### 4.14 Palmitato aumenta a atividade de ligação do fator transcricional NF- $\kappa$ B à região promotora do gene *Slc2a4*

Ao avaliar os resultados da atividade de ligação do fator transcricional NF- $\kappa$ B à região promotora do gene *Slc2a4*, no complexo **A** foi observado um aumento de ligação no período de 2 horas e 12 horas de tratamento em relação ao controle. Na análise do complexo **B**, observou-se aumento significativo no período de 2 horas e no período de 12 horas de tratamento.

Complexo **A** (Controle:  $101,69 \pm 2,91$ , 2H:  $116,72 \pm 4,54^*$ , 6H:  $91,07 \pm 4,64^\#$ , 12H:  $142,61 \pm 6,78^{*\#\&}$ , resultados expressos em unidades arbitrárias, n=10 amostras, sendo  $*P < 0,05$  vs. CTL,  $**P < 0,01$  vs. CTL,  $^\#P < 0,05$  vs. 2H,  $^\&P < 0,05$  vs. 6H. ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste.

Complexo **B** (Controle:  $100,00 \pm 7,85$ , 2H:  $168,26 \pm 18,95^{**}$ , 6H:  $120,45 \pm 15,21$ , 12H:  $153,47 \pm 20,59^*$ , resultados expressos em unidades arbitrárias, n=9 à 10 amostras, sendo  $*P < 0,05$  e  $**P < 0,01$  vs. CTL. ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste.

**Figura 25** – Análise da atividade de ligação de proteínas nucleares provenientes de amostras de células musculares L6 tratadas com 0,75mM de palmitato.



Em **A**, gráficos representando a quantificação relativa dos complexos proteína/DNA (bandas **a** e **b**). Os valores são média  $\pm$  EPM de 9 à 10 diferentes amostras, sendo \* $P < 0,05$  vs. CTL, \*\* $P < 0,01$  vs. CTL, # $P < 0,05$  vs. 2H, & $P < 0,05$  vs. 6H. ANOVA one-way e Student-Newman-Keuls como pós-teste. Em **B**, autoradiografia mostrando a ligação de proteínas nucleares ao domínio de ligação do NF- $\kappa$ B a região promotora do *Slc2a4*.

## 5 RESUMO DOS RESULTADOS

---

**Tabela 5.** Síntese do efeito do palmitato sobre as proteínas e genes estudados.

	2h	6h	12h
GRP78	↑	-	-
P-PERK	↑	-	-
P-EIF2 $\alpha$	↓	↓	↓
GADD34	-	-	-
GADD153	↓	↓	↓
IRE1 $\alpha$	↑	-	-
XBP-1	-	-	-
TRAF2	↑	-	-
mRNA Cebpa	↑	-	↑
mRNA Srebf1	-	↓	↑

**Tabela 6.** Regulação da expressão do *Slc2a4* e da via/atividade do NF- $\kappa$ B

	2 horas	6 horas	12 horas
GLUT4	↓	↓	↓
mRNA <i>Slc2a4</i>	↓	↓	↓
p-IKK $\alpha/\beta$	-	-	-
mRNA <i>Rela</i>	-	↑	↑
p65 total	-	↑	↑
p65 nuclear	↑	↑	↑
p50 total	-	↑	↑
p50 nuclear	-	↑	-
Ligação domínio $\kappa$ B do <i>Slc2a4</i>	↑	-	↑

## 6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

---

Elevação crônica na concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGLs) é comumente associada a uma prejudicada captação de glicose mediada por insulina, e está relacionada com obesidade e diabetes do tipo 2 (DM2) (Armoni et al., 2005).

A lipotoxicidade pode prejudicar a sinalização insulínica através de numerosos mecanismos incluindo o estresse de retículo endoplasmático (RE), estresse oxidativo e mudanças na transdução dos sinais e/ou segundos mensageiros, tais como a proteína cinase C (PKC) ou fosforilação em serina do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1). Recentemente o estresse de RE tem estado em destaque não somente por seu papel na indução de resistência a insulina, mas também por causa de seu envolvimento na apoptose de células B pancreáticas, uma característica do diabetes do tipo 2 (Mayer, 2010; Scheuner et al., 2008).

Estudos recentes têm descrito que os AGLs induzem um desbalanço entre a demanda e a capacidade de atuação do retículo endoplasmático (RE) causando o estresse de RE. A consequência celular deste estresse é chamada de resposta a proteínas não-enoveladas (UPR, unfolded protein response) (Scheuner et al., 2008).

Enquanto as consequências do estresse de RE têm sido amplamente estudadas em tecido adiposo e fígado, percebe-se que o estresse de RE no músculo esquelético, maior sítio de captação de glicose, não tem recebido igual atenção.

A captação de glicose no músculo, principal evento relacionado à homeostasia glicêmica no período pós-prandial, é mediada pela proteína GLUT4; e está bem documentado na literatura que a resistência à insulina associa-se principalmente a uma marcada redução na expressão desta proteína (Corrêa-Giannella; Machado, 2013). Além disso, lições obtidas a partir de animais transgênicos, também destacam a importância da expressão de Slc2a4/GLUT4 como o principal fator determinante da capacidade de transportar glicose. De fato, camundongos modificados que não expressam GLUT4 em músculo desenvolvem resistência à insulina e diabetes (Stembit et al., 1997), enquanto a super-expressão do GLUT4 em camundongos db/db melhora o diabetes (Brozinick et al., 2001).

Ácidos graxos saturados, como o palmítico (C16:0), são importante causa de resistência insulínica periférica caracterizada por prejudicada

captação/disponibilidade de glicose no músculo esquelético (Tsuchiya et al., 2010), e estudos tem demonstrado que o palmitato pode reprimir a expressão do GLUT4 (Jové et al., 2006). Entretanto, os mecanismos envolvidos ainda são completamente desconhecidos. A redução da expressão do GLUT4 em células C2C12 tratadas com palmitato foi sugerida como relacionada a atividade da citocina pró-inflamatória IL-6 (Jové et al., 2005), mas os resultados deste estudo, de fato, não comprovavam a participação da IL-6.

Nas nossas condições experimentais, o palmitato foi capaz de induzir importante redução no conteúdo de proteína GLUT4 e de RNAm do *Slc2a4*, o que também já havia sido observado em células da linhagem L6 (Anhê et al., 2012). Entretanto, no período 2 a 12 horas, observou-se que as reduções de conteúdo da proteína e do RNAm induzidas pelo palmitato não variaram de forma estequiométrica. Enquanto o RNAm *Slc2a4* reduziu no máximo em 20%, a proteína reduziu em até 50%. Nos diferentes tempos, o efeito repressor do palmitato foi sempre maior na proteína do que no RNAm, sugerindo que estivessem ocorrendo tanto regulações transcricionais como pós-transcricionais.

