

MILANO FELIPE DOS SANTOS FERREIRA MARQUES

**PARTICIPAÇÃO DO CANAL DE POTÁSSIO DEPENDENTE DE
ATP (KATP) NA RESISTÊNCIA À INSULINA EM MÚSCULO
ESQUELÉTICO: CORRELAÇÃO COM O GENE DO GLUT4**

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.

Aera de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado

Versão original

São Paulo
2013

RESUMO

MARQUES, M. F. S. F. **Participação do canal de potássio dependente de ATP (KATP) na resistência à insulina em músculo esquelético: correlação com o gene do Glut4.** 2013. 94 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A resistência à insulina foi induzida em ratos Wistar machos, por tratamento com glutamato monossódico (MSG) (4 mg/g/dia, s.c). Aos três meses de idade, ratos controles e obesos foram divididos em grupos não tratados (C e MSG) e tratados (CG e MSG/G) com glibenclorida (0,1mg/kg/dia, em água de beber) por 4 semanas. Os animais foram submetidos ao teste de tolerância a insulina (ITT) e amostras de músculo EDL e sóleo foram retirados para quantificação do mRNA e proteína. No ITT, ratos MSG mostraram diminuição significativa do decaimento de glicose em resposta à insulina, o que reverteu com o tratamento com glibenclorida. Em músculo sóleo, foi observado aumento de 45% no mRNA de SUR2A no grupo MSG/G ($p < 0,01$ vs. MSG e C). Os resultados de mRNA de KIR6.2 resultaram em aumento da expressão em animais MSG/G comparados a todos os demais grupos. Semelhantemente, no grupo MSG/G foi encontrado aumento de 103% da proteína KIR6.2 em membranas plasmáticas (PM), em comparação aos demais grupos. A análise de mRNA *Slc2a4*, resultou em aumento de 15% em ratos MSG em relação ao grupo controle, que aumentou ainda mais após o tratamento com glibenclorida. Em relação a proteína GLUT4, ratos obesos tratados com glibenclorida aumentaram a proteína GLUT4, comparados com controles e obesos não tratados. Não foram encontradas diferenças da expressão de mRNA de MEF2A, MEF2D e HIF1- α em sóleo. Em relação aos resultados em músculo extensor digital longo, (EDL), não houve diferença no mRNA e proteína de SUR2A. O mRNA de *Slc2a4* reduziu em 40% em ratos MSG, e elevou-se após o tratamento com glibenclorida, mas não foram encontradas diferenças estatísticas do conteúdo da proteína GLUT4 em EDL nas frações subcelulares analisadas, PM (membranas plasmáticas) e M (microsomas). Em EDL, foi observada uma elevação de mRNA do KIR6.2 no grupo CG, quando comparado aos grupos MSG e MSG/G, a proteína KIR6.2 não teve alteração. Não foram encontradas diferenças da expressão de mRNA MEF2A, MEF2D e HIF1- α em EDL. Em relação aos resultados encontrados em culturas de células musculares L6, geraram dados opostos ao *in vivo*. Foi observada elevação da expressão de SUR2a do grupo glibenclorida em relação ao grupo controle e controle + insulina, diferença também foi encontrada em relação ao grupo glibenclorida + insulina. Já os resultados de mRNA de KIR6.2, o grupo controle + insulina obteve redução de KIR6.2 em relação ao controle. O tratamento com glibenclorida resultou em aumento da expressão de KIR6.2, em relação ao grupo controle e controle + insulina. A associação de glibenclorida + insulina resultou em diminuição de KIR6.2 em relação ao grupo glibenclorida. Glibenclorida sozinha reduziu a expressão de *Slc2a4* em relação ao controle e controle + insulina. A adição de insulina conjuntamente com glibenclorida elevou a expressão em relação ao grupo glibenclorida. E finalmente, foi observado que insulina provocou redução discreta da expressão de NF-KB no grupo controle + insulina em relação ao controle. A glibenclorida elevou a expressão de NF-KB em relação aos grupos controle e controle + insulina. O tratamento conjunto de glibenclorida + insulina, gerou redução da expressão de NF-KB em relação ao grupo glibenclorida.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Resistência à insulina. Canal de potássio dependente de ATP. Fator de transcrição. Receptor de sulfoniluréia.

ABSTRACT

MARQUES, M. F. S. F. **Participation of ATP-sensitive potassium (KATP) channel in skeletal muscle insulin resistance: correlation with GLUT4 gene.** 2013. 94 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Insulin resistance was induced in male Wistar rats by neonatal treatment with monosodium glutamate (MSG) (4mg/g/day, s.c). At the age of three months, both control (C) and MSG treated animals received glimepiride (0.1 mg/kg/day, in the drinking water) for 4 weeks, and were divided into non-treated (C and MSG) and glimepiride treated (CG and MSG-G) groups. Animals were submitted to insulin tolerance test (ITT) and samples of glycolytic (EDL-extensor digitorum longus) and oxidative (soleus) skeletal muscles were excised for quantification of mRNA expression and protein. In ITT, MSG rats showed significant decrease in glucose decay in response to insulin, which reversed by treatment with glimepiride. In soleus muscle, was observed 45% increase in mRNA SUR2A in MSG/G group ($p < 0.01$ vs. MSG and C). Kir6.2 mRNA resulted in increased expression in animals MSG/G compared to all other groups. Similarly, in-group MSG / G was found increase 103% of Kir6.2 protein in plasma membrane (PM), as compared to other groups. The Slc2a4 mRNA analysis resulted in 15% increase in MSG rats in relation to control group, which further increased after treatment with glimepiride. Regarding GLUT4 protein, obese rats treated with glimepiride increased GLUT4 protein, compared with controls and obese untreated. There weren't differences in MEF2A, MEF2D and HIF1- α mRNA expression in soleus. Regarding the results in long digital extensor muscle (EDL), there was no difference in mRNA and SUR2A protein. The Slc2a4 mRNA decreased in 40% in MSG rats, and increased after treatment with glimepiride, but there were no statistical differences in GLUT4 protein content in EDL in subcellular fractions analyzed, PM (plasma membrane) and M (microsomes). In EDL, was observed an increase in Kir6.2 mRNA in CG group compared to groups MSG E MSG/G, Kir6.2 protein did not change. There were not found differences in MEF2A, MEF2D and HIF1- α mRNA expression in EDL. Regarding the results found in cultured L6 muscle cells, generated opposed data to *in vivo*. Was observed elevated expression of SUR2a glimepiride group compared to control group and control + insulin, difference also was found in relation to glimepiride group + insulin. Already Kir6.2 mRNA results, the control group + insulin obtained a Kir6.2 reduction compared to control. Treatment with glimepiride resulted in increased Kir6.2 expression in the control group and control + insulin. The association of insulin + glimepiride resulted in decrease of Kir6.2 compared to glimepiride group. Glimepiride alone reduced the expression of *Slc2a4* in relation to control and control + insulin. The adding of insulin with glimepiride increased expression compared to glimepiride group. And finally, was observed that insulin caused a slight reduction in NF-KB expression in control group + insulin compared to control. Glimepiride increased NF-KB expression in relationship to control and control + insulin. The joint treatment of glimepiride + insulin, generated reduced NK-KB expression compared to the glimepiride group.

