

**PAULA EICHLER**

**DIMINUIÇÃO DE PROTEÍNA GLUT4 EM TECIDO ADIPOSEO  
DE RATOS TRATADOS COM INJEÇÕES SUBCUTÂNEAS  
DE ÓLEOS DE SOJA OU DE GIRASSOL**

**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  
Fisiologia Humana.**

**Área de Concentração: Endocrinologia**

**Orientador: Prof. Ubiratan Fabres Machado**

**São Paulo**

**2008**

## RESUMO

EICHLER, P. **Diminuição da proteína GLUT4 em tecido adiposo de ratos tratados com injeções subcutâneas de óleos de soja ou de girassol.** 83 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Mudanças no teor e na qualidade de lípides da dieta são capazes de alterar a sensibilidade insulínica, envolvendo, entre outros mecanismos, alterações na expressão do gene do transportador de glicose GLUT4. Sua expressão também já foi relacionada a alterações na sensibilidade insulínica, como ocorre no diabetes melito tipo 2. Estudos prévios de nosso laboratório demonstraram que injeções subcutâneas de óleo de girassol aumentaram a expressão de RNAm de GLUT4 em tecido adiposo de ratas. Os mecanismos pelos quais esta regulação ocorre ainda não foram esclarecidos. Nossa hipótese é de que os óleos injetados proporcionem concentrações plasmáticas ou teciduais de ácidos graxos capazes de ativar fatores transcricionais reguladores do gene *GLUT4*. Foi demonstrada resistência insulínica em ratos tratados por 7 dias com injeções subcutâneas de óleos de soja ou de girassol. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito destes tratamentos sobre: a expressão dos genes e das proteínas GLUT1 e GLUT4 em tecido muscular (MG) e adiposo branco (TAB); a expressão dos fatores transcricionais NF- $\kappa$ B, PPAR $\gamma$ , MEF2A e MF2D nestes tecidos; e o conteúdo plasmático e tecidual de diferentes ácidos graxos. Resultados: no grupo girassol, aumentou RNAm de GLUT4 em MG e TAB e diminuiu RNAm de GLUT1 no TAB; neste tecido também diminuiu a quantidade de RNAm de a NF- $\kappa$ B. Pelo experimento de translocação foi evidenciada menor translocação de GLUT4 para a membrana plasmática no TAB nos grupos soja e girassol e menor quantidade de proteína GLUT4 na fração microssomal. No plasma e fígado não houve alteração na quantidade dos ácidos graxos dosados, entretanto, no MG e no TAB houve algumas alterações (MG – palmitoléico: maior no grupo girassol; linolênico: menor no soja e girassol; araquidônico: maior no soja, e menor que no girassol. TAB - palmítico e esteárico: maior no soja e girassol; linoleico: menor no soja e girassol), sendo que no TAB houve alteração também da proporção saturado/ insaturados de aproximadamente 1:9 no grupo controle para 2:8 nos grupos tratados com os óleos. Concluimos que a resistência insulínica desenvolvida está relacionada com diminuição de GLUT4 e de sua translocação para a membrana plasmática observadas no TAB de ratos tratados com óleo de soja ou

girassol, provavelmente devido a ação de ácidos graxos tecido-específicos sobre eventos regulatórios como a diminuição do fator transcricional NFκB neste tecido.

**Palavras-chave:** GLUT4. Fatores transcricionais. Ácidos graxos. Injeções subcutâneas. Óleos vegetais.

## ABSTRACT

EICHLER, P. **Decrease in GLUT4 protein in adipose tissue of rat treated with subcutaneous injections of soybean or sunflower oils.** 83 f. Thesis (Philosophy Doctor in Human Physiology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2008.