Discrepâncias entre a regulação do RNAm *Slc2a2* e da proteína GLUT4 já foram descritas em outras condições experimentais (Alves-Wagner et al., 2009), sempre indicando a ocorrência de regulações pós-transcricionais. Assim, no presente estudo, surgiu o pressuposto de que o estresse de retículo induzido pelo palmitato poderia ser a causa da exacerbação da redução da expressão do GLUT4, e partiu-se para a investigação das vias de estresse de retículo.

A proteína GRP78/BiP é uma chaperona do retículo endoplasmático já bem caracterizada, e que pertence a família de proteínas HSP70 (heat shock proteins). Ela é expressa constitutivamente em todas as células e desempenha importante papel na homeostasia celular, uma vez que sua transcrição é induzida em resposta a uma série de estímulos que perturbam a função do RE (Kaufman, 2002), sendo por isto considerada um marcador de estresse de retículo.

Grande número de estudos estabelece que o aumento de GRP78 é uma medida protetora contra o estresse de RE (Gonzalez–Gronow et al., 2009; Lee et al., 2005;). Por outro lado, já foi demonstrado também que a expressão reduzida desta chaperona pode contribuir com o quadro de resistência à insulina pela inibição da ativação de AKT desempenhando papel importante no desenvolvimento do diabetes do tipo 2 (Yamagishi et al., 2012).



No presente trabalho, GRP78 apresentou aumento transitório, somente no período de 2 horas de incubação com o ácido graxo, sugerindo que talvez nos outros períodos os mecanismos de atenuação da tradução, mecanismos de degradação associada ao RE (ERAD) e/ou apoptose celular estivessem ativados, pois quando a reparação de proteínas mal-enoveladas pelas chaperonas não obtém sucesso as proteínas aberrantes são encaminhadas para os sistemas de degradação, e os sensores de estresse (ATF6, IRE1 e PERK) são devidamente acionados.

GRP78 funciona como uma reguladora da UPR pela inativação dos sensores de estresse em condições normais. Quando proteínas mal enoveladas se acumulam na célula, a interação com os sensores de estresse é rompida e ATF6, IRE1 e PERK ficam livres para realizar suas funções (Rao et al., 2004).

Nas células de mamíferos, a primeira resposta ao estresse de RE é, em geral, a atenuação da taxa de tradução de mRNA, fato mediado pela via de sinalização da proteína PERK, que fosforila o fator de iniciação EIF2 $\alpha$  em serina 51, e assim causa inibição da síntese de proteínas e consequente redução do aporte de proteínas ao RE (Schröder et al., 2005).

Embora a fosforilação de EIF2 $\alpha$  iniba a iniciação da tradução de uma forma geral, paradoxalmente ela é requerida para a tradução seletiva de alguns mRNAs, que assistem na regulação de genes envolvidos no metabolismo, no estado redox da célula e nos mecanismos apoptóticos, como por exemplo, o fator ATF4 (Muaddi et al, 2010). É proposto que ATF4 promove a sobrevivência celular por induzir a expressão de genes para a biossíntese e transporte de aminoácidos, respostas anti-estresse oxidativo, dobramento e secreção de proteínas (Back et al., 2009).

Como pode ser observado nos resultados obtidos em resposta ao palmitato, a proteína PERK apresentou aumento apenas transitório (período de 2 horas) tanto em seu conteúdo total quanto em seu estado fosforilado. Porém, isto foi acompanhado de uma significativa e persistente redução de fosforilação de EIF2 $\alpha$  (2, 6 e 12 horas), apesar de aumento importante em seu conteúdo total (2, 6 e 12 horas) pelo tratamento. Esses achados sugerem que apesar do aumento transitório da ativação/expressão da PERK, o sinal desta via da UPR não se propagou em resposta ao tratamento com palmitato.

Há relatos na literatura de que a resposta da PERK, sob diferentes condições, seja complexa, sugerindo que as consequências à jusante da ativação desta proteína possam diferir substancialmente, dependendo do nível e duração de sua ativação, assim como da expressão de outros fatores regulatórios que atuem sinergisticamente na adaptação metabólica. Isto é, genes podem mostrar uma resposta bifásica dependendo dos níveis de ativação da PERK. Esta complexidade não é surpreendente dado o fato de que a fosforilação de EIF2 $\alpha$  pode ter dois efeitos opostos: repressão da síntese global de proteínas e ativação da tradução de mRNAs específicos (Cavener, 2010).

A complexidade da relação entre a sobrevivência e a morte celular na UPR pode ser relacionada ao grau de fosforilação de EIF2 $\alpha$ . Estudos demonstram que a redução na fosforilação de EIF2 $\alpha$  possa contribuir para a morte celular (Ron, 2007), uma vez que a defosforilação deste fator leva ao aumento traducional e o aumento da carga de síntese proteica pode exacerbar o estresse de RE (Lai et al., 2007). Contudo, ainda existem dúvidas a cerca da regulação do nível de EIF2 $\alpha$  fosforilado para a sobrevivência celular visto que a ativação da PERK é efêmera e sua inibição traducional é transitória justamente para permitir uma eficiente resposta frente ao estresse (Ron, 2007; Schroder et al., 2005).

A Proteína GADD34 é importante no feedback negativo na via da PERK/EIF2 $\alpha$  atenuando a sinalização ao estresse, e reconstituindo a síntese proteica (Brush et al., 2002). Como foi verificado nos resultados deste estudo, GADD34 não sofreu alteração significativa pelo tratamento com palmitato, e por isso, podemos propor que talvez outros fatores estejam atuando na intensa redução de EIF2 $\alpha$  observada.

Como a via PERK/EIF2 $\alpha$  não apresentou resultados conclusivos, a próxima via investigada neste trabalho foi IRE1 $\alpha$ /XBP-1/TRAF2.

IRE1 $\alpha$  converte o pré-mRNA de XBP-1 (X-box binding protein 1) num RNA maduro (splicing) e a proteína traduzida deste mRNA leva a ativação de componentes relacionados ao sistema de degradação de proteínas no RE (Malhotra et al., 2007). Pela análise do conteúdo proteico de XBP-1 nuclear, verifica-se que o mesmo não apresentou alteração pelo tratamento com palmitato. Isso nos revela que a via IRE1 $\alpha$ /XBP-1 também não foi ativada nesta condição experimental, e na sequência a proteína TRAF2 (fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral) foi investigada.

