UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Bruno Gonzaga Teodoro

Função da Acil-CoA Sintetase 6 no metabolismo de músculo esquelético de ratos e humanos

Ribeirão Preto – SP 2016

Bruno Gonzaga Teodoro

Função da Acil-CoA Sintetase 6 no metabolismo de músculo esquelético de ratos e humanos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, ênfase em Bioquímica. **Orientadora: Profa. Dra. Luciane Carla Alberici**

"Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)"

Ribeirão Preto – SP 2016 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Teodoro, Bruno Gonzaga Função da Acil-CoA Sintetase 6 no metabolismo de músculo esquelético de ratos e humanos. Ribeirão Preto, 2016. 87 p.: il.; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica. Orientadora: Alberici, Luciane Carla

1. Músculo esquelético. 2. Mitocôndria. 3. Acil-CoA Sintetase. 4. Metabolismo Lipídico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Bruno Gonzaga Teodoro

Título: Função da Acil-CoA Sintetase 6 no metabolismo de músculo esquelético de ratos e humanos.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências, ênfase em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Carla Alberici

Aprovado em _____ de _____ de 20_____

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a)		
Instituição:	Assinatura:	
Prof.(a) Dr.(a)		
Instituição:	Assinatura:	
Prof.(a) Dr.(a)		
Instituição:	Assinatura:	
Prof.(a) Dr.(a)		
Instituição:	Assinatura:	
Prof.(a) Dr.(a)		
Instituição:	Assinatura:	

Dedico a todos que lutam pela ciência no Brasil

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus e toda a espiritualidade por dar-me a oportunidade desta reencarnação, onde posso passar por todos obstáculos sabendo que eles me dão a oportunidade de aprimoramento moral. Só assim foi possível a realização deste almejado sonho.

Agradeço imensamente ao amor da minha vida Milane, minha esposa maravilhosa, que me dá toda base possível e imaginável em afeto, carinho, luz, paz e apoio para que este doutorado fosse realizado. Além disso, nos deu o nosso maior tesouro, nossa amada filha Eloá, fruto do nosso amor que nos ensinou o que é amor de pai e de mãe. Meu amor, muito obrigado por me fazer viver a plenitude do amor.

Agradeço a minha família que é minha base moral e que sempre me apoiou em todas as decisões que tomei. Agradecimento muito especial à minha mãe Jussânia, meu pai Leôncio, meus irmãos Felipe, Diego e Daiane. Agradeço também a família da Milane, que é também minha família, por toda atenção, carinho e respeito que todos nos tratam, um especial abraço para minha sogra Neide, meu sogro Wilson e meus Cunhados Willian e Mariana.

Agradeço ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo, pela liberação parcial nos 3 primeiros anos de doutorado e pela liberação total neste último ano. Sem estas liberações seria impossível ter realizado este doutorado. Um agradecimento especial ao Diretor Geral do Campus, Lacyr João Sverzut por sempre nos apoiar no que diz respeito à qualificação acadêmica e profissional. Um agradecimento aos todos que foram meus alunos, pois um jovem estudioso nos inspira e nos faz acreditar num futuro com Brasil mais justo, igual e desenvolvido.

Agradeço ao professor Dr. Leonardo dos Reis Silveira, por abrir as portas de seu laboratório e da USP para mim, pela confiança depositada, por ensinar a trabalhar duro

para que se tenha pesquisas de qualidade superior, mas principalmente, por me apresentar e me indicar para minha querida orientadora, professora Dra. Luciane Carla Alberici. Um agradecimento especial à Tatiane Ramos, que sempre esteve disposta a nos ajudar no que fosse necessário.

Um agradecimento mais do que especial para minha amada orientadora, Lu, com a qual pude aprender as bases de como fazer ciência com ética, qualidade e inovação. Lu, gostaria de agradecer pelo seu brilhantismo na ciência, que faz toda a diferença na vida de quem está sendo orientado por você. Muito obrigado a nos ensinar a trabalhar em grupo, com respeito, educação. Muito obrigado pela oportunidade em trabalhar com você e pela confiança que sempre depositou em mim.

Gostaria de agradecer a todas as amizades que a USP me proporcionou. "A amizade, nem mesmo a força do tempo irá destruir". Agradecimento aos grandes amigos, Igor Hayaxibara Sampaio, Felipe Dalalio, Lucas Bomfim, Flávia Baraldi, Camila Pederiva, Anderson Souza, Amanda Martins, André Lima Queiroz, Amanda Ouchida, Carlos Couto, Jonathas R dos Santos, Michel Araújo, Tanes Lima, Felippe Zuccoloto, Madla Adami dos Passos, Thaís Amaral Souza, Carlos Dechandt, Tatiane Vicentine e Giulia.

Aos técnicos de laboratório da Bioquímica da FCFRP, que sempre foram muito prestativos e me ajudaram em todas as vezes que necessitei. Um agradecimento à Cris, Aninha, Lu Ceribeli, a Luciana Ângulo e em especial ao Alcides, Ieda e Nana, que além de me ajudarem muito, ainda me deram o imenso prazer da amizade.

À FAPESP pelo financiamento da pesquisa e à CAPES que por meio do processo 99999.008343/2014-04, me deu a oportunidade de realizar um sonho de estudar e continuar as pesquisas na East Carolina Univesity, na Carolina do Norte, nos Estados Unidos. Um agradecimento a todos os professores e colegas do *East Carolina Diabetes and Obesity Institute*, ao professor Darrel P Neufer, por me aceitar em seu laboratório e por toda sua cordialidade em nos receber no seu país, ao professor RN Cortrigth por viabilizar a realização dos experimentos em seu laboratório e por todos ensinamentos fundamentais para a mudança da minha visão de ciência. Aos amigos especiais e orientais Tai-Yu Huang e Lin-Chen pela recepção e carinho e amizade que tornou nossa estada nos Estados Unidos mais afetiva e agradável.

Índice de Figuras

Figura 1: Via do ácido fosfatídico-diacilglicerol e monoacilglicerol- diacilglicerol
(Adaptado de Chen e Farese, 2005.)
Figura 2: Funções das ACSL. (Adaptado de Grevengoed et al., 2014)
Figura 3: Representação do modelo quimiosmótico (NELSON e COX, 2012)
Figura 4: Produção de calor pela proteína desacopladora (UCP)
Figura 5: Mecanismo de desacoplamento pelas UCPs (Krauss et al., 2006)
Figura 6: Transporte de AGs para mitocôndria (Nelson e Cox, 2012)
Figura 7: Etapas da oxidação mitocondrial de AGs (Nelson e Cox, 2012) 30
Figura 8: Mapa do plasmídeo pLX304
Figura 9: Gel de agarose do plasmídeo após expansão e purificação com MidPrep
(Qiagen®)
Figura 10: Figura representativa da cultura primária de músculo de ratos
Figura 11: Mecanismo de silenciamento gênico por siRNA 43
Figura 12: Experimento típico realizado em células musculares de ratos retirado do
software DatLab [®] do equipamento Oroborus [®]
Figura 13: Curvas de <i>melting</i> dos primers utilizados no estudo
Figura 14: Expressão relativa de mRNA de ACSL6, DGAT1 e SREBP-1c em tecido de
músculo esquelético de ratos (gastrocnêmios) após 48h de jejum
Figura 15: Expressão do mRNA da ACSL6 1c em tecido de músculo esquelético de ratos
(gastrocnêmios) submetidos à 6 semanas de treinamento aeróbio
Figura 16: Curva temporal da expressão do mRNA da ACSL6 em tecido de músculo
esquelético de ratos (gastrocnêmios) após a ingestão aguda de refeição hiperlipídica
(HFM)

Figura 17: Curva temporal da expressão gênica do SREBP-1c em tecido de músculo
esquelético de ratos (gastrocnêmios) após a ingestão aguda de refeição hiperlipídica
(HFM)
Figura 18: Curva temporal da expressão gênica do DGAT1 em tecido de músculo
esquelético de ratos (gastrocnêmios) após a ingestão aguda de refeição hiperlipídica
(HFM)
Figura 19: Expressão relativa de mRNA da ACSL6 em tecido de músculo esquelético de
ratos (gastrocnêmios) após a ingestão crônica de dieta hiperlipídica (HFD)53
Figura 20: Expressão relativa de mRNA da ACSL6 no tecido de músculo esquelético
(quadríceps) de voluntárias humanas magras e obesas antes e após a ingestão aguda de
refeição hiperlipídica (HFM) 54
Figura 21: Expressão relativa de mRNA da ACSL6 no tecido de músculo esquelético
(quadríceps) de voluntárias humanas magras antes e após 7 dias de dieta hiperlipídica
(HFD) em humanos magros
Figura 22: Curva de concentração da inibição gênica da ACSL6 por siRNA em cultura
de células de músculo esquelético de rato55
Figura 23: Viabilidade de células de músculo esquelético de rato após transfecção de
scramble ou siRNA e controle positivo de morte celular (incubação das células com 10%
de DMSO por 2h)
Figura 24: Acúmulo do marcador fluorescente Bodipy em cultura de células de músculo
esquelético de rato transfectadas com scramble ou siRNA para a ACSL6 57
Figura 25: Densidade das gotas lipídicas em cultura de células de músculo esquelético
de rato transfectadas com scramble ou siRNA ACSL6

Figura 26: Quantificação relativa de diacilglicerol (DAG), fosfatidilcolinas (PC) e Triacilgliceróis (TAGs) em cultura de células de músculo esquelético de rato, transfectadas com scramble ou siRNA para ACSL6, por espectrometria de massas..... 58 Figura 27: Quantificação relativa de ácidos graxos livres em cultura de células de músculo esquelético de rato transfectadas com scramble ou siRNA ACSL6 por Figura 28: Expressão gênica de DGAT1, DGAT2 e SREBP-1c em cultura de células de Figura 29: Traçado representativo do experimento de consumo de O₂ por células de músculo esquelético de rato transfectadas com scramble ou siRNA da ACSL6, realizado Figura 30: Taxas do consumo de O₂ em células de músculo esquelético de rato Figura 31: Atividade Enzimática de Citrato Sintase em células de músculo esquelético Figura 32: Expressão proteica de pAMPK e AMPK em extrato de lisado de células de Figura 33: Expressão relativa de mRNA de genes oxidativos e de metabolismo de AGs em células de músculo esquelético de rato transfectadas com scramble ou siRNA para Figura 34: Taxa de produção de H₂O₂ em células de músculo esquelético de rato Figura 35: Oxidação de palmitato marcado radioativamente em células de músculo