Quality and quantity of dietary lipids are capable of change insulin sensibility, due to, among other mechanisms, alteration in GLUT4 gene expression. This was already linked to variations in insulin sensibility, as occurs in type 2 diabetes mellitus. Previous studies from our lab showed that subcutaneous injections of sunflower oil increased GLUT4 mRNA expression in female rats adipose tissue. Mechanisms of this regulation are yet to be enlightened. Our hypothesis is that the injected oils propitiate plasma or tissue fatty acid specific concentrations capable of triggering GLUT4 transcriptional factors. Insulin resistance was demonstrated in rats treated for 7 days with soybean or sunflower oil subcutaneous injections. Thus, the goal of the present work was investigate the effect of this treatment on: GLUT1 and GLUT4 protein and gene expression in muscular (M) and white adipose tissue (WAT); the expression of NF- $\kappa$ B, PPAR $\gamma$ , MEF2A e MF2D transcriptional factors in these tissues; and plasma and tissue content of different fatty acids. Results: GLUT4 mRNA increased in M and WAT and GLUT1 mRNA decreased in TAB of the sunflower treated group. NF- $\kappa$ B decreased in TAB of sunflower group. Translocation experiment showed diminished GLUT4 translocation to plasma membrane in WAT of both oils treated groups, as well as less GLUT4 quantity in microsome. There was no changes in the quantity of fatty acids dosed in plasma and liver, however, there were some changes in M and WAT of oil treated groups when compared to saline control (M – palmitoleic: greater in sunflower; linolenic: lower in soybean and sunflower; arachidonic; greater in soybean. WAT – palmitate and stearic: greater in soybean and sunflower; linoleico: lower in soybean and sunflower). In addition, there was alteration in proportion of saturated/ unsaturated fatty acids in WAT from 1:9 in control group to 2:8 in the oils treated groups. We conclude that the insulin resistance developed by these vegetable oil injections is related to decreasing in GLUT4 quantity and translocation to plasma membrane observed in WAT, probably due to the action of specific fatty acids on regulatory events like transcription factor NF- $\kappa$ B decreasing in this tissue.

**Key words:** GLUT4. Transcription factors. Fatty acids. Subcutaneous injections. Vegetable oils.

## 1 INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos, que receberam, originalmente, este nome por terem sido inicialmente identificados e isolados de gorduras. As gorduras e óleos apresentam, naturalmente, esta classe de compostos que contém uma cadeia hidrocarbonada (4 a 26 C), que constitui a porção apolar da molécula, e um grupamento terminal carboxila, que constitui a região polar da molécula. Os ácidos graxos apresentam-se de tamanho variado, sendo classificados como de cadeia curta (2 a 4 carbonos), cadeia média (6 a 14 carbonos) e cadeia longa (16 ou mais átomos de carbono).

A presença ou não de duplas ligações (insaturações) nas suas cadeias carbonadas classifica-os como saturados ou insaturados (mono ou poliinsaturados). Cada insaturação gera um ângulo na molécula de ácido graxo e as moléculas saturadas são lineares. O ângulo formado pela insaturação pode ser *cis*, que “torce” a molécula ou *trans*, que mantém a linearidade como em uma saturada. Enquanto a grande maioria dos AG encontrados na natureza são *cis*, apenas leite e carne de animais ruminantes apresentam a configuração *trans*. Entretanto, o processo artificial de hidrogenação dos óleos para os tornarem mais sólidos, leva à eliminação de duplas ligações ou à conformação *trans*.

Os ácidos graxos são encontrados naturalmente em óleos e gorduras que compõe grandíssima parte da nossa alimentação, estando presentes, especialmente, nos grãos, sementes, em frutas como a azeitona, o coco e o abacate, e também nas carnes e no leite e seus derivados. São nutrientes essenciais para o organismo na formação das membranas celulares, na determinação da sua fluidez e reatividade química, na participação de processos metabólicos e oxidativos, e também como material precursor de moléculas sinalizadoras. Desta forma, podem influenciar a resposta imunitária, inflamatória e hormonal, não só através das vias sinalizadoras, mas também através da expressão gênica.

Segundo Sampath et al. (2004), há evidências do possível benefício de consumo de certos tipos de AG, especialmente os poliinsaturados, sendo implicados na diminuição de níveis plasmáticos de lipídios, aumento da sinalização insulínica, diminuição do risco de diabetes melito tipo 2 e aumento da resposta imune. Já foi estabelecido o papel de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) na coordenação entre beta oxidação de ácidos graxos e síntese lipídica hepáticas (CLARKE e JUMP, 1997).

Os ácidos graxos livres desempenham papel fundamental na patogênese do diabetes e podem estar envolvidos nos eventos precoces que levam à resistência insulínica em humanos (BODEN, 1997). Estudos clássicos com perfusão de ácidos graxos em ratos (RANDLE et al., 1963) demonstraram que a oxidação dos ácidos graxos pode inibir a oxidação da glicose através dos efeitos inibitórios da acetil-CoA sobre a atividade da piruvato desidrogenase em músculo esquelético e cardíaco. O aumento concomitante de citrato e ATP resultam na redução da via glicolítica pela inibição da fosfofrutoquinase, levando ao acúmulo de glicose intracelular e redução da sua captação. Assim, a utilização alternativa de ácidos graxos como fonte energética caracteriza o Ciclo de Randle, e o excesso da disponibilidade de AG pode resultar em resistência insulínica.