Keywords: Skeletal muscle. Insulin resistance. ATP-sensitive potassium channels. Transcription factors. Sulfonylurea receptors.

1 INTRODUÇÃO

O diabetes melito (DM) é a mais comum das doenças metabólicas, sua incidência aumenta em ritmo alarmante, do ano 2000 a 2010, a prevalência de diabéticos aumentou de 121 para 185 milhões, representando 6,4% da população adulta mundial. Projeções indicam que 366 milhões de indivíduos estarão afetados pela doença em 2030 (BAILEY et al., 2010; WILDING, 2007). Por isso essa enfermidade vem se tornando um dos maiores problemas de saúde pública do século 21. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006), o crescimento dos casos de diabetes está relacionado com alterações no estilo de vida e no perfil socioeconômico destes indivíduos, diminuindo a expectativa de vida desses pacientes em 15 anos. Cerca de dois terços dos indivíduos com diabetes vivem nos países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade, com crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens (MEETOO et al., 2007; WILD et al., 2004).

Na população brasileira entre 30 e 69 anos, a prevalência de DM acomete cerca de 7% e chega a atingir cifras próximas a 20% na população acima dos 70 anos. Estima-se que 50% dos diabéticos ainda não foram diagnosticados e 25% não fazem nenhum tipo de tratamento (PAIVA et al., 2006). O DM não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia. Essa hiperglicemia é o resultado de defeitos na ação da insulina, em sua secreção ou em ambos (SPELLMAN, 2008).

A classificação atual do DM é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento. A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM (doenças do pâncreas exócrino, *Maturity Onset Diabetes of the Young* MODY e endocrinopatias) e diabetes gestacional (SKELLY, 2006).

A obesidade e o ganho de peso estão entre os principais fatores de risco para o DM2, estimando-se que cada quilograma de aumento de peso associa-se a uma elevação de 9% na prevalência de DM. Mais de 80% dos pacientes diabéticos do tipo 2 apresentam obesidade ou excesso de peso, agravando a sua situação metabólica, e predispondo a dislipidemias e hipertensão arterial (PILZ; MÄRZ, 2008).

O DM2 caracteriza-se por glicemia inapropriadamente elevada, frequentemente acompanhada de dislipidemia e hipertensão arterial. Muitos indivíduos são assintomáticos, porém a hiperglicemia é em grau suficiente para causar alterações degenerativas a longo prazo (SKELLY, 2006; TIBALDI, 2008). O DM2 é uma desordem metabólica complexa, de

causas multifatoriais e poligênicas, apesar de pouco se conhecer sobre os genes envolvidos. A síndrome, no entanto, no que se refere à perda do controle glicêmico envolve desarranjo metabólico/funcional em três territórios: tecidos periféricos (adiposo e muscular), ilhotas pancreáticas e tecido hepático. No DM2 os tecidos muscular, adiposo e hepático desenvolvem resistência à ação da insulina, porém nas ilhotas pancreáticas, a secreção de insulina pelas células beta pode estar preservada, gerando um estado relativo de insuficiência de insulina. Com o tempo, a secreção de insulina pode evoluir para uma deficiência absoluta, por exaustão da célula beta, causando maior deterioração na homeostasia (HICKMAN; MACDONALD, 2007).

Quando tecidos sensíveis à ação da insulina, quanto ao transporte de glicose, têm a capacidade de captar glicose reduzida, caracteriza-se o estado de resistência à insulina. Esta desordem metabólica contribui no estabelecimento de quadros de hipertensão, dislipidemia e doença cardiovascular aterosclerótica, que associados à obesidade e/ou DM2 compõem a Síndrome Metabólica (REAVEN, 1988). A resistência insulínica torna-se mais intensa, o que pode ser associado à carga genética e/ou condições adquiridas como obesidade, sedentarismo e envelhecimento; e então, começa a diminuir a secreção de insulina (SPELLMAN, 2007). Estudos recentes comprovam que uma das vias de deterioração da função das células beta ocorre por exposição crônica a elevados níveis de ácidos graxos livres (AGL), associados à obesidade e aos estados de resistência insulínica (PRATO et al., 2007). A lipotoxicidade está associada ao acúmulo de gordura intracelular causando disfunção da secreção pancreática de insulina e a diminuição da função das células beta. De acordo com esta hipótese, a exposição crônica aos AGL levaria a ativação de vias que causam aumento do estresse oxidativo e ativação de vias inflamatórias ocasionando apoptose das células beta pancreáticas (MARCHETTI et al., 2008).

O músculo esquelético é o maior território de utilização de glicose, sendo responsável no organismo por 85% da captação de glicose estimulada por insulina (DEFRONZO et al., 1981) no período pós-prandial.

O transporte de glicose é fundamental para o metabolismo energético celular. A rota glicolítica é empregada por todos os tecidos para degradação de glicose e fornecimento de energia (na forma de ATP) e intermediários para outras rotas metabólicas. Para acessar o intracelular, a glicose não pode solubilizar-se na membrana, devido ao caráter polar da molécula, e, para tanto, existem dois mecanismos de transporte de glicose através da membrana celular: difusão facilitada, mediada por transportadores da família GLUT; e co-

transporte com o íon sódio, mediado por transportadores da família SGLT (SCHEEPERS et al., 2004).

A família GLUT é composta por 14 membros que são numerados pela ordem cronológica de seu descobrimento. São proteínas de 45-60 kDa com 12 α -hélices transmembrânicas e hidrofóbicas, interligadas por alças hidrofílicas, distribuídas de forma que a porção C-terminal e a N-terminal fiquem do lado citoplasmático (JOOST et al., 2001).