Figura 36: Produção de lactato em células de músculo esquelético de rato, transfectadas
com scramble ou siRNA ACSL6 e incubadas com CCCP (100nM por 2h) ou com
rotenona (1µM por 2h) 66
Figura 37: Eficiência de transfecção de ACSL6 em células de músculo esquelético
humano transfectadas com GFP e ACSL6 ou vetor vazio
Figura 38: Expressão relativa de mRNA da ACSL6 em células de músculo esquelético
humano transfectadas com vetor vazio ou plasmídeo de ACSL6
Figura 39: Expressão proteica da ACSL6 em células de músculo esquelético humano
transfectadas com vetor vazio ou plasmídeo ACSL668
Figura 40: Análise do acúmulo do marcador fluorescente Bodipy em em células de
músculo esquelético humano transfectadas com vetor vazio ou plasmídeo ACSL6 69
Figura 41: Espectro representativo das análises das espécies lipídicas em células de
músculo esquelético humano transfectadas com vetor vazio ou plasmídeo ACSL6 70
Figura 42: Expressão proteica da DGAT1 em lisado de células de músculo esquelético
humano transfectadas com vetor vazio ou plasmídeo ACSL671
Figura 43: Oxidação de palmitato em células de músculo esquelético humano
transfectadas com vetor vazio ou plasmídeo ACSL671
Figura 44: Expressão relativa de mRNA de PGC1a em células de músculo esquelético
humano transfectadas com vetor vazio ou plasmídeo de ACSL6
Figura 45 – Mecanismos propostos para a ação da ACSL6 em músculo esquelético 78

Índice de Tabelas

Tabela 1: Desenho dos primers utilizados	no estudo 4	6
------------------------------------------	-------------	---

SUMÁRIO

RESU	IMO	10
ABST	RACT	12
LISTA	A DE ABREVIATURAS	14
INTR	ODUÇÃO	16
1.	Metabolismo dos lipídeos no músculo esquelético	16
2.	Acil-CoA Sintetases na distribuição metabólica de Acil-CoA	18
3.	Bioenergética Mitocondrial	21
JUST	IFICATIVA	32
OBJE	TIVO	33
1.	Geral	33
2.	Específicos	33
MATI	ERIAIS E MÉTODOS	35
1.	Delineamento do Estudo com Humanos e Aprovação Ética	35
2.	Cultura de células de músculo esquelético de humanos	36
3. hum	Transfecção dos plasmídeos de ACSL6, GFP e Vetor Vazio em células de músculo esquelético ano	o 37
4.	Delineamento do Estudo com animais e Aprovação Ética	40
5.	Cultura primária de células de músculo esquelético de ratos	40
6.	Silenciamento da ACSL6 em células de rato	42
7.	Ensaio de viabilidade nas células de ratos	43
8.	Consumo de Oxigênio nas células de ratos	44
9.	Produção de H ₂ O ₂ nas células de ratos	44
10.	Produção de lactato nas células de ratos	45
11.	Análise da expressão gênica em células de ratos e humanos por qRT-PCR	45
12.	Extração de lipídeos e análise por espectrometria de massas em células de humanos e ratos	47
13.	Avaliação das gotas lipídicas em células de humanos e ratos	47
14.	Oxidação de AG em células musculares de humanos e ratos	48
15.	Análise da expressão de proteínas por Western Blotting	48
16.	Medida da atividade da Citrato Sintase em células musculares de ratos	49
17.	Análise estatística	49
RESU	ILTADOS	50
1. hum	Expressão de mRNA da ACSL6 em diferentes estados nutricionais e condições metabólicas er anos e ratos	n 50
2.	Efeitos do silenciamento gênico da ACSL6 em células primárias de rato	55
3. rato	Efeitos do silenciamento gênico da ACSL6 no metabolismo mitocondrial em células primárias 60	3 de
4.	Efeitos da Superexpressão de ACSL6 em células de Músculo Esquelético de Humanos	66
DISC	USSÃO	73

CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXO I – ARTIGOS PUBLICADOS	87

RESUMO

TEODORO, BG. Função da Acil-CoA Sintetase 6 no metabolismo de músculo esquelético de ratos e humanos. 132f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Cinco membros da família das Acil-CoA sintetases de cadeia longa (ACSL) são responsáveis por ativar ácidos graxos, produzindo acil-CoA, e distribuí-los entre diversas vias metabólicas no interior da célula, tais como a síntese de triacilglicerol (TAG) e βoxidação mitocondrial. Apesar das disfunções nas ACSLs contribuirem para muitas doenças metabólicasa função de algumas isoformas de ACSL em tecidos específicos permanece ainda sem descrição na literatura. Aqui mostramos pela primeira vez a presença de mRNA da ACSL6 no músculo esquelético de seres humanos. Além disso, indivíduos obesos apresentaram menores níveis de mRNA de ACSL6 quando comparados à indivíduos magros. Após refeição hiperlipídica aguda (high fat meal, HFM, 90% de gordura) a expressão ACSL6 aumentou 2,5 vezes em relação aos níveis de jejum. Nós também verificamos as condições metabólicas que controlam a expressão ACSL6 em ratos: o jejum de 48h modulou negativamente a expressão gênica de ACSL6 e de outros genes de síntese de lipídeos tais como SREBP-1c e DGAT1, enquanto que a ingestão aguda de HFM (80% de gordura saturada, 10 mL/kg) teve o efeito oposto; Após o treinamento aeróbio (6 semanas, 5 dias /semana, uma vez por dia, 60 min a 70% da capacidade aeróbica máxima) o mRNA da ACSL6 foi reduzido em 35%. Em células primárias de músculo esquelético de ratos, a transfecção com siRNA de ACSL6 diminuiu a expressão de ACSL6, DGAT1 e SREBP-1c e o acúmulo de TAGs e gotas lipídicas. O silenciamento gênico da ACSL6 também aumentou o conteúdo dos ácidos graxos C16:0 e C18:0, AMPK-fosforilada, capacidade respiratória mitocondrial, a oxidação de palmitato e mRNA de PGC-1a, UCP2 e UCP3, mas diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio. Em células primárias de músculo esquelético de seres humanos, a superexpressão da ACSL6 não alterou o conteúdo de TAG e da proteína DGAT1, mas aumentou as espécies lipídicas esfingomielina e fosfatidilcolinas, e reduziu a oxidação de 1-¹⁴C-palmitato e a expressão do PGC1α. Em conclusão, ACSL6 está envolvida na síntese e distribuição de acil-CoA para a síntese de lipídeos. A inibição gênica da ACSL6 melhora a capacidade de respiração mitocondrial e oxidação lipídica, através da ativação da via AMPK/PGC1α.

Palavras-Chave: Músculo esquelético; Mitocôndria; Acil-CoA Sintetase; Metabolismo Lipídico.

ABSTRACT

TEODORO, BG. Function of Acyl-CoA Synthetase 6 in human and rats skeletal muscle metabolism. 132f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Five members of long-chain acyl-CoA synthetase (ACSL) family activate fatty acids providing acyl-CoA for several metabolic pathways within the cell, such as synthesis of triacylglycerol (TAG) and mitochondrial β -oxidation, and their dysfunctions contribute to many metabolic diseases. Despite this, the existence and function of some ACSL isoforms in specific tissues remains unclear. Here we show for the first time the presence of ACSL6 mRNA and protein in skeletal muscle (SM) of humans. Obese subjects had lower levels of ACSL6 mRNA when compared to leans, and acute high fat meal (HFM, 90% fat) increased ACSL6 expression 2.5 times over fasted levels in both. We also verify the metabolic conditions that control ACSL6 expression in rats: fasting (48h) negatively modulated the ACSL6 mRNA and the expression of other genes of lipid synthesis SREBP-1c and DGAT1 in rat SM, while acute ingestion of HFM (80% saturated fat, 10 mL/Kg) had the opposite effect; After aerobic training (6 weeks, 5 days/week, once a day, 60 min at 70% of maximal aerobic capacity) ACSL6 mRNA was reduced 35%. In primary skeletal muscle cells (PSMC) of rats, ACSL6-specific siRNA oligo transfection (20 nM) decreased ACSL6, DGAT1 and SREBP-1c mRNA and the accumulation of TAGs and lipid droplets (LD). The knockdown also increased the content of C16:0 and C18:0 fatty acids, AMPK-Phosphorylated, mitochondrial content and respiratory rates, palmitate oxidation and PGC-1a, UCP2 and UCP3 mRNA, but decreased reactive oxygen species production. In PSMC of humans, ACSL6 overexpression did not change the contents of TAG or DGAT1 mRNA, but increased sphingomyelin and phosphatidylcholines and reduced ^{14C}-palmitate oxidation and PGC1a mRNA expression. In conclusion, ACSL6 drives acyl-CoA toward lipid synthesis and its

downregulation improves mitochondrial capacity of respiration, lipid oxidation and biogenesis, which involves the activation of AMPK/PGC1-α pathway.

Key Words: Skeletal Muscle; Mitochondria; Acyl-CoA Synthetase; Lipid Metabolism.

LISTA DE ABREVIATURAS

18s: RNA ribossômico 18s **ACS:** Acil-CoA sintetase **ACSBg:** Acil-CoA sintetase *Bubblegum Family* ACSL: Acil-CoA sintetase da família de cadeia longa (Long-Chain Family) ACSVL: Acil-CoA sintetase da família de cadeia muito longa (Very Long-Chain Family) **ADP:** Adenosina difosfato AG: Ácido Graxo AG-CoA: Ácido graxo ligado à CoA. AGL: Ácido graxo livre AMP: Adenosina monofosfato AMPK: proteína kinase ativada por AMP ATGL: lipase de triacilglicerol do adipócito (Adipose triglyceride lipase) **ATP:** Adenosina trifosfato **BSA:** Albumina do soro bovino CCCP: Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone CoA: Coenzima A **DAG:** Diacilglicerol **DEXA:** Raio X de dupla absorbância (*Dual-energy X-ray absorptiometry*) **DGAT1:** Diacilglicerol Aciltrasnferase 1 (*Diglyceride acyltransferase 1*) **DGAT2:** Diacilglicerol Aciltrasnferase 2 (*Diglyceride acyltransferase 2*) **DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's medium **DNA:** Ácido Desoxirribonucleico **DNAase:** desoxirribonuclease **DNP:** 2.4-Dinitrofenol **ECL:** Eletroquimioluminescência EROs: Espécies reativas de oxigênio FADH2: flavina-adenina dinucleótido (reduzida) FABP: : proteína de ligadora de ácidos graxos **FBS:** soro fetal bovino (*fetal bovine serum*) GFP: Proteína Fluorescente Verde HEPES: N- N-(2-hidroxietil) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico) **HFD:** Dieta hiperlipídica (*High Fat Diet*) HFM: Refeição hiperlipídica (High fat meal) **HRP:** horseradish peroxidase HSL: lipase hormônio sensível **IMCL:** lipídeos intramiocelulares M/Z: razão massa por carga MAG: monoacilglicerol mRNA: ácido ribonucleico mensageiro MUFA: ácido graxo monoinsaturado NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada) NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada) **PBS:** tampão fosfato-salina PGC1a: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha pH: potencial hidrogeniônico PI: Iodeto de Propídeo PUFA: ácidos graxos poliinsaturados **qRT-PCR:** quantitative real-time polymerase chain reaction

