

Ana Bárbara Teixeira Alves

EFEITO DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO SIMPÁTICO β -
ADRENÉRGICO SOBRE A EXPRESSÃO DO GENE DO GLUT4
NO JEJUM

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências (Fisiologia).

São Paulo
2007

Ana Bárbara Teixeira Alves

EFEITO DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO SIMPÁTICO β -
ADRENÉRGICO SOBRE A EXPRESSÃO DO GENE DO GLUT4 NO JEJUM

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências (Fisiologia).

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado

São Paulo
2007

Queira,
Basta ser sincero e desejar profundo
Você será capaz de sacudir o mundo...
...E não diga que a vitória está perdida
Se é de batalhas que se vive a vida...
...Não diga que a canção está perdida
Tenha em fé em Deus, tenha fé na vida...
(Raul Seixas)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os cientistas, da área básica e clínica, que tentam esclarecer a fisiologia humana para melhorar a qualidade de vida das pessoas.

Para os meus amigos do laboratório, em especial Bira, Rosana, Robinson e Ana,
e para meu pai, mãe, Ana Kat, Lú, Gú e Mathias

“A amizade sincera é um santo remédio

É um abrigo seguro

É natural da amizade o abraço, o aperto de mão, o sorriso

Por isso se for preciso conte comigo amigo, disponha

Lembre-se sempre que mesmo modesta, minha casa será sempre sua

Amigo do peito, de fé

Os melhores amigos não trazem dentro da boca palavras fingidas ou falsas histórias

Sabem entender o silêncio e manter a presença, mesmo quando ausentes

Por isso amigo, apesar de tão raro,

não há nada melhor do que

um grande amigo”

(Renato Teixeira)

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Ubiratan, meu pai científico, pela confiança e pelos ensinamentos. Sua sabedoria e ética são inigualáveis, tenho orgulho em ser sua aluna. Você é um exemplo de Mestre para nós.
- Ao pessoal do laboratório: Maristela e Helayne pela dedicação ao laboratório e aos alunos. À Rosana pela ajuda intelectual e pelas conversas boas. À Ana Claudia, Guilherme, Daniela e Paulo pelo apoio e pelas risadas juntos. Bah! Aos gaúchos Paula, Raquel e Robinson (nem tão gaúcho) pelo companheirismo e alegria. Às novatas Daniela e Aline, sejam bem-vindas. Obrigada todos vocês pela amizade, pelo carinho e por tornarem o laboratório um ambiente tão agradável e alegre! E sem esquecer, obrigada por agüentarem o gene ABL, mesmo quando super expresso.
- Aos meus pais, Luiz e Dag, pela oportunidade que me deram, pelo amor, compreensão e dedicação. Sem a ajuda de vocês isso não seria possível. Vocês são exemplos para mim. Amo vocês.
- Aos meus irmãos: Ana Katarina, Luiz Marcelo e Luiz Gustavo que sempre me xingam, mas mesmo assim, me ajudam. Amo vocês.
- Ao Mathias pelo carinho, apoio e compreensão. É muito bom saber que logo terei sua companhia pelo resto da vida. Amo você.
- Aos professores do ICB, em especial, Maria Tereza, pelos ensinamentos e amizade.
- Aos membros da banca, em especial Karla Melo, Luciana Rossoni e Fábio Bessa de Lima, pela disponibilidade e ajuda.

- Aos funcionários do ICB, especialmente ao Zé Maria, às funcionárias da biblioteca e aos funcionários do biotério, pela ajuda de sempre.
- Aos meus amigos da faculdade, Carla, Marina, Rafaela, Fernanda e Marcel, amizades que perduraram;
- À FAPESP pelo apoio financeiro;
- A todos que, involuntariamente, foram omitidos, mas que são merecedores de serem aqui lembrados.

RESUMO

Alves, A. B. T. **Efeito do sistema nervoso autônomo simpático β -adrenérgico sobre a expressão do gene do GLUT4 no jejum.** 2007. 61 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O SLC2A4 é um gene de poupança, que codifica o transportador de glicose GLUT4, o qual favorece o armazenamento de energia em períodos de abundância de alimento e a conservação de energia em períodos de escassez, contribuindo para a sobrevivência. O papel do GLUT4 no armazenamento de energia nos momentos de oferta de substratos está claramente definido. Nos períodos de escassez de alimento, entretanto, a regulação do GLUT4 ainda não está clara. O GLUT4 diminui no tecido adiposo, mas em músculo esquelético, cuja função precisa ser preservada no jejum, sua regulação é controversa e nunca foi estudada quando circunstâncias estressantes são impostas ao organismo. Os músculos esqueléticos captam glicose em resposta à insulina e à atividade contrátil; e redução na expressão do GLUT4 diminui a captação de glicose, como ocorre no diabetes. O sistema nervoso simpático β -adrenérgico é importante para a manutenção da homeostasia no jejum e, sobretudo, na resposta a condições estressantes impostas nesta situação. Neste trabalho investigamos a participação do sistema nervoso simpático β -adrenérgico sobre a regulação da expressão gene do GLUT4 em músculo vermelho-oxidativo (sóleo) e branco-glicolítico (extensor digital longo - EDL) no jejum. Foram estudados ratos nas seguintes condições: alimentados livremente (A); jejuados por 48 horas (J); e jejuados por 48 horas sob bloqueio β_1 e β_2 com propranolol (JP) ou bloqueio β_1 , β_2 e β_3 com propranolol+SR59230A (JPS) ou sob estímulo β_1 , β_2 e β_3 com isoproterenol (JI). O mRNA e a proteína GLUT4 foram analisados por Northern e Western Blotting. O

jejum diminuiu o peso dos animais ($P<0,0001$), a glicemia ($P<0,001$), a insulinemia ($P<0,01$), e aumentou concentração de ácidos graxos livres (AGL) ($P<0,0001$). Durante o jejum: 1) o bloqueio β_1, β_2 aumentou a insulinemia ($P<0,001$) sem alterar glicemia e AGL; 2) o bloqueio β_1, β_2 e β_3 aumentou a insulinemia, e reduziu a glicemia ($P<0,05$); e 3) o estímulo β_1, β_2 e β_3 apenas aumentou AGL ($P<0,05$). O mRNA do GLUT4 no jejum, aumentou no sóleo (24,03%) e no EDL (53,83%). Os bloqueios β_1 e β_2 reduziram o mRNA do GLUT4 no sóleo ($P<0,05$) e no EDL ($P<0,001$), o bloqueio triplo também reduziu no sóleo ($P<0,001$) e EDL ($P<0,001$), enquanto o estímulo β aumentou o mRNA do GLUT4 no sóleo ($P<0,05$), sem alterar no EDL. A proteína GLUT4 aumentou no músculo sóleo ($P<0,01$) e com os tratamentos somente alterou-se (redução, $P<0,01$) no bloqueio triplo, no músculo EDL. Nossos resultados demonstraram que o jejum aumenta a expressão do gene do GLUT4 em músculo esquelético, o que deve ser importante para a manutenção da atividade contrátil, sobretudo das fibras glicolíticas. A atividade simpática β -adrenérgica participa da regulação do mRNA durante o jejum, sendo fundamental na manutenção do conteúdo de proteína GLUT4 em músculo glicolítico (EDL), importante para garantir respostas a estresse (luta/fuga) durante o jejum.

Palavras-chave:

Jejum, GLUT4, músculo esquelético, sistema nervoso simpático β -adrenérgico, propranolol, isoproterenol, SR59230A.

ABSTRACT

Alves, A. B. T. **Effect of β -adrenergic sympathetic autonomic nervous system on GLUT4 gene expression on fasting.** 2007. 61 s. Máster thesis (Human Physiology) – Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2007.

The SLC2A4 is a thrifty gene which codifying the glucose transporter GLUT4, which favours the storage of energy in periods of food abundance, and its conservation during the periods of scarcity, contributing to survival. GLUT4 protein is well known to play an important role in energy storage when large amounts of glucose are available. However, its regulation in periods of low offer of energy substrate is yet to be clarified. In adipose tissue, GLUT4 expression decreases during food deprivation but in skeletal muscle, whose function must be preserved under such condition, GLUT4 regulation is not clearly understood and it has never been studied when stressful stimuli are imposed to the animal. Skeletal muscle take up glucose in response to insulin and contractile activity, and low GLUT4 expression decreases glucose uptake, as observed in diabetes. The β adrenergic sympathetic nervous system (SNS) plays a key role in the homeostasis maintenance during fasting, mainly when stressful conditions are added to this situation. The present study was aimed to investigate the participation of the β -adrenergic SNS in the regulation of GLUT4 mRNA and protein expression in slow-twitch oxidative (soleus) and fast-twitch glycolytic (extensor digitorum longus-EDL) muscles of fasted rats. Wistar rats were fed *ad libitum* or fasted for 48hours. Fasted animals were treated or not with β_1/β_2 -adrenoceptors antagonist, propranolol, or $\beta_1/\beta_2/\beta_3$ -adrenoceptors antagonist, propranolol+SR59230A, or $\beta_1/\beta_2/\beta_3$ -adrenoceptors agonist, isoproterenol. GLUT4 mRNA and protein expression were analyzed by Northern and Western Blotting. Fasting

decreased body weight ($P<0.0001$), glycemia ($P<0.001$), and insulinemia ($P<0.01$), and increased non esterified free fatty acids (NEFA, $P<0.0001$). After treatments, fasted animals presented: 1) increased insulinemia ($P<0.001$), with no changes in glycemia or NEFA, when β_1/β_2 were blocked; 2) increase in insulinemia accompanied by a significant decrease in glycemia ($P<0.05$), with $\beta_1/\beta_2/\beta_3$ blockade; 3) increase in NEFA ($P<0.05$), with $\beta_1/\beta_2/\beta_3$ stimulus. Concerning the GLUT4 mRNA, it increased significantly in soleus (24,03%) and EDL (53,83%) during fasting, and after β_1/β_2 blockade it decreased in soleus ($P<0,05$) and in EDL ($P<0.001$), and with $\beta_1/\beta_2/\beta_3$ blockade it decreased in soleus ($P<0,001$) and in EDL ($P<0,001$). Conversely, β stimulus increased GLUT4 mRNA in soleus ($P<0.05$) without changing it in EDL. GLUT4 protein, increased during fasting in soleus ($P<0,01$), and decreased after triple blockade only in EDL ($P<0.01$). In summary, our results demonstrated that fasting increased GLUT4 gene expression in skeletal muscle, and this response can be important to keep the ability for contractile activity, especially in white glycolytic fibres. The β -adrenergic sympathetic activity participates in the regulation of mRNA during fasting, being essential for the maintenance of the GLUT4 protein content in glycolytic muscle (EDL), what is important to assure the response to stressful situations (fight/escape) during fasting.

Key words

Fasting, GLUT4, skeletal muscle, β - adrenergic sympathetic nervous system, propranolol, isoproterenol, SR59230A.

SUMÁRIO

I. Introdução.....	15
II. Objetivos.....	22
III. Material e métodos.....	23
III.I. Animais.....	23
III.II. Tratamentos.....	23
III.III. Quantificação do mRNA do GLUT4 por Northern blotting.....	25
III.IV. Quantificação da proteína do GLUT4 por Western blotting.....	29
III.V. Determinação de ácidos graxos livres.....	32
III.VI. Análise dos resultados.....	32
IV. Resultados.....	33
IV.I. Peso corporal.....	33
IV.II. Peso dos tecidos.....	34
IV.III. Glicemia.....	37
IV.IV. Insulinemia.....	38
IV.V. Ácidos Graxos Livres (AGL).....	39
IV.VI. mRNA do GLUT4.....	41
IV.VII. Proteína GLUT4.....	43
V. Discussão.....	46
VI. Conclusão.....	52
VII. Referências bibliográficas.....	53

I – Introdução:

A hipótese do genótipo de “poupança” foi proposta há quarenta e cinco anos (Neel, 1962) para explicar o aumento da incidência da obesidade e diabetes. Esta teoria propõe que estes genes traduzem proteínas que favorecem o armazenamento de energia durante períodos de abundância de comida e a conservação da energia durante sua escassez, auxiliando na sobrevivência. Este perfil genético é considerado como tendo sido benéfico à sobrevivência do homem paleolítico caçador-colhedor, e fundamental para a evolução humana. Entretanto, a ação previamente benéfica desses genes tornou-se deletéria quando houve aumento da disponibilidade de alimentos, como ocorreu na vida moderna.

