

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

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- κ 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- κ 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 α e a via IRE1 α /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 α e SREBP1 não parecem regular o *Slc2a4* mediante o tratamento com palmitato. Já o fator transcricional NF- κ B apresentou-se aumentado em seu conteúdo proteico e em seu RNAm. A atividade de ligação do NF- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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 α pathway and IRE1 α /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 α and SREBP1 are not regulating *Slc2a4* by treatment with palmitate. The transcriptional factor NF- κ B were increased in protein content and mRNA. The binding activity of NF- κ 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- κ 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- κ 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 (α) e duas subunidades beta (β), ligadas por pontes dissulfeto. As subunidades α encontram-se extracelularmente, enquanto as subunidades β são proteínas transmembranas. A insulina liga-se a porção α , levando a uma alteração conformacional que retira a ação inibitória da subunidade α sobre a subunidade β , que se autofosforila em resíduos de tirosina. Uma vez ativa, a porção β fosforila substratos do receptor de insulina (IRS), que contêm múltiplos sítios de fosforilação em tirosina. Pelo menos 12 substratos para o IR já foram identificados (IRS1 a 6, Gab-1, Shc 1 a 3, p62, APS), sendo IRS-1 e IRS-2 os mais diretamente relacionados à resistência à insulina (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⁺, 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).

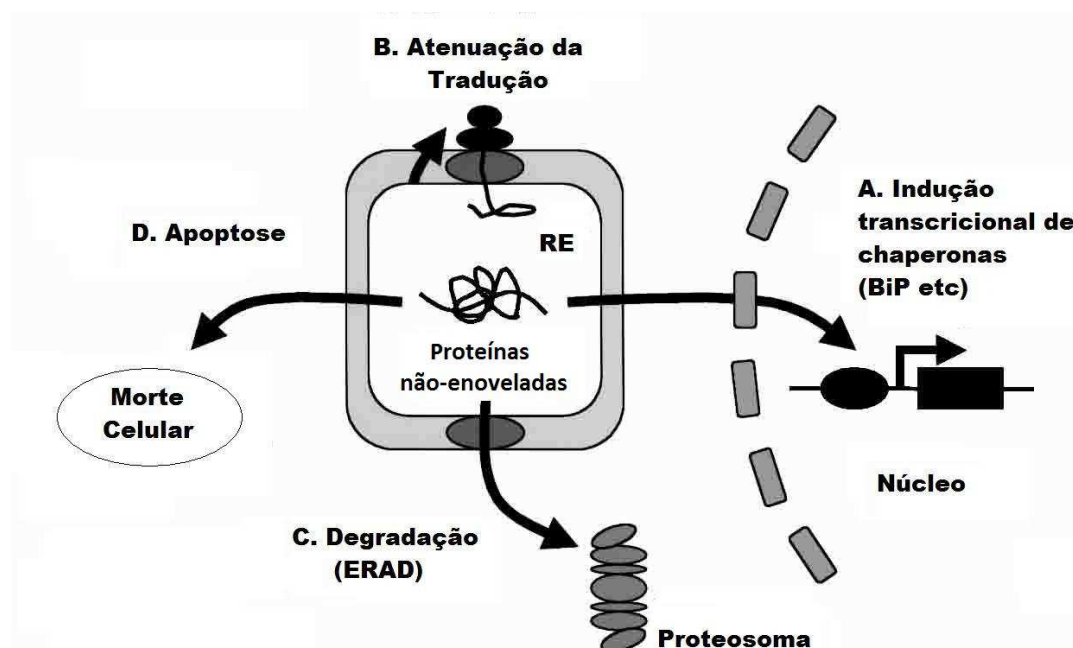
Várias condições podem perturbar as funções do RE, tais como, inibição da glicosilação de proteínas, redução da formação de pontes dissulfeto, depleção de cálcio no lúmen do RE, prejuízo no transporte de proteínas do RE para o Golgi, acúmulo de proteínas mal enoveladas, hipóxia, toxinas, excesso de ácidos 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 α (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 α : a proteína *PKR-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK), a proteína cinase R (PKR), *Heme-regulated EIF2 α kinase* (HRI) e a proteína cinase *general control nonrepressed-2* (GCN2). Entretanto, a via PERK/EIF2 α é a que possui maior significância biológica (Kaufman et al., 2002).