RPL39: 60S ribosomal protein L39
SAT: Ácido graxo saturado
SDS-PAGE: gel de eletroforese de poliacrilamida com Dodecil sulfato de sódio
siRNA: small interfering RNA
SREBP-1c: Sterol regulatory element-binding protein 1c
TAG: triacilglicerol
TAM: tecido adiposo marrom
TBST: tampão tris-salina com tween 20
UCP: proteína desacopladora
VO2: volume de oxigênio consumido
β-HAD: β-Hydroxy acyl-CoA dehydrogenase

INTRODUÇÃO

1. Metabolismo dos lipídeos no músculo esquelético

O músculo esquelético é um tecido que está constantemente sendo submetido a diferentes demandas mecânicas e energéticas, especialmente durante a atividade física. Isto requer um alto nível de plasticidade do tecido e uma alta oferta de substratos energéticos para a produção de ATP (Bosma et al., 2015). Ao longo do processo evolutivo, os lipídeos tornaram-se essenciais para manutenção energética da homeostase da célula de músculo esquelético, por dois motivos essenciais: o primeiro é pelo fato de oferecerem alta densidade energética e massa relativamente pequena; o segundo motivo é que o músculo utilizando lipídeos como fonte energética poupa glicose, o qual é o substrato essencial para o sistema nervoso central. Este fato é explicado pelo ciclo glicose-ácido graxo, proposto por Randle e colaboradores (1963), o qual demonstra a preferência de utilização de ácidos graxos (AG) em relação à glicose como fonte energética no músculo esquelético em estado de repouso.

Os AG transportados até a fibra muscular são primeiramente ativados pela sua esterificação à CoA, formando acil-CoA, numa reação dependente de ATP, catalizada pelas Acil-CoA Sintetases (ACS), enzimas que se localizam na membrana plasmática, retículo sarcoplasmático, mitocôndrias e gotas lipídicas (Cooper et al., 2015).

Subsequentemente, os acil-CoA são destinados à oxidação mitocondrial ou enviados às vias de síntese de lipídeos dependendo das condições nutricionais e energéticas da célula. Após elevada ingestão alimentar, por exemplo, os triacilgliceróis (TAG) são sintetizados pela via monoaciliglicerol- diacilglicerol (MAG-DAG) (Han et al., 2013) no músculo, onde o acil-CoA é incorporado ao monoacilglicerol para a formação de DAG, o qual sofre incorporação de outro acil-CoA para subsequente formação de TAG, em contraste ao fígado, onde a síntese *de novo* das espécies de TAG através da via do ácido

fosfatídico-DAG é predominante (Han et al., 2013). As enzimas envolvidas na via MAG-DAG-TAG são a monoacilglicerol aciltransferase (MGAT) e DAG-aciltransferase (DGAT), que são as principais enzimas envolvidas no acoplamento do segundo e terceiro acil-CoA ao esqueleto de glicerol, respectivamente (Wendel et al., 2009). Este processo está descrito de maneira resumida na Figura 01.



Figura 1: Via do ácido fosfatídico-diacilglicerol e monoacilglicerol- diacilglicerol (Adaptado de Chen e Farese, 2005.). ACSL \rightarrow Acil-CoA Sintetase de cadeia longa, GPAT \rightarrow Glicerol-3-fosfato O-aciltransferase, AGAPT \rightarrow Acil-glicerol-fosfato-acil transferase, PPH-1 \rightarrow Fosfatidato Fosfatase 1, MGAT \rightarrow monoacilglicerol acil-trasnferase, DGAT \rightarrow diacilglicerol-acil-trasnferase.

TAG, colesterol e DAG, nesta ordem de abundância, são armazenados na célula muscular em forma de gotas lipídicas, compondo uma reserva particular de lipídeos, chamados de lipídeos intramiocelulares (IMCL), que por já estarem presentes no tecido são mobilizados mais rapidamente. O tamanho da gota lipídica no músculo esquelético saudável varia entre 0,3 μ m e 1,5 μ m (He et al., 2004), sendo bem menor do que em adipócitos, os quais possuem um tamanho 100 vezes maior (Suzuki et al., 2011). Além disso, os IMCL são altamente moduláveis de acordo com o estado nutricional. Por exemplo, no jejum ocorre redução no número e tamanho dos IMCL, ao passo que em apenas 3 dias de dieta hiperlipídica, aumento no número e tamanho dos IMCL pode ser observado (Bachmann et al., 2001; Sakurai et al., 2011). Visto que em pessoas sedentárias altos níveis de IMCL podem estar a associados à doenças metabólicas tais como resistência à insulina e obesidade (Bosma et al., 2015), o estudo do metabolismo de síntese e degradação de lipídeos no músculo esquelético são de extrema importância para detecção da etiologia de doenças metabólicas.

Por outro lado, caso o tecido muscular esteja em uma situação de necessidade energética, tais como exercício físico e jejum, os AG provenientes da corrente sanguínea podem ser esterificados a CoA e enviados diretamente a oxidação mitocondrial ou primeiro se integrar ao *pool* de IMCL para serem posteriormente hidrolisados e enviados à mitocôndria (Kanaley et al., 2009). Para que a hidrólise ocorra são necessárias as ações das Lipases de Triglicerídeo (ATGL) e hormônio sensível (HSL). Após a hidrólise a maioria dos AG são encaminhados para oxidação mitocondrial.

2. Acil-CoA Sintetases na distribuição metabólica de Acil-CoA

Os AG de cadeia longa e muito longa derivados da dieta (exógeno), da síntese *de novo*, ou do *turnover* intracelular de TAG, fosfolipídeos e ésteres colesterol (endógenos) possuem variados destinos metabólicos dentro da célula, os quais incluem a entrada em vias de oxidação, a incorporação ou reincorporação em complexos lipídicos, a esterificação à proteínas e a síntese de eicosanóides. Esses AG também podem ativar fatores de transcrição, participar da sinalização intracelular, e modular alostericamente reações enzimáticas (Figura 2) (Grevengoed et al., 2014). Exceto à sinalização e a formação de eicosanóides, o destino metabólico desses AG requer primeiramente a formação de uma acil-coenzima A (CoA), como explicado anteriormente, por uma das 13 acil-CoA sintetases (ACS) que usam AG de cadeia longa (16-22 carbonos) e de cadeia muito longa (> 22 carbonos). As 13 isoformas das ACS são subdividas em três subfamílias: a de cadeia longa (ACSL), de cadeia muito longa (ACSVL)/ proteína de transporte de AG (FATP), e ACS bubblegum (ACSBg)] perfazendo um total de 26 membros da família ACS, cujos membros contêm nucleotídeos associados (AMP / ATP) e motivos estruturais vinculados à AG (Watikins et al., 2007). A nomenclatura dos genes que codificam as ACSL foi unificada em 2004, e vai de ACSL1 à ACSL6, sendo que não existe ACSL2 (Mashek et al., 2004).



Figura 2: Funções das ACSL. (Adaptado de Grevengoed et al., 2014). Após a entrada para a célula, os AG podem atuar na regulação trasnericional e síntese de algumas

espécies lipídicas. Após sofrer ação das ACS, os produtos acil-CoA podem ser direcionados para síntese de lipídeos, acilação de proteínas, regulação transcricional, modificação de AG e oxidação mitocondrial e peoroxissomal.

A ativação das ACSL é uma reação de dois passos que requer energia, equivalente a duas ligações de alta energia (Watikins et al., 2007):

- (1) Ácido Graxo + ATP \rightarrow acil-AMP + PPi
- (2) Acil-AMP + CoASH \rightarrow acil-CoA + AMP

Em animais, os AG predominantes são os de cadeia longa, dentre os quais a maioria são compostos de 16 e 18 átomos de carbono com graus variáveis de saturação (Grevengoed et al., 2014). Sendo assim, a acilação de AG se dá em sua maioria pelas ACSL. As acil-CoA assim geradas podem seguir para várias vias metabólicas dentro da célula, incluindo a síntese de fosfolipídeos, DAG e TAG, acilação de proteínas, βoxidação mitocondrial, ou de ligação a fatores de transcrição. A partir do ano 2000, o grupo de pesquisa da professora R. Coleman, da Universidade da Carolina do Norte (Estados Unidos), tem se dedicado a demonstrar sua hipótese na qual, o destino do acil-CoA é dependente da isoforma da ACSL, sua localização sub-celular, e o tecido em que se encontra (Lewin et al, 2001;. Van Horn 2005; Kin 2001;. Coleman et al, 2002). Por exemplo, em ratos as isoformas da ACSL (1, 3, 4, 5 ou 6) têm diferentes níveis de expressão do mRNA com base no tipo de tecido (Mashek et. Al, 2006). A ACSL1 é altamente expressa em tecido adiposo, fígado e coração, enquanto ACSL3 é mais abundante no cérebro, músculo esquelético e testículos. O gene ACSL4 é altamente expresso no fígado, cérebro e na glândula supra-renal. Já a ACSL5 é mais expressa no fígado, mucosa duodenal e tecido adiposo marrom, enquanto ACSL6 é predominantemente expressa no cérebro e músculo esquelético. A função de cada isoforma ACSL podem também diferir entre os tecidos. Por exemplo, ACSL1 direciona o acil-CoA para a síntese de TAG no fígado (Li et al., 2009), mas no músculo esquelético (Li et al., 2015) e coração (Ellis et al., 2011), esses produtos de ACSL são distribuídos para β-oxidação mitocondrial.

A maior parte da informação sobre como as isoformas da ACSL funcionam no músculo esquelético vem de estudos com roedores; comparativamente, muito menos informação é conhecida em seres humanos. Em ratos, Mashek e colaboradores (2006) mostraram que 48 horas de jejum provocam um aumento dos níveis mRNA das ACSL1 e ACSL4, por outro lado modulou negativamente a expressão de ACSL6, enquanto realimentação destes animais promoveu o efeito oposto. Em contraste, a expressão de ACSL3 não foi modulada nutricionalmente e o mRNA da ACSL 5 não foi detectado. Recentemente, Li e colaboradores (Li et al., 2015) mostraram que camundongos knockout para o gene da ACSL1 em músculo esquelético foi associado à diminuição da oxidação de AG e concomitante maior dependência do metabolismo da glicose. No entanto, o papel da ACSL6 no músculo esquelético permanece desconhecido.