Como é sabido, em adição ao *splicing* do RNAm de XBP-1, a ativação de IRE1 resulta no recrutamento de proteínas TRAF2 e a literatura indica que IRE1 $\alpha$  forma um complexo com as I $\kappa$ B cinases por meio de TRAF2, evidenciando a participação desta proteína na ativação de NF- $\kappa$ B (Dutta et al. 2006; Hu et al., 2006). As TRAFs (TNF receptor-associated factors) são proteínas intermediárias tanto nas vias canônicas como não-canônicas de sinalização de NF- $\kappa$ B, contudo sua atuação ainda não está totalmente elucidada (Sun, 2011).

As TRAFs são descritas como proteínas adaptadoras, que possuem um domínio N-terminal do tipo “*RING finger*”, o qual funciona como uma E3 ubiquitina ligase catalisando a transferência da ubiquitina às proteínas alvo de degradação (Hayden et al., 2008). É descrito que esta região N-terminal da TRAF2 é requerida na ativação de NF- $\kappa$ B (Sughra et al., 2010). Uma explicação plausível seria que esta região “*RING finger*” de TRAF2 catalisa a poliubiquitinação da RIP1 (proteína de interação com o receptor de TNF do tipo 1) em resposta a estimulação de TNF $\alpha$ . RIP1 ubiquitinizada recruta o complexo TAK1 (TGF $\beta$ - activated kinase 1), e então TAK1, por sua vez, fosforila e ativa IKK $\beta$  (Perkins, 2007).

Em adição a esta atividade ubiquitina ligase, TRAF2 parece interagir com receptores que integram a via não canônica de NF- $\kappa$ B, especialmente NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase) (Zhang et al., 2011). NIK foi a primeira proteína identificada da via de ativação de NF- $\kappa$ B chamada de não-canônica. A NIK estimula a fosforilação de IKK $\alpha$  e o processamento ubiquitino-dependente do precursor p100, gerando a proteína p52 e induzindo a migração do heterodímero RelB/p52 para o núcleo celular (Nomura et al., 2000; Perkins, 2007).

Como pode ser observado no presente estudo, a proteína IRE1 $\alpha$  apresentou aumento significativo na segunda hora de tratamento com palmitato evidenciando uma possível correlação da mesma com a ativação de TRAF2 que também mostrou aumento neste período. No entanto em resposta ao palmitato, a TRAF2 parece não estimular a fosforilação de IKK $\alpha/\beta$ , visto que estas proteínas não se ativaram com o tratamento.

A ativação de PERK, ATF6 e possivelmente de IRE1 leva a indução transcricional de CHOP10/GADD153, um fator de transcrição bZIP, que induz apoptose através de regulação positiva de genes como GADD34, ERO1, DR5 (death receptor 5), TRB3 (Tribbles homolog 3), anidrase carbônica VI ou ainda pela inibição da expressão do gene anti-apoptótico Bcl2 (Malhotra et al., 2007).

Como última forma de análise das vias de estresse de retículo, a proteína CHOP10/GAD153 foi investigada no núcleo celular, e não se observou aumento de seu conteúdo nuclear, evidenciando que provavelmente não houve ativação de processo apoptótico nas células L6 em razão do tratamento com palmitato.

A capacidade de CHOP10/GADD153 induzir apoptose associada ao estresse de RE foi recentemente demonstrada como dependente da duração do estado de estresse, ou seja, a exposição crônica a um estresse leve pode levar a adaptação por atenuação seletiva da expressão de CHOP mediada pela degradação de seu RNAm e proteína (Malhotra et al., 2007). Assim acredita-se que CHOP10/GADD153 não tenha sido ativada porque o estímulo causado pelo palmitato não foi forte o suficiente para induzir o estresse de RE e tão pouco causar apoptose celular.

Como pode ser observado neste estudo, o palmitato parece não causar estresse de retículo nas células musculares L6, apesar de vários relatos na literatura demonstrarem que este ácido graxo ativa a UPR em outros tipos celulares, como hepatócitos (Achard et al., 2010), células B pancreáticas (Green et al., 2011) e células musculares de camundongos C2C12 (Peng et al., 2011). Observamos apenas um indício transitório (em duas horas) o qual não se consolidou às 6 e 12 horas, quando a redução da expressão do *Slc2a4* está bastante evidente, contribuindo para a resistência à insulina induzida pelo palmitato.

A literatura ainda é bem controversa ao relacionar o palmitato, estresse de retículo e resistência à insulina no músculo esquelético.

Peng e seus colaboradores (2011) evidenciaram que o palmitato na dose de 500  $\mu$ M causava a diminuição da fosforilação de AKT, aumento de fosforilação de PERK, elevação de XBP-1 na forma "*spliced*" e alterações significantes na morfologia do retículo endoplasmático de células C2C12. Além disso, neste mesmo estudo foi verificado que o palmitato prejudicava a captação de glicose insulino-estimulada em mioblastos L6 que super expressavam GLUT4 (L6-GLUT4myc). Deldicque et al. (2010) também verificaram que 1000  $\mu$ M durante 17 horas aumentava dramaticamente o conteúdo proteico de BiP, IRE1 $\alpha$  e p-PERK e o mRNA de CHOP, ATF4 e XBP-1 em células C2C12.

Por outro lado, Hassan e colaboradores (2012) demonstraram que o estresse de retículo endoplasmático não medeia a resistência à insulina palmitado-induzida em miotubos C2C12 e em células musculares de biópsia humana. Eles verificaram que a incubação com 750  $\mu$ M de palmitato ativava apenas de forma moderada as

vias do estresse de RE e prejudicava a fosforilação de AKT/PKB pelo aumento da síntese de ceramidas, enquanto a tunicamicina (potente indutor de estresse de retículo) gerava uma ativação muito maior das vias da UPR e proporcionava forte ativação de IRE1/JNK, prejudicando a fosforilação de IRS-1 e causando um prejuízo mais precoce na via de sinalização da insulina. Neste mesmo estudo os tratamentos com chaperonas químicas inibidoras de estresse não melhoraram a sinalização da insulina quando as células foram incubadas com o palmitato, contrastando com o que foi observado no estresse induzido por tunicamicina, onde as chaperonas químicas inibiram IRE1/JNK e melhorando a sensibilidade a insulina.