O GLUT4 é o transportador insulino-dependente mais abundante nas membranas celulares do músculo esquelético, cardíaco e tecido adiposo. A insulina, na musculatura esquelética estimula a captação de glicose e a síntese de glicogênio, e no tecido adiposo estimula a captação de glicose e redução na degradação com aumento na síntese de triglicérides. Embora sejam vários os eventos intracelulares envolvidos na captação de glicose estimulada pela insulina, o fenômeno culmina com a translocação de vesículas ricas em GLUT4 do intracelular para a membrana plasmática, aumentando a densidade de transportador na membrana, e conseqüentemente aumentando a difusão da glicose para o intracelular (MACHADO, 1998). Qualquer defeito em alguma destas etapas pode determinar resistência ao estímulo da insulina, podendo levar ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (HUANG; CZECH, 2007).

Resistência insulínica no músculo esquelético é defeito primário em indivíduos portadores de DM2. A sensibilidade insulínica decai drasticamente, embora a tolerância à glicose possa se deteriorar minimamente, enquanto houver hiperinsulinemia compensatória (GULLI et al., 1992; PRATIPANAWATR et al., 2001)

No músculo esquelético, o GLUT4, codificado pelo gene Solute Carrier 2A4 (*Slc2a4*), apresenta-se em maior quantidade em fibras do tipo I e IIa, quando comparado com as fibras do tipo IIb (MARETTE et al., 1992). No estado quiescente, uma boa quantidade de proteína GLUT4 permanece estocada em vesículas intracelulares, porém frente a um estímulo realizado pela insulina ou pela contração muscular, as vesículas são rapidamente translocadas para a membrana plasmática e para os túbulos T, aumentando drasticamente a captação de glicose (CORTRIGHT; DOHM, 1997).

Adicionalmente a esta regulação aguda na distribuição subcelular, a expressão de *Slc2a4* está sob controle dinâmico e complexo. Em estados de deficiência insulínica tais como jejum e diabetes insulino privo, ambos conteúdos de mRNA e proteína GLUT4 estão reduzidos no tecido adiposo e músculos cardíaco e esquelético (CAMPS et al., 1992; DEPRE et al., 2000; NEUFER et al., 1993). Porém, em estados de diabetes tipo 2, a resistência à

insulina também se acompanha de redução de GLUT4, apesar da presença de hiperinsulinemia (MACHADO et al., 1993, MACHADO et al., 1994).

A região promotora do gene do *Slc2a4* apresenta sítios específicos (elementos responsivos) que ancoram proteínas (fatores de transcrição) que atuam como ativadores ou repressores da transcrição gênica. Um fator de transcrição apresenta domínios que se ligam ao DNA (no elemento responsivo) e outros que podem recrutar co-ativadores ou co-repressores, os quais contribuem na estimulação ou repressão da transcrição do gene-alvo pela RNA-Polimerase tipo II. Portanto, o controle da expressão gênica é modulado pela interação de uma série de fatores de transcrição, além de sua capacidade de ativarem co-ativadores ou co-inibidores (BRIAVANOU; DORNELL, 2002).

O fator transcricional MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2), importante na regulação do gene *Slc2a4*, tem papel central na proliferação, diferenciação, morfogênese, sobrevivência e apoptose da célula muscular. Os fatores MEF2 pertencem à família MADS Box (MCM1-Agamous-Deficiens-Serum response factor) e foram descritos pela primeira vez como fatores de transcrição que se ligam a sequências de DNA ricas em A/T nos promotores de vários genes músculo-específicos. Existem 4 genes da família MEF2 que foram identificados em vertebrados: *mef2a*, *b*, *c* e *d* que são expressos de forma distinta, mas em padrões de sobreposição durante a embriogênese e nos tecidos adultos. Eles possuem domínios de ligação ao DNA quase idênticos na extremidade N-terminal, com alta homologia no domínio MADS Box (aminoácidos 1-57). Este domínio é responsável pela ligação ao DNA e dimerização das proteínas, permitindo que os fatores MEF2 se liguem como homo ou heterodímeros a um elemento *cis* com a sequência (C/T)TA(A/T)TATATATA(G/A). Um domínio adjacente ao MADS Box chamado domínio MEF2 (aminoácidos 58-86), que é característico da família, influencia a afinidade de ligação ao DNA assim como a interação com co-fatores. A região C terminal apresenta o domínio de transativação. Nessa região, também ocorrem processos complexos de *splicing* alternativo, com certos exons presentes em todos os tipos celulares, enquanto outros são limitados a tipos celulares específicos (BLACK; OLSON, 1998; JANSON et al., 2001).

Os fatores da família MEF2 podem ser ativados por Ca⁺⁺, Calcineurina, MAP quinases p38, ERK5 e CaM quinase. Além disso, os fatores MEF2 também são regulados pela associação com desacetilases de histonas da classe II (HDAC-II) no núcleo. Neste caso, a sinalização pelo Ca⁺⁺, através da ativação de CaM-quinase leva à fosforilação de HDAC-II,

que se transloca para o citosol, permitindo a ativação dos fatores MEF2 (BLACK; OLSON, 2006).

O elemento responsivo aos MEF2s, na região promotora do gene *Slc2a4* de camundongo, está localizado entre os pares de bases 466-457 (LIU et al., 1994), e ancora os fatores MEF2A, B, C e D, e o MyoD, que atuam como ativadores da transcrição do *Slc2a4* (MORENO et al., 2003).

Outro regulador do gene *Slc2a4* é o fator induzido por hipóxia (HIF). Este é um fator de transcrição gênica heterodimérico, em geral composto de duas proteínas *basic helix-loop-helix* (bHLH): HIF-A e HIF-B. Existem três isoformas de HIF-A que são estruturalmente semelhantes. A isoforma HIF-3A, ao contrário das isoformas HIF-1A e HIF-2A, está associada à regulação negativa da transcrição gênica induzida pelo HIF (WANG et al., 1993; WANG et al., 1995).