Considerando estas alterações no transporte de glicose, o conhecimento sobre o comportamento de seus transportadores deve ser aprofundado. Já foram identificados 14 isoformas de transportadores de glicose por difusão facilitada, nominadas GLUT1 a GLUT14. Todas são compostas de uma cadeia polipeptídica de 12 segmentos de aminoácidos transmembrânicos, hidrofóbicos inseridos na porção lipídica da membrana plasmática; correspondendo a uma porção bastante homóloga entre todas isoformas. Estes segmentos unidos por alças de aminoácidos, que representam porções extremamente heterólogas entre as 14 isoformas, especialmente as maiores e os terminais COOH e NH<sub>2</sub>. Dentre os 14 transportadores de glicose por difusão facilitada, o GLUT4 é o transportador

responsivo à insulina, presente nos tecidos sensíveis a este hormônio: o tecido adiposo, muscular esquelético e cardíaco (SERAPHIM, 2006).

Nugent et al. (2001) mostraram que o aumento da disponibilidade de ácidos graxos livres *in vivo* pode prejudicar a disponibilidade de glicose mediada por insulina através da inibição da captação de glicose, e que muitos ácidos graxos de cadeia longa, tanto saturados, como insaturados, mostraram-se capazes de diminuir os níveis de RNAm do transportador de glicose GLUT4 em adipócitos *in vitro*. De acordo com Epps-Fung et al. (1997), o mecanismo pelos quais os níveis elevados de ácidos graxos inibem o transporte de glicose seria por alteração na capacidade cinética do GLUT4 e não por alteração na sua translocação. Estes autores verificaram que a resposta à administração de palmitato a adipócitos é bifásica: em um primeiro momento, há um aumento do transporte de glicose via GLUT4 seguido de uma redução da sensibilidade insulínica; e concluíram que há vias de sinalização separadas para o transporte de glicose via GLUT4 e para a síntese de glicogênio, já que a resistência insulínica induzida pelo palmitato em adipócitos estaria limitada somente ao transporte de glicose estimulado pela insulina e por EGF (*Epidermal Growth Factor*) sem afetar a habilidade destes hormônios de estimular a síntese de glicogênio. Hirabara (2005) demonstrou que o tratamento agudo com ácido palmítico potencializa a síntese de glicogênio sem alterar a captação de glicose em músculo sóleo de ratos. Ainda, mostrou que este aumento da glicogeniogênese não está relacionado às vias insulínicas envolvendo pp185, Akt, GSK-3 e MAP quinases p44 e p42.

A independência entre a síntese de glicogênio e a taxa de transporte de glicose sugere que a primeira não seja limitada pela segunda, e que a debilidade da síntese de glicogênio e da oxidação da glicose causada por níveis de ácidos graxos elevados seja via geração de um sinalizador extracelular distinto, como o TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor-alpha*) o que explicaria a modulação negativa direta do transporte de glicose e a inibição



indireta da síntese de glicogênio, levando a uma disfunção na resposta insulínica ainda maior (VAN EPPS-FUNG, 1997). O TNF e os ácidos graxos não esterificados foram propostos como fatores cruciais no desenvolvimento do estado de resistência a insulina. Storz et al. (1999) salientam a complexidade dos mecanismos que governam a resistência à insulina em músculo esquelético, quando mostraram que o TNF aumentou a expressão de GLUT1 na membrana e o transporte de glicose em células musculares, e que o palmitato inibiu as cascatas de sinalização da insulina não somente em nível de fosforilação do receptor de insulina (IR) e do IRS-1, mas também em nível de proteína quinase B (PKB), participante direta na translocação do GLUT4.

McGowan et al. (1996) demonstraram que o tratamento de adipócitos com TNF resultou em ativação do NF- $\kappa$ B. O TNF é uma das poucas citocinas que sabidamente iniciam a translocação de NF- $\kappa$ B do citosol (forma inativa) ao núcleo (forma ativa) resultando na regulação de genes responsivos ao TNF. Assim, o NF- $\kappa$ B pode ser visto como um terceiro mensageiro na via de transdução de sinal.

Embora o promotor do gene do GLUT4 tenha um sítio de ligação semelhante ao sítio de ligação ao NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B-*like*) localizado de -110 a -120 bases, a ativação deste intermediário ainda não foi absolutamente relacionada à expressão deste gene, mas há um papel potencial deste mensageiro nos eventos regulados pelo TNF no adipócito (LONG e PEKALA, 1996a). Silva et al. (2005) demonstraram diminuição de RNAm de GLUT4 em músculo sóleo de ratos em jejum de 48 horas concomitante com aumento da expressão e ativação de NF- $\kappa$ B.