Estes dados revelam o quanto os mecanismos envolvidos no estresse de retículo são variáveis, de acordo com o fator indutor aplicado. Contudo, nenhum dos estudos prévios verificaram a expressão do GLUT4.

Como é sabido, os ácidos graxos e/ou produtos derivados do seu metabolismo celular podem modular a atividade de fatores transcricionais (Duplus et al., 2000). Concomitantemente a isto, o estresse de retículo também é relatado como capaz de modular a expressão de vários genes (Hotamisligil, 2010). Assim, avaliou-se o conteúdo do RNAm de *Srebf1*, *Cebpa* e *Rela*, todos reguladores do gene *Slc2a4*, e sugeridos como sendo modulados por ácidos graxos e também ativados no estresse de RE.

Como já mencionado anteriormente o SREBP1 é um fator de transcrição envolvido na síntese de colesterol e ácido graxo e no metabolismo de glicose e é reconhecido como estimulador do *Slc2a4*. Os SREBPs são fatores de transcrição residentes no retículo endoplasmático e estudos evidenciam aumento da expressão destes no estresse de RE (Colgan et al., 2007; Wang et al., 2005). De fato, No estresse de RE ocorre indução de SREBPs pela degradação de INSIG via diminuição traducional por PERK/eIF2 $\alpha$  (Colgan et al., 2007) e pela ativação de ATF6, cujas proteínas que o clivam (S1P e S2P), clivam e ativam também os SREBPs (Ye et al., 2000).

No presente estudo o mRNA de *Srebf1* apresentou pequeno aumento significativo (15%) em 12 horas de tratamento com o palmitato, o que está em desacordo com a regulação negativa do gene *Slc2a4*, observada já a partir de 2 horas de tratamento. Por outro lado, na sexta hora de tratamento com o palmitato houve uma redução na expressão do *Srebf1*.

Já foi descrito que os ácidos graxos insaturados como oleico e linoleico são capazes de reprimir a expressão do mRNA do *Srebf1* (Hannah et al., 2001). Também, que o palmitato (saturado) prejudica enquanto o eicosapentaenoato (poli-insaturado) melhora a secreção e a via de sinalização da insulina por meio da regulação do SREBP1 em ilhotas pancreáticas (Kato et al., 2008). No caso do palmitato (400 $\mu$ M), observou-se aumento do RNAm do *Srebp1c*, com aumento também no conteúdo nuclear de SREBP-1c (Kato et al., 2008).

Assim, acredita-se que o palmitato seja capaz de modular a expressão/atividade do *Srebf1*, mas de maneira tecido, dose e tempo dependentes, de forma que no presente estudo, parece não ter participado da regulação observada na expressão do *Slc2a4* (GLUT4).

Os C/EBPs são membros da família b-zip (domínio básico de ligação do DNA), que contém um domínio *zipper* de leucina necessário para a sua dimerização. Desempenham papel importante na diferenciação de adipócitos, onde o C/EBP $\alpha$  estimula, entre outros genes, o *Slc2a4* (Pessler-Cohen et al., 2006). Entretanto, no músculo a função deste fator ainda não está esclarecida.

Como foi observado neste trabalho, o gene *Cebpa* (C/EBP $\alpha$ ) apresentou aumento significativo nos períodos de 2 e 12 horas de tratamento com o palmitato, o que é impossível de coadunar com a redução da expressão de *Slc2a4*/GLUT4 observada em células musculares L6.

Modificações pós-traducionais são mecanismos comuns para a regulação da estrutura das proteínas, e modificações na região N-terminal do C/EBP $\alpha$  por sumoilação e fosforilação já foram descritas (Cha et al., 2008). Hemati e colaboradores (1997) demonstraram que tratando adipócitos 3T3-L1 com insulina ocorria uma supressão de *Slc2a4*/GLUT4, que não se relacionava com o declínio do mRNA e/ou da proteína do C/EBP $\alpha$ , mas que dependia do grau de sua fosforilação em serina-21. Cha e seus colegas (2008) buscaram compreender o papel da fosforilação do C/EBP $\alpha$  em serina-21 e verificaram que nem a sinalização da insulina e nem a translocação do GLUT4 estavam alterados, mas que existia uma significativa redução na expressão do GLUT4 e uma reduzida habilidade de transativação do promotor do GLUT4.

Assim, é possível articular que, apesar do aumento da expressão do C/EBP $\alpha$  pelo tratamento com palmitato, o grau de fosforilação da proteína esteja reduzido de modo a participar da repressão do GLUT4 observada no presente estudo.

O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição pleiotrópico presente em quase todos os tipos celulares, atuando como um finalizador de uma série de vias de transdução de sinais que são iniciadas por estímulos como inflamação, estresse, imunidade, diferenciação, crescimento celular, tumorigênese e apoptose celular (Hayden et al., 2008). O NF- $\kappa$ B tem sido indicado como um fator transcricional repressor do gene *Slc2a4* há muito tempo (Silva et al. 2005), especialmente como mediador da atividade do TNF- $\alpha$  (Furuya et al., 2010), um clássico repressor do *Slc2a4*. Apenas recentemente nosso grupo demonstrou (Furuya et al., 2013) que a região promotora do gene *Slc2a4* apresenta sequências (-134/-112 e -82/-60 no gene do camundongo) às quais tanto NF- $\kappa$ B p50 como NF- $\kappa$ B p65 são capazes de se ligar e agir como repressor direto da atividade transcricional do *Slc2a4*.

No presente estudo, um aumento no conteúdo do mRNA do *Rela* (isoforma que codifica a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B) foi detectado na presença do palmitato nos períodos de 6 e 12 horas de incubação. Desta forma, optou-se por investigar não só a expressão deste fator transcricional, como também o conteúdo proteico nas subunidades p65 e p50 e sua atividade de ligação no gene *Slc2a4* por meio de EMSA.

Observou-se aumento no conteúdo proteico total da subunidade p65 nos períodos de 6 e 12hs, sendo que no núcleo este aumento foi significativo desde a segunda hora de tratamento. O conteúdo total da subunidade p50 também apresentou aumento significativo nos períodos de 6 e 12 horas, sendo que no núcleo o maior acréscimo foi evidenciado em 6 horas de tratamento com o palmitato. Em conjunto, estes resultados indicam que um aumento na atividade reguladora do NF- $\kappa$ B inicia-se já na segunda hora por meio da p65 (provavelmente como homodímero), exacerbando-se em 6 e 12 horas (como heterodímero p50/p65) em resposta ao palmitato. Ainda, avaliando a somatória dos conteúdos nuclear e citoplasmático da p65, observa-se um aumento significativo no conteúdo total da proteína em 6 e 12 horas, o qual coaduna perfeitamente com o aumento na expressão do RNAm do *Rela* também observado em 6 e 12 horas.