Membros da família ACSL afetam não só o metabolismo de AG como também desempenham um papel importante na proliferação de células normais e tumorais, e regulam a apoptose celular. Disfunção dessas enzimas conduz frequentemente a muitas doenças metabólicas, tais como as relacionadas com a síndrome metabólica, esteatose hepática não alcoólica, desordens neurológicas e outras doenças (para revisão, Yan et al., 2015). Esses achados demonstram a importância do estudo do papel de cada isoforma da ACSL em tecidos específicos.

3. Bioenergética Mitocondrial

As mitocôndrias são organelas presentes em quase todas as células eucarióticas e são responsáveis pela conversão de energia de óxido-redução para energia química (ATP), que será utilizada nas reações celulares que necessitam de energia. Neste processo de conversão de energia, denominado fosforilação oxidativa, uma série de complexos transportadores de elétrons e a enzima ATP sintase, localizada na membrana mitocondrial interna, são necessários (figura 03).

Na membrana mitocondrial interna, elétrons advindos das coenzimas reduzidas NADH e FADH₂ são transferidos à cadeia de transporte de elétrons, um conjunto de complexos de proteínas que contém centros redox com aumento progressivo de afinidade por elétrons (potencial de redução). A transferência de elétrons inicia-se com a oxidação de NADH e FADH₂ pela Coenzima Q (UQ), catalisadas respectivamente pelos complexos I (NADH desidrogenase) e II (Succinato desidogenase), gerando a forma reduzida da coenzima Q (UQH₂). Em alguns tecidos a Coenzima Q pode ser também reduzida pela glicerol-3-fosfato desidrogenase ou pela ubiquinona oxiredutase (resultado da β-oxidação de AGs). Oxidação da UQH₂ pelo citocromo C é então catalisada pelo complexo III (Ubiquinona-citocromo C Oxidoredutase). Finalmente, o complexo IV (citocromo oxidase) catalisa a oxidação do citocromo C reduzido, com redução de O₂ à H₂O (Voet et al., 1999).

Segundo MITCHELL (1961) a passagem desses elétrons através dos complexos da cadeia respiratória, organizados em ordem crescente de potencial redox, permite um fluxo de H⁺ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, contra o seu gradiente de concentração. Essa teoria foi chamada teoria quimiosmótica. O potencial eletroquímico formado pelo bombeamento de prótons é o responsável pelo acoplamento entre a oxidação de substratos energéticos e a utilização desta energia. A passagem dos prótons do espaço intermembranas de volta para a matriz, através da ATP sintase (Fig. 3), desta vez a favor do gradiente de concentração é responsável pela fosforilação do ADP em ATP.



Figura 3: Representação do modelo quimiosmótico (NELSON e COX, 2012).

A geração de um gradiente eletroquímico transmembrânico de prótons ($\delta\mu$ H⁺) é um elemento central no aproveitamento de energia nos sistemas biológicos. Ao longo da evolução este mecanismo foi fundamental, já que é aproveitado tanto na fosforilação oxidativa em mitocôndrias quanto na fotossíntese de ATP em cloroplastos. Além disso, este gradiente pode ser usado diretamente para processos endergônicos sem participação de ADP. São exemplos deste mecanismo de acoplamento direto, as trocas eletroforéticas de ATP⁴⁻ por ADP³⁻, a redução de NAD(P)⁺ pela transidrogenase específica e a captação eletroforética de Ca²⁺ que transporta duas cargas positivas para o interior da mitocôndria.

Alguns mecanismos são capazes de desviar o gradiente de H⁺ da síntese de ATP, e são chamados de mecanismos de desacoplamento. Ânions AG possuem essa habilidade quando protonados, pois atravessam facilmente as membranas mitocondriais, carregando um próton para a matriz por mecanismo de "flip-flop" (Walter e Gutknecht, 1984 e Andreyev et al., 1989). Devido à alcalinidade da matriz mitocondrial em relação ao espaço intermembranas, o AGL é desprotonado no interior da mitocôndria e, em sua forma de ânion, pode ser transportado de volta para o espaço intermembranas por dois processos eletroforéticos: a) pelo transportador de nucleotídeos de adenina (ATN), na ausências de seus substratos específicos (ADP e ATP) (Skulachev, 1991), ou b) por proteínas desacopladoras, as UCPs (Garlid et al., 1996). Esse transporte de AGL carregados negativamente para o espaço intermembranas é seguido pelo seu rápido retorno na forma protonada. Isto resulta em um ciclo fútil que provoca a transferência de um H⁺ para matriz mitocondrial para cada ciclo (Alberici, 2006).

As proteínas desacopladoras (UCPs) são transportadores mitocondriais localizados na membrana interna e parecem controlar o grau de acoplamento da fosforilação oxidativa (Rousset *et al.*, 2004). Além de passagem de prótons para a matriz mitocondrial através da ATP sintase, um vazamento de prótons por meio de canais alheios à ATP sintase, tais como as UCPs, representa mais um mecanismo de "consumir" o gradiente de prótons mitocondrial (Rousset *et al.*, 2004). A teoria de Mitchell previu que qualquer vazamento de prótons provocaria desacoplamento da respiração e perda dessa energia na forma de calor (termogênese) (Fig. 4). Dessa forma, a manutenção do gradiente de prótons mitocondrial para síntese de ATP leva a um aumento no consumo de substratos energéticos e na respiração mitocondrial.

A UCP foi descoberta em estudos em mitocôndrias de tecido adiposo marrom, onde é responsável pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa para geração de calor (Nicholls et al., 1976). Como foi a primeira a ser identificada deu-se a denominação de UCP1. O tecido adiposo marrom (TAM) é um tecido adiposo com características peculiares presente em animais que hibernam, pequenos mamíferos, recém-nascidos e roedores expostos ao frio, sendo sua principal função a produção de calor para manutenção da temperatura corporal (Nicholls e Locke, 1984). Estudos realizados em mitocôndrias de TAM revelaram que estas possuem uma alta taxa respiratória e que essa respiração não estava acoplada à síntese de ATP, indicando um processo termogênico. Aparentemente ácidos graxos gerados por uma estimulação da lipólise estavam ativando diretamente algum caminho para a passagem de prótons não acoplada à fosforilação do ADP. A presença da proteína UCP1 explicou essa passagem alternativa de prótons de volta à matriz mitocondrial (Nicholls e Locke, 1984).

Depois da descoberta da UCP1, foram descobertas outras homólogas desta proteína chamadas UCP2 e UCP3. Enquanto a UCP1 é encontrada principalmente no tecido adiposo marrom, a UCP2 pode ser encontrada em diversos órgãos e a UCP3 é predominantemente encontrada no músculo esquelético. A distribuição dessas proteínas por órgãos que não tem função termogênica sugeriu que elas desempenhassem outros papéis além da produção de calor (Rousset *et al.*, 2004). Por exemplo, a UCP2 é conhecida por controlar a secreção de insulina em células β pancreáticas (Fleury *et al.*, 1997), sendo negativamente correlacionada com a secreção de insulina, e desempenha um importante papel em processos arterioscleróticos, prevenindo a formação de placas e inflamação das artérias (Blanc *et al.*, 2003; Rousset *et al.*, 2004).

De acordo com a literatura, as UCPs são conhecidas por promover um decréscimo na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), atuando como um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo (Vidal-Puig *et al.*, 2000),



Figura 4: Produção de calor pela proteína desacopladora (UCP). Como o desacoplamento mitocondrial acelera o metabolismo, as reações químicas acontecem de maneira mais rápida, porém não há conversão da energia eletroquímica em ATP, dessa maneira esta energia eletroquímica é convertida em calor, produzido pelo aumento da velocidade das reações químicas. Nesta figura este calor está representado apenas de forma simbólica em vermelho. Fonte: <u>http://mundodabioquimica.blogspot.com.br/2014/06/proteinas-desacopladoras.html</u>

Evidências de que AGLs seriam importantes em modulações metabólicas e mitocondriais surgiram quando à esses AGLs foi atribuída a capacidade de desacoplar a respiração da fosforilação oxidativa mitocondrial. Sabe-se que as UCPs catalisam o fluxo de prótons através da membrana mitocondrial, em direção à matriz, e que esse processo é obrigatoriamente dependente da presença de ácidos graxos (Garlid *et al.*, 2000).

Três mecanismos propõem explicar o processo pelo qual as UCPs dissipam o gradiente de prótons da membrana mitocondrial interna. Um deles é proposto por por Garlid *et al.* (1996) onde as UCPs catalisam um movimento de flip-flop (Fig. 5) da cabeça aniônica do AG (grupo carboxil desprotonado) da membrana interna para a membrana externa mitocondrial. No espaço intermembranas, o grupo carboxil dos ácidos graxos é rapidamente protonado, podendo assim permear facilmente a membrana, carregando um próton para a matriz mitocondrial (Andreyev Ayu *et al.*,

1989) pelo mecanismo de "flip-flop". Como a matriz mitocondrial é altamente alcalina em relação ao espaço intermembranas, esse próton é perdido no interior da mitocôndria e a forma aniônica do AG pode ser transportado de volta para o espaço intermembranas em resposta ao potencial positivo externo novamente por meio das UCPs. Novamente no espaço intermembranas esse ânion ácido graxo é protonado, resultando em um ciclo fútil que tem como saldo o transporte líquido de H⁺ para a matriz mitocondrial, dissipando o gradiente de prótons e promovendo o desacoplamento da fosforilação oxidativa.



Figura 5: Mecanismos de desacoplamento pelas UCPs (Krauss et al., 2006)

Winkler e Klingenberg propuseram o "modelo de tamponamento" no qual os ácidos graxos se ligam a regiões no interior do canal de prótons das UCPs, agindo como doadores/aceptores de prótons locais facilitando o transporte de H⁺ para a matriz. O último mecanismo é proposto por Skulachev, no qual as UCPs transportam ácidos graxos diretamente, fazendo com que os prótons sejam transportados por meio de difusão não iônica do ácido graxo protonado. Esse modelo é chamado modelo protonoforético.

Tanto o processo de produção de ATP quanto o de desacoplamento mitocondrial, exigem um aumento do transporte de elétrons e consumo de O₂ para manutenção do potencial eletroquímico de H⁺. Para isto ocorre necessariamente um aumento na oxidação de substratos energéticos para abastecimento do Ciclo do Ácido Cítrico e geração de coenzimas reduzidas NADH e FADH₂. Os principais substratos energéticos para a oxidação no músculo esquelético são a glicose e os AGs. Como aqui trataremos especificamente dos AGs, torna-se importante descrever como esse processo acontece.