As duas subunidades (HIF-A e HIF-B) são constitutivamente expressas, entretanto, enquanto a subunidade B é estável tanto em normóxia quanto em hipóxia, a A é rapidamente degradada se o ambiente for de normóxia (MAXWELL et al., 1999; WANG et al., 1995a). O HIF-1A já foi descrito como ativador da transcrição dos genes *Slc2a1* e *Slc2a3*, e como inibidor da transcrição do gene do *Slc2a2* (ERBET et al., 1996). Royer e colaboradores (2000) verificaram o aumento do GLUT4 na hipóxia, e estudos do nosso laboratório demonstraram fortes evidências de que HIF1-A esteja envolvido na ativação do gene *Slc2a4* em músculo esquelético (LIMA et al., 2009; SILVA et al., 2005).

NF- κ B (do inglês, *nuclear factor kappa B*) também é proposto como um regulador do gene *Slc2a4*. A família do NF- κ B é composta por cinco membros denominados, RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105) e NF- κ B2 (p52/p100). Ambas as subunidades p50 e p52 são sintetizadas a partir de proteínas precursoras longas, p105 e p100. Em geral, a forma ativa de NF- κ B consiste de um heterodímero composto pela subunidade p65 associada à p50 ou p52. Na maioria das células, este heterodímero reside no citosol associado a um inibidor protéico, I κ B (do inglês, *inhibitors of NF- κ B*). Em mamíferos, há três principais isoformas de I κ B: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ . A ativação de NF- κ B tipicamente envolve a fosforilação de I κ B pelo complexo I κ B cinase (do inglês, *I κ B kinase*), composto por IKK α , IKK β e IKK γ (NEMO). Pela via clássica de ativação de NF- κ B, I κ B ao ser fosforilado, dissocia-se das subunidades heterodiméricas de NF- κ B sendo direcionado à degradação proteossomal. Como consequência o NF- κ B migra ao núcleo onde se liga as sequências de DNA, conhecidas como sítios κ B, localizadas nas regiões promotoras de genes relacionados a apoptose, adesão celular, resposta

imune, inflamação, estresse celular e remodelamento tecidual. É importante ressaltar que a expressão desses genes é também dependente da ação de outras vias de sinalização e fatores de transcrição. Assim, os resultados da ativação de NF- κ B dependerão da natureza e do contexto da célula (PERKINS, 2007).

A atuação de NF- κ B na regulação do gene *Slc2a4* foi sugerida em meados de 2002 (RUAN et al., 2002). Posteriormente, Silva et al. (2005) relacionaram o aumento do mRNA do NF κ B e da sua atividade de ligação ao DNA, com a diminuição na expressão gênica de GLUT4 em amostras de músculo solear de ratos jejuados. Além disto, a repressão na expressão do gene *Slc2a4* já foi relacionada com aumento no conteúdo de IL-6 do (inglês, *interleucin 6*) devido ativação da via PKC/NF- κ B por palmitato, em células musculares C2C12 (JOVÉ et al., 2005). Adicionalmente, alguns estudos de nosso laboratório reforçaram o papel inibitório do NF κ B na expressão do *Slc2a4* também em célula adiposa (FURUYA et al., 2010; FURUYA et al., 2012). Finalmente, um recente estudo do nosso grupo demonstrou definitivamente o efeito repressor do NF κ B sobre a transcrição do *Slc2a4*, apontando 2 sítios de ligação presentes no promotor do gene (FURUYA et al., in press).

Além da regulação por meio de fatores transcrionais, em algumas situações fisiopatológicas, especialmente obesidade e DM2, a resistência insulínica pode estar ligada a ativação dos canais de potássio dependentes de ATP, os quais funcionam como sensor energético e metabólico.

Os canais de potássio dependentes de ATP (KATP) são proteínas de membrana com permeabilidade seletiva ao potássio, e representam a maior e mais diversa família de canais iônicos identificada. O receptor de sulfoniluréia 1 (SUR1), membro da super família *ATP-binding cassette* (ABC) encontra-se na região regulatória do KATP e foi assim denominado por ser sítio de ligação das sulfoniluréias, classe de fármacos utilizada no tratamento de DM2. O canal iônico KIR6.2, denominado de *Potassium inwardly-rectifying channel*, está localizado na região formadora de poros (ASHCROFT, 2006; BRYAN et al., 2004). Acredita-se que o SUR seja o sensor da relação ATP/ADP, importante na atividade do canal. Os genes *KIR 6.2* e *SUR1* estão localizados conjuntamente no cromossomo 11 (11p 15.1) e estão sob regulação de um promotor comum, regulado por um único fator de transcrição, porém desconhecido, isso permite que as expressões de ambos os genes estejam intrinsecamente associadas (SMITH et al., 2007).

O papel deste canal está bem definido em células beta pancreáticas, onde participa ativamente do processo de secreção de insulina em resposta à glicose; os mecanismos

envolvidos incluem: 1) transporte da glicose para o interior as células pelo transportador GLUT2; 2) metabolização intracelular da glicose gerando ATP; 3) aumento intracelular da razão ATP/ADP; 4) fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}); 5) aumento de K^+ intracelular; 6) despolarização de membrana da célula beta; 7) abertura do canal de Ca^{2+} voltagem dependente; 8) influxo de Ca^{2+} e aumento de sua concentração citoplasmática e 9) exocitose dos grânulos secretores contendo insulina (ASHCROFT, 2006; SMITH, 2007).

A participação do K_{ATP} na regulação da secreção da insulina foi evidenciada após a descoberta de que mutações nos genes codificadores das subunidades *SUR1* e *KIR6.2* são responsáveis pela doença conhecida como hipoglicemia hiperinsulinêmica persistente neonatal (HHPN), anteriormente conhecida como nesidioblastose (THOMAS et al., 1995). O conhecimento sobre o K_{ATP} está bem desenvolvido na célula beta pancreática, devido ao seu importante papel na secreção de insulina, entretanto, sua função em outros territórios ainda é praticamente desconhecida.

O canal K_{ATP} está presente em vários outros tecidos; incluindo tecido cardíaco, adiposo, vascular, cerebral e muscular liso. Existem várias combinações *KIR 6.X / SUR*, que se expressam seletivamente em vários tecidos, e que determinam diferenças bioquímicas e farmacológicas. Duas isoformas de *KIR6* (*KIR 6.1* e *KIR 6.2*) e duas proteínas *SUR* (*SUR1* e *SUR2*) foram identificadas em seres humanos. As proteínas *SUR2A* e *SUR2B* são formadas por *splicing* alternativo do RNA primário, e conferem propriedades fisiológicas e farmacológicas distintas sobre a complexidade do canal, sendo que a isoforma *SUR2A* é predominantemente encontrada em músculo esquelético e cardíaco. (FLAGG et al., 2010). Assim, no tecido muscular, a combinação das proteínas identificada é *KIR6.2 / SUR2A* (NAGASHIMA et al., 2004; SOLBACH et al., 2006), cuja função é desconhecida, embora haja indícios de que participe no processo de captação de glicose (SEINO; MIKI, 2003). Canais de K_{ATP} estão entre os canais mais expressos em sarcolema do músculo esquelético. A função do canal de K_{ATP} no músculo esquelético tem sido pouco estudada, em comparação ao músculo cardíaco.