Apesar de termos observado claramente a translocação nuclear de p50 e p65, alguns estudos contestam que o principal passo envolvido na atividade transcricional do NF- $\kappa$ B seja a translocação dos dímeros para o núcleo, visto que alguns deles, em certos tipos celulares e/ou condições experimentais, podem ser constitutivamente

nucleares (Ghosh et al., 2002), de maneira que confirmar maior atividade de ligação do NF- $\kappa$ B à região promotora do *Slc2a4* seria fundamental.

Ao avaliar a atividade de ligação do NF- $\kappa$ B à região promotora do gene *Slc2a4*, foi observado um aumento na atividade de ligação já no período de 2 horas de tratamento com o palmitato, o que apesar de esvanecer em tempos intermediários, voltou a se manifestar fortemente (12 horas de tratamento). Este aumento de atividade transcricional do NF- $\kappa$ B pode explicar a redução na expressão de *Slc2a4*/GLUT4 observada em resposta ao palmitato. Neste sentido, também já foi evidenciada maior atividade de ligação de proteínas nucleares ao domínio de ligação do NF- $\kappa$ B no promotor do *Slc2a4* em resposta ao tratamento, in vivo, com ácidos graxos insaturados oleico e o linoleico (Poletto, 2011), sugerindo que este mecanismo de regulação do gene *Slc2a4* (via NF- $\kappa$ B) seja comum a vários ácidos graxos. Contudo, no presente estudo, não ficou claro o mecanismo pelo qual o palmitato regulou a expressão e/ou atividade do NF- $\kappa$ B.

Como pode ser visto nos resultados do presente trabalho, houve discrepância entre o grau de fosforilação de IKK $\alpha/\beta$  e a ativação de NF- $\kappa$ B. A ativação de NF- $\kappa$ B foi detectada já no período de 2 horas de tratamento (translocação nuclear e aumento da ligação), entretanto nenhum aumento importante e significativo foi observado na fosforilação de IKK $\alpha/\beta$ . Porém, já foi relatado que a ativação de IKK pode ser um evento transitório, pois o IKK sofre regulação negativa intrínseca muito rapidamente, podendo ser alvo de componentes como deubiquitinasas A20 e CYLD (Hayden et al., 2008); e assim a participação de IKK $\alpha/\beta$  talvez não possa ser descartada. Ainda, há relatos de que a regulação da atividade do NF- $\kappa$ B não depende unicamente de IKK (Ghosh et al., 2002); e assim, o fato de não ter sido observado aumento na fosforilação do complexo IKK, não inviabiliza o aumento da atividade do NF- $\kappa$ B observada em resposta ao palmitato.

É possível cogitar que, no presente estudo, uma via “não-canônica” possa estar ativada, visto que o complexo IKK não apresentou alteração.

Tem sido descrito algumas cinases podem fosforilar I $\kappa$ B em resíduos de tirosina, em lugar da clássica fosforilação em serina, também conduzindo à ativação de NF- $\kappa$ B (Imbert, 1996). Contudo o papel da fosforilação em tirosina na ativação do NF- $\kappa$ B ainda não está bem esclarecido. Além deste aspecto, embora a atenção primária sempre esteja direcionada a ação de cinases envolvidas na fosforilação de I $\kappa$ B, a subunidade P65 de NF- $\kappa$ B também pode ser diretamente fosforilada por



outras proteínas cinases como a PKC e PKA (Ghosh et al., 2002; Mut et al., 2010; Zhong et al., 1997), independentemente das IKKs. Além disso, já foi demonstrado que mesmo em células depletadas de I $\kappa$ B (subunidades  $\alpha/\beta/\epsilon$ ), o NF- $\kappa$ B é capaz de se ligar ao DNA e ativar a transcrição, evidenciando que a ativação do NF- $\kappa$ B não depende apenas das vias clássicas (Tergaonkar, 2005).

Assim, parece que a repressão da expressão do *Slc2a4* induzida pelo palmitato envolve o NF- $\kappa$ B, evidenciando uma importante ligação palmitato-inflamação-redução de *Slc2a4*/GLUT4 e resistência à insulina.

## 7 CONCLUSÃO

---

Os resultados deste estudo evidenciam que o palmitato induz diminuição da expressão do RNAm do *Slc2a4* e da proteína GLUT4 em células musculares L6. Neste efeito do palmitato observa-se:

- que o estresse de retículo endoplasmático não está envolvido de maneira importante;
- que a via apoptótica CHOP10/GADD153 não é ativada;
- que os fatores transcricionais C/EBP $\alpha$  e SREBP1 não participam da repressão do *Slc2a4*;
- e que ativação de NF-kB, por uma via alternativa, é um importante mecanismo envolvido na repressão do gene *Slc2a4*.

## REFERÊNCIAS\*

---

Achard CS, Laybutt R. Lipid-induced endoplasmic reticulum stress in liver cells results in two distinct outcomes: adaptation with enhanced insulin signaling or insulin resistance. *Endocrinology*. 2012;153:2164–77.

Alves-Wagner ABT, Freitas HS, Souza PB, Seraphim PM, Mori RCT, Machado UF. B-adrenergic activity preserves GLUT4 protein in glycolytic fibers in fasting. *Muscle Nerve*. 2009;40:847–54.

Anhê GF, Okamoto MM, Kinote A, Sollon C, Lellis-Santos C, Anhê FF, Lima GA, Hirabara SM, Velloso LA, Bordin S, Machado UF. Quercetin decreases inflammatory response and increases insulin action in skeletal muscle of ob/ob mice and in L6 myotubes. *European Journal of Pharmacology*. 2012;689:285–93.

Araki E, Oyadomari S, Mori M. Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic B-cells and diabetes mellitus. *Exp Biol Med*. 2003;228:1213–17.

Armoni M, Harel C, Bar-Yoseph F, Milo S, Karnieli E. Free fatty acids repress the GLUT4 gene expression in cardiac muscle via novel response elements. *The journal of biological chemistry*. 2005;280(41):34786–95.

Bachar E, Ariav Y, Ketzinel-Gilad M, Cerasi E, Kaiser N, Leibowitz G. Glucose amplifies fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress in pancreatic  $\beta$ -cells via activation of mTORC1. *PLoS ONE*. 2009;4(3):e4954.