Para serem oxidados os AGs necessitam de transporte para a mitocôndria. Os AGs com cadeia carbônica igual ou menor a 12 carbonos entram na mitocôndria sem ajuda de transportadores de membrana. Aqueles com 14 carbonos ou mais, que são a maioria dos AGs obtidos na dieta ou liberados pelo tecido adiposo, não conseguem passar diretamente através das membranas mitocôndrias e precisam passar pelas três reações enzimáticas do circuito da carnitina (Nelson e Cox, 2012). A primeira reação é catalizada pelas Acil-CoA sintetases (conforme descrito nas reações 01 e 02 apresentadas anteriormente). Após a formação do AG ativado, o mesmo se liga ao grupo hidroxil da carnitina, formando um acil graxo-carnitina – a segunda reação. Essa transesterificação é catalisada pela Carnitina-Acil-Transferase I na membrana externa, que o transporta para o espaço intermembranas. O éster de acil graxocarnitina então entra na matriz mitocondrial pela difusão facilitada por meio do transportador de acil-carnitina/carnitina da membrana mitocondrial interna. No terceiro e último passo do circuito da carnitina, o grupo acil graxo é enzimaticamente transferido da carnitina para a coenzima A intramitocondrial pela Carnitina-Acil-Transferase II, regenerando o acil graxo-CoA e liberando carnitina livre dentro da matriz. A carnitina retorna ao espaço intermembrana por meio do transportador acilcarnitina/carnitina (Nelson e Cox, 2012). Este processo está descrito de forma resumida na figura 06.



Figura 6: Transporte de AGs para mitocôndria (Nelson e Cox, 2012).

Após entrarem na mitocôndria, os AGs são oxidados em 3 etapas (Figura 07). Na primeira etapa, denominada β -oxidação, os AGs sofrem remoção oxidativa de sucessivas unidades de dois carbonos na forma de Acetil-CoA. A formação de cada Acetil-CoA, requer a remoção de quatro átomos de hidrogênio (2 pares de elétrons e 4 H⁺) da porção acil graxo pelas desidrogenases. Na segunda etapa, os grupos acetil da Acetil-CoA são oxidados à CO₂ no ciclo do ácido cítrico, que também ocorre na matriz da mitocôndria. As duas primeiras etapas da oxidação produzem as coenzimas reduzidas NADH e FADH₂, que na terceira etapa doam elétrons para cadeia respiratória mitocondrial, por meio da qual ocorre a fosforilação oxidativa (Nelson e Cox, 2012).



Figura 7: Etapas da oxidação mitocondrial de AGs (Nelson e Cox, 2012).

Tendo em vista estes três parâmetros (Metabolismo de lipídeo, Acil-CoA Sintetases e Bioenergética Mitocondrial), temos subsídios para entender como a formação de Acil-CoA pelas ACSLs interage com a síntese lipídeos e a oxidação mitocondrial dos AGs no músculo esquelético.

A apesar do acúmulo de lipídeos no músculo esquelético estar associado à incidência de patologias tais como resistência à insulina, ainda não se tem conhecimento acerca de qual isoforma da ACSL estaria associada com a síntese de lipídeos nesse órgão. Aqui, trabalhamos na hipótese de que a ACSL6 possa estar envolvida no direcionamento das acil-CoA para a síntese de lipídeos, já que ela é a única isoforma das ACSLs que diminui sua expressão gênica no músculo esquelético de ratos em jejum (Mashek et al., 2006). Assim utilizamos estabelecemos os estados de jejum, alimentado e exercício em
ratos e humanos a fim de verificar qual a resposta fisiológica da ACSL6 frente estes diferentes estados metabólicos. Além disso, para aprofundarmos o conhecimento acerca da nossa hipótese, utilizamos técnicas de silenciamento gênico e superexpressão da ACSL6 nas células de músculo esquelético de ratos e humanos e avaliamos os aspectos metabólicos e possíveis mecanismos moleculares envolvidos com ACSL6.

JUSTIFICATIVA

Membros da família ACSL controlam o metabolismo de AG e também desempenham um papel importante na proliferação de células normais e tumorais, e regulam a apoptose celular. A disfunção dessas enzimas conduz frequentemente a muitas doenças metabólicas, tais como as relacionadas à síndrome metabólica, esteatose hepática não alcoólica, desordens neurológicas e outras doenças (para revisão, Yan et al., 2015). Isto demonstra a importância do conhecimento da função de cada isoforma da ACSL em tecidos específicos. Especificamente no músculo esquelético de ratos e humanos, é desconhecida a função que a isoforma ACSL6 desempenha, bem como não é bem descrita a isoforma envolvida na síntese de lipídeos. Assim, o conhecimento da função da ACSL6 no músculo esquelético pode abrir um campo para o entendimento de doenças relacionadas ao metabolismo de lipídeos no músculo esquelético, tais como resistência à insulina, lipodistrofia e obesidade.

OBJETIVO

1. Geral

Avaliar a função metabólica da Acil-CoA Sintetase 6 (ACSL6) no músculo esquelético de ratos e humanos.

2. Específicos

- ✓ Em ratos,
 - In vivo, verificar a expressão gênica da ACSL6 no músculo esquelético em diferentes estados nutricionais e metabólicos (jejum, ingestão aguda ou crônica de dieta hiperlipídica e exercício físico);
 - Em células primárias de músculo esquelético de rato, submetidas ao silenciamento gênico para ACSL6, verificar:
 - os níveis de IMCL;
 - o consumo de O₂;
 - a densidade mitocondrial
 - a velocidade de oxidação de palmitato;
 - as vias de sinalização intracelular envolvidas.
- ✓ Em humanos,
 - In vivo, verificar a expressão gênica da ACSL6 em diferentes estados nutricionais e metabólicos (jejum e ingestão aguda ou crônica de dieta hiperlipídica) no músculo esquelético de humanos;
 - Em células primárias de músculo esquelético de humanos, submetidas à superexpressão da ACSL6, verificar:
 - o nível de IMCL;
 - a velocidade de oxidação de palmitato;

• as vias de sinalização intracelular envolvidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Delineamento do Estudo com Humanos e Aprovação Ética

Recrutamento dos voluntários

Dez indivíduos do sexo feminino foram recrutados para o estudo, sendo cinco magras (IMC < 25 Kg/m²) e cinco obesas (IMC > 35 Kg/m²). As voluntárias foram préselecionadas por meio de questionários e entrevistas pessoais para os critérios de inclusão-exclusão. Todas voluntárias foram selecionadas antes do período menopausa, na fase folicular do ciclo menstrual (dias 1-4) por causa de influências conhecidas dos hormônios esteróides sexuais circulantes na função mitocondrial (Kane et al., 2011), sendo sedentárias (menos de 30 minutos de atividade física por semana por> 6 meses), não-fumantes, sem histórico de doença metabólica (não estavam tomando medicamentos conhecidos para alterar o metabolismo, tais como reposição hormonal da tireoide). Os percentuais de gordura corporal e massa livre de gordura foram determinados pelo DEXA (do inglês, Dual-energy X-ray absorptiometry) e o estado sedentário foi confirmado por uma avaliação do VO₂ máximo em esteira e pela calorimetria indireta. A altura e o peso corporal foram registrados e as biópsias de músculo esquelético foram obtidas a partir do vasto lateral do quadríceps utilizando uma modificação da técnica de biópsia de agulha percutânea, como relatado anteriormente (Houmard et al., 1993). Altura e peso corporal também foram registrados em toda a intervenção dietética. O estudo foi aprovado pelo Institutional Review Board of East Carolina University (UMCIRB 12-000448).

Intervenção Dietética – Dieta (crônica) e Refeição (aguda) Hiperlipídica

As voluntárias foram submetidas à dieta rica em gordura, composta por 60% de gordura (~ 40 kcal / kg de peso corporal / dia), com 20% de carboidratos e 20% de proteína, durante sete dias. No primeiro dia as voluntárias chegaram ao laboratório com

10 horas de jejum e realizou-se a biópsia do músculo esquelético pré- e quatro horas pósconsumo de uma refeição líquida rica em gordura [50% necessidades calóricas diárias; ~ 70% de calorias provenientes de gordura SAT: MUFA: PUFA (48: 37: 15) fornecida pela mistura Pulmocare[®] e creme de leite]. Nos dias subsequentes, as voluntárias ingeriram alimentos sólidos, baseados em suas preferências individuais, que contabilizaram 60% do total da energia diária ingerida na forma de gordura (dieta hiperlipídica, ~40 kcal/kg de peso corporal). Foi feito um monitoramento da ingestão diária de alimentos (quantidades e seleções) e ajustes foram feitos em uma base diária para atender aos requisitos de energia e do conteúdo de gordura. No sétimo dia, as voluntárias foram submetidas à terceira e quarta biópsia muscular com a mesma condição do primeiro dia (ou seja, prée 4h pós- refeição líquida rica em gordura).

2. Cultura de células de músculo esquelético de humanos

De 60 a 80 mg de músculo esquelético (peso úmido) foi obtido a partir do vasto lateral e as células satélites foram rapidamente isoladas em tampão fosfato de Dulbecco com solução salina (DPBS) contendo 1% glucose e 1% penicilina. O tecido muscular foi digerido em DMEM contendo 1,5% colagenase II, 2,5% tripsina, 0,1% DNAse e 1% penicilina a 37° C durante 30 min. A ação da tripsina foi minimizada com a adição de meio de contendo 10% soro de cavalo, 10% soro fetal de bovino (FBS), 2 mM Lglutamina e 1% penicilina. O meio foi centrifugado a 4000 rpm, a 4 ° C durante 20 min e o sobrenadante descartado (Houmard et al., 1993). As células isoladas foram suspensas em meio de crescimento contendo DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS), 0,5 mg/mL de BSA, 0,5 mg/mL de fetuina, 20 ng/mL de fator de crescimento epidérmico 0,39 dexametasona, humano, µg/mL de 50 µg/mL degentamicina/anfotericina B, e cultivadas a 37°C em estufa umidificada à 5% CO₂ e 95%

ar ambiente até que atingissem confluência suficiente (80%) para que entrassem em processo de diferenciação, com a adição do soro de cavalo.