Recentemente, Stannard e Johnson (2003) destacaram que a atividade física do homem caçador-colhedor era requerida antes que a energia derivada da comida pudesse ser utilizada ou armazenada, propondo que os genes de “poupança” deveriam ter tido um papel secundário na sobrevivência, comparados com os genes que preservam a capacidade física durante a escassez de comida. Atividade física intensa requerida para caçar, colher e resistir à predação (Stannard & Johnson, 2003), deveria representar um importante estresse.

Durante o jejum, a resistência insulínica é caracterizada em todos os tecidos do organismo (Penicaud *et al.*, 1985) e a atividade simpática é aumentada no tecido adiposo branco (Migliorini *et al.*, 1997), porém diminuída em vários locais como coração, rim, tecido adiposo marrom (BAT) e músculo esquelético (Young & Landsberg, 1977; Young & Landsberg, 1979; Young *et al.*, 1982; Daly *et al.*, 1992), evidenciando a importância de poupar substrato glicose nesta circunstância. Quando o alimento é oferecido, uma reversão tanto da sensibilidade insulínica quanto da atividade simpática local pode rapidamente ocorrer (Penicaud *et al.*, 1985; Young, 2003). Entretanto, se uma situação estressante, como atividade

física árdua, é imposta durante o jejum, uma rápida e intensa resposta simpática pode ser crucial para a sobrevivência.

Esta condição fisiológica supõe a importância da preservação de glicose durante o jejum, como também a estocagem de substratos assim que a realimentação é iniciada, ou mesmo a rápida provisão em caso de imposição de estresse. Estudos a respeito da utilização de glicose no jejum têm focado nos mecanismos celulares envolvendo a sensibilidade insulínica e modulação da expressão de genes envolvidos, mas a participação do sistema β -adrenérgico ainda não foi esclarecida, especialmente in vivo.

Glicose é o combustível chave nos mamíferos, e é um importante substrato metabólico. Ela é obtida diretamente da dieta, após a hidrólise de dissacarídeos e polissacarídeos ingeridos, ou por síntese, a partir de outros substratos, em órgãos como o fígado. O processo que envolve a transferência da glicose através da membrana plasmática é feito por proteínas transportadoras (Wood & Trayhurn, 2003), por ser uma molécula polar, insolúvel na membrana plasmática. Esses transportadores compreendem 2 distintos grupos, com diferenças funcionais e estruturais: os SGLT (co-transportadores Na^+ dependente, gene denominado SLC5A) (Wright, 2001) e GLUT (transportadores Na^+ independente, gene denominado SLC2A) (Joost & Thorens, 2001).

Os transportadores GLUT utilizam o gradiente da glicose (e outras hexoses) para a difusão facilitada através da membrana, e exibem diferentes especificidades de substratos, propriedades cinéticas e perfil de expressão tecidual (Wood & Trayhurn, 2003). Esses transportadores possuem 12 segmentos transmembrânicos hidrofóbicos, através dos quais a molécula de glicose pode cruzar a membrana, com terminações amino e carboxil citoplasmáticas (Thorens *et al.*, 1990).

O SLC2A4 é um gene de “poupança”. Este gene codifica a isoforma de transportador de glicose GLUT4, que é expressa especificamente em tecidos com alta capacidade de captação de glicose quando o substrato está disponível abundantemente, tal como no período pós-prandial, quando a proteína é translocada para a membrana plasmática sob estímulo insulínico (Thorens *et al.*, 1990). Assim, o GLUT4 é um transportador de glicose responsivo à insulina, e está localizado em células musculares e adiposas (Shepherd & Kahn, 1999).

No tecido adiposo, está bem descrito que os níveis de GLUT4 diminuem durante o jejum, aumentando após a realimentação (Charron & Kahn, 1990). Entretanto, no músculo esquelético, a regulação do GLUT4 durante o jejum é controversa e ainda não está claramente definida, ainda mais se condições estressantes são impostas nesta situação.

O tecido muscular esquelético é o maior local envolvido na captação de glicose dependente de insulina, responsável por 80% da captação de glicose pós-prandial (Baron *et al.*, 1988), a qual é mediada pelo GLUT4. Este tecido possui os 3 subtipos de receptores β -adrenérgicos (1, 2 e 3), porém apresenta predominante o subtipo β_2 (Kim *et al.*, 1991). E comparando os receptores β -adrenérgicos com os receptores α -adrenérgicos, os receptores α -AR são mais escassos no músculo esquelético (Rattigan *et al.*, 1986).

O tecido muscular esquelético sóleo é constituído principalmente por fibras musculares vermelhas de contração lenta, oxidativa, do tipo I; enquanto que o EDL é constituído principalmente por fibras musculares brancas de contração rápida, glicolítica, do tipo IIB.

Os ácidos graxos livres desempenham papel importante na patogênese do diabetes e podem estar envolvidos nos eventos precoces que levam à resistência insulínica em humanos, por prejudicar a utilização de glicose periférica e por promover uma super-produção de glicose hepática (Boden, 1997).

A transição para o estado de jejum, no qual os ácidos graxos livres (FFA) derivados da lipólise do tecido adiposo se tornam a maior origem de combustível metabolicamente oxidável para o coração, músculo esquelético e fígado, é acompanhada por completas mudanças no metabolismo lipídico. O ciclo de FFA é iniciado pela lipólise de triglicerídeos (TG) catalizados pela lipase hormônio sensível (HSL) (Kalderon *et al.*, 2000).

Estudos mostraram que o aumento da concentração de ácidos graxos livres *in vivo* pode inibir a captação de glicose estimulada pela insulina, provavelmente por inibição do transporte ou da metabolização da de glicose; e diminuição da atividade da glicogênio sintase no músculo (Boden, 1997). Existem estudos que mostram que os ácidos graxos podem ativar e/ou controlar a expressão gênica de alguns fatores de transcrição, cujos elementos responsivos já foram encontrado na região promotora do gene do GLUT4 (Pégorier *et al.*, 2004), indicando que eles possam participar da regulação da expressão deste gene.

Redução da massa adiposa e aumento do gasto energético são um dos efeitos fisiológicos mais consideráveis do tratamento crônico de β -agonistas. A diminuição da massa adiposa pode ser conseqüência do aumento da mobilização de gorduras do tecido adiposo; diminuição da síntese de gordura no tecido adiposo e fígado, ou a combinação de ambas. A habilidade da adrenalina em modular diretamente o metabolismo de lipídios, no tecido adiposo e fígado, foi demonstrada em animais de várias espécies. A ligação de β -agonistas em receptores adrenérgicos no tecido adiposo ativa a adenilato ciclase, alterando os níveis de AMP cíclico, ativando proteínas quinases, e levando a uma ativação da lipase hormônio sensível e hidrólise de triacilglicerol (Yang & McElligott, 1989).

Foi bem documentado que β -agonistas podem estimular a lipólise nos adipócitos de ratos e inibir a síntese de ácidos graxos *de novo* em hepatócitos e adipócitos, *in vitro*. Altas

concentrações de β -agonistas inibem a lipogênese na presença ou na ausência de insulina (Yang & McElligott, 1989).

Os efeitos do sistema nervoso simpático no metabolismo de glicose e lipídios são mediados pela adrenalina circulante e pela inervação simpática direta no fígado, tecido adiposo e músculo esquelético (Nonogaki, 2000).

Os neurônios pós-ganglionares simpáticos tipicamente liberam noradrenalina, que excita algumas células efectoras, mas inibe outras. Enquanto que a medula adrenal libera principalmente adrenalina (Willis Jr, 2004).

Os receptores adrenérgicos são proteínas transmembrânicas com uma terminação amino extracelular e uma terminação carboxil intracelular, possuindo 7 regiões hidrofóbicas na membrana celular, e encontram-se associados a proteína G. Os receptores adrenérgicos são divididos em α_1 , (α_{1A} , α_{1B} e α_{1D}), α_2 (α_{2A} , α_{2B} e α_{2C}) e β (β_1 , β_2 , β_3 e β_4). Os receptores α_1 agem nas células alvo por meio de proteína Gq, já os receptores α_2 agem por meio de proteína Gi, enquanto que os receptores β agem por meio de Gs. Portanto, os receptores α_1 aumentam o 1,4,5-Inositol trifosfato e diacilglicerol intracelular, os receptores α_2 diminuem o AMPc intracelular e os receptores β aumentam o AMPc intracelular nos tecidos alvo (Goldfien, 2001).

Três diferentes subtipos de receptores β -adrenérgicos foram clonados e identificados farmacologicamente: β_1 , β_2 e β_3 . O receptor β_3 difere dos β_1 e β_2 tanto na estrutura do gene quanto na estrutura molecular da proteína (Brodde & Michel, 1999). O gene humano do receptor β_3 possui introns e éxons adicionais, em comparação aos genes dos receptores β_1 e β_2 (Granneman *et al.*, 1993). Estudos farmacológicos recentes, feitos principalmente em tecido

cardíaco de humanos e de ratos, propuseram a existência de um quarto β receptor, mas esse subtipo ainda não foi clonado (Brodde & Michel, 1999).

Os três subtipos de receptores β -adrenérgicos podem ser ativados pela adrenalina e noradrenalina. Uma distinção básica entre os receptores β_1 e β_2 é a potência relativa da adrenalina e noradrenalina, sendo ambas catecolaminas igualmente potentes para o receptor β_1 , e a adrenalina tendo seletividade 100 vezes maior para o receptor β_2 . Já a noradrenalina é mais potente que a adrenalina como agonista para o receptor β_3 . A catecolamina sintética, isoproterenol, é um potente agonista para os três subtipos de receptores β , sem especificidade. Propranolol e seus análogos são potentes antagonistas para os receptores β_1 e β_2 , porém o receptor β_3 é pouco sensível a estes antagonistas. Todos os três subtipos de β -receptores ativam adenilato ciclase como primeiro mecanismo de transdução de sinal (Bylund *et al.*, 1994).

O receptor adrenérgico β_1 é expresso predominantemente no coração, o receptor β_2 é predominante no sistema respiratório e o receptor β_3 é expresso primariamente no tecido adiposo e pode ser importante na regulação do peso corporal (Skeberdis, 2004). Moléculas com alta afinidade ao receptor β_3 têm sido repetidamente testadas devido a sua potencial aplicação anti-diabetogênica e anti-obesidade (Milagro *et al.*, 1999), por seus efeitos lipolítico e termogênico, respectivamente nos tecidos adiposos branco e marrom.

Estudos anteriores no nosso laboratório (Alves & Machado, 2004) mostraram que o bloqueio β aumentou rapidamente o mRNA do GLUT4 no jejum de 48 horas. Enquanto que a participação α -adrenérgica parece ser, *in vivo*, pouco importante na regulação do mRNA do GLUT4 durante o jejum, desde que o prazosin (α antagonista) não alterou o mRNA do

GLUT4 no jejum de 48 horas. Esses resultados nos fizeram estudar particularmente a participação do sistema nervoso simpático β adrenérgico durante o jejum.

A participação do sistema nervoso autônomo simpático β -adrenérgico durante o jejum pode ser extremamente importante, não apenas na manutenção da homeostasia frente à ausência de aporte alimentar, mas, sobretudo na resposta a condições estressantes como o exercício físico, necessário para a caça e/ou a colheita de alimentos.

Em relação à proteína GLUT4, e a respeito da atividade simpática, estudos *in vitro* mostraram que o AMP cíclico, o segundo mensageiro dos efeitos β -adrenérgicos, reprime a transcrição do gene do GLUT4 em adipócitos (Flores-Riveros *et al.*, 1993), mostrando a atividade simpática, *in vitro*, como repressora do gene do GLUT4. Entretanto, a participação do sistema nervoso simpático β -adrenérgico como modulador da expressão do GLUT4 em músculo esquelético, *in vivo*, e durante o jejum, nunca foi investigado. Diante dos fatos aqui expostos, justifica-se o presente estudo.