Back SH, Scheuner D, Han J, Song B, Ribick M, Wang J, Gildersleeve RD, Pennathur S, Kaufman RJ. Translation attenuation through eIF2 $\alpha$  phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in B cells. *Cell Metabolism*. 2009;10:13–26.

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Fève B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*. 2006;17(1):4-12.

Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2005;7:1553-67.

Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest*. 2002; 32(3):14-23.

Brozinick JT JR, Mccoid SC, Reynolds TH, Nardone NA, Hargrove DM, Stevenson RW, Cushman SW, Gibbs EM. GLUT4 overexpression in db/db mice dose-

---

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [Cited 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

independently ameliorates diabetes but is not a lifelong cure. *Diabetes*. 2001;50:593-600.

Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S. Growth arrest and dna damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 $\alpha$  to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the  $\alpha$  subunit of eukaryotic translation initiation factor. *Mol Cell Biol*. 2003;23(4):1292-303.

Cavener DR, Gupta S, Mcgrath BC. PERK in beta cell biology and insulin biogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2010;21(12):714-21.

Cha HC, Oak RN, Kang S, Tran TA, Kobayashi S, Chiang SH, Tenen DG, Macdougald OA. Phosphorylation of CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  regulates GLUT4 expression and glucose transport in adipocytes. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2008;283(26):18002–11.

Colgan SM, Tang D, Werstuck GH, Austin RC. Endoplasmic reticulum stress causes the activation of sterol regulatory element binding protein-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39:1843–51.

Curi R, Peres CM. Ácidos graxos como moduladores intercelulares. In: Curi R, Pompeia C, Miyasaka Miy, Procopio J. Entendendo as gorduras: os ácidos graxos. São Paulo: Manole; 2002. p. 201-14.

Corrêa-Gianella ML, Machado UF. SLC2A4 gene: a promising target for pharmacogenomics of insulin resistance. *Pharmacogenomics*. 2013;14(8):847–50.

DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991;14(3):173-94.

DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am*. 2004;88(4):787-835.

Deldicque L, Cani PD, Philp A, Raymackers JM, Meakin PJ, Ashford MLJ, Delzenne NM, Francaux M, Baar K. The unfolded protein response is activated in skeletal muscle by high-fat feeding: potential role in the downregulation of protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299:E695–705.

De Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*. 2008;582(1):97-105.

Duplus E, Glorian M, AND Foresti C. Fatty acid regulation of gene transcription. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2000;275(40):30749–52.

Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gélinas C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- $\kappa$ B. *Oncogene*. 2006;25:6800–16.

Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The Molecular Basis for Oxidative Stress-Induced Insulin Resistance. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7:1040–52.

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;59:395–9.

Furuya DT, Poletto AC, Machado UF. Obesidade x Resistência à insulina x Inflamação. Identificação de dois sítios de ligação de NFκB na região promotora do gene do GLUT4. *Endocrinologia & Metabologia*. 2008;52:S171.

Furuya DT, Poletto AC, Freitas HS, Machado UF. Inhibition of cannabinoid CB1 receptor upregulates Slc2a4 expression via nuclear factor-κB and sterol regulatory element-binding protein-1 in adipocytes. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2012;49:97–106.

Furuya DT, Neri EA, Poletto AC, Anê GF, Freitas HS, Campello RS, Rebouças NA, Machado UF. Identification of nuclear factor-κB sites in the Slc2a4 gene promoter. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2013;370:87–95.

Ghosh S, Karin M. Missing Pieces in the NF-κB Puzzle. *Cell*. 2002;109:S81–96.

Glezer I, Marcourakis T, Avellar MCW, Gorensteina C, Scavone C. O fator de transcrição NF-κB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. *Rev Bras Psiquiatr*. 2000;22(1):26-30.

Gonzalez–Gronow M, Selim MA, Papalas J, Pizzo SV. GRP78: A multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid Redox Signal*. 2009,11(9):2299–306.

Green CD, Olson LK. Modulation of palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in pancreatic β-cells by stearoyl-CoA desaturase and Elovl6. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300:E640–49.

Guo W, Wong S, Xie W, Lei T, Luo Z. Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293:E576–86.

Haber EP, Hirabara SM, Gomes AD, Curi R, Carpinelli AR, Carvalho CRO. Palmitate modulates the early steps of insulin signalling pathway in pancreatic islets. *FEBS Letters*. 2003;544(1-3):185-88.

Hannah VC, Ou J, Luong A, Goldstein JL, Brown MS. Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem*. 2000;276(6):4365-72.

Hassan RH, Hainault L, Vilquin JT, Samama C, Lasnier F, Ferré P, Fougère F, Hajdouch E. Endoplasmic reticulum stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells. *Diabetologia*. 2012;55:204–14.

Hayden MS, Ghosh S. Shared Principles in NF-κB Signaling. *Cell*. 2008;132:344-58.

Hemati N, Ross SE, Erickson RL, Groblewski GE, Macdougald OA. Signaling pathways through which insulin regulates CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) phosphorylation and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *The journal of biological chemistry*. 1997;272(41):25913–19.

Hetz C, Glimcher LH. Fine-tuning of the unfolded protein response: assembling the IRE1 $\alpha$  interactome. *Molecular Cell*. 2009;35:551-61.

Hommelberg PPH, Plat J, Langen RCJ, Schols AMWJ, Mensink RP. Fatty acid-induced NF- $\kappa$ B activation and insulin resistance in skeletal muscle are chain length dependent. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296:E114-20.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259:87-91.

Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010;140:900–17.

Hu P; Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH. Autocrine tumor necrosis factor  $\alpha$  links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(8):3071-84.

Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metabolism*. 2007;5(4):237–52.

Im SS, Kwon SK, Kang SY, Kim TH, Kim H, Hur MW, Kim KS, Ahn YH. Regulation of GLUT4 gene expression by SREBP-1c in adipocytes. *Biochem J*. 2006;399:131–9.

Im SS, Kwon SK, Kim TH, Kim H, Ahn YH. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. *Life*. 2007;59(3):134-45.

Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, Pahl HL, Traenckner EB, Mueller-Dieckmann C, Farahifar D, Rossi B, Aueberger P, Baeuerle PA, Peyron JF. Tyrosine phosphorylation of I kappa B- $\alpha$  activates NF- $\kappa$ B without proteolytic degradation of I kappa B- $\alpha$ . *Cell*. 1996;86(5):787-98.