3. Transfecção dos plasmídeos de ACSL6, GFP e Vetor Vazio em células de músculo esquelético humano

Foi adquirido um plasmídeo para ACSL6 da empresa DNASU[®]. Esse plasmídeo contém o clone para ACSL6 humano "HsCD00438860" inserido no vetor bacteriano pLX304, contendo promotor CMV e fusionado à V5 (Figura 8). A sequência do clone "HsCD00438860" encontra-se descrita a seguir:

ATGCAGACACAGGAGATCCTGAGGATACTGCGACTGCCTGAACTAGGTGACTTGGGACAG TTTTTCCGCAGCCTCTCGGCCACCACCCTCGACAGTGGCGGGGCACGGCGATCTGTGATT **GGGTCTGGCCCTCAGCTACTTACCCACTACTATGATGATGCCCGGACCATGTACCAGGTG** TTCCGCCGTGGGCTTAGCATCTCAGGGAATGGGCCCTGTCTTGGTTTCAGGAAGCCTAAG CAGCCTTACCAGTGGCTGTCCTACCAGGAGGTGGCCGACAGGGCTGAATTTCTGGGGTCC GGACTTCTCCAGCACAATTGTAAAGCATGCACTGATCAGTTTATTGGTGTTTTTGCACAA AATCGGCCAGAGTGGATCATTGTGGAGCTGGCCTGCTACACATATTCCATGGTGGTGGTC CCGCTCTATGACACCCTGGGCCCTGGGGCTATCCGCTACATCATCAATACAGCGGACATC AGCACCGTGATTGTGGACAAACCTCAGAAGGCTGTGCTTCTGCTAGAGCATGTGGAGAGG AAGGAGACTCCAGGCCTCAAGCTGATCATCCTCATGGACCCATTCGAAGAAGCCCTGAAA GAGAGAGGGCAGAAGTGCGGGGGGGGGCGTCATTAAGTCCATGCAGGCCGTGGAGGACTGTGGC CAAGCGAATCACCAGGCTCCTGTGCCCCCGCAGCCTGATGACCTCTCCATTGTGTGTTTC ACAAGCGGCACGACAGGGAACCCAAAGGGTGCGATGCTCACCCATGGGAACGTGGTGGCT GATTTCTCAGGCTTTCTGAAAGTGACAGAGGGAGATATCCGCCTTCTCTCAGATGACATG AAGGCTCTATGCCCCACCATCTTCCCTGTGGTCCCACGACTGCTGAACCGGATGTACGAC AAGATCTTCAGCCAGGCAAACACCACCATTAAAGCGCTGGCTCCTGGAGTTTGCAGCAAAG CGTAAGCAAGCCGAGGTCCGGAGTGGAATCATCAGGAATGATAGTATCTGGGATGAACTC TTCTTTAATAAGATTCAGGCCAGTCTTGGTGGGTGTGTGCGGATGATTGTTACTGGAGCA GCCCCAGCATCACCAACAGTTCTGGGATTTCTCCGGGCAGCTCTAGGGTGCCAGGTTTAT GAAGGTTATGGCCAAACTGAGTGCACAGCTGGATGTACCTTCACCACTCCTGGCGACTGG ACCTCAGGGCACGTAGGGGCGCCACTTCCCTGCAATCATATCAAGCTCGTTGATGTTGAG GAACTGAACTACTGGGCCTGCAAAGGAGAGGGGGGGGGAGATATGTGTGAGAGGGACCAAATGTG TTCAAAGGCTACTTGAAAGATCCAGACAGGACGAAGGAGGCCCTGGACAGCGATGGCTGG CTTCACACTGGAGACATCGGAAAATGGCTGCCGGCAGGAACTCTTAAAATTATTGATCGG AAAAAGCATATATTTAAACTTGCTCAGGGAGAATATGTTGCACCCGAGAAGATTGAGAAC ATCTACATCCGGAGCCAACCTGTGGCGCAAATCTATGTCCATGGGGACAGCTTAAAGGCC TTTTTGGTAGGCATTGTTGTGCCTGACCCTGAAGTTATGCCCTCCTGGGCCCAGAAGAGA GGAATTGAAGGAACATATGCAGATCTCTGCACAAATAAGGATCTGAAGAAAGCCATTTTG GAAGATATGGTGAGGTTAGGAAAAGAAAGTGGACTCCATTCTTTTGAGCAGGTTAAAGCC ATTCACATCCATTCTGACATGTTCTCAGTTCAAAATGGCTTGCTGACACCAACACTAAAA GCTAAGAGACCTGAGCTGAGAGAGTACTTCAAAAAACAAATAGAAGAGCTTTACTCAATC TCCATG

O plasmídeo foi expandido em meio LB e purificado por MidPrep (Qiagen®). Para

9).

A trasnfecção das células de músculo esquelético humano, foi realizada através de eletroporação, utilizando o kit de transfecção Amaxa Nucleofactor[®], seguindo protocolo recomendado pelo fabricante Lonza[®]. As células (10⁶ células/reação) foram cuidadosamente ressuspendidas em 100 µL solução Nucleofector[®] (Lonza[®], Walkersville, MD) em temperatura ambiente (21°C), incubadas com 4 µg de DNA de plasmídeo da ACSL6 e GFP (DNASU[®]), enquanto as células controle foram transfectadas com um plasmídeo de vetor vazio. As células e o DNA plasmídico suspensos foram transfectados pelo sistema de eletroporação Amaxa Nucleofector (Lonza[®], Walkersville, MD) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a transfecção, os mioblastos foram transferidos para meio de crescimento pré-equilibrado a 37°C em estufa umidificada à 5% de CO₂ e 95% de ar ambiente, durante 48 horas ou até atingir 80% de confluência. Para a diferenciação de mioblastos para miotubos, foi realizado a troca do meio de crescimento para meio de diferenciação (contendo 2% de soro de cavalo, 0,5 mg/mL de BSA, 0,5 mg/mL de fetuína, e 50 µg/mL de gentamicina/anfotericina B). A eficiência de transfecção (fluorescência de GFP) e a viabilidade celular foram medidas por microscopia de fluorescência invertida (Olympus America Inc, Melville, NY). No quinto dia de diferenciação, os miotubos humanos primários foram expostos à 125 µM palmitato/125 µM oleato e, em seguida, coletados no sétimo dia da diferenciação para a execução de todos os experimentos.

confirmar a purificação do plasmídeo, realizou-se uma corrida em gel de agarose (figura



Figura 8: Mapa do plasmídeo pLX304



Figura 9 - Gel de agarose do plasmídeo após expansão e purificação com MidPrep (Qiagen®).

4. Delineamento do Estudo com animais e Aprovação Ética

Os procedimentos envolvendo ratos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de animais de laboratório da Universidade de São Paulo - Campus de Ribeirão Preto (Protocolo 092/2010). Ratos machos, pesando 100 g, foram submetidos a uma das seguintes condições: 1) 48 horas de jejum; 2) 12 horas em jejum seguido pela ingestão aguda de uma mistura de 80% lipídeos (SAT) e 10% de glicose (0,2 mL/kg de peso corporal) por gavagem. Os animais foram eutanasiados sequencialmente às 2h, 4h, 12h e 24h após a ingestão; 3) dieta *ad libitum* (PragaSoluções Biociências[®]), contendo 60% de gordura (banha), durante 6 semanas; ou 4) exercício físico em esteira a 60% da velocidade aeróbia máxima (anteriormente determinada por teste de capacidade aeróbia máxima), 1h por dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas.

5. Cultura primária de células de músculo esquelético de ratos

As células musculares foram obtidas a partir dos músculos quadríceps, isquiostibiais, tibial anterior, extensor digital longo (EDL), sóleo e gastrocnêmio de ratos machos (quatro semanas). O material biológico foi extraído com o auxílio de instrumentação cirúrgica esterilizada e isolados em tampão fosfato-salina de Dulbecco (DPBS), contendo glicose (1%) e penicilina (1%). O tecido muscular foi triturado com auxílio de pinça e tesoura, após centrifugação de 20 minutos por 1000 rpm a 4 °C, o precipitado foi homogeneizado e em solução contendo colagenase tipo II a 2%, durante 90 minutos, a 37 °C. Em seguida, passou por outra digestão em solução contendo colagenase a 2,5 %, tripsina (2,5 %) e DNAse (0,1%), durante 30 minutos, a 37 °C. O homogenato foi centrifugado a 1000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C e, em seguida, 30 mL de DMEM com 10 % de soro fetal bovino e 10% de soro de cavalo foram adicionados à solução para minimizar ação da tripsina sobre as células. A solução foi centrifugada a 1000 rpm, por

20 min, a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O material foi ressuspenso em meio de cultura DMEM contendo soro fetal bovino 10 % e soro de cavalo a 10 %, L-glutamina a 4 mM, antibiótico a 1 % e pH 7,3. Após a contagem, os mioblastos foram distribuídos em placas de seis poços (2,5x 10^5 células) contendo matrigel (0,1%) e mantidas a 37 °C em estufa úmida na presença 5% de CO2 até atingirem o seu estágio de diferenciação (5° dia). Após as céulas atingirem confluência de 80% a troca do meio DMEM contendo soro de cavalo 10% foi realizada a cada 48 horas até as células atingirem ponto de diferenciação celular de miotubos. (LYNGE et al., 2001).

O processo de crescimento e diferenciação celular da cultura primária de músculo esquelético foi acompanhado através da análise das imagens. A figura a seguir ilustra 48h após o isolamento das células, quando as células estavam em mioblastos e; 120h após a o isolamento, quando as células encontram-se no formato de miotubos.



Figura 10 - Figura representativa da cultura primária de músculo esquelético de ratos. A foto da esquerda representa as células 48h após o isolamento, ainda em estágio de mioblastos. A foto da direita representa as células 120h após o isolamento, já em estágio de miotubos.

6. Silenciamento da ACSL6 em células de rato

Para realização do silenciamento gênico da ACSL6, utilizou-se a tecnologia de siRNA (RNA de pequena interferência, do inglês *small interfering RNA*), cujo mecanismo básico encontra-se explicado na figura a seguir.

As células foram transfectadas com oligo específico de siRNA para ACSL6 (SASI_Rn01_00079210) ou scramble (oligo com sequência aleatória, que não codifica nenhum siRNA) como controle, obtidos da Sigma-Aldrich[®]. Quarenta e oito horas anteriormente à diferenciação das células, o meio das células foi trocado por meio de crescimento livre antibióticos. Os oligos específicos de siRNA (20 nM) e Lipofectamine 2000 (Life Technology[®], EUA) (0,5 μ L/mL) foram adicionados ao meio de crescimento livre de antibiótico no início do processo de diferenciação. Esta mistura foi adicionada às placas de cultura de células, e mantida a 37 ° C em estufa de CO₂ à 5% durante 24 h. As células foram então lavadas com PBS e incubadas em DMEM contendo 10% soro de cavalo e uma mistura de palmitato:oleato (na razão de 1:1; contendo 125 μ M de cada AG) conjugado ao BSA (1%). Após 24h de diferenciação, as células foram tripsinizadas e lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS), e ressuspensas no tampão de ensaio adequado para análises.



Figura 11 - Mecanismo de silenciamento gênico por siRNA. Através clivagem por ação da enzima Dicer, são produzidas moléculas de RNA dupla fita que se associam a um complexo ribonucleoprotéico conhecido como RISC (do ingês *RNA-induced silencing complex*). Após esta associação, uma das fitas do RNA é degradada e a outra é utilizada como para o direcionamento do complexo RISC às fitas complementares de mRNA específicos, os quais serão alvo do silenciamento gênico.