II – Objetivos:

Investigar a participação do sistema nervoso autônomo simpático β -adrenérgico sobre a regulação da expressão do gene do GLUT4 em músculo esquelético durante o jejum.

II.I – Objetivos específicos:

Verificar a abundância do mRNA e da proteína do GLUT4 em tecidos muscular esquelético vermelho (sóleo) e branco (EDL), após 48 horas de jejum, na vigência de bloqueio β_1 , β_2 e β_3 -adrenérgicos e estímulo β_1 , β_2 e β_3 -adrenérgicos.

III - Material e métodos:

III.I. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar de ~ 200 a 250g (fornecidos pelo Biotério Central do ICB/ USP), acondicionados em biotério termorregulado ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), com ciclo de luz/escuridão 12/12 horas (início do período claro às 06:00 h) e água e alimentação à vontade. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

A - ratos alimentados livremente;

J - ratos submetidos a jejum de 48 horas;

JP - ratos submetidos a jejum de 48 h, sob bloqueio β_1 e β_2 -adrenérgicos.

JI - ratos submetidos a jejum de 48h, sob estímulo β_1 , β_2 e β_3 -adrenérgicos.

JPS – ratos submetidos a jejum de 48h, sob bloqueio β_1 , β_2 e β_3 -adrenérgicos

O controle de peso corporal dos animais foi feito através de três pesagens:

- peso no dia da individualização em gaiolas individuais (inicial);
- peso no dia de início da privação alimentar de 48 horas (4^o dia);
- peso no dia do sacrifício, após as 48 horas (6^o dia).

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, protocolo n^o 23-fls.13-livro2.

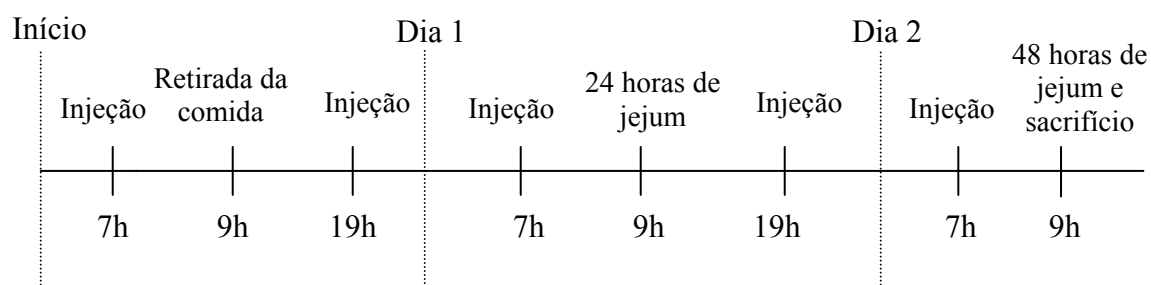
III.II. Tratamentos

Devido à condição experimental do jejum, todos os animais foram colocados em gaiolas individuais durante 3 dias para um período de adaptação e durante todo o restante do

tratamento. A privação alimentar por 48 horas foi iniciada às 9:00 horas, nos grupos J, JP, JPS e JI, enquanto os animais do grupo A foram estudados, nesta mesma hora, e estavam alimentados livremente.

Administração de agonista e antagonistas β -adrenérgicos

O bloqueador β -adrenérgico utilizado foi propranolol, antagonista dos receptores β -adrenérgicos 1 e 2, e o estimulador β -adrenérgico foi isoproterenol, agonista dos receptores β -adrenérgicos 1, 2 e 3 (Tan *et al.*, 2003). As doses de propranolol e isoproterenol foram de 8mg/Kg de peso corporal/2xdia e 4 mg/Kg de peso corporal/2xdia (Kimura *et al.*, 1993), respectivamente. Foi utilizado também um bloqueio dos receptores β -adrenérgicos 1, 2 e 3 com propranolol mais antagonista β_3 SR59230A (Oxalato de SR 59230A, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), na dose de 0,141mg/Kg de peso corporal/2xdia (Gaspiretti *et al.*, 2005). As primeiras injeções intraperitoneais foram aplicadas 2 horas antes do início do jejum e 10 horas depois do início do jejum. Os animais do grupo J, sem bloqueio, receberam injeções de salina nos mesmos tempos dos demais. O esquema abaixo, resume o tratamento utilizado.



Coleta das amostras de sangue e tecidos

No momento do sacrifício, os animais foram anestesiados (anestésico: tiopental sódico 5mg/100g de peso corporal, intraperitonal - Thiopentax[®], Cristália, Itapira, SP, Brasil) para obtenção das amostras de sangue e tecido. Do sangue, coletado da veia cava inferior, uma gota foi utilizada para análise da concentração de glicose em sangue total (com glicosímetro - Precision Q.I.D., Medisense, Abbot Laboratory Company, Bedford, Massachusetts, USA), e o restante foi centrifugado para obtenção de plasma, para posterior dosagem de insulina (com radioimunoensaio - Coat-a-Coat, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). Imediatamente após a coleta de sangue, com o animal ainda vivo, foi feita a dissecação das patas e os tecidos musculares esqueléticos soleo e EDL (extensor digital longo) foram isolados. Os tecidos foram pesados e utilizados por inteiros, a fim de preservar a composição de fibras musculares. Mantidas em freezer -75°C, as amostras foram utilizadas para análise do conteúdo de mRNA do GLUT4 por Northern Blotting e do conteúdo de proteína de GLUT4 por Western Blotting.

Após a retirada dos tecidos os animais foram sacrificados com dose excessiva de anestésico (anestésico: tiopental sódico - Thiopentax[®], Cristália, Itapira, SP, Brasil).

III.III. Quantificação do mRNA do GLUT4 por Northern blotting

Preparação das amostras:

O tecido foi homogeneizado em Polytron com Trizol[®] Reagent (Invitrogen[™] life technologies, Gaithersburg, USA) para isolamento do RNA total (1ml de Trizol).

Após a centrifugação (12000rpm a 4°C), foi adicionado ao sobrenadante 0,2ml de clorofórmio. Os tubos foram, então, agitados vigorosamente por 15 segundos, incubados

durante 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugados a 12000rpm, durante 15 minutos, a 4°C. Foi adicionado 0,5 ml de isopropanol à fase superior, transferida para novo tubo, logo após foram agitados por inversão 20X, e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Então, foi feita uma centrifugação a 12000rpm, durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com 1ml de etanol 70%, e submetido a uma centrifugação a 12000rpm, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi seco em temperatura ambiente durante 10 minutos. A cada tubo foi adicionado 50µl de água DEPC (Dietil Pirocarbonato) para solubilização do precipitado em banho-maria a 65 °C, durante 10 minutos.

Avaliação da concentração de RNA total

Foi retirado 1µl da amostra solubilizada de RNA total e adicionado a 79µl de água DEPC para leitura em espectrofotômetro (Gene Quant, Amershan Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) em 260 nm. Essa leitura permitiu o cálculo da concentração de ácido nucléico da amostra. Uma unidade de densidade óptica (DO) corresponde a aproximadamente 40 µg/ml de fita simples e a relação DO 260/DO 280, sempre > 1,65, permite estimar a pureza do ácido nucléico da amostra.

Northern Blotting para quantificação do mRNA do GLUT4

A avaliação do mRNA do GLUT4 foi feita através da técnica de Northern Blotting (Davis *et al.*, 1994), conforme sumarizado a seguir:

- *Eletroforese*

As amostras foram colocadas em freezer -70 °C. Após os cálculos para aplicação no gel, foi separada a quantidade certa das amostras, então elas foram secas em temperatura ambiente e após, adicionado 6µ de água DEPC (Dietil Pirocarbonato) em casa amostra.

3µl de “Running Buffer” 10X (MOPS 0,2 M, EDTA 10mM, NaOAc 50mM, pH 7,0); 4,8µl de formaldeído e 15µl de formamida foi adicionado a 20 µg de RNA total (solubilizados em 6 µl de água DEPC) e incubados em banho-maria a 65 °C, durante 10 minutos, depois resfriou-se no gelo para manter a nova forma do RNA. Foram adicionados 2,5µl de tampão de aplicação (“loading buffer”: glicerol 30 %; azul de bromofenol 0,025 % em água DEPC qsp) e 2µl de brometo de etídio (diluído 1:20). A amostra foi então aplicada no gel de corrida.

Gel de corrida: O gel utilizado para a corrida foi gel de agarose 1,3% (agarose 0,78g, água DEPC 43,8 ml, 6 ml “Running Buffer” 10X, 10,2 ml formaldeído). O tempo de corrida eletroforética foi de aproximadamente 2 horas, sob voltagem constante de 70mV, num sistema de eletroforese horizontal submarina, em “Running Buffer” 1X.

- *Transferência*

Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado 2X em água milli Q autoclavada durante 15 minutos e as amostras foram transferidas para a membrana de nylon Hybond[®]N (Amesham Biosciences, Buckinghamshire, UK) através do método de transferência por capilaridade.

A transferência por capilaridade foi realizada durante 20 horas aproximadamente, em tampão 20X SSC (NaCl 175,3 g; Tri-Sódio Citrato 88,2 g, pH 7,0 em 1 l), em temperatura ambiente.

Após a transferência, a membrana foi lavada em tampão 2X SSC e seca em temperatura ambiente. Posteriormente, o RNA foi fixado à membrana através da radiação ultravioleta 254nm, por 3 minutos.

- *Hibridação*

Foram utilizados 25ng de cDNA de GLUT4 ou de β -actina, 50 μ Ci de α^{32} -P dCTP (Redivue-Tip α^{32} P dCTP- Amersham Biosciences), e o kit Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen™ life technologies, Gaithersburg, USA) para obtenção da sonda radioativa.

Durante a hibridação, a membrana de nylon foi colocada em um tudo para hibridação com solução tampão de hibridação (Fosfato de sódio 0,5M, pH 6,8; 7% SDS; 1% BSA; 1mM EDTA). Inicialmente, a membrana foi pré-hibridada na presença de 100 μ g/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado, em volume de tampão de hibridação suficiente para manter toda mergulhada, durante 3 horas, a 60 °C. Posteriormente, a sonda radioativa foi adicionada à solução de pré-hibridação e incubada a 65 °C, durante 20 horas.

Após a hibridação, com a finalidade de remover as ligações inespecíficas, a membrana foi submetida a duas lavagens com tampão de baixa estringência (2X SSC, SDS 0,1%), uma de 5 minutos e outra de 20 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, foi feita uma lavagem de 2,5 minutos, com tampão de lavagem de alta estringência (0,1X SSC, SDS 0,1 %), numa temperatura a partir de 60°C.

- *Autorradiografia e densitometria*

A membrana de nylon foi exposta a filme (Kodak X-Omat LS, Eastman Kodak Company, Rochester, NY), durante aproximadamente 4 dias, a -70 °C. O filme foi revelado em solução reveladora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, BR) e fixado em solução fixadora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, BR), sendo evidenciados os “blots” correspondentes ao mRNA do GLUT4.

A intensidade do “blots” foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se um “software” (Image master 1D – Amershan Pharmacia Biotech, Uppsala, SW).

- *Normalização dos valores*

Para a correção das quantidades de RNA total das amostras, foi utilizada uma sonda de cDNA de β -actina. Portanto, após a obtenção dos resultados do mRNA do GLUT4, a membrana foi lavada e hibridada novamente com a sonda de β -actina. Os valores (em densidade óptica) obtidos dos “blots” de mRNA do transportador foram normalizados pelos respectivos valores da β -actina.

Posteriormente, os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA), considerando 100 o valor obtido em cada experimento para A (animais alimentados livremente) e/ou J (jejum de 48 horas), dependendo da análise.