Alguns ácidos graxos ou seus derivados podem agir como ligantes endógenos ao PPAR $\gamma$  nuclear (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), que modula positivamente a sensibilidade à insulina (NUGENT et al., 2001). Este receptor nuclear

(predominantemente expresso em tecido adiposo) modula a transcrição de muitos genes envolvidos no metabolismo da glicose, de lípidos e no balanço energético, incluindo o gene que codifica o GLUT4 (KLIEVER et al., 2001). Experimentos com drogas que ativam o PPAR $\gamma$ , como as tiazolidinonas (HAUNER, 2002), ou mesmo com o clofibrate, um ligante do PPAR $\alpha$  capaz de ligar-se com baixa afinidade ao PPAR $\gamma$  (LONG e PEKALA, 1996b), comprovaram o papel destes fatores nucleares na expressão gênica de GLUT4. Outro estudo (MEZEI et al., 2003) sugere que as responsáveis pela melhoria no metabolismo lipídico seriam as isoflavonas do óleo de soja, produzindo um efeito antidiabético por ativação dos receptores PPAR.

Experimentos *in vitro* (TEBBEY et al., 1994) demonstraram que a exposição crônica (48 horas) de adipócitos ao ácido araquidônico (AA) resultou em uma inibição no conteúdo de RNAm de GLUT4, mas não no RNAm de GLUT1, e concluíram que o AA pode mimetizar parcialmente os efeitos do TNF $\alpha$  e da insulina na regulação negativa da expressão gênica do GLUT4, o que está de acordo com Mingrone et al. (2002) que concluíram que a resistência insulínica em pacientes com obesidade mórbida está positivamente associada ao conteúdo intramiocítico de triglicérides e à expressão gênica do TNF $\alpha$  e inversamente correlacionada à expressão de GLUT4.

Long e Pekala (1996b) explicaram diferentes vias na regulação da expressão do gene do GLUT4, uma indireta, ocorrendo pela conversão do ácido araquidônico a prostaglandina 2 (PG2) e uma direta com a utilização de um análogo não metabolizável, o ácido eicosatetraenóico; ambas causaram diminuição nos níveis de RNAm de GLUT4.

Realizando infusão lipídica em músculo esquelético e cardíaco, Vettor et al. (2002) demonstraram que um aumento de lípidos foi responsável pela diminuição da expressão gênica do GLUT4. Entretanto, Gaster et al. (2003) afirmaram que a expressão de GLUT4

em fibras musculares não está associada ao conteúdo de triglicérides intracelulares ou com os níveis de ácidos graxos livres no plasma.

Em recente revisão sobre os efeitos dos ácidos graxos sobre o metabolismo do músculo esquelético, Hirabara et al. (2007) discutiram amplamente características dos efeitos da sua exposição aguda e prolongada. Resumidamente, estes autores confirmaram a ocorrência do ciclo de Randle, inibição da via de sinalização de insulina e desacoplamento mitocondrial como efeito dos ácidos graxos livres. Consideraram, entretanto, que, agudamente, o ciclo de Randle não é responsável pela resistência insulínica, pois a glicose é direcionada para síntese de glicogênio, que por sua vez pode levar à resistência insulínica posteriormente devido a seu acúmulo, e conseqüente redução de captação de glicose. Ainda, propõe que a inibição da via de sinalização da insulina por exposição aguda aos AG não é suficiente para diminuir a sensibilidade insulínica, mas quando esta é prolongada, leva a resistência insulínica. Sobre o desacoplamento mitocondrial, afirmam que embora os ácidos graxos de cadeia longa possam regular termogênese e produção de espécies reativas de oxigênio a curto prazo, a longo prazo levam as mitocôndrias à exaustão.

A resistência aos efeitos da insulina sobre a utilização da glicose é um padrão característico do diabetes tipo 2, da obesidade e da síndrome metabólica. Sendo o GLUT4 o principal transportador de glicose responsável à insulina, é natural que defeitos ou alterações neste transportador sejam considerados como causa primária da resistência insulínica. Embora o papel deste transportador seja bem conhecido, os mecanismos que regulam a sua expressão ainda não estão completamente elucidados.