Estudos de camundongos geneticamente modificados revelaram que os canais K_{ATP} também estão envolvidos na proteção contra isquemia neuronal, cerebral, alterações cardíacas, regulação da musculatura lisa vascular e na captação de glicose no músculo esquelético (SEINO; MIKI, 2003). Estas propriedades derivam da sua capacidade de alterar o metabolismo celular, por meio da atividade elétrica e/ou por sensoriamento nas mudanças dos

níveis de ATP e MgADP citosólicos. Estes nucleotídeos têm ações antagônicas sobre o canal, o MgADP abre enquanto o ATP fecha o canal (CAMPBELL et al., 2003).

As sulfoniluréias exercem o seu efeito de liberar insulina principalmente através da inibição do canal de potássio dependente de ATP. No presente estudo, utilizamos a glimepirida, uma droga do grupo das sulfoniluréias, que são secretagogos de insulina e, por isso, indicados apenas para pacientes que tenham reserva pancreática do hormônio. As sulfoniluréias recebem esta denominação por apresentarem na sua estrutura química, um grupamento composto por ácido sulfônico e uréia (KECSKEMETI et al., 2002). Por seu potente efeito sobre a secreção de insulina, induzem aumento da insulinemia e, algumas vezes, hipoglicemia prolongada (RAPTIS; DIMITRIADIS, 2001).

A glimepirida é uma sulfoniluréia cujos efeitos vão além do estímulo à secreção de insulina. Dados de literatura sugerem que esta droga pode apresentar efeitos extra-pancreáticos importantes, levando a um aumento da sensibilidade à insulina. Há estudos que demonstraram que a glimepirida aumenta a captação de glicose e a taxa de translocação de GLUT4 em músculo esquelético (MORI et al., 2008; MULLER; GEISEN, 1996) e a expressão da proteína GLUT4 em músculo cardíaco (BAHR et al., 1995).

Em relação à homeostasia glicêmica, no músculo esquelético, o papel dos canais KATP ainda é completamente desconhecido, embora já tenha sido discutida a possibilidade de estarem envolvidos na captação de glicose (MINAMI et al., 2004). Além disso, recentemente, nosso grupo demonstrou que o tratamento de ratos resistentes à insulina com glimepirida, restaura a homeostasia glicêmica, aumentando a captação de glicose em músculo sóleo, por aumentar a expressão e a translocação do GLUT4 no tecido (MORI et al., 2008).

O músculo esquelético é o principal sítio de captação de glicose sob estímulo insulínico (ZORZANO; PALACIN; GUMÁ, 2005). Uma vez que os KATP possam desempenhar um papel importante na capacidade do músculo esquelético captar glicose, por exemplo, modulando a expressão do gene *Slc2a4*, as proteínas constituintes do canal passariam a representar um importante alvo para desenvolvimento de novas abordagens preventivas ou terapêuticas para a resistência à insulina e o diabetes mellitus.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, observou-se que:

- o tratamento dos animais obesos com glimepirida induziu no músculo sóleo um aumento do *Slc2a4*, o qual se refletiu em aumento importante da proteína, o que deve contribuir para melhorar a captação de glicose neste tecido, e conseqüentemente contribuir para recuperar a homeostasia glicêmica.
- glimepirida aumentou a expressão de mRNA de SUR2a e KIR6.2 em sóleo, assim como aumentaram as proteínas SUR2A e KIR6.2. Estas observações indicam que a glimepirida deve alterar o KATP dos animais obesos, pelo menos no sóleo, podendo induzir alterações metabólicas que se relacionem com a melhora da homeostasia glicêmica.
- no modelo in vitro, glimepirida aumentou o mRNA de NF- κ B, o que em geral ocorre em paralelo à atividade transcricional deste fator, sendo um mecanismo que reduz a resistência à insulina.

Com base nos resultados destacados acima, conclui-se que glimepirida aumenta expressão do gene *Slc2a4* em músculo sóleo de ratos resistentes à insulina, o que se correlaciona com aumento de mRNA de SUR2A/KIR6.2, sugerindo uma relação entre estas variáveis, ou a existência de fatores reguladores comuns. Um candidato importante a regulador comum destes genes é o NF- κ B, um importante mediador da resposta inflamatória, Estas regulações devem estar envolvidas no efeito sensibilizador da glimepirida sobre a sensibilidade à insulina in vivo.

REFERÊNCIAS*

ASHCROFT, F. M. K (ATP) channels and insulin secretion: a key role in health and disease. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 34, pt. 2, p. 243-246, 2006.

ASHCROFT, F. M.; GRIBBLE, F.M. Sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. **Diabetologia**, v. 42, n. 8, p. 903-919, 1999.

ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, v. 54, p. 87-143, 1989.

BACKS, J.; OLSON, E. N. Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. **Circ. Res.**, v. 98, p. 15-24, 2006.

BAHR, M.; VON HOLTEY, M.; MULLER G.; ECKEL, J. Direct stimulation of myocardial glucose transport and glucose transporter-1 (GLUT1) and GLUT4 protein. **Circ. Res.**, v. 136, p. 2547-2553, 1995. Suppl. 6.

BAILEY, C. J.; GROSS, J. L.; PIETERS, A.; BASTIEN, A.; LIST, J. L. Effect of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycaemic control with metformin: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 375, p. 2223-2233, 2008.

BARROS, R. P.; MORANI, A.; MORISCOT, A.; MACHADO, U. F. Insulin resistance of pregnancy involves estrogen-induced repression of muscle GLUT4. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 295, p. 24-31, 2008.

BLACK, B. L.; OLSON, E. N. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 14, p. 167-196, 1998.

BONORA, E.; NOGHETI, P.; ZANCARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIATORI, V.; CORGNATI, A.; MUGGEO, M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance testes with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 68, p. 374-378, 1989.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 25, n. 2, p. 169-193, 2000.