III.IV – Quantificação da proteína do GLUT4 por Western blotting

Preparação das amostras:

As amostras de tecido foram homogeneizadas em Polytron PT 3000 KINEMATICA® (BRINKMAN) a 20.000rpm em tampão de homogeneização (Tris HCl 10mM; EDTA 1,0mM; sacarose 250mM) numa proporção de 1:6 (peso:volume). Posteriormente, foram centrifugadas a 2350rpm por 10 minutos, a 4°C, o precipitado foi ressuscitado e centrifugado a 2350rpm por 10 minutos, a 4°C. Os dois sobrenadantes foram somados e submetidos a uma ultracentrifugação a 41000rpm, por 75 minutos a 4°C, e o pellet final foi ressuscitado em tampão de homogeneização, sendo estocado a uma temperatura de -20°C. A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

“SDS-PAGE”:

Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin (Garfin, 1990), que envolve um sistema de dois géis:

- gel de empacotamento (“stacking gel”)
- gel de separação (“resolving gel”)

Antes da aplicação, foi adicionado às amostras a mistura contendo “laemmli” (glicerol 15%, Tris 0,05M, Bromofenol Blue 0,05%, SDS 9%) e 6% de mercaptoetanol, e então as amostras foram fervidas por 5 minutos.

A eletroforese começa com a corrida no gel de empacotamento sob voltagem constante em 75 mV até que ocorra o empacotamento da amostra, o que pode ser observado na transição dos géis. Posteriormente, foi aplicada uma corrente constante de 55mA para a corrida no gel de separação por 5 horas.

Transferência Eletroforética:

Após a separação das frações protéicas no gel de poliacrilamida foi realizada sua transferência eletroforética para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL[®] (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), por 16 horas, em uma corrente de 42mA, numa temperatura de 4°C, em tampão de transferência (Tris HCL 0,25M, Glycine 1,9M, água milliQ e metanol).

A qualidade da transferência foi verificada corando-se o gel com azul brilhante de coomasie (Towbin *et al.*, 1979; Timmons & Dunbar, 1990).

“ECL- Enhanced Chemiluminescence”:

- Bloqueio inespecífico da membrana em leite desnatado (23%, Molico[®]-Nestlé) diluído em PBS 1X pH 7,2 [NaCl 0,8%; Na₂HPO₄·(12H₂O) 0,115%; KCl 0,02%; KH₂PO₄ 0,02%] por 1 hora;
- Incubação com anticorpo primário anti-GLUT4-Chemicon (1:3000) em PBS 1X (BSA 8%) por 3 horas a 37° C, sob agitação;
- Lavagens: rápidas com 10mL de solução de lavagem (1mL de Tween 20 + 999mL PBS 1X - 0,1% Tween 20);
- Incubação com anticorpo secundário (anti IgG de coelho) conjugado com enzima peroxidase - HRP Amersham Biosciences (1:10.000) em PBS 1X (BSA 1%) por 1 hora, sob agitação e temperatura ambiente;
- Lavagens: lavagens com solução de lavagem;
- Detecção: a reação da oxidação do luminol pela peroxidase, tendo como substrato peróxido de hidrogênio, foi visualizada por meio de quimioluminescência (ECL-enhanced chemiluminescence) utilizando-se kit (ECL- Amersham Biosciences).
- Exposição e revelação: a membrana foi exposta a filme (Kodak X-Omat LS, Eastman Kodak Company, Rochester, NY), por um tempo variável de 1,5 a 5 minutos. Após esse período o filme foi revelado com solução reveladora e reforçadora GBX e solução fixadora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, BR).

Expressão dos resultados:

A intensidade dos “blots” e os resultados em cada membrana foram normalizados considerando-se 100 o valor obtido em A (animais alimentados livremente) e/ou J (jejum de 48 horas), dependendo da análise. Posteriormente, a partir da quantidade de proteína aplicada

na eletroforese e da recuperação protéica das amostras, calculou-se a quantidade de GLUT4 por grama de tecido (UA/g).

III.V. Determinação de ácidos graxos livres

A dosagem de ácidos graxos livres foi feita pelo método de Chromy *et al.* (1977).

Para tal, pipetou-se 1ml de tampão fosfato em um tubo de vidro. Depois, adicionou-se 100µl de plasma e/ou padrão. Adicionou-se 6ml de solução extratora (CHM – Clorofórmio, heptano e metanol), e agitou-se vigorosamente por 10 minutos. Deixou-se 15 minutos em repouso e centrifugou-se a 1500rpm por 10 minutos. Então, removeu-se a parte aquosa superior da solução e transferiu 4ml da fase inferior para outro tubo contendo 2ml de Cu-TEA (Reagente de Cooper), agitou-se por 20 minutos. Após, centrifugação a 1500rpm por 20 minutos, transferiu-se 2ml da fase superior para o tubo de leitura, acrescentando-se 0,5ml da solução DPC (reativo de cor – Difenilcarbazida, difenilcarbazona, etanol e TEA) e agitou-se cuidadosamente. Após 15 minutos foi realizada a leitura em 550nm.

III.VI. Análise dos resultados

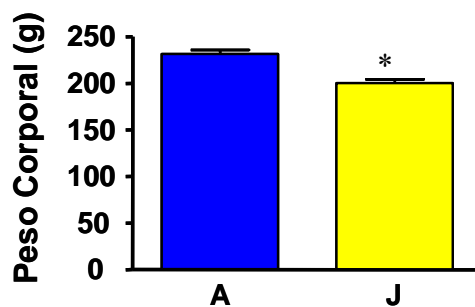
Os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls, e quando comparamos apenas dois grupos (A e J) foi feito o teste “t”. Essas análises foram feitas com auxílio do programa computacional GraphPad Prism[®], v. 3,02 (GraphPad, USA).

IV – Resultados:

IV.I. Peso corporal

O peso corporal dos grupos A e J está representado na *figura 1*. Nesta figura o peso dos animais foi obtido no dia do sacrifício. Comparando-se os grupos observa-se que os animais que foram submetidos a jejum de 48 horas tiveram uma redução de peso quando comparado aos animais que não foram submetidos ao jejum (grupo A).

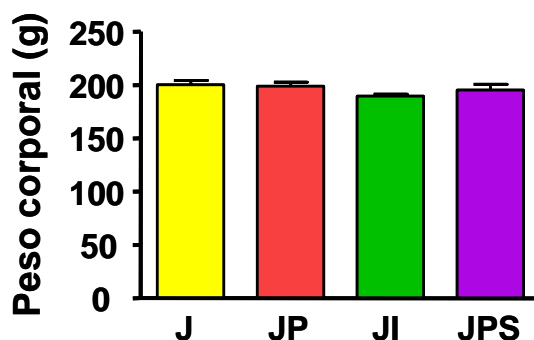
O grupo J apresentou um peso 13,43% menor que o peso do grupo A ($P < 0,0001$).



	A	J
Médias \pm EPM	231,5 \pm 4,19 (13)	200,4 \pm 3,89 (11)

Figura 1: Peso corporal dos animais dos grupos A (alimentado livremente) e J (jejum de 48 horas), no dia do sacrifício. Valores são média \pm EPM, o número de animais está entre parenteses. * $P < 0,0001$ vs A.

A *figura 2* mostra o peso corporal dos animais jejuados (J, JP, JI e JPS). Os tratamentos com propranolol (JP), com isoproterenol (JI) e com propranolol+SR59230A (JPS) não alteraram o peso durante o jejum.



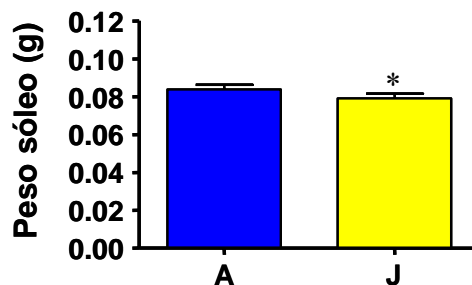
	J	JP	JI	JPS
Médias ± EPM	200,4 ± 3,89 (11)	198,9 ± 3,71 (13)	189,5 ± 1,88 (11)	195,4 ± 5,30 (8)

Figura 2: Peso corporal dos animais dos grupos J (jejum de 48 horas), JP (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 -adrenérgico), JI (jejum de 48 horas sob estímulo β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) e JPS (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) no dia do sacrifício. Valores são média \pm EPM, o número de animais está entre parenteses.

IV.II. Peso dos tecidos

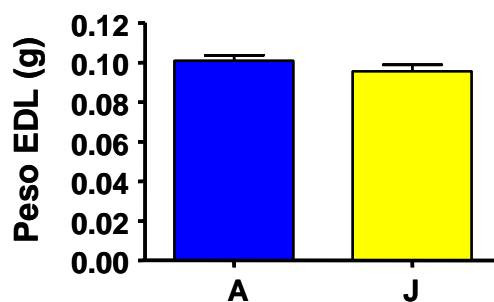
Na *figura 3* está representado o peso do tecido muscular esquelético sóleo coletado dos animais A e J. O grupo J teve uma redução de 8,13% do tecido muscular esquelético sóleo devido ao jejum de 48 horas ($P < 0,05$), comparado ao grupo A.

A *figura 4* mostra o peso do tecido muscular esquelético EDL coletado dos animais A e J. O grupo J teve uma pequena redução de tecido muscular esquelético EDL devido ao jejum de 48 horas, porém não houve diferença significativa entre os grupos.



	A	J
Médias \pm EPM	0,086 \pm 0,002 (11)	0,079 \pm 0,003 (10)

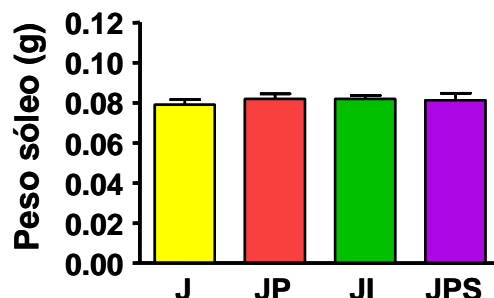
Figura 3: Peso do tecido muscular esquelético sóleo dos animais dos grupos A (alimentado livremente) e J (jejum de 48 horas). Valores são média \pm EPM, o número de animais está entre parenteses. *P<0,05.



	A	J
Médias \pm EPM	0,102 \pm 0,003 (11)	0,096 \pm 0,004 (10)

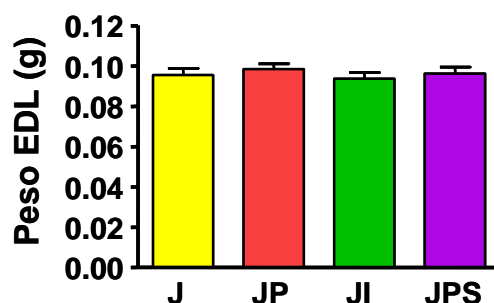
Figura 4: Peso do tecido muscular esquelético EDL dos animais dos grupos A (alimentado livremente) e J (jejum de 48 horas). Valores são média \pm EPM, o número de animais está entre parenteses. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Na *figura 5* está representado o peso do tecido muscular esquelético sóleo e na *figura 6* o peso do EDL coletados dos animais que foram submetidos a jejum de 48 horas (J), com propranolol (JP), isoproterenol (JI) e propranolol+SR59230A (JPS). Não houve diferença significativa entre os grupos em ambos os tecidos.



	J	JP	JI	JPS
Médias ± EPM	0,08 ± 0,002	0,082 ± 0,002	0,082 ± 0,002	0,081 ± 0,003
	(11)	(11)	(11)	(8)

Figura 5: Peso do tecido muscular esquelético sóleo dos animais dos grupos J (jejum de 48 horas), JP (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 -adrenérgico), JI (jejum de 48 horas sob estímulo β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) e JPS (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) no dia do sacrifício. Valores são média ± EPM, o número de animais está entre parenteses. Não houve diferença significativa.



	J	JP	JI	JPS
Médias ± EPM	0,095 ± 0,003	0,1 ± 0,002	0,093 ± 0,003	0,096 ± 0,003
	(11)	(12)	(11)	(8)

Figura 6: Peso do tecido muscular esquelético EDL dos animais dos grupos (jejum de 48 horas), JP (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 -adrenérgico), JI (jejum de 48 horas sob estímulo β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) e JPS (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) no dia do sacrifício. Valores são média ± EPM, o número de animais está entre parênteses. Não houve diferença significativa.