Jiang HY, Wek SA, Mcgrath BC, Scheuner D, Kaufman RJ, Cavener DR, Wek RC. Phosphorylation of the  $\alpha$  subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF- $\kappa$ B in response to diverse cellular stresses. *Mol Cell Biol*. 2003;23:5651–63.

Joost, H.; Thorens, B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence, characteristics, and potential function of its novel members. *Mol Membr Biol*. 2001;18:247-56.

Jové M, Planavila A, Sanchez RM, Merlos M, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. Palmitate induces tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in C2C12 skeletal muscle cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Endocrinology*. 2006;147:552–61.

Jové M, Planavila A, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. Palmitate induced interleukin 6 production is mediated by protein kinase C and nuclear factor kB activation and leads to glucose transporter 4 down-regulation in skeletal muscle cells. *Endocrinology*. 2005;146(7):3087-95.

Jump DB. Fatty acid regulation of gene expression. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2004;41(1):41-78.

Jump DB, Tripathy S, Depner CM. Fatty Acid–Regulated Transcription Factors in the Liver. *Annu Rev Nutr*. 2013.33:1.1–1.21

Kaneko M, Niinuma Y, Nomura Y. Activation signal of NF-kB in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol Pharm Bull*. 2003;26:931–5.

Karaskov E, Scott C, Zhang L, Teodoro T, Ravazzola M, Volchuk A. Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic  $\beta$ -Cell apoptosis. *Endocrinology*. 2006;147(7):3398-407.

Kashyap SR, DeFronzo RA. The insulin resistance syndrome: physiological considerations. *Diab Vasc Dis Res*. 2007;4(1):13-19.

Kato T, Shimano H, Yamamoto T, Ishikawa M, Kumadaki S, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Yahagi N, Nakakuki M, Hasty AH, Takeuchi Y, Kobayashi K, Takahashi A, Yatah S, Suzuki H, Sone H, Yamada N. Palmitate impairs and eicosapentaenoate restores insulin secretion through regulation of SREBP-1c in pancreatic islets. *Diabetes*. 2008;57:2382–92.

Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002;110:1389–98.

Kawamoto EM, Lepsch LB, Boaventura MF, Munhoz CD, Lima LS, Yshii LM, Avellar MC, Curi R, Mattson MP, Scavone C. Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. *J Neurosci*. 2008;28:845-60.

Kennedy A, Martinez K, Chuang C, Lapoint K, McIntosh M. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *Journal of Nutrition*. 2009;139(1):1-4.

Kettelhut IC, Navegantes LCC, Migliorini, RH. Controle hormonal e neural do metabolismo energético. In: Aires MM. *Fisiologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.p.1168-79.

Kimball SR. Eukaryotic initiation factor eIF2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1991;31:25-29.

Kitamura M. Biphasic, bidirectional regulation of NF $\kappa$ B by endoplasmic reticulum stress antioxidant. *Redox Signal*. 2009;11(9):2353–64.

Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology*. 2007;22:193–201.

Lambertucci RH, Hirabara SM, Silveira LR, Levada-Pires AC, Curi R, Pithon-Curi TC. Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2008;216:796-804.

Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*. 2005;35(4):373–81.

Lee JN, Zhang X, Feramisco JD, Gong Y, Ye J. Unsaturated fatty acids inhibit proteasomal degradation of Insig 1 at a postubiquitination step. *J Biol Chem*. 2008;283(48):33772-83.

Lin JH, Walter P, Yen TSB. Endoplasmic reticulum stress in disease. *Pathogenesis. Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2008;3:399–425.

Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE. Palmitate-induced Apoptosis Can Occur through a Ceramide-independent Pathway. *The journal of biological chemistry*. 2001;276(18):14890–95.

Lima GA, Anê GF, Giannocco G, Nunes MT, Correa-Gianella ML, Machado UF. Contractile activity per se induces transcriptional activation of SLC2A4 gene in soleus muscle: involvement of MEF2D, HIF1- $\alpha$ , and TR alpha transcriptional factors. *Am J Physiol Endocrinol. Metab*. 2009;296(1):E132-38.

Liu J, Jin X, Yu CH, Chen SH, Li WP, Li YM. Endoplasmic reticulum stress involved in the course of lipogenesis in fatty acids-induced hepatic steatosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2009;25(3):613-18.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods*. 2001;25:402-8.

Lorenzo M, Fernández-Veledo S, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, De Alvaro C, Nieto-Vazquez I. Insulin resistance induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in myocytes and brown adipocytes. *J Anim Sci*. 2008;86:E94-104.

Lu J, Wang Q, Huang L, Dong H, Lin L, Lin N, Zheng F, Tan J. Palmitate causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human mesenchymal stem cells: Prevention by AMPK activator *endocrinology*. 2012;153:5275–84.

Machado UF. Transportadores de glicose. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 1998;42(6):413-21.

Machado UF, Schaan BD, Seraphim PM. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006;50(2):177-89.



Malhotra JD, Kaufman RJ. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2007;18:716–31.

Mayer CM, Belsham DD. Palmitate Attenuates Insulin Signaling and Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Hypothalamic Neurons: Rescue of Resistance and Apoptosis through Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase Activation. *Endocrinology*. 2010;151:576–85.

Miller RS, Diaczok D, Cooke DW. Repression of GLUT4 expression by the endoplasmic reticulum stress response in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;362:188–92.

Mitsumoto Y, Klip A. Developmental regulation of the subcellular distribution and glycosylation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during myogenesis of L6 muscle cells. *J Biol Chem*. 1992;267(7):4957-62.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.

Muaddi H, Majumder M, Peidis P, Papadakis AI, Holcik M, Scheuner D, Kaufman RJ, Hatzoglou M, Koromilas AE. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  at serine 51 is an important determinant of cell survival and adaptation to glucose deficiency. *Molecular Biology of the Cell*. 2010;2:3220–31.

Mut M, Amos S, Hussaini IM. PKC alpha phosphorylates cytosolic NF-kappaB/p65 and PKC delta delays nuclear translocation of NF-kappaB/p65 in U1242 glioblastoma cells. *Turkish Neurosurgery*. 2010;20(3):277-85.

Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka T, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, Matsuhisa M. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2005;280(1):847–51.

Nomura F, Kawai T, Nakanishi K, Akir S. NF-kB activation through IKK-I dependent I-TRAF/TANK phosphorylation. *Genes to Cells*. 2000;5:191-202.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306(5695):457-61.