Algumas fosfatases que desfosforilam o fator EIF2 α e reconstituem a síntese global proteica foram caracterizadas: GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein-34) e *CreP* (constitutive repressor of EIF2 α phosphorylation). Estas fosfatases regulam a atividade da proteína fosfatase 1 (PP1), por meio de seus domínios C-terminais homólogos, e desfosforilam EIF2 α . 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_i^{Met}) é transferido para a subunidade 40S ribossomal num complexo ternário consistindo de Met-tRNA_i^{Met}, 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 α) é um inibidor competitivo de EIF2B impedindo a reação de troca GDP-GTP. Assim, a fosforilação de EIF2 α efetivamente evita a formação do complexo EIF2-GTP-Met-tRNAⁱ e inibe a síntese proteica global. (Kimball, 1999).

Embora a fosforilação de EIF2 α 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 α 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 α , 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, γ -glutamylcisteina sintetase, Heme oxigenase-1 (HO-1) e UDP-glucuronosyl transferase (Malhotra et al., 2007).

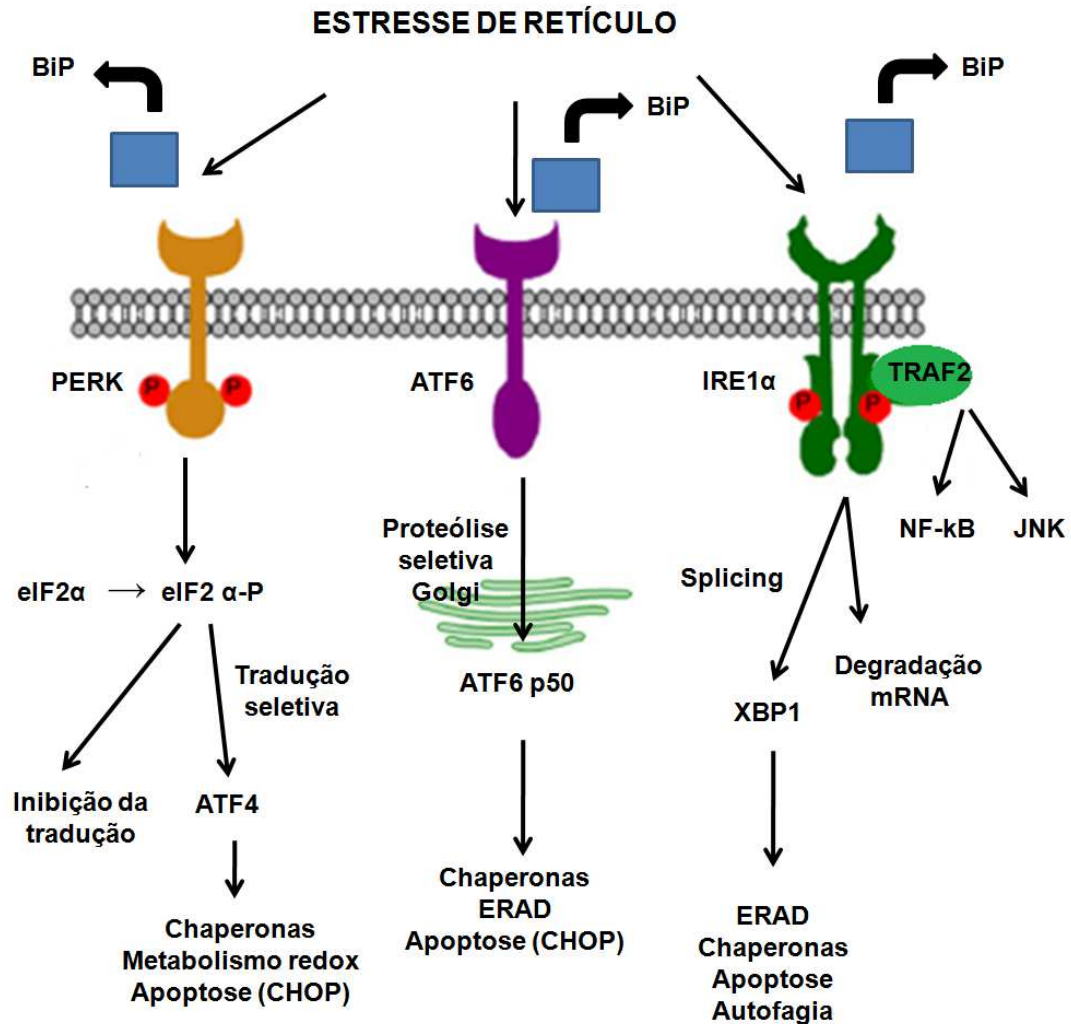
Num segundo momento, a liberação da GRP78 do ATF6 dispara um mecanismo de ativação distinto do anteriormente descrito. O ATF6 desligado da GRP78 transloca-se para o aparato de Golgi, onde proteases residentes (S1P e S2P) o clivam e liberam o fator de transcrição ativo no citosol. ATF6 atua aumentando 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 α é a via mais conservada da UPR, entretanto pouco ainda é conhecido sobre sua regulação. A IRE1 α 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- κ B (Hu et al., 2006; Zangh et al., 2011).