IV.III.Glicemia

A *figura 7* mostra a concentração basal (às 9:00 horas imediatamente antes do sacrifício) de glicose no sangue total dos animais A e J. O grupo J apresentou uma glicemia 36,29% menor que o grupo A ($P < 0,001$).

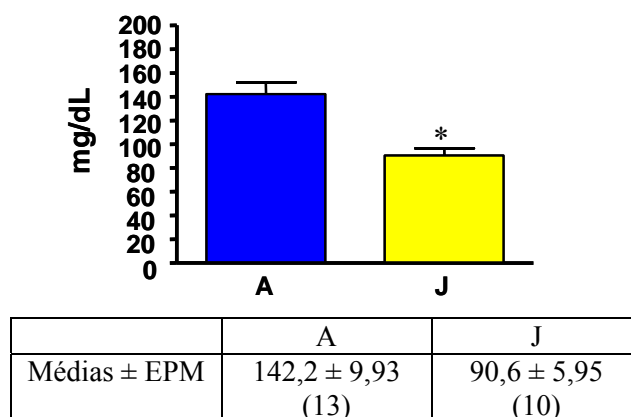
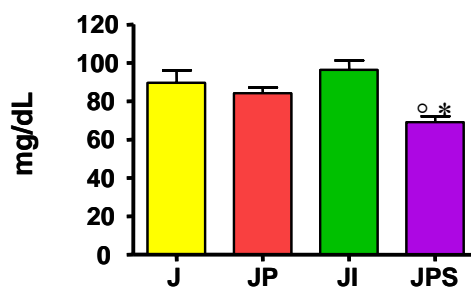


Figura 7: Concentração de glicose basal (retirada imediatamente ao sacrifício) dos animais dos grupos A (alimentado livremente) e J (jejum de 48 horas). Valores são média ± EPM, o número de animais está entre parênteses. * $P < 0,001$ vs A.

A *figura 8* mostra a concentração basal (às 9:00 horas imediatamente antes do sacrifício) de glicose no sangue total dos animais J, JP, JI e JPS. Apenas o grupo JPS mostrou uma diminuição de 20 a 30% na glicemia, quando comparado aos demais grupos ($P < 0,05$).



	J	JP	JI	JPS
Médias ± EPM	89,56 ± 6,54	84,15 ± 3,12	96,36 ± 4,98	69,13 ± 3,01
	(9)	(13)	(11)	(8)

Figura 8: Concentração de glicose basal (retirada imediatamente ao sacrifício) dos animais dos grupos J (jejum de 48 horas), JP (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 -adrenérgico), JI (jejum de 48 horas sob estímulo β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) e JPS (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) no dia do sacrifício. Valores são média \pm EPM, o número de animais entre parenteses. $^{\circ}P < 0,05$ vs J e JP. $*P < 0,01$ vs JI.

IV.IV. Insulinemia:

A concentração de insulina plasmática (na hora do sacrifício) dos grupos A e J está representada na *figura 9*. O grupo J teve uma diminuição da concentração de insulina plasmática 82,51% ($P < 0,01$) em relação ao grupo alimentado (A).

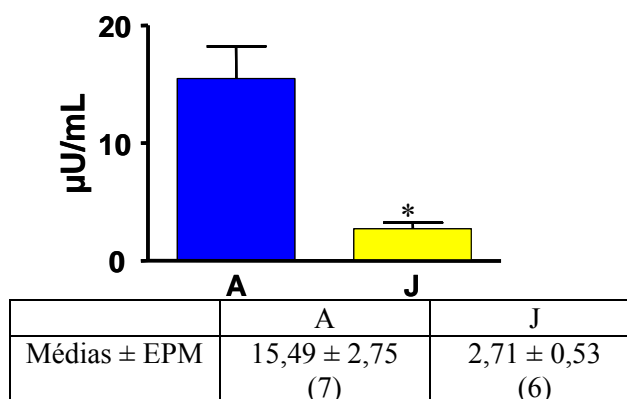
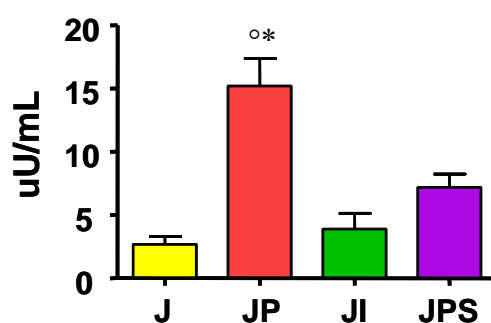


Figura 9: Concentração de insulina plasmática (obtida na hora do sacrifício) dos grupos A (alimentado livremente) e J (jejum de 48 horas). Valores são em média \pm EPM, o número de animais está entre parenteses. $*P < 0,01$.

A concentração de insulina plasmática dos grupos J, JP, JI e JPS está representada na *figura 10*. O grupo JP teve um aumento da concentração de insulina plasmática 473,96% em relação ao grupo J ($P < 0,001$), o grupo JI teve um aumento não significativo de 46,03% (relação ao grupo J) e, o grupo JPS teve um aumento não significativo de 170,94% (em relação ao grupo J).



	J	JP	JI	JPS
Médias ± EPM	2,65 ± 0,65	15,21 ± 2,16	3,87 ± 1,25	7,18 ± 1,07
	(5)	(7)	(8)	(5)

Figura 10: Concentração de insulina plasmática (obtida na hora do sacrifício) dos grupos J (jejum de 48 horas), JP (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 -adrenérgico), JI (jejum de 48 horas sob estímulo β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) e JPS (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) no dia do sacrifício. Valores são em média ± EPM, o número de animais está entre parenteses. * $P < 0,001$ vs J e JI. ° $P < 0,01$ vs JPS.

IV.V. Ácidos graxos livres (AGL)

A concentração de ácidos graxos livres (na hora do sacrifício) dos grupos A e J está representada na *figura 11*. O grupo J teve um aumento de 269,56% ($P < 0,0001$) na concentração de AGL em relação ao grupo alimentado (A).

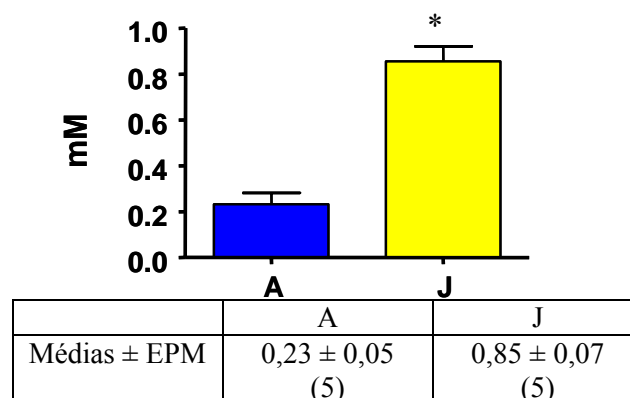


Figura 11: Concentração de ácidos graxos livres (obtida na hora do sacrifício) dos grupos A (alimentado livremente) e J (jejum de 48 horas). Valores são em média ± EPM, o número de animais está entre parenteses. *P < 0,0001.

A concentração de ácidos graxos livres dos grupos J, JP, JI e JPS está representada na *figura 12*. O grupo JI teve um aumento de 23,53% na concentração de AGL em relação ao grupo J (P<0,05). Enquanto que os grupos JP e o JPS não alteraram a concentração de AGL.

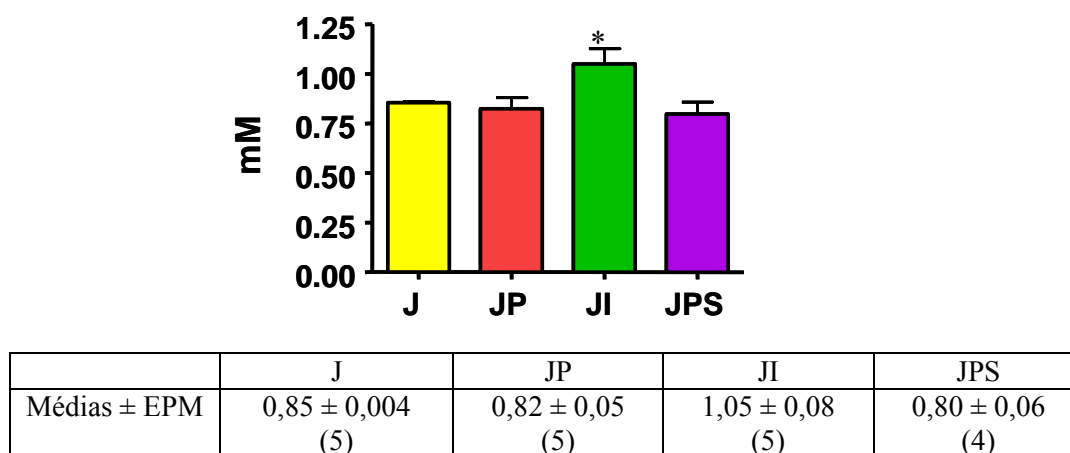


Figura 12: Concentração de ácidos graxos livres (obtida na hora do sacrifício) dos grupos J (jejum de 48 horas), JP (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 -adrenérgico), JI (jejum de 48 horas sob estímulo β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) e JPS (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) no dia do sacrifício. Valores são em média ± EPM, o número de animais está entre parenteses. *P < 0,05 vs J, JP e JPS.

IV.VI. mRNA do GLUT4

As figuras 13 e 14 mostram a quantidade de mRNA de GLUT4 dos grupos A e J presente nos músculos esquelético sóleo e EDL. Houve um aumento de ~25% (sóleo) e ~50% (EDL) do mRNA de GLUT4 no grupo submetido a jejum de 48 horas ($P < 0,001$).

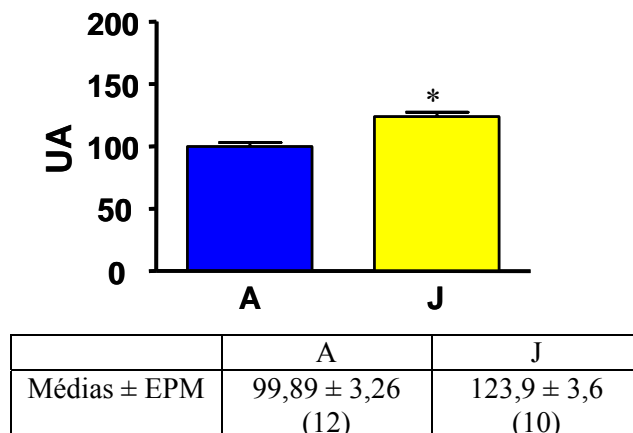


Figura 13: Expressão do mRNA do GLUT4 em tecido muscular esquelético sóleo dos animais dos grupos A (alimentado livremente) e J (jejum de 48 horas). Quantidade de mRNA em UA, unidades arbitrárias. Valores são média \pm EPM, o número de animais está entre parenteses. * $P < 0,0001$ vs A.

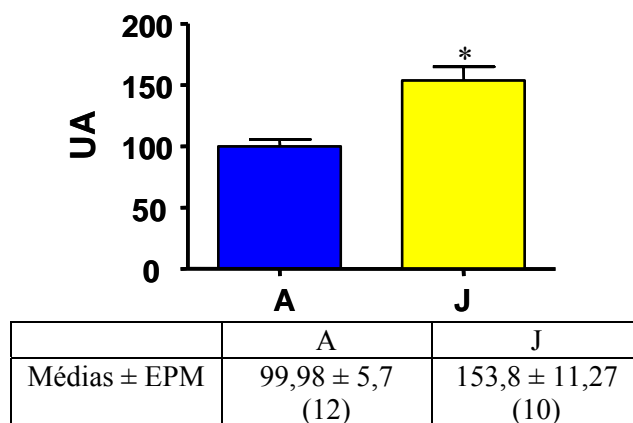


Figura 14: Expressão do mRNA do GLUT4 em tecido muscular esquelético EDL dos animais dos grupos A (alimentado livremente) e J (jejum de 48 horas). Quantidade de mRNA em UA, unidades arbitrárias. Valores são média \pm EPM, o número de animais está entre parenteses. * $P < 0,001$ vs A.