BRIAVANOU, A. H.; DARNELL JR, J. E. Signal Transduction and the control of gene expression. **Science**, v. 295, p. 813-818, 2002.

BRYAN, J.; VILA-CARRILES, W. H.; ZHAO, G.; BABENKO, A. P.; BRYAN, L. A. Toward linking structure with function in atp-sensitive k channels. **Diabetes**, v. 53, p. S104-S112, 2004. Suppl. 3.

CAMERON, D. P.; CUTBUSH, L.; OPAT, F. Effect of monosodium glutamate-induced obesity in mice on carbohydrate metabolism and insulin secretion. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 5, p. 41-51, 1978.

*De acordo com:

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

CAMPBELL, J. D.; SANSOM, M. S. P.; ASHCROFT, F. M. Potassium channel regulation. **European Molecular Biology Organization**, v. 4, n.11, p. 1038–1042, 2003.

CAMPS, M.; CATELLO, A.; MUNOZ, P.; MONFAR, M.; TESTAR, X.; PALACIN, M.; ZORZANO, A.; Effect of diabetes and fasting on GLUT4-(muscle/fat) glucose transporter expression in insulin-sensitive tissues. **Biocem. J.**, v. 282, p. 765-772, 1992.

CORTRIGHT, R. N.; DOHM, G. L. Mecanism by which by insulin and muscle contraction stimulate glucose transport. **Can. J. Appl. Physiol.**, v. 22, p. 519-530, 1997.

DAWSON, R; ANNAU Z. A behavioral assessment of arcuate nucleus damage after a single injection of monosodium glutamate. **Neurobehav. Toxicol. Teratol.**, v. 5, p. 399-406, 1983.

DEFROZO, R. A.; JACOT, E.; JEQUIER, E.; MAEDER, E.; WAHREN, J.; FELBER, J. P. The effects of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. **Diabetes**. v. 30, p. 1000-1007, 1981. Suppl. 12.

DEPRE, C.; YOUNG, M.; YING, J.; AHUJA, H.; HAN, Q.; GARZA, N.; DAVIES, P.; TAEGTMEYER, H. Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 32, p. 985-996, 2000.

EL-REYANI, N. E.; BOZDOGAN, Ö, BACZKÓ, I.; LEPRÁN, I.; PAPP, J. G. Comparison of the efficacy of glibenclamide and glimepiride in reperfusion-induced arrhythmias in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 365, p. 187-192, 1999.

ERBET, B. L.; GLEADLE, J. M.; O'ROURKE, J.; BARTLETT, S. M.; POUTON, J.; RATCLIFFE, P. J. Isoenzyme specific regulation of genes involved in energy metabolism by hypoxia: similarities with the regulation of erythropoietin. **Biochem. J.**, v. 313, p. 809-814, 1996.

FERNANDES, L. C.; MARQUES DA COSTA, M. M.; CURI, R. Metabolism of glucose, glutamine and pyruvate in lymphocytes from walker 256 tumor-bearing rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 2539-2543, 1994.

FLAGG, T. P.; ENKVETCHAKUL, D.; KOSTER, J. C.; COLIN G. NICHOLS, C. G. Muscle KATP Channels: Recent Insights to Energy Sensing and Myoprotection. **American Physiological Society**, v. 1, p. 130-135, 2010.

FURUYA, D. T.; POLETTO, A. C.; FAVARO, R. R.; MARTINS, J. O.; ZORN, T. M.; MACHADO, U. F. Anti-inflammatory effect of atorvastatin ameliorates insulin resistance in monosodium glutamate-treated obese mice. **Metabolism**, v. 59, p. 395-399, 2009. Suppl. 3.

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

GULLI, G.; FERRANNINI, E.; STERN, M.; HAFFNER, S.; DEFRONZO, R.A.; The metabolic profile of NIDDM is fully established in glucose-tolerant offspring of two Mexican-American NIDDM parents. **Diabetes**, v. 41, p. 1575-1586, 1992.

HICKMAN, I. J.; MACDONALD, G. A. Diabetes on the severity of liver disease. **Am. J. Med.**, v. 120, n. 10, p. 829-834, 2007.

HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. **Prog. Lipid. Res.**, v. 28, p. 67-115, 1989. Suppl. 2.

HOMMELBERG, P. P.; PLAT, J.; LANGEN, R. C.; SCHOLS, A. M.; MENSINK, R. P. Fatty acid-induced NF-kappaB activation and insulin resistance in skeletal muscle are chain length dependent. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 269, p. E114-E120, 2009. Suppl. 1.

HUANG, S.; CZECH, M. P. The GLUT4 glucose transporter. **Cell Metabolism.**, v. 4, n. 4, p. 237-252, 2007.

HWANG, L. E.; GU, J.; SCHAU, M.; BUNN, H. F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha in mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin proteasome pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 7987-7992, 1998.

JANSON, C. G.; CHEN Y, LI Y.; LEIFER D. Functional regulatory regions of human transcription factor MEF2C. **Brain. Res. Mol.**, v. 16, p. 70-82, 2001

JEANRENAUD, B. Hyperinsulinemia in obesity syndromes: its metabolic consequence and possible etiology. **Metabolism**, v. 27, s. 2, p.1881-1892, 1978.

JOOST, H. G.; THORENS, B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. **Mol. Membr. Biol.**, v. 18, n. 4, p. 247-256, 2001.

KECSKEMET, V.; BAGI, Z.; PACHER, P.; POZA, I.; KOCSIS, E.; KOLTAI, M. Z. New trends in the development of new antidiabetic drugs. **Curr. Med. Chem.**, v. 9, p. 53-71, 2002.

KIZER, J. S.; NEMEROFF, C. B.; YOUNGBLOOD, W. W. Neurotoxic amino acids and structurally related analogs. **Pharmacol. Rev.**, v. 29, p. 301-318, 1978.

KOVACS, M.; KINEMAN, R. D; SCHALLY, A. V.; FLERKO, B.; FROHMAN, L. A. Increase in mRNA concentrations of pituitary receptors for growth hormone-releasing hormone and growth hormone secretagogue after neonatal monosodium glutamate treatment. **J. Neuroendocrinol.**, v. 12, p. 335-341, 2000.

KRAMER, W.; MULLER, G.; GEISEN, K. Characterization of the molecular mode of action of the sulfonylurea, glimepiride, at beta cell. **Horm. Metab. Res.**, v. 28, p. 464-468, 1996.