Fig. 2 – Esquema representativo das três vias de sinalização da UPR: PERK, ATF6 e IRE1 α (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 κ 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- α), ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF- κ 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- κ B) e o CCAAT/enhancer-binding protein- α (C/EBP α).

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 α (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- κ B (Hommelberg et al., 2009; Sinha, et al., 2004; Zhang et al., 2010). Vários trabalhos têm demonstrado também que ocorre ativação do NF- κ B em resposta ao estresse de retículo via IRE1/ TRAF2 e via PERK/ EIF2 α (Hu et al., 2006; Jiang et al., 2003; Kaneko et al., 2003; Kitamura, 2009; Pahl et al., 1997).

O NF- κ 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 κ B, inibindo a atividade de NF- κ B. A forma ativada do NF- κ 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- κ B reside no citosol na forma de heterodímero ligado ao inibidor proteico, I κ B. Em mamíferos, há três principais I κ Bs: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ . A ativação de NF- κ B tipicamente envolve a fosforilação de I κ B pelo complexo I κ B cinase, composto por IKK[1]- α , IKK[2]- β e IKK[3]- γ , sendo esta última conhecida por regulador essencial de NF- κ B (NEMO). I κ 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- κ B. O NF- κ B migra para o núcleo, liga-se a sequências de DNA, conhecidas como sítios κ B, em regiões promotoras de genes alvos de seu controle (Hayden et al., 2008).

É sabido que o NF- κ 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- κ B atua na transcrição de citocinas pró inflamatórias como o TNF- α (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- κ 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 α (alpha), β (beta), γ (gama), δ (delta), ϵ (épsilon) e ζ (zeta) (White et al., 2010).

O fator de transcrição C/EBP α (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 α em seu promotor e que este último o regula positivamente (Im et al., 2007).

O C/EBP ζ 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 α , 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 α e IRE1/XBP-1/TRAF2 na ativação do NF- κ 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.

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 α 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 β -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 α 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>

dependently 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 α to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the α 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 α 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- κ 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, Fougelle 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 α (C/EBP α) 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 α interactome. *Molecular Cell*. 2009;35:551-61.

Hommelberg PPH, Plat J, Langen RCJ, Schols AMWJ, Mensink RP. Fatty acid-induced NF- κ 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- α : 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 α links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ 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- α activates NF- κ B without proteolytic degradation of I kappa B- α . *Cell*. 1996;86(5):787-98.

Jiang HY, Wek SA, Mcgrath BC, Scheuner D, Kaufman RJ, Cavener DR, Wek RC. Phosphorylation of the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF- κ 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- α expression in C2C12 skeletal muscle cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor- κ 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 β -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 κ 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- α , 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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- α 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 α 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- κ B 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- κ B, MEF2A, MEF2D and HIF1- α 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 κ 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- κ 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 κ B proteins in regulating constitutive NF- κ 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- κ 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- κ 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- κ B is regulated by the I κ 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.