Na *figura 15* está representada a quantidade de mRNA de GLUT4 no músculo sóleo dos grupos J, JP, JI e JPS. O grupo JP apresentou uma quantidade de mRNA de 15,05% GLUT4 menor que o grupo J ($P < 0,05$), e o bloqueio triplo elevou essa diminuição para ~35% ($P < 0,001$). Enquanto que o grupo JI apresentou uma quantidade de mRNA de GLUT4 19% maior que o grupo J ($P < 0,05$).

Na *figura 16* está representada a quantidade de mRNA de GLUT4 dos grupos J, JP, JI e JPS presente no músculo esquelético EDL. Os bloqueios β -adrenérgicos (propranolol e propranolol+SR59230S) causaram uma diminuição do mRNA do GLUT4 (26% e 24%, $P < 0,001$), enquanto o estímulo β -adrenérgico (isoproterenol) não alterou o mRNA de GLUT4.

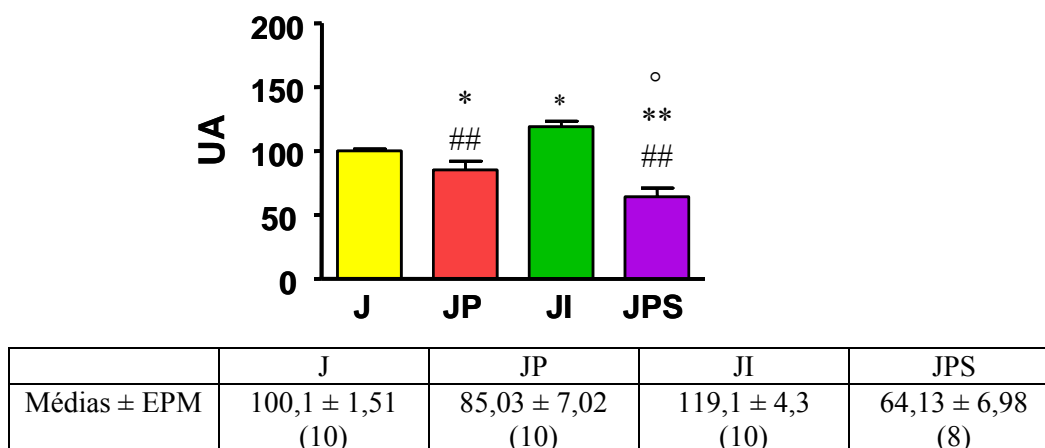


Figura 15: Expressão do mRNA do GLUT4 em tecido muscular esquelético sóleo dos animais dos J (jejum de 48 horas), JP (jejum de 48 horas sob bloqueio β -adrenérgico) e JI (jejum de 48 horas sob estímulo β -adrenérgico). Quantidade de mRNA em UA, unidades arbitrárias. Valores são média \pm EPM, o número de animais está entre parenteses. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$ vs J, ### $P < 0,001$ vs JI, ° $P < 0,05$ vs JP.

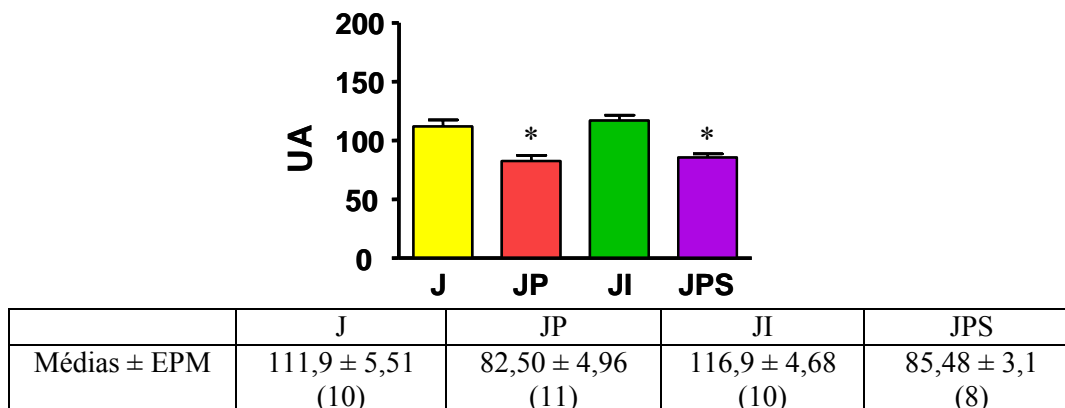


Figura 16: Expressão do mRNA do GLUT4 em tecido muscular esquelético EDL dos animais dos grupos J (jejum de 48 horas), JP (jejum de 48 horas sob bloqueio β -adrenérgico) e JI (jejum de 48 horas sob estímulo β -adrenérgico). Quantidade de mRNA em UA, unidades arbitrárias. Valores são média \pm EPM, o número de animais está entre parenteses. * $P < 0,001$ vs J e JI.

IV.VII. Proteína GLUT4

A *figura 17* mostra que a quantidade de proteína GLUT4/g de tecido presente no músculo esquelético sóleo aumentou 182,04% no jejum ($P < 0,01$), quando comparado com alimentado (A).

Na *figura 18* mostra que a quantidade de proteína GLUT4/g de tecido dos grupos A e J presente no músculo esquelético EDL não se alterou.

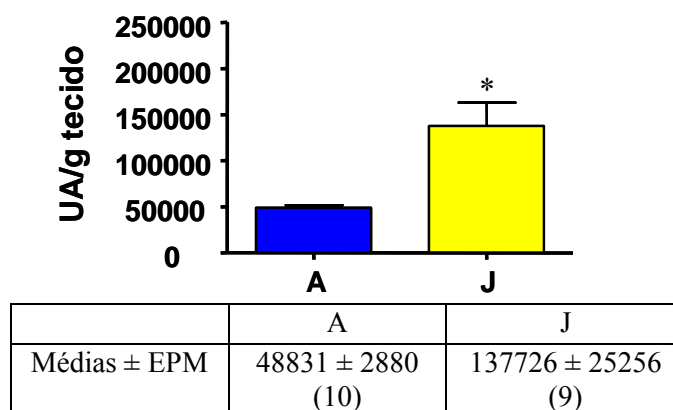


Figura 17: Expressão da proteína GLUT4/g tecido no músculo esquelético sóleo dos animais dos grupos A (alimentado livremente) e J (jejum de 48 horas). Quantidade de proteína em UA, unidades arbitrárias. Valores são média \pm EPM, o número de animais está entre parenteses. * $P < 0,01$ vs A.

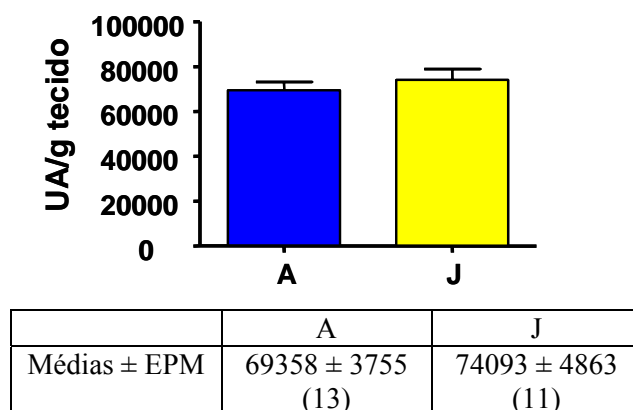
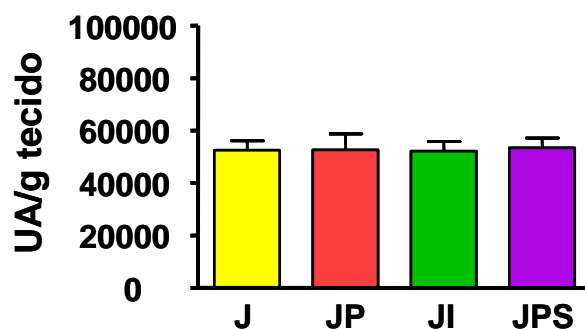


Figura 18: Expressão da proteína GLUT4/g tecido no músculo esquelético EDL dos animais dos grupos A (alimentado livremente) e J (jejum de 48 horas). Quantidade de proteína em UA, unidades arbitrárias. Valores são média ± EPM, o número de animais está entre parenteses. Não houve diferença significativa.

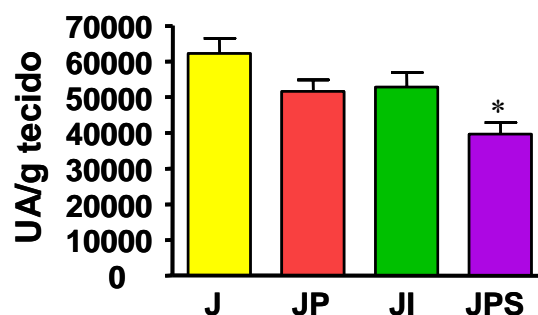
A *figura 19* mostra a quantidade de proteína GLUT4/g de tecido dos grupos J, JP, JI e JPS no músculo sóleo, e observa-se que os tratamentos não alteraram a quantidade de proteína GLUT4.

Na *figura 20* observa-se a quantidade de proteína GLUT4/g de tecido dos grupos J, JP, JI e JPS no músculo EDL, e verifica-se que apenas o bloqueio triplo feito com propranolol+SR59230A reduziu em 36,35% a proteína GLUT4/g de tecido ($P < 0,01$).



	J	JP	JI	JPS
Médias ± EPM	52441 ± 3702 (11)	52601 ± 6086 (12)	52138 ± 3634 (11)	53419 ± 3733 (8)

Figura 19: Expressão da proteína GLUT4/g tecido no músculo esquelético sóleo dos animais dos grupos J (jejum de 48 horas), JP (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 -adrenérgico), JI (jejum de 48 horas sob estímulo β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) e JPS (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) no dia do sacrifício. Quantidade de proteína em UA, unidades arbitrárias. Valores são média ± EPM, o número de animais está entre parenteses. Não houve diferença significativa entre os grupos.



	J	JP	JI	JPS
Médias ± EPM	62299 ± 4229 (11)	51659 ± 3217 (12)	52828 ± 4102 (11)	39650 ± 3208 (6)

Figura 20: Expressão da proteína GLUT4/g tecido no músculo esquelético EDL dos animais dos grupos J (jejum de 48 horas), JP (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 -adrenérgico), JI (jejum de 48 horas sob estímulo β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) e JPS (jejum de 48 horas sob bloqueio β_1 , β_2 , β_3 -adrenérgico) no dia do sacrifício. Quantidade de proteína em UA, unidades arbitrárias. Valores são média ± EPM, o número de animais está entre parenteses. * $P < 0,01$ vs J.

V – Discussão:

A Organização Mundial da Saúde estima que até 2030 a população mundial com diabetes possa atingir 370 milhões, sendo que atualmente são 194 milhões de portadores. Essa perspectiva exige estudos para esclarecer mecanismos moleculares que se relacionam com modificações na ação da insulina em tecidos sensíveis à insulina, tanto na obesidade como no DM2.

Neste sentido, sabe-se que alteração na expressão do GLUT4 determina alteração na capacidade tecidual de utilizar glicose, o que se reflete na homeostasia glicêmica. O jejum é uma condição que induz resistência insulínica, na qual a regulação do GLUT4 ainda não está completamente conhecida. Além disso, nada se conhece sobre a participação da atividade adrenérgica nesta situação, no que se refere à expressão do GLUT4.

O jejum de 48 horas promoveu perda de peso corporal e do tecido muscular sóleo. No jejum, observa-se nas primeiras 24 horas: alterações no balanço da água extracelular (Novarini *et al.*, 1983); e redução no conteúdo de glicogênio muscular de 30 a 50% respectivamente em fibras brancas e vermelhas (Conlee *et al.*, 1976) reduzindo o conteúdo de água intracelular. A medida que o jejum progride, acentua-se a perda de peso corporal por perda de massa adiposa o que inclui diminuição do conteúdo de triglicérideo muscular (Kelley & Goodpaster, 2001). Os bloqueios (propranolol e propranolol+SR59230A) e o estímulo (isoproterenol) β -adrenérgicos não alteraram esses efeitos do jejum.