7. Ensaio de viabilidade nas células de ratos

As células (25×10⁴) foram suspensas em tampão de ligação de iodeto de propídio (PI) seguindo as instruções do fabricante (Dead Cell Apoptosis Kit, Invitrogen/Molecular Probes). Os dados foram adquiridos em um citômetro de fluxo (Guava EasyCyte 8HP, Millipore, Hayward, CA, EUA) e analisados com o auxílio do software 2.7TM guavaSoft (Guava EasyCyte 8HP, MilliporeTM, Hayward, CA, USA).

8. Consumo de Oxigênio nas células de ratos

As células (10⁶) foram suspensas em 2,1 mL de meio Krebs Henseleit contendo glicose (10 mM), pH 7,3 a 37°C e introduzidas no *High Resolution Oxygraph* (Oroboros, Áustria) equipado com o software DataLab 5.0 para monitoramento de consumo de oxigênio. Oligomicina (2 μ g/mL) e cianeto de carbonilo m-clorofenil-hidrazona (CCCP) (2 μ M) foram usados para inibir a síntese de ATP e induzir o desacoplamento mitocondrial, respectivamente. Um experimento típico realizado nestas células encontrase na figura a seguir.



Figura 12 - Experimento típico realizado em células musculares de ratos retirado do software DatLab[®] do equipamento Oroborus[®]. No eixo X encontra-se o tempo em minutos, no eixo Y está a concentração do oxigênio na cubeta representado no gráfico pela linha azul, já no eixo Z encontra-se o consumo de oxigênio por milhões de células. Até aproximadamente 10min de experimento, a respiração celular foi sustentada pelo substrato do meio (glicose) e endógenos (principalmente glicogênio e AGs), após isto adicionou-se oligomicina (OLIGO) para análise da respiração que ocorre na ausência da síntese de ATP e, a aproximadamente no minuto 16 do experimento foi adicionado o desacoplador químico CCCP para induzir um estado de respiração máxima.

9. Produção de H2O2 nas células de ratos

As células (5×10^5) foram mantidas a 37°C em 2 mL de PBS contendo 5,6 mM glicose,

1 μ M Amplex Ultra-Red e 0,1 U/mL *Horse* Peroxidase (HRP) durante 40 min. Aliquotas (200 μ L) de meio foram recolhidas em curso de tempo de 5 min, 20 min e 40 min. A intensidade de fluorescência foi determinada nos comprimentos de onda 563/581 nm excitação/emissão. Uma curva padrão foi feita com H₂O₂ e a fluorescência foi convertida para a concentração e depois para velocidade de produção por minuto (pmol.min⁻¹).

10. Produção de lactato nas células de ratos

As células (10⁶) foram mantidas a 37°C em PBS contendo 25 mM glicose, durante 3 h. Após a incubação, o meio foi recolhido e as concentrações de lactato foram determinadas pela reação enzimática da lactato desidrogenase (1 µg) e de NAD⁺ (10 mM) em tampão Tris-HCl (Ph 7,8) . O NADH resultante foi determinado com intensidade de fluorescência a 360/460 nm excitação/emissão. Uma curva padrão foi feita com lactato e a fluorescência foi convertida para a concentração e depois para velocidade de produção por minuto (pmol.min⁻¹).

11. Análise da expressão gênica em células de ratos e humanos por qRT-PCR

As células (5 × 10⁵) ou os tecidos (~ 20 mg) de músculo esquelético de humano ou de rato foram homogeneizados em reagente Trizol (Invitrogen®) para o isolamento do RNA. Para análise de qRT-PCR, o RNA foi reversamente transcrito utilizando a Transcriptase Reversa IMPROM II (PROMEGA[®]) e amplificados para o qPCR através do reagente EvaGreen (BioRad®) para os genes de rato e o reagente fluorescente TaqMan (Applied Biosystems®) para os genes humanos. A expressão relativa de mRNA foi determinada após a normalização por β-actina ou RPL39 para ratos e 18S para humano usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). O qRT-PCR foi realizado utilizando o termociclador Eppendorf Mastercycler Realplex 4 (Eppendorf[®]). Os primers utilizados para experimentos com ratos, PGC1α, β-actina, RPL39, UCP3, UCP-2, ACSL6, SREBP-1c, DGAT1, DGAT2, ACSL1, ACSL3, e primers para Humanos ACSL6, 18S, PGC1α foram desenhados conforme descrito na Tabela 1. Após a amplificação dos genes, foi realizado uma curva de *melting* para confirmação da especificidade de cada primer. Esta curva de *melting* foi realizada através de uma rampa de aquecimento variando de 60°C até 95°C em 10 min. As curvas de *melting* dos primers utilizados no estudo encontram-se na figura abaixo.

Gene	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5´-3´)
ACSL6	CAGTAGAAATCCTCAGTCTGGC	GGCTCACTTCGGATGTAGATG
UCP3	ATGAGTTTTGCCTCCATTCG	GGCGTATCATGGCTTGAAAT
UCP-2	ATGTGGTAAAGGTCCGCTTC	CATTTCGGGCAACATTGGG
PGC1a	CAAGCCAAACCAACAACTTTATCTCT	CACACTTAAGGTTCGCTCAATAGT
DGAT1	GACAGCGGTTTCAGCAATTAC	GGGTCCTTCAGAAACAGAGAC
DGAT2	ACAGTGGGTCCTATCCTTCC	ATCTCCTGCCACCTTTCTTG
ACSL1	GAAAGCCAAACCAGCCATATG	GAAAAGATGCCGATGAACTGC
ACSL3	ATGAAAACGGACAGAGGTGG	TGCCTCAACTTTGCCTAGAG
β-actina	CACTTTCTACAATGAGCTGCG	CTGGATGGCTACGTACATGG
RPL39	CAAAATCGTCCTATTCCTCAATGG	CAGTAGAAATCCTCAGTCTGGC
B-HAD	TCTTGACTATGTTGGACTGGATAC	AAGGACTGGGCTGAAATAAGG
SREBP-1c	CACAGGGTAGCCATGAGATTAG	CATCCTTCCTGGATTGTCCTT

 Tabela 01: Desenho dos primers utilizados no estudo



Figura 13: Curvas de melting dos primers utilizados no estudo

12. Extração de lipídeos e análise por espectrometria de massas em células de humanos e ratos

As células (5×10^6) foram homogeneizadas em 2,25 mL de H₂O em gelo. Após isto, 2,5 mL de hexano e 1,45 mL de metanol foram adicionados rapidamente para extração de lipídeos. Os extratos lipídicos foram analisados por *Easy Ambient Sonic-spray Ionization Mass Spectrometry* (EASI-MS) nos modos de ionização negativa ou positiva (Alberici et al. 2011), utilizando um espectrômetro de massa *Single-Quadrupole* (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com uma fonte EASI (Haddad et al 2006;. Haddad et al., 2008). Para a identificação de estruturas lipídicas foram utilizados estudos de Goto-Inoue (et al., 2012) e Magnusson (et al., 2008). Foi utilizado como padrão interno o triglicerídeo com massa 901.

13. Avaliação das gotas lipídicas em células de humanos e ratos

As células (25×10^3) foram fixadas com paraformaldeído a 4% durante 15 minutos a 37°C, em estufa 5% CO₂. Sob estas condições, as células foram permeabilizadas com 0,1% Triton em tampão PBS durante 5 min e em seguida incubadas com 10 µg/mL de Bodipy (493/503 - Molecular Probes) durante 30 min. As células foram então lavadas com PBS e colocadas para detecção das imagens. As imagens foram adquiridas em um microscópio de fluorecência Leica CTR 6000 usando uma lente objetiva de 40x, nos comprimentos de onda 493/503 nm (Excitação/Emissão), e analisadas através do *software Image J*.

14. Oxidação de AG em células musculares de humanos e ratos

O palmitato marcado radioativamente com carbono 14[1-14C-palmitato] (Perkin Elmer, Boston, MA, EUA) foi utilizado para medir a oxidação de ácidos graxos nos miotubos primários humanos e de ratos de acordo com Cortright et al. (2006). As células de músculo esquelético humano ou de rato foram incubadas a 37 °C em estufa 5% CO2 durante 3 horas em meio de diferenciação contendo 100 µM palmitato, 12,5 mM HEPES, 0,25% BSA, 1 mM carnitina, e 10 μ Ci/ml de 1-¹⁴C-palmitato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Após o período de incubação, as reações foram interrompidas com adição de 70% ácido perclórico. As placas foram transferidas para um agitador orbital, e CO₂ proveniente da oxidação do palmitato marcado foi deslocado para o lado poço que continha 200 µL de NaOH 1 N durante 1 hora. A radioatividade de CO₂ (oxidação completa de palmitato) foi determinada por contagem do líquido de cintilação, utilizando tubos de 4 mL da Uniscint BD (National Diagnostics, Atlanta, GA). Os pellets de células remanescentes do experimento de oxidação foram lavados duas vezes com solução PBS gelado, coletados com 200 µL de SDS a 0,05%. Os lisados celulares foram armazenados a - 80 ° C para a determinação subsequente de proteínas. A taxa de oxidação dos ácidos graxos foi expressa como pmol/mg de proteína/h.

15. Análise da expressão de proteínas por Western Blotting

Alíquotas dos lisados de células (10-30 µg de proteína) foram separadas por gel de SDS-PAGE e transferidas para membrana de PVDF. Depois de ter sido bloqueada com 10% leite desnatado, a membrana foi incubada *overnight* à 4°C com diluições apropriadas dos anticorpos primários, incluindo a pAMPK (Cell Signaling Technology), AMPK (Cell Signaling Technology), de DGAT1 (Santa Cruz Biotechnology), ACSL6 (Sigma-Aldrich), β-actina (Cell Signaling Technology). Após lavagem em TBST (3 x 10 min), as

membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com HRP apropriados durante 120 min à temperatura ambiente. A ligação do anticorpo foi detectada pelo aumento do substrato quimioluminescente de ECL e de ECL-Prime® (GE Technology), como descrito pelo fabricante. As imagens foram obtidas utilizando sistema digital de XRS+ (BioRad system based on CCD high-resolution).

16. Medida da atividade da Citrato Sintase em células musculares de ratos

As células musculares (5x10⁶ células/ml) foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas duas vezes para romper a membrana mitocondrial e expor a citrato sintase (CS) (Siu et al., 2013), posteriormente, os homogenatos foram centrifugados em 12000 G a 4 °C durante 10 minutos e o sobrenadante contendo a proteína utilizado (Bharadwaj et al, 2015). A proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad Cat.500-0006) à temperatura ambiente. O tampão de reação continha trietanolamina-HCl (0,1 M), pH 8,0, 0,3 mM de acetil-CoA, 0,5 mM de oxaloacetato, 0,25% de Triton X-100 e 0,1 mM 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). A reação foi iniciada pela adição de 10 ug de (Eigentler et al.. 2015) atividade CS foi proteína e а determinada espectrofotometricamente de acordo com o método para Srere (1969) onde cada amostra foi analisada em quintuplicata.