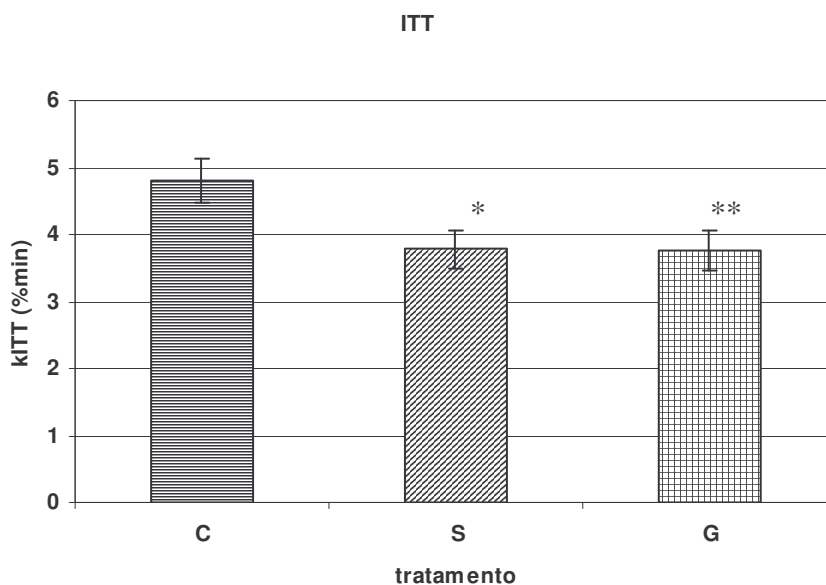
São inúmeros os fatores transcricionais já relacionados ao GLUT4 e/ ou a outras isoformas de transportador de glicose. Além disso, a análise de genes de transportadores de glicose já demonstrou a ocorrência de elementos responsivos inespecíficos, tornando um regulador potencial qualquer fator transcricional capaz de ligar-se a estes elementos

responsivos. Todos os demais receptores de hormônios lipossolúveis também são candidatos a regularem a expressão de transportadores de glicose, visto seu mecanismo de ação.

O papel dos ácidos graxos na modulação da sensibilidade à insulina *in vivo* e *in vitro* está bem determinado, entretanto, a natureza precisa destes mecanismos ainda é desconhecida. A maioria dos estudos *in vivo* sobre ácidos graxos relaciona sua ingestão aos níveis de colesterol, enfocando a condição cardiovascular, porém poucos trabalhos foram realizados buscando, de forma mais direta, a relação ácidos graxos – expressão gênica.

Experimentos realizados em nosso laboratório com drogas lipossolúveis mostraram alterações na expressão de GLUT4 nos ratos controles tratados apenas com injeções do óleo utilizado como veículo (soja ou girassol). Barros (2002, dados não publicados) verificou diminuição de sensibilidade insulínica em ratas tratadas por 2 ou 4 dias com injeções subcutâneas de óleo de girassol após ooforectomia e também aumento de RNAm de GLUT4 em tecido adiposo branco após tratamento por 7 dias. Isto pode indicar uma ação transcricional tecido específica e tempo dependente dos AG presentes no óleo de girassol. Seraphim (2004, dados não publicados) verificou o aumento de RNAm de GLUT4 em músculo de camundongos tratados com óleo de soja como grupo controle aos que receberam isoproterenol.

Para avaliar a sensibilidade insulínica deste tratamento (injeções subcutâneas de salina, óleo de soja ou óleo de girassol por 7 dias em ratos), foi realizado um teste de tolerância à insulina, com material e métodos descritos mais adiante na seção apropriada. Este estudo preliminar (POLETTO et al., 2004) demonstrou a diminuição na sensibilidade insulínica, uma vez que os grupos óleo de soja e óleo de girassol tiveram valores significativamente menores de constante de decaimento de glicose após sobrecarga de insulina do que o grupo salina (Figura 1.1).



**Figura 1.1:** ITT em ratos ( $n=6$ ) com 2 meses de idade, tratados com injeções subcutâneas de solução salina (C), óleo de soja (S), ou óleo de girassol (G) por 7 dias. Resultados expressos por % da constante de decaimento de glicose (kITT) obtidas dos valores de glicemia de 0 a 16 minutos após sobrecarga venosa de insulina; \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  vs C.

Tendo em vista estas importantes observações, de que pequenas quantidades de óleos vegetais injetados no espaço subcutâneo interferem na sensibilidade insulínica e na expressão de GLUT4, e de que estes óleos são rotineiramente utilizado como veículo de drogas lipossolúveis e grupos controle, somados à necessidade de conhecer quais fatores estão participando das alterações da expressão gênica dos transportadores de glicose observados no diabetes, justifica-se este trabalho, com o objetivo citado adiante.

extraído das sementes, podendo ser responsável por efeitos aqui atribuídos aos ácidos graxos.