LEE, M.; HWANG, J. T.; LEE, H. J.; KANG, I.; CHI, S. G.; KIM, S.S.; HA, J. AMP activated protein kinase activity is critical for hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 39653-39661, 2003.

LIMA, G. A.; ANHÊ, G, F.; GIANNOCCO, G.; NUNES, M. T.; CORREA-GIANELLA, M. L.; MACHADO, U. F. 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.**, v. 296, n. 1, p. E132-E138, 2009.

LIU, M. L.; OLSON, A. L.; EDGINGTON, N. P.; MOYE-ROWLEY, W. S.; PESSIN, J. E. Mef2 binding site is essential for c12 myotubes-specific expression of rat GLUT4/Muscle-adipose facilitative glucose transport gene. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 28514-28521, 1994.

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

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. **Method. Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

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

MACHADO, U. F.; SHIMIZU, I. SAITO, M. Decreased glucose transporter (GLUT4) content in insulin-sensitive tissues of obese aurothioglucose – and monosodium glutamate-treated mice. **Horm. Metab. Res.**, v. 25, p. 462-465, 1993.

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

MACHADO, U. F.; NOGUEIRA, C. R.; CARPINELLI, A. R. Obesity is the major cause of alterations in insulin secretion and calcium fluxes by isolated islets from aged rats. **Physiol. Behav.**, v. 52, p. 717-721, 1992.

MACHO, L.; JEZOVA, D.; ZORAD, S.; FICKOVA, M. Postnatal monosodium glutamate treatment results in attenuation of corticosterone metabolic rate in adult rats. **Endocr. Regul.**, v. 33, p. 61-67, 1999. Suppl. 2.

MACHO, L.; FICKOVÁ, M.; JEZOVA, D.; ZORAD, S. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. **Physiol. Res.**, v. 49, p. S79-S85, 2000. Suppl. I.

MAITER, D.; UNDERWOOD, L. E.; MARTIN, J. B.; KOENIG, J. I. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. **Endocrinology**, v. 128, p. 1100-1106, 1991. Suppl. 2.

MARCHETTI, P.; DOTTA, F.; LAURO, D.; PURRELLO, F. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment. **Regulatory Peptides**, v. 146, n. 1-3, p. 4-11, 2008.

MARETTE, A.; RICHARDSON, J. M.; RAMLAL, T.; BALON, T. W.; VRANIC, M.; PESSIN, J. E.; KLIP, A. Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transports in red and White muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. C443-C452, 1992.

MARMO, M. R.; NUNES, M.T; VOLPATO, C. T.; KETEKHUT, I. C.; HELL, N. S.; LIMA, F. B.; DOLNIKOFF, M. S. Reduced growth hormone mRNA levels in 28d-old MSG rats impair protein and lipid metabolism. **Eur. J. Physiol.**, v. 427, p. R29, 1994.

MAXWELL, P. H.; WIESENER, M. S.; CHANG, G. W.; CLIFFORD, S. C.; VAUX, E. C.; COCKMAN, M. E.; WYKOFF, C. C.; PUGH, C. W.; MAHER, E. R.; RATCLIFFE, P. J. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. **Nature**, v. 399, p. 271-275, 1999.

MEETOO, D.; MCGOVERN, P.; SAFADI, R. An epidemiological overview of diabetes across the world British. **Journal of nursing**, v. 16, n. 16, p. 1002-1007, 2007.

MORENO, H.; SERRANO, A. L.; SANTALUCIA, T.; GUMMÁ, A.; CANTO, C.; BRAND, N. J.; PALCÍN, M. SCHIAFFINO, S.; ZORZANO, A. Differential regulation of the muscle specific GLUT4 enhancer in regenerating and adult skeletal muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 278. p. 40557-40564, 2003.

MORI, R. C.; HIRABARA, S. M.; HIRATA, A. E.; OKAMOTO, M. M.; MACHADO, U. F. Glimepiride as insulin sensitizer: increased liver and muscle responses to insulin. **Diabetes Obes. Metab.**, 2008.

MORTON, N. M.; PATERSON, J. M.; MASUZAKI, H.; HOLMES, M. C.; STAEELS, B.; FIEVET, C.; WALKER, B. R.; FLIER, J. S.; MULLINS, J. J.; SECKL, J. R. Novel adipose tissue-mediated resistance to diet-induced visceral obesity in 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice. **Diabetes**, v. 53, p. 931-938, 2004. Suppl. 4.

MORRIS, M. J.; TORTELLI, C. F.; FILIPPIS, A.; PROIETTO, J. Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. **Regul. Peptide**, v. 25, n. 75-76, p. 441-447, 1998.

MINAMI, K., MIKI T.; KADOWAKI, T.; SEINO, S. Roles of ATP-Sensitive K channels as metabolic sensors: studies of Kir6.x null mice. **Diabetes**, v. 53, n. 3, 2004.

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.**, v. 267, n.7, p. 4957-4962, 1992.

MULLER, G.; GEISEN, K. Characterization of the molecular mode of action of the sulfonylurea, glimepiride, at adipocytes. **Horm. Metab. Res.**, v. 28, n. 9, p. 469-487, 1996.

NAKAJIMA, H.; TOCHINO, Y.; FUJINO-KURIHARA, H.; YAMADA, K.; GOMI, M.; TAJIMA, K.; KANAYA, T.; MIYAZAKI, A.; MIYAGAWA, J.; HANAFUSA, T. Decreased incidence of diabetes mellitus by monosodium glutamate in the non-obese diabetic (NOD) mouse. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 50, p. 251-257, 1985. Suppl. 2.

NAKAI, T.; TAMAI, T.; TAKAI, H.; HAYASHI, S.; FUJIWARA, R.; MIYABO, S. Decreased ketonaemia in the monosodium glutamate-induced obese rats. **Life Sci.**, v. 28, p. 2009-20013, 1986. Suppl. 22.

NAGASHIMA, K.; TAKAHASHI, A.; IKEDA, H.; HAMASAKI, A.; KUWAMURA, N.; YAMADA, Y.; SEINO, Y. Sulfonylurea and non-sulfonylurea hypoglycemic agents: pharmacological properties and tissue selectivity. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 66, n. 1, p. S75-S78, 2004.