Como esperado, o jejum induziu redução da glicemia e conseqüentemente da insulinemia, e aumento da concentração plasmática de AGL, que sabidamente ocorre por aumento da atividade lipolítica do tecido adiposo. Esse aumento de AGL contribui como substrato metabólico alternativo à glicose, o qual pode ser oxidado por tecidos musculares.

Atividade gliconeogênica hepática e renal foram eficientes em manter a glicemia dentro de valores normais (90 mg/dL). Para isso, aumento na proteólise e na lipólise provê substratos para a gliconeogênese (Genuth, 2004).

O bloqueio com propranolol induziu um importante aumento na insulinemia, que surpreendentemente não se refletiu em alteração da glicemia, resultado que tem sido reiteradamente observado em nosso laboratório (Zanquetta *et al.*, 2006). A adição do bloqueio β_3 ao bloqueio do propranolol promoveu redução da insulinemia (aumentada só com propranolol), redução da glicemia (inalterada só com propranolol). Pode-se supor que o bloqueio triplo tenha sido necessário para prejudicar a atividade gliconeogênica, reduzindo glicemia, e então, compensatoriamente, os níveis de insulina também diminuíram.

Sabe-se que a mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo é regulada, entre outros fatores, pela atividade adrenérgica local e humoral, que estimulam a atividade da enzima lipase hormônio sensível, catalizadora da hidrólise de triacilglicerol intracelular (Stralfors *et al.*, 1984). Entretanto, no presente estudo, observamos que a elevação dos AGL induzida pelo estado de jejum não se alterou mesmo com o bloqueio β -adrenérgico triplo. Essa observação sugere que, apesar do conhecido papel lipolítico da atividade β -adrenérgica, durante o jejum, outros fatores reguladores da lipólise estão atuando preponderantemente. Esses fatores podem incluir a diminuição da insulina e o aumento de glucagon, glicocorticóides e hormônio de crescimento.

Por outro lado, o estímulo adrenérgico com isoproterenol não alterou glicemia e insulinemia, indicando que os fatores metabólicos/hormonais estão dominando o controle homeostático. Entretanto, o isoproterenol foi capaz de induzir um aumento adicional na elevada concentração de AGL do jejum, evidenciando uma atividade lipolítica residual, capaz

de ser acionada em resposta a estresse. Aumento de AGL em resposta a infusão com isoproterenol durante o jejum (4 dias) já foi descrita em bovinos (Blum *et al.*, 1982). Entretanto, nesta espécie, a infusão de propranolol foi capaz de reduzir os AGL, o que não foi observado no presente estudo.

Analisando a expressão gênica do transportador GLUT4 no jejum de 48 horas houve um aumento de ~25% ($P < 0,0001$) no músculo sóleo e um aumento de ~50% ($P < 0,001$) no músculo EDL, quando comparados ao grupo alimentado livremente. Autores indicaram um aumento na expressão gênica do GLUT4 no tecido muscular de ratos submetidos a jejum (Charron & Kahn, 1990; Woloschak *et al.*, 1993), o que explica antigos resultados de captação de glicose em resposta à maior sensibilidade insulínica, ocorrida *in vitro* em sóleos de ratos jejuados (Brady *et al.*, 1981).

Estudando GLUT4 na musculatura esquelética, alguns autores mostraram que a regulação da expressão gênica do GLUT4 em músculo é tecido-específica, pois as fibras brancas e vermelhas respondem diferentemente a estados metabólicos alterados, como diabetes e jejum (Kahn *et al.*, 1991; Camps *et al.*, 1992; Neuffer *et al.*, 1993).

Neuffer e colaboradores (1993) mostraram que o mRNA de GLUT4 é aumentado somente em músculo branco, não alterando no vermelho, durante o jejum. Esses autores mostraram uma evidência direta de regulação transcricional tecido específica do gene do GLUT4. Uma hipótese é que o jejum induz a um aumento do AMPc, que induza a fosforilação e ativação de proteínas específicas de ligação ao DNA com ativação da região promotora do gene do GLUT4. Esses mesmos autores viram que o aumento da transcrição e aumento de mRNA não são da mesma magnitude (33% e 50%, respectivamente) e sugeriram que isso é evidência indireta de regulação pós-transcricional.

Estudos mostraram que AMP cíclico reprime a transcrição do gene do GLUT4 em adipócitos (Flores-Riveros *et al.*, 1993), porém os fatores transcricionais parecem ser diferentes entre o tecido muscular e adipócitos (Neufer *et al.*, 1993). Bourey e colaboradores (1990), também constataram que a regulação da expressão gênica do GLUT4 parece ser regulada diferentemente entre as células adiposas e células musculares, no jejum.

Existe uma notável heterogeneidade na sensibilidade insulínica e responsividade entre as diferentes composições de fibras musculares (James *et al.*, 1985), sendo as fibras musculares brancas menos sensíveis e menos responsivas à insulina que fibras musculares vermelhas (Kern *et al.*, 1990). O transporte de glicose e o GLUT4 são maiores no músculo vermelho que no músculo branco (Kern *et al.*, 1990).

O músculo sóleo é composto de 89% de fibras tipo I e 11% de fibras tipo IIA (Armstrong & Phelps, 1984). Enquanto que o EDL é composto por 45% de fibra tipo IIB, 29% tipo IIX, 23% tipo IIA e 3% tipo I (Windisch *et al.*, 1998).

Diferentes tipos de fibras musculares também têm diferentes aspectos metabólicos para produção de energia. As fibras de contração rápida são consideradas como tendo alto potencial na produção de ATP por caminhos anaeróbios (Okumura *et al.*, 2005). Na maioria das fibras rápidas, a atividade das enzimas glicolíticas é elevada e a atividade das enzimas oxidativas é baixa, devido a poucas mitocôndrias presentes na fibra. As fibras rápidas dependem do metabolismo glicolítico. Em contraste, as fibras lentas satisfazem as demandas metabólicas com fosforilação oxidativa (Watras, 2004).

Observou-se que o jejum aumentou a expressão do mRNA do GLUT4 em ambos os músculos, entretanto, a proteína GLUT4 aumentou somente no sóleo. Isto indica que alterações pós-transcricionais estão ocorrendo no músculo EDL, e pode-se imaginar que o

aumento de mRNA seja importante para preservar o conteúdo de GLUT4. A resposta observada no sóleo indica que, apesar de sua capacidade de oxidar AGL, este músculo, de alto e contínuo consumo de glicose, não somente preserva, mas aumenta a proteína GLUT4, facilitando a captação de glicose quando o gradiente está reduzido, devido à redução da glicemia. Já o músculo glicolítico, capaz de utilizar seu alto conteúdo de glicogênio, apenas preserva o conteúdo de GLUT4, garantindo assim sua rápida atividade em resposta a estímulos contráteis como os acionados por luta/fuga.

Discrepância entre a variação de conteúdo de mRNA e proteína GLUT4, como observada no músculo EDL no presente estudo, já foi relatada em músculo sóleo de ratos submetidos a jejum de 3 dias (Bourey *et al.*, 1990). Neste estudo, os autores observaram que o jejum aumentou o conteúdo da proteína GLUT4, sem alterar o conteúdo do mRNA, e propuseram a ocorrência de regulação pós-transcricional. Essa questão será discutida mais detalhadamente logo a seguir.

Analisando os resultados obtidos com os tratamentos de bloqueio β -adrenérgico durante o jejum, mais uma vez verifica-se a ocorrência de regulações pós-transcricionais do gene do GLUT4, induzindo discrepâncias entre as variações de conteúdo de mRNA e de proteína. A ocorrência de regulação pós-transcricional na expressão do gene do GLUT4 têm sido freqüentemente descrita, sobretudo em músculo, em várias situações (Bourey *et al.*, 1990; Klip *et al.*, 1994), e estudos de nosso laboratório sugerem que envolvam alteração no tamanho da cauda poly(A) do mRNA do GLUT4 (Seraphim, 2001), o que sabidamente pode interferir tanto na estabilidade do mRNA (alterando *turnover*), como na eficiência de tradução nos ribossomas (Wang *et al.*, 1999). Baseados nisso, podemos propor que nas situações em que o mRNA aumentou sem alterar a proteína (EDL no jejum) possa ter ocorrido redução na cauda

poly(A) o que aumenta a degradação do mRNA e diminui a eficiência de tradução. Inversamente, nas situações em que observou-se diminuição do mRNA sem alterar proteína (bloqueios) pode ter ocorrido aumento da cauda poly(A), e assim, menor conteúdo de mRNA pode garantir a mesma quantidade de proteína.

Por outro lado, do ponto de vista funcional (captação de glicose), sobressai-se as alterações observadas no conteúdo de proteína, estas sim podendo se refletir em alteração no aporte celular de glicose. Neste sentido, observou-se que apenas o bloqueio triplo foi capaz de alterar (diminuição) a proteína GLUT4, e isto ocorreu apenas no EDL. Neste sentido, embora a densidade de receptores β -adrenérgicos seja maior em músculo oxidativo (Williams *et al.*, 1984; Fell *et al.*, 1985), já foi demonstrado que o efeito de antagonistas β -adrenérgicos é maior em fibra glicolítica (Watson-Wright & Wilkinson, 1986), assim explicando porque os efeitos foram mais proeminentes em EDL.

Finalmente, em relação ao efeito do estímulo triplo (isoproterenol), apenas aumento do mRNA foi observado no sóleo, mais uma vez sem alterar proteína, reiterando a ocorrência de alterações pós-transcricionais. Esse resultado sugere que na regulação do gene do GLUT4 durante o jejum, a participação do sistema β -adrenérgico está presente, podendo ser pelo menos parcialmente alterada por bloqueios, porém é incapaz de ser exacerbada em resposta a aumento de atividade β -adrenérgica.

Em conjunto, os resultados evidenciam a participação do sistema β -adrenérgico na regulação do gene do GLUT4 em músculo esquelético durante o jejum.

VI – Conclusão:

Concluimos que o jejum causa um aumento na expressão gênica do GLUT4 no músculo esquelético, sendo importante para que sua atividade contrátil seja preservada na vigência de menor concentração de glicose.

Também concluimos que a atividade β -adrenérgica é importante para aumentar a expressão do mRNA do GLUT4 em músculo oxidativo, mas não da proteína. Por outro lado, em músculo glicolítico, a atividade β -adrenérgica, é fundamental para preservar o conteúdo de proteína GLUT4, importante para garantir respostas ao estresse (luta/fuga) durante o jejum.

VII – Referências Bibliográficas:

- ALVES, A. B. T.; MACHADO, U. F. Regulação do Sistema Nervoso Autônomo Simpático sobre a expressão gênica do GLUT4 na realimentação pós-jejum. Trabalho de Graduação Interdisciplinar, Universidade Presbiteriana Mackenzie. A474r, EB. BIO2004.
- ARMSTRONG, R. B.; PHELPS, R. O. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. **Am J Anat**, 171: 259-72. 1984.
- BARON, A. D.; BRECHTEL, G.; WALLACE, P.; EDELMAN, S. V. Rates and tissues sites of non-insulin and insulin-mediate glucose uptake in humans. **Am J Physiol**, 255: E769-74. 1988.
- BLUM, J. W.; FROEHLI, D.; KUNZ, P. Effects of catecholamines on plasma free fatty in fed and fasted cattle. **Endocrinology**, 110: 452-6. 1982.
- BODEN, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. **Diabetes**, 46: 3-10. 1997.
- BOUREY, R. E.; KORANYI, L.; JAMES, D. E.; MUECKLER, M.; PERMUTT, M. A. Effects of altered glucose homeostasis on glucose transporter expression in skeletal muscle of the rat. **J Clin Invest**, 86: 542-47. 1990.
- BRADY, L. J.; GOODMAN, M. N.; KALISH, F. N.; RUDERMAN, N. B. Insulin binding and sensitivity in rat skeletal muscle: effect of starvation. **Am J Physiol**, 240: E184-90. 1981.
- BRODDE, O. E.; MICHEL, M. C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heard. **Pharmacol Rev**, 51(4): 651-90. 1999.