Em síntese, o presente estudo revela que quantidades adicionais mínimas de óleos vegetais (soja e girassol) ofertadas ao organismo são capazes de alterar a homeostasia glicêmica reduzindo a sensibilidade à insulina. Este efeito envolve redução dos transportadores GLUT1 em músculo e tecido adiposo, e de GLUT4 em tecido adiposo, e provavelmente decorre de um desbalanço na concentração tecidual de diferentes ácidos graxos livres. É possível que estas alterações tecido-específicas determinem respostas teciduais específicas, teciduais específicas, difíceis de serem interpretadas no presente momento. Investigações adicionais poderiam contribuir para esclarecer essas alterações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ABUSHUFA, R.; REED, P.; WEINKOVE, C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. *Clin. Chem.*, v. 40, p. 1707-12, 1994.

AMERICAN OIL CHEMISTRY'S SOCIETY (AOCS). *Codex Standard for named vegetable oils cx-stan 210-1999*. Disponível em: <[http://www.foodquality.wfp.org/portals/0/cxs\\_210\\_2003e.swf](http://www.foodquality.wfp.org/portals/0/cxs_210_2003e.swf)>. Acesso em: 10 abr. 2008.

ARMSTRONG, R. B.; PHELPS, R. O. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.*, v.171, n.3, p.259-72, 1984.

BARROS, R. P. A. *Influência do 17  $\beta$ -estradiol na expressão do gene da proteína GLUT4 em músculo esquelético gastrocnemius e tecido adiposo branco de ratas*. 80 f. Tese (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

BODEN, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, v. 46, p. 3-10, 1997.

BONORA, E.; TARGHER, G.; ALBERICHE, M.; BONNADONNA, R. C.; SAGGIANI, F.; ZENERE, M. B.; MONAUNI, T.; MUGGEO, M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. *Diabetes Care*, v. 25, n.1, p. 57-63, 2000.

BRYANT, N. I.; GOVERS, R.; JAMES, D. E. Regulated transport of the glucose transport GLUT4. *Nat. Rev. – Mol. Cell Biol.*, v.3, p. 267-277, 2002.

CHROMY, V.; GERGERL, J.; VOZNOCEK, J.; KROMBHOLZOVA, L.; MUSIL, J. Assay for serum free fatty acids by extraction-photometric procedure. *Clin. Chim. Acta*, v. 80, p. 327-32, 1977.

CUSHMAN, S. W.; WARDZALA, L. J. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, v. 255, n.10, p. 4758-62, 1980.

DAVIS, L. G.; KRIEHL, W. M.; BATTLY, J. F. *Basic Methods in Molecular Biology*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory, 1994.

DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, v. 14, n.3, p.173-94, 1991.

DEY, D.; MUKHERJEE, M.; BASU, D.; DATTA, M.; ROY, S. S.; BANDYOPADHYAY, A.; BHATTACHARYA, S. Inhibition of insulin receptor gene

---

\* De acordo com:

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

expression and insulin signaling by fatty acid: interplay of PKC isoforms therein. *Cell. Physiol. Biochem.*, v. 16, p. 217-228, 2005.

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

FOLCH, J.; LEE, M.; STANLEY, G. H. A. A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, v. 226, p. 497-503, 1957.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I.; LIMA, F. B. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v. 50, n.2, p.216-29, 2006.

GAO, Z.; ZHANG, X.; ZUBERI, A.; HWANG, D.; QUON, M. J.; LEFEVRE, M.; YE, J. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol.*, v. 18, n. 8, p. 2024-34, 2004.

GARFIN, D. E. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol.*, v. 182, p. 425-41, 1990.

GASTER, M.; OTTOSEN, P. D.; VACH, W.; CHRISTIANSEN, H.; STAEHR, P.; BECK-NIELSEN, H.; SCHRODER, H. D. GLUT4 expression in human muscle fibres is not correlated with intracellular triglyceride (TG) content. Is TG a marker or a marker of insulin resistance? *APMIS*, v. 111, n. 2, p. 338-48, 2003.

GIRON, M. D.; SALTO, R.; HORTELANO, P.; PERIAGO, J. L.; VARGAS, A. M.; SUAREZ, M. D. Increased diaphragm expression of GLUT4 in control and streptozotocin-diabetic rats by fish oil-supplemented diets. *Lipids*, v. 34, p. 801-7, 1999.

HABER, E. P.; XIMENES, H. M.; PROCÓPIO, J.; CARVALHO, C. R.; CURI, R.; CARPINELLI, A. R. Pleiotropic effects of fatty acids on pancreatic beta-cells. *J. Cell. Physiol.*, v. 194, n. 1, p.1-12, 2003.

HAJDUCH, E.; LITHERLAND, G. J.; HUNDAL, H. S. Protein kinase B: a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett.*, v. 492, p.199-203, 2001.

HAUNER, H. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, v. 18, n. 2, S10-5, 2002.