Pahl HL, Baeuerle PA. The ER-overload response: activation of NF-kB. *Trends Biochem Sci*. 1997;22:63–7.

Peng G, Li L, Liu Y, Pu J, Zhang S, Yu J, Zhao J, Liu P. Oleate blocks palmitate-induced abnormal lipid distribution, endoplasmic reticulum expansion and stress, and insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology*. 2011;152:2206–18.

Perkins ND. Integrating cell-signaling pathways with NF-kB and IKK function. *Nature*. 2007;8:49-62.

Pessler-Cohen D, Pekala PH, Kovsan J, Bloch-Damti A, Rudich A, Bashan N. GLUT4 repression in response to oxidative stress is associated with reciprocal alterations in C/EBP alpha and delta isoforms in 3T3-L1 adipocytes. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2006;112(1):3-12.

Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance *J Clin Invest*. 2000;106(2):165–69.

Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(9):45.

Poletto AC. Ácidos graxos insaturados oléico e linoléico reprimem o gene Slc2a4 via NF-κB e SREBP-1. 2011. 89 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Ragheb R, Shanab GML, Medhat AM, Seoudi DM, Adeli K, Fantus IG. Free fatty acid-induced muscle insulin resistance and glucose uptake dysfunction: Evidence for PKC activation and oxidative stress-activated signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;389(2):211-16.

Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*. 2002;365:561-75.

Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell. *Cell Death and Differentiation*. 2004;11:372–80.

Rieusset J, Chauvin MA, Durand A, Bravard A, Laugerette F, Michalski MC, Vidal H. Reduction of endoplasmic reticulum stress using chemical chaperones or GRP78 overexpression does not protect muscle cells from palmitate-induced insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012;417:439-45

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Molecular cell biology*. 2007;8:519-29.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414:799-806.

Salvadó L, Coll T, Gómez-Foix AM, Salmerón E, Barroso E, Palomer X, Vázquez-Carrera M. Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia*. 2013;56:1372–82.

Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev*. 2007;87:507-20.

Scheuner D, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with B-cell failure and diabetes. *Endocrine Reviews*. 2008;29:317-33.

Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research*. 2005;569:29–63.

Senn JJ. Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(37):26865–75.

Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106:171–76.

Silva JLT, Giannocco G, Furuya DT, Lima G A, Moraes P A.C., Nacheff S, Bordin S, Britto L RG, Nunes MT, Machado UF. NF- $\kappa$ B, MEF2A, MEF2D and HIF1- $\alpha$  involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2005;240:82–93.

Sinhá S, Perdomo G, Brown NF, O'doherty RM. Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of nuclear factor  $\kappa$ B. *J Biol Chem*. 2004;279(40):41294-301.

Stenbit AE, Tsao TS, LI J, Burcelin R, Geenen DL, Factor SM, HOUSEKNECHT K, KATZ EB, CHARRON MJ. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med*. 1997;3(10):1096-101.

Sughra K, Birbach A, DE Martin R, Schmid JA. Interaction of the TNFR-receptor associated factor TRAF1 with I-Kappa B kinase-2 and TRAF2 indicates a regulatory function for NF-Kappa B signaling. *PLoS One*. 2010;5(9):e12683.

Sun SC. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Research*. 2011;21(1):71-85.

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Molecular Cell Biology*. 2006;7:85-96.

Tergaonkar V, Correa RG, Ikawa M, Verma IM. DISTINCT roles of I $\kappa$ B proteins in regulating constitutive NF- $\kappa$ B activity. *Nature cell biology*. 2005;7(9):921-27.

Tsai YC, Weissman AM. Ubiquitylation in ERAD: reversing to go forward? *PLoS Biol*. 2011;9(3):1-5.

Tsuchiya Y, Hatakeyama H, Emoto N, Wagatsuma F, Matsushita S, Kanzaki M. Palmitate-induced down-regulation of sortilin and impaired GLUT4 trafficking in C2C12 myotubes. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. 2010:1-15.

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, RON D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*. 2000;287(5453):664-6.

Wali VB, Bachawal SV, Sylvester PW. Endoplasmic reticulum stress mediates c-tocotrienol-induced apoptosis in mammary tumor cells. *Apoptosis*. 2009;14:1366–77.

Wan XD, Yang WB, Xia YZ, Wang JF, Lu T, Wang XM. Disruption of glucose homeostasis and induction of insulin resistance by elevated free fatty acids in human L02 hepatocytes. *J Endocrinol Invest*. 2009;32(5):454-59.

Wang H, Kouri G, Wollheim CB. ER stress and SREBP-1 activation are implicated in B-cell glucolipototoxicity. *Journal of Cell Science*. 2005;118(17):3905-15.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(5):1111-19.

Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO reports*. 2002;3(10):944-50.

White MF, Kahn CR. The insulin signaling system *J. Biol. Chem*. 1994;269:1-4.

White UA, Stephens JM. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010;318:10-4.

Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2656-64.

Yamagishi N, Ueda T, Mori A, Saito Y, Hatayama T. Decreased expression of endoplasmic reticulum chaperone GRP78 in liver of diabetic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012;417:364-70.

Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, GOLDSTEIN JL. ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. *Molecular Cell*. 2000;6:1355-64.

Yonemitsu S, Nishimura H, Shintani M, Inoue R, Yamamoto Y, MASUZAKI H, et al. Troglitazone induces GLUT4 translocation in L6 myotubes. *Diabetes*. 2001;50:1093-1101.

Youngren, JF. Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007;64:873-91.

Zaid H, Antonescu CN, Randhawa VK, KLIP A. Insulin action on glucose transporters through molecular switches, tracks and tethers. *Biochem J*. 2008;413:201-15.

Zha BS, Zhou H. ER Stress and Lipid Metabolism in Adipocytes. *Biochemistry Research International*. 2012:1-9.

Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008;454(7203):455-62.

Zhang L, Blackwell K, Altaeva A, Shi Z, Habelhah H. TRAF2 phosphorylation promotes NF- $\kappa$ B-dependent gene expression and inhibits oxidative stress induced cell death. *Molecular Biology of the Cell*. 2011;22:128-40.

Zhang J, Wu W, Li D, Guo Y, Ding H. Overactivation of NF- $\kappa$ B impairs insulin sensitivity and mediates palmitate-induced insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocr.* 2010;37:157–66.

Zhong H, Suyang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. The transcriptional activity of NF- $\kappa$ B is regulated by the I $\kappa$ B-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell.* 1997;89(3):413-24.

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