NEMEROFF, C. B.; KONKOL, R. J.; BISSETE, G.; YOUNGBLOOD, W.; MARTIN, J. B.; BRAZEAU, P.; RONE, M. S.; PRANGE, A. J.; BREESE, G. R.; KIZER, J. S. Analysis of the disruption in hypothalamic-pituitary regulation in rats treated entally with monosodium L-glutamate (MSG): evidence for the involvement of tuberoinfundibular cholinergic and dopaminergic systems in neuroendocrine regulation. **Endocrinology**, v. 101, p. 613-622, 1997. Suppl. 2.

NEUFER, P. D.; CAREY, J. O.; DOHM, G. L. Transcriptional regulation of the gene for glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle. Effects of diabetes and fasting. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p.13824-13829, 1993.

OLNEY, J. H. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, p. 719-721, 1969.

PAIVA, D. C. P.; BERSUSA, A. A. S.; ESCUDER, M. M. L. Avaliação da assistência ao paciente com diabetes e/ou hipertensão pelo Programa Saúde da Família do Município de Francisco Morato, São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 377-385, 2006.

de CARVALHO PAPA, P.; VARGAS, A. M.; SILVA, J. L. T., NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. **Life Sciences**, v. 71, p. 1917-1928, 2002.

PAPA, P. C.; SERAPHIM, P. M.; MACHADO, U. F. Loss of weight restores GLUT4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated mice. **International Journal of Obesity**, v. 21, p. 1065-1070, 1997.

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

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45, 2001.

PRATIPANAWATR, W.; PRATIPANAWATR, R.; CUSI, K.; BERRIA, R.; ADAMS, J. M.; JENKINSON, C. P.; MAEZONO, K.; DEFRONZO, R. A.; MANDARINO, L. J. Skeletal muscle insulin resistance in non-diabetic subjects with a strong family history or type 2 diabetes is associated with decreased insulin-stimulated insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation. **Diabetes**, v. 50; p. 2572-2578, 2001.

PRATO, S. D.; BIANCHI, C.; MARCHETTI, P. β -cell function and anti-diabetic pharmacotherapy. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 23, p. 518-527, 2007.

PILZ, S.; MÄRZ, W. Free fatty acids as a cardiovascular risk factor. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 46, n. 4, p. 429-434, 2008.

RAPTIS, S. A.; DIMITRIADIS, G. D. Oral hypoglycemic agents: insulin secretagogues, alpha-glucosidase inhibitors and insulin sensitizers. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabets**, v. 109, p. S265-S287, 2001. Suppl. 2.

REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, p. 1595-1607, 1998.

RICHARDSON, J. M.; BALOW, T. W.; TREADWAY, J. L.; PESSIN, J. E. Differential regulation of glucose transporter activity and expression in red white skeletal muscle. **Diabetes**. v. 266, n. 16, p. 12690-12694, 1991.

ROGERS, P.; WEBB, G. P. Estimation of body fat normal and obese mice. **Br. J. Nutr.**, v. 43, s. 1, p. 83-86, 1980.

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

SCHEEPERS, A.; JOOST, H. G.; SCHÜRMAN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **J. Parent. Ent. Nutrit.**, v. 28, n. 5, p. 365-372, 2004.

SEINO, S.; MIKI, T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v. 81, n. 2, p. 133-176, 2003.

SILVA, J. L. T.; GIANOCCO, G.; FURUYA, D. T.; LIMA, G. A.; MORAES, P. A. C.; NACHEF, S.; BORDIN, S.; BRITTO, L. R. G.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. NF- κ B, MEF2A, MEF2D and HIF1- α involvemet on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleous muscle. **Mol. Cell. Endoc.**, v. 240, p. 82-93, 2005.

SKELLY, A. H. Type 2 Diabetes mellitus. **Nursing Clinics of North America**, v. 41, p. 531-547, 2006.

SMITH, A. J.; TANEJA, T. K.; MANKOURI, J.; SIVAPRASADARAO, A. Molecular cell biology of KATP channels: implications for neonatal diabetes. **Expert Rev. Mol. Med.**, v. 9, n. 21, p. 1-17, 2007.

SOLBACH, T. F.; KFNIG, J.; FROMM, M. F.; ZOLK, O. ATP-Binding Cassette Transporters in the Heart. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 16, n. 1, p. 7-15, 2006.

SPELLMAN, C. W. Islet cell dysfunction in progression to diabetes mellitus. **J Am Osteopath Assoc.**, v. 107, p. S1-S5, 2007. Suppl. 3.

SPELLMAN, C. W. Aggressively managing type 2 diabetes mellitus, hyperlipidemia, and bone loss. **J. Am. Osteopath Assoc.**, v. 5, n. 3, p. 20-27, 2008.

THAI, M. V.; GURUSWAMY, S.; CAO, K. T.; PESSIN, J. E.; OLSON, A. L. Myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-binding site is required for GLUT4 gene expression in transgenic mice. Regulation of MEF2 DNA binding activity in insulin- deficient diabetes. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 14285-14292, 1998.

THOMAS, P. M.; COTE, G. J.; WOHLIK, S.; HADDAD, B.; MATHEW, P. M.; RABL, W. Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. **Science**, v. 268, p. 426-429, 1995.

TIBALDI, J. Initiating and intensifying insulin therapy in type 2 diabetes mellitus. **The American Journal of Medicine**. v. 121, n. 6, p. 20-29, 2008.

TOKUYAMA, K.; HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis, torpor, and obesity of glutamate-treated mice. **Am. J. Physiol.**, v. 251, p. 407-415, 1986.

VIRKAMAKI, A.; KORSHENINNIKOVA, E.; SEPALA-LINDROOS, A.; VEHKAVAARA, S.; GOTO, T.; HALAVAARA, J.; HAKKINEN, A. M.; YKI-JARVINEN, H. Intramyocellular lipid is associated with resistance to vivo insulin actions on glucose uptake, antilipolysis, and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle. **Diabetes**, v. 50, p. 2337-2345, 2001. Suppl. 10.

WANG, G. L.; SEMENZA, G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 4304-4308, 1993.

WANG, G. L.; SEMENZA, G. L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 1230-1237, 1995.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE R.; KING, H. G. Prevalence of diabetes. estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1047-1053, 2004.

WILDING, J. P. H. The importance of free fatty acids in the development of Type 2 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 24, p. 934-945, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definition and diagnosis of classification of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia**. Report of a WHO/IDF consultation, 2006.

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

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