HIRABARA, S. M. Efeito agudo dos ácidos graxos no metabolismo de glicose em músculo esquelético. 112 f.. Tese (doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HIRABARA, S. M., SILVEIRA, L. R.; ABDULKADER, F.; CARVALHO, C. R. O.; PROCÓPIO, J.; CURI, R. Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism. *J. Cell. Physiol.*, v. 210, p. 7-15, 2007.

HUNNICUTT, J. W.; HARDY, R. W.; WILLIFORD, J.; MCDONALD, J. M. Saturated fatty acid-induced insulin resistance in rat adipocytes. *Diabetes*, v. 43, p. 540-5, 1994.



KLIEWER, S. A.; XU, H. E.; LAMBERT, M. H.; WILLSON, T. M. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog. Horm. Res.*, v. 56, p. 239-63, 2001.

KOTANI, K.; PERONI, O. D.; MINOKOSHI, Y.; BOSS, O.; KAHN, B. GLUT4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral lipid utilization. *J. Clin. Invest.*, v. 114, p. 1666-75, 2004.

LAM, T. K. T.; VAN DE WERVE, G.; GIACCA, A. Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 284, p. E281-90, 2003.

LONG, S. D.; PEKALA, P. H. Lipid mediators of insulin resistance: ceramide signaling down-regulates GLUT4 gene transcription in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.*, v. 319, p. 179-84, 1996.

LONG, S. D.; PEKALA, P. H. Regulation of GLUT4 gene expression by arachidonic acid. Evidence for multiple pathways, one of which requires oxidation to prostaglandin E2. *J. Biol. Chem.*, v. 271, n. 2, p. 1138-44, 1996.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MANCO, M.; BERTUZZI, A.; SALINARI, S.; SCARFONE, A.; CALVANI, M.; GRECO, A. V.; MINGRONE, G. The ingestion of saturated fatty acid triacylglycerols acutely affects insulin secretion and insulin sensitivity in human subjects. *Br. J. Nutr.*, v. 92, n. 6, p. 895-903, 2004.

MANIATTIS, T.; FRITCH, E. F.; SAMBROCK, J. (Ed.). *Molecular Cloning: laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory, 1989.

MATSUURA, B.; KANNO, S.; MINAMI, H.; TSUBOUCHI, E.; IWAI, M.; MATSUI, H.; HORIIKE, N.; ONJI, M. Effects of antihyperlipidemic agents on hepatic insulin sensitivity in perfused Goto-Kakizaki rat liver. *J. Gastroenterol.*, v. 39, p. 339-345, 2004.

MCGOWAN, K. M.; DEVENTE, J. E.; CAREY, J. O.; WAYS, D. K.; PEKALA, P. H. Protein kinase C isoform expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes: loss of protein kinase C- $\alpha$  isoform correlates with loss of phorbol 12-myristate 13-acetate activation of nuclear factor kappaB and acquisition of the adipocyte phenotype. *J. Cell. Physiol.*, v. 167, p. 113-20, 1996.

MEZEI, O.; BANZ, W. J.; STEGER, R. W.; PELUSO, M. R.; WINTERS, T. A.; SHAY, N. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J. Nutr.*, v. 133, n. 5, p. 1238-43, 2003.

MINGRONE, G.; ROSA, G.; DI ROCCO, P.; MANCO, M.; CAPRISTO, E.; CASTAGNETO, M.; VETTOR, R.; GASBARRINI, G.; GRECO, A. V. Skeletal muscle triglycerides lowering is associated with net improvement of insulin sensitivity, TNF- $\alpha$  reduction and GLUT4 expression enhancement. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, v. 26, n. 9, p. 1165-72, 2002.

MONTESUIT, C.; ROSENBLATT-VELIN, N.; PAPAGEORGIOU, I.; CAMPOS, L.; PELLIEUX, C.; PALMA, T.; LERCH, R. Regulation of glucose transporter expression in cardiac myocytes: p38 MAPK is a strong inducer of GLUT4. *Cardiovasc. Res.*, v. 64, p. 94-104, 2004.

NEWSHOLME, P.; HABER, E. P.; HIRABARA, S. M.; REBELATO, E. O. L.; PROCOPIO, J.; MORGAN, D.; OLIVEIRA-EMILIO, H. C.; CARPINELLI, A. R.; CURI, R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J. Physiol.*, v. 583, p. 9-24, 2007.

NISHIYAMA-NAKURE, A.; DE SOUZA, J. A. A.; CARNELÓS FILHO, M.; CURI, R. HPLC determination of underivatized fatty acids saponified at low temperature. Analysis of fatty acids in oils and tissues. *Ana.l Lett.*, v. 31, p. 2565-76, 1998.