- BYLUND, D. B.; EIKENBERG, D. C.; HIEBLE, J. P.; LANGER, S. Z.; LEFKOWITZ, R. J.; MINNEMAN, K. P.; MOLINOFF, P. B.; RUFFOLO, R. R., JR.; TRENDELENBURG, U. IV. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenocetors. **Pharmacol Rev**, 46: 121-36. 1994.
- CAMPS, M.; CASTELLÓ, A.; MUNÓZ, 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. Heterogeneous response in heart, red and white muscle. **Biochem J**, 282: 765-72. 1992.
- CHARRON, M. J.; KAHN, B. B. Divergent molecular mechanisms for insulin-resistant glucose transport in muscle and adipose cells in vivo. **J Biol Chem**, 265: 7994-8000. 1990.
- CHROMY, V.; GERGERL, J.; VOZNOCEK, J.; KROMBHOLZOVA, L.; MUSIL, J. Assay for serum free fatty acids by extraction-photometric procedure. **Clin Chim Acta**, 80: 327-32. 1977.
- CONLEE, R. K.; RENNIE, M. J.; WINDER, W. W. Skeletal muscle glycogen content: diurnal variation and effects of fasting. **Am J Physiol**, 231: 614-18. 1976.
- DALY, P. A.; YOUNG, J. B.; LANDSBERG, L. Effect of cold exposure and nutrient intake on sympathetic nervous system activity in rat kidney. **Am J Physiol**, 263: F586-93. 1992.
- DAVIS, L. G.; KUEHL, W. M.; BATTEY, J. F. Basic methods in molecular biology. New York: **Plenum Press**. 1994.

- FELL, R. D.; LIZZO, F. H.; CERVONI, P.; CRANDALL, D. L. Effect of contractile activity on rat skeletal muscle beta-adrenoceptor properties. **Proc Soc Exp Biol Med**, 180: 527-32. 1985.
- FLORES-RIVEROS, J. R.; KAESTNER, K. H.; THOMPSON, K. S.; LANE, M. D. Cyclic AMP-induced transcriptional repression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene: identification of a promoter region required for down-regulation of transcription. **Biochem Biophys Res Commun**, 194: 1148-54. 1993.
- GARFIN, D. E. One-dimensional gel electrophoresis. **Methods Enzimol**, 182: 425-41. 1990.
- GASPARETTI, A. L.; ALVAREZ-ROJAS, F.; ARAUJO, E. P.; HIRATA, A. E.; SAAD, M. J. A.; VELLOSO, L. A. β 3-Adrenergic-dependent and -independent mechanisms participate in cold-induced modulation of insulin signal transduction in Brown adipose tissue of rats. **Eur J Physiol**, 449: 537-46. 2005.
- GENUTH, S. M. O sistema endócrino, pág 806 – In: Fisiologia, 5ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier. 2004.
- GOLDFIEN, A. Adrenal Medulla, págs: 405-406 – In: Basic & Clinical Endocrinology, 6A. Edição, USA: The McGraw Hill Companies. 2001.
- GRANNEMAN, J. G.; LAHNERS, K. N.; CHAUDHRY, A. Characterization of the human beta 3-adrenergic receptor gene. **Mol. Pharmacol**, 44: 264-70. 1993.
- JAMES, D. E.; JENKINS, A. B.; KRAEGEN, E. W. Heterogeneity of insulin action in individual muscles in vivo: euglycemic clamp studies in rats. **Am J Physiol**, 248: E567-74. 1985.

- JOOST, H. G.; THORENS, B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). **Molecular Membrane Biology**, 18: 247-56. 2001.
- KAHN, B. B.; ROSSETTI, L.; LODISH, H. F.; CHARRON, M. J. Decreased *in vivo* glucose uptake but normal expression of GLUT1 and GLUT4 in skeletal muscle of diabetic rats. **J Clin Invest**, 87: 2197-206. 1991.
- KALDERON, B.; MAYOREK, N.; BERRY, E.; ZEVIT, N.; BAR-TANA, J. Fatty acid cycling in the fasting rat. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 279: E221-7. 2000.
- KELLEY, D. E.; GOODPASTER, B. H. Skeletal muscle triglyceride. An aspect of regional adiposity and insulin resistance. **Diabetes Care**, 24: 933-41. 2001.
- KERN, M.; WELLS, J. A.; STEPHENS, J. M.; ELTON, C. W.; FRIEDMAN, J. E.; TAPSCOTT, E. B.; PEKALA, P. H.; DOHM, G. L. Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (GLUT4) protein level. **Biochem J**, 270: 397-400. 1990.
- KIM, Y. S.; SAINZ, R. D.; MOLENAAR, P.; SUMMERS, R. J. Characterization of β_1 - and β_2 -adrenoceptors in rat skeletal muscles. **Biochemical Pharmacology**, 42: 1783-89. 1991.
- KIMURA, K.; MIYAMOTO, A.; OHSHIKA, H. Down-regulation of β -adrenoceptors and loss of G α subunit levels in ventricular myocardium of rats treated with isoproterenol. **Life Sciences**, 53: PL171-76. 1993.
- KLIP, A.; TSAKIRIDIS, T.; MARETTE, A.; ORTIZ, P. A. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies *in vivo* and *in cell cultures*. **FASEB J**, 8: 43-53. 1994.

- LOWRY, O. H.; ROSEMBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193: 265-75. 1951.
- MIGLIORINI, R. H.; GAROFALO, M. A.; KETTELHUT, I. C. Increase sympathetic activity in rat white adipose tissue during prolonged fasting. **Am J Physiol**, 272: R656-61. 1997.
- MILAGRO, F. I.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; FORGA, L.; MARTÍNEZ, J. A. A β_3 -adrenergic agonist increases muscle GLUT1/GLUT4 ratio, and regulates liver glucose utilization in diabetic rats. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, 1, 97-104. 1999.
- NEEL, J. V. Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? **Am J Hum Genet**, 14: 353-62. 1962.
- NEUFER, P. D.; CAREY, J. O.; DOHM, G. L. Transcriptional regulation of the gene for glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle. **J Biol Chem**, 268: 13824-29. 1993.
- NONOGAKI, K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. **Diabetologia**, 43: 533-49. 2000.
- NOVARINI, A.; BORGHI, L.; CURTI, A.; ELIA, F.; MONTANARI, M.; RONCORONI, L.; VIOLI, V.; BORGHETTI, A.; PERACCHIA, A. Extracellular water, electrolyte and nitrogen balance after postoperative parenteral nutrition and intracellular involvement in muscle. **Acta Chir Scand**, 149: 651-56. 1983.
- OKUMURA, N.; HASHIDA-OKUMURA, A.; KITA, K.; MATSUBAE, M.; MATSUBARA, T.; TAKAO, T.; NAGAI, K. Proteomic analysis of slow- and fast-twitch skeletal muscles. **Proteomics**, 5: 2896-06. 2005.
- PÉGORIER, J-P.; MAY, C. L.; GIRARD, J. Control of gene expression by fatty acids. **J Nutricion**, 134: 2444S-49S. 2004.

- PENICAUD, L.; KANDE, J. L. E.; MAGNEN, J.; GIRARD, J. R. Insulin action during fasting and refeeding in rat determined by euglycemic clamp. **Am J Physiol Endocrinol Met**, 249: E514-18. 1985.
- RATTIGAN, S.; APPLEBY, G. J.; EDWARDS, S. J.; MCKINSTRY, W. J.; COLQUHOUN, E. Q.; CLARK, M. G.; RICHTER, E. A. Alpha-adrenergic receptors in rat skeletal muscle. **Biochem Biophys Res Commun**, 136: 1071-7. 1986.
- SERAPHIM, P. M. A resistência à insulina reduz a expressão do gene do GLUT4 na presença e na ausência de obesidade. Dissertação (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2001.
- SHEPHERD, P. R.; KAHN, B. B. Glucose transporters and insulin action: Implications for insulin resistance and Diabetes Mellitus. **N Engl J Med**, 341: 248-57. 1999.
- SKEBERDIS, V. A. Structure and function of β_3 – adrenergic receptors. **Medicina (Kaunas)**, 40: 407-13. 2004.
- STANNARD, S. R.; JOHNSON, N. A. Insulin resistance and elevated triglyceride in muscle: more important for survival than “thrifty” genes? **J Physiol**, 554: 595-607. 2003.
- STRALFORS, P.; BJORGELL, P.; BELFRAGE, P. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: Identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. **Proc Natl Acad Sci USA**, 81: 3317-21. 1984.
- TAN, L-B.; BURNISTON, J. G.; CLARK, W. A.; NG, Y, L.; GLODSPINK, D. F. Characterization of adrenoceptor involvement in skeletal and cardiac myotoxicity

Induced by sympathomimetic agents: toward a new bioassay for beta-blockers.

Cardiovasc Pharmacol, 41: 518-25. 2003.

- TIMMONS, T. M.; DUNBAR, B. Protein blotting and immunodetection. **Methods Enzymol**, 182: 679-88. 1990.
- THORENS, B.; CHARRON, M. J.; LODISH, H. F. Molecular physiology of glucose transporter. **Diabetes Care**, 13: 209-18. 1990.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some implications. **Proc Natl Acad Sci USA**, 76: 4350-4. 1979.
- YANG, Y. T.; McELLIGOTT, M. A. Multiple actions of β -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. **Biochem J**, 261: 1-10. 1989.
- YOUNG, J. B.; LANDSBERG, L. Suppression of sympathetic nervous system during fasting. **Science**, 196: 1473-75. 1977.
- YOUNG, J. B.; LANDSBERG, L. Effect of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in pancreas and liver. **Am J Physiol**, 236: E524-33. 1979.
- YOUNG, J. B.; SAVILLE, E.; ROTHWELL, N. J.; STOCK, J.; LANDSBERG, L. Effect of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in brown adipose tissue in the rat. **J Clin Invest**, 69: 1061-71. 1982.
- YOUNG, J. B. Developmental plasticity in sympathetic nervous system response to fasting in adipose tissue of male rats. **Metabolism**, 52: 1621-26. 2003.
- WANG, Z.; DAY, N.; TRIFILLIS, P.; KILEDJIAN, M. An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro. **Mol Cell Biol**, 19: 4552-60. 1999.

- WATRAS, J. Músculo, pág 244 – In: Fisiologia, 5ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier. 2004.
- WATSON-WRIGHT, W. M.; WILKINSON, M. The muscle slice--a new preparation for the characterization of beta-adrenergic binding in fast- and slow-twitch skeletal muscle. **Muscle Nerve**, 9: 416-22. 1986.
- WILLIAMS, R. S.; CARON, M. G.; DANIEL, K. Skeletal muscle beta-adrenergic receptors: variations due to fiber type and training. **Am J Physiol**, 246: E160-7. 1984.
- WILLIS Jr, W.D. O Sistema Nervoso, pág 220 - In: Fisiologia, 5ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier. 2004.
- WINDISCH, A.; GUNDERSEN, K.; SZABOLCS, M. J.; GRUBER, H.; LOMO, T. Fast to slow transformation of denervated and electrically stimulated rat muscle. **J Physiol**, 510: 623-32. 1998.
- WOLOSCHAK, M.; SHEN-ORR, Z.; LEROITH, D.; ROBERTS, C. T. Jr. Nutritional regulation of insulin-sensitive glucose transporter gene expression in rat cardiac muscle. **Proc Soc Exp Biol Med**, 203: 172-4. 1993.
- WOOD, S.; TRAYHURN, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **British J Nutrition**, 89: 3-9. 2003.
- WRIGHT, E. M. Renal Na⁺-glucose cotransporters. **Am J of Physiology**, 280: F10-18. 2001.
- ZANQUETTA, M. M.; NASCIMENTO, M. E.; MORI, R. C.; D'AGORD SCHAAN, B.; YOUNG M. E.; MACHADO, U. F. Participation of beta-adrenergic activity in modulation of GLUT4 expression during fasting and refeeding in rats. **Metabolism**, 55: 1538-45. 2006.