NUGENT, C.; PRINS, J. B.; WHITEHEAD, J. P.; WENTWORTH, J. M.; CHATEERJEE, V. K. K.; O'RAHILLY, S. Arachidonic acid stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by increasing GLUT1 and GLUT4 levels at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, v. 276, n. 12, p. 9149-57, 2001.

PAPA, P. C.; SERAPHIM, P. M.; MACHADO, U. F. Loss of weight restores GLUT4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium-treated obese mice. *Int. J. Obes.*, v. 21, p. 1064-1070, 1997.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

POLETO, A. C.; EICHLER, P.; MACHADO, U. F. Desenvolvimento de resistência insulínica em ratos adultos após tratamento crônico com injeções subcutâneas de óleo de soja (S) ou de girassol (G). *Arq. Brás. Endocrinol. Metabol.*, v. 48, n. 5, p. S1: S639, 2004.

POMPÉIA, C. Ácido araquidônico. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J. *Entendendo a gordura. Os ácidos graxos*. Barueri, São Paulo: Manole, 2002. p. 343-365.

RANDLE, P. J.; HALES, C. N.; GARLAND, P. B.; NEWSHOLME, E. A. *Lancet*, v. 13, p. 785-9, 1963.

RUAN, H.; HACOEN, N.; GOLUB, T. R.; VAN PARIJS, L.; LODISH, H. F.; Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappa B activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes*, v. 51, n. 5, p. 1319-36, 2002.

SASAGAWA, T.; ISHII, K.; HASUDA, K.; KUBOTA, M.; OTA, Y.; OKITA, M. The effect of dietary polyunsaturated fatty acid on insulin sensitivity and lipid metabolism in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, v. 64, p. 181-7, 2001.

SILVA, J. L. T.; GIANNOCCO, 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- $\kappa$ B, MEF2A, MEF2D and HIF1- $\alpha$  involvement on insulin- and contraction-induced

regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 240, p. 82-93, 2005.

SIMONCÍKOVÁ, P.; WEIN, S.; GASPERIKOVA, D.; UKROPEC, J.; CERTIK, I.; KLIMES, I.; SEBOKOVA, E. Comparison of the extrapancreatic action of  $\gamma$ -linolenic acid and n-3 PUFAs in the high fat diet-induced insulin resistance. *Endocr. Regul.*, v. 36, p. 143-9, 2002.

STORLIEN, L. H.; JENKINS, A. B.; CHISHOLM, D. J.; PASCOE, W. S.; KHOURI, S.; KRAEGEN, E. W. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes*, v. 40, p. 280-9, 1991.

STORZ, P.; DOPPLER, H.; WERNIG, A.; PFIZENMAIER, K.; MULLER, G. Cross-talk mechanisms in the development of insulin resistance of skeletal muscle cells palmitate rather than tumour necrosis factor inhibits insulin-dependent protein kinase B (PKB)/ Akt stimulation and glucose uptake. *Eur. J. Biochem.*, v. 266, n. 1, p. 17-25, 1999.

SUZUKI, K.; KONO, T. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v. 5, p. 2542-5, 1980.

TEBBEY, P. W.; MCGOWAN, K. M.; STEPHENS, J. M.; BUTTKE, T. M.; PEKALA, P. H. Arachidonic acid down-regulates the insulin-dependent glucose transporter gene (GLUT4) in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting transcription and enhancing RNA turnover. *J. Biol. Chem.*, v. 269, n. 1, p. 639-44, 1994.

THONG, F. S. L.; DUGANI, C. B.; KLIP, A. Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway. *Physiology*, v. 20, p. 271-284, 2005.

TIMMONS, T. M.; DUNBAR, B. S. Protein blotting and immunodetection. *Methods Enzymol.*, v. 182, p. 679-88, 1990.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v. 76, n. 9, p. 4350-4, 1979.

VAN EPPS-FUNG, M.; WILLIFORD, J.; WELLS, A.; HARDY, R. W. Fatty acid-induced insulin resistance in adipocytes. *Endocrinology*, v. 138, n.10, p. 4338-45, 1997.

VETTOR, R.; FABRIS, R.; SERRA, R.; LOMBARDI, A. M.; TONELLO, C.; GRANZOTTO, M.; MARZOLO, M. O.; CARRUBA, M. O.; RICQUIER, D.; FEDERSPIL, G.; NISOLI, E. UCP2, UCP3 and GLUT4 gene expression during lipid infusion in rat skeletal and heart muscle. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, v. 26, n. 6, p. 838-47, 2002.