17. Análise estatística

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média e foram analisados pelos testes ANOVA *one way*, seguida pelo pós-teste de Student–Newmans Kells. O teste t de *student* não pareado, foi utilizado para comparação dos experimentos duas médias, usando o programa Prisma 6.0. p \leq 0.05 foi considerado significativo.

RESULTADOS

1. Expressão de mRNA da ACSL6 em diferentes estados nutricionais e condições metabólicas em humanos e ratos

A expressão de mRNA da ACSL6 no músculo esquelético foi avaliada em roedores submetidos a diferentes condições metabólicas, tais como jejum, exercício aeróbio, ingestão aguda e crônica de dieta hiperlipídica. Após 48h de jejum, encontramos 40% de diminuição no mRNA da ACSL6 (Fig. 14), a qual foi acompanhada pela diminuição da expressão de outros dois genes de síntese de lipídeos: *Steroyl Response Element Binding Protein 1c* (SREBP-1c), um fator-chave de transcrição que regula a lipogênese celular no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo (Bizeau et al., 2003); e da diacilglicerol transferase 1 (DGAT1), uma enzima que catalisa a conversão de DAG em TAG pela doação de um grupo acil fornecido pela acil-CoA (Cases et al., 1998).



Figura 14: Expressão relativa de mRNA de ACSL6, DGAT1 e SREBP-1c em tecido de músculo esquelético de ratos (gastrocnêmios) após 48h de jejum. * p < 0.05; ** p < 0.01. Média ± EPM. N= 6.

Após treinamento aeróbio (6 semanas, 5 dias por semana, uma vez por dia, 60 minutos a 70% da capacidade aeróbica máxima) o mRNA da ACSL6 foi reduzido em 35% (Fig. 15). Por outro lado, 4 e 12 h após a ingestão aguda de refeição hiperlipídica (*high fat* *meal*, HFM, 80% de gordura saturada, 10 mL/kg) o mRNA da ACSL6 foi significativamente maior comparado ao período antes da ingestão (0h, jejum de 48h) (Fig. 16). Esta elevação foi acompanhada por maiores níveis na transcrição de SREBP-1c (Fig. 17) e DGAT1 (Fig. 18).



Figura 15: Expressão do mRNA da ACSL6 1c em tecido de músculo esquelético de ratos (gastrocnêmios) submetidos à 6 semanas de treinamento aeróbio. * p<0,05. Média \pm EPM . N= 6.



Figura 16: Curva temporal da expressão do mRNA da ACSL6 em tecido de músculo esquelético de ratos (gastrocnêmios) após a ingestão aguda de refeição hiperlipídica (HFM). * p<0,05. Média \pm EPM . N= 6.



Figura 17: Curva temporal da expressão gênica do SREBP-1c em tecido de músculo esquelético de ratos (gastrocnêmios) após a ingestão aguda de refeição hiperlipídica (HFM) em ratos. * p < 0.05; ** p < 0.01. Média ± EPM . N= 6.



Figura 18: Curva temporal da expressão gênica do DGAT1 em tecido de músculo esquelético de ratos (gastrocnêmios) após a ingestão aguda de refeição hiperlipídica (HFM). * \rightarrow p <0,05; ** p<0,01. Média ± EPM . N= 6.

Como um fator para a transcrição de vários genes de síntese de lipídeos (Eberle et al, 2004), SREBP-1c foi fortemente expresso antes (2h após HFM) do que ACSL6 e DGAT1. Nas horas subsequentes os níveis de transcrição destes genes foram

gradativamente reduzidos e, após 24 horas, retornaram aos níveis encontrados durante o estado de jejum.

Surpreendentemente, após a ingestão crônica de dieta hiperlipídica (HFD, 60% de lipídeos, durante 6 semanas) a expressão da ACSL6 foi reduzida cerca de 40% (Fig. 19), sugerindo um mecanismo de defesa contra o excesso de acúmulo de lipídeos no músculo esquelético.



Figura 19: Expressão relativa de mRNA da ACSL6 em tecido de músculo esquelético de ratos (gastrocnêmios) após a ingestão crônica de dieta hiperlipídica (HFD). * p<0,05. Média \pm EPM . N= 6.

Em humanos sob estado de jejum, verificamos que indivíduos obesos apresentam níveis mais baixos de RNAm de ACSL6 quando comparado sujeitos magros (Fig. 20). Quatro horas após HFM (90% de gordura) a expressão de mRNA da ACSL6 foi aumentada de 2,5 vezes em relação aos níveis de jejum no músculo esquelético de ambos, magros e obesos. Ao contrário do efeito verificado em ratos, a HFD crônica (40% de gordura, 7 dias) não alterou os níveis de transcrição de ACSL6 em indivíduos magros (Fig. 21), talvez devido a diferenças no período de ingestão HFD (ratos: 6 semanas; humanos: 7 dias). Em conjunto, estes resultados sugerem que ACSL6 é um importante

gene modulado positivamente durante estados associados à síntese de lipídeos em ratos e em seres humanos.



Figura 20: Expressão relativa de mRNA da ACSL6 no tecido de músculo esquelético (quadríceps) de voluntárias humanas magras e obesas antes e após a ingestão aguda de refeição hiperlipídica (HFM). * p<0,05; ** p<0,01. Média ± EPM, N= 5.



Figura 21: Expressão relativa de mRNA da ACSL6 no tecido de músculo esquelético (quadríceps) de voluntárias humanas magras antes e após 7 dias de dieta hiperlipídica (HFD) em humanos magros. Média \pm EPM, N= 5.

2. Efeitos do silenciamento gênico da ACSL6 em células primárias de rato

Em seguida, verificamos os efeitos da inibição gênica de ACSL6 em cultura de células primárias em músculo esquelético de ratos. Na concentração de 20 nM de siRNA para ACSL6, os níveis de transcrição de ACSL6 foram significativamente diminuídos (75%; p <0,05) quando comparados ao controle (transfecção de oligo scramble); em concentrações mais elevadas (80 nM ou 160 nM) a transfecção não capaz de promover inibição significativa (Fig. 22).



Figura 22: Curva de concentração da inibição gênica da ACSL6 por siRNA em cultura de células de músculo esquelético de rato. * p<0,05. Média \pm EPM . N= 6.

A diminuição de 75% do mRNA da ACSL6 não alterou a viabilidade das células quando comparada ao seu controle (scramble), ao passo que, o controle positivo de morte celular (incubação das células com 10% de DMSO), diminuiu significativamente a viabilidade celular (Fig. 23).



Figura 23: Viabilidade de células de músculo esquelético de rato após transfecção de scramble ou siRNA e controle positivo de morte celular (incubação das células com 10% de DMSO por 2h). ** \rightarrow p < 0,01. Média ± EPM . N= 6.

O silenciamento da ACSL6 reduziu a acúmulo do fluorófolo lipofílico Bodipy (493/503), uma sonda específica para os lipídeos não-polares (principalmente TAG), visualizada na forma de partículas fluorescentes no citoplasma das células (Fig. 24), indicando uma redução na densidade dos gotas lipídicos (LD) intracelulares (Fig. 25).



Figura 24: Acúmulo do marcador fluorescente Bodipy (verde) em cultura de células de músculo esquelético de rato, transfectadas com scramble ou siRNA para a ACSL6, visualizada por microscopia de fluorescência (493/503). As gotas lipídicas são consideradas os pontos lipídicos (círculos) com intensidade mais alta. N = 3 replicatas biológicas (culturas diferentes) e N = 7 replicatas experimentais (placas e trasnfecções diferentes na mesma cultura).



Figura 25: Densidade das gotas lipídicas (número de gotas/área de célula) em cultura de células de músculo esquelético de rato transfectadas com scramble ou siRNA ACSL6. * p<0,05. Média \pm EPM . N = 3 replicatas biológicas (culturas diferentes) e N = 7 replicatas experimentais (placas e trasnfecções diferentes na mesma cultura). Os gotas foram

contadas automaticamente através do programa Image J, utilizando uma saturação de fluorescência de 80% e a ferramenta para contagem de partículas.

Estes resultados foram reforçados pela análise por espectrometria de massas (MS), a qual mostrou uma diminuição significativa na intensidade relativa dos íons de triacilgliceróis sodiados [TAG+Na]⁺ m/z 853 (C50: 4), 855 (C50: 3), 879 (C52: 3), 881 (C52: 2), 905 (C54: 4) e 907 (C54:. 3) (Fig. 26) em células transfectadas com siRNA para ACSL6 siRNA comparação com células controle, bem como a diminuição da intensidade do Íon de [DAG + K⁺] + de m/z 685 (C38: 1). Encontramos também diminuição dos Íons de m/z 725 (C16: 0) de [sphingomyelin + Na] + e Íons de m / z 756 (C32: 0) de [fosfatidilcolinas + Na], mas sem mudanças na intensidade dos Íons de [fosfatidilcolinas + Na +] de m/z 782 (34: 1) 808 (36: 2) e 827 (38: 6) (Fig. 26). Por outro lado, encontramos aumento da intensidade dos íons de [AG+ H] de m/z 255 (C16: 0) e 283 (C18: 0) (Fig. 27).



Figura 26: Quantificação relativa de diacilglicerol (DAG), fosfatidilcolinas (PC) e Triacilgliceróis (TAGs) em cultura de células de músculo esquelético de rato, transfectadas com scramble ou siRNA para ACSL6, por espectrometria de massas. Os

íons de DAG, PC e TAGs foram normalizados pelo padrão interno com massa de 550. * p<0,05; ** p<0,01. N=6.



Figura 27: Quantificação relativa de ácidos graxos livres em cultura de células de músculo esquelético de rato, transfectadas com scramble ou siRNA ACSL6, por espectrometria de massas. Os íons de de AG foram normalizados pelo padrão interno com massa de 227. * p<0,05; ** p<0,01. N=6.

Nessas células silenciadas para ACSL6 também observamos uma diminuição na expressão gênica de DGAT1 e SREBP-1c (Fig. 28), genes-chave na síntese de lipídeo muscular. Estes resultados corroboram os resultados encontrados *in vivo* em ratos submetidos ao jejum, o que indica associação entre a ACSL6 e a biossíntese de lipídeo no músculo esquelético.



Figura 28: Expressão relativa de mRNA de DGAT1, DGAT2 e SREBP-1c em cultura de células de músculo esquelético de rato, transfectadas com scramble ou siRNA ACSL6. Média \pm EPM . N= 6. * P < 0,05.

3. Efeitos do silenciamento gênico da ACSL6 no metabolismo mitocondrial em células primárias de rato

Utilizando da técnica de *High Resolution Respirometry*, verificamos que a diminuição da expressão do gene ACSL6 promoveu mudanças na respiração mitocondrial de células intactas (Fig. 29 e 30). O silenciamento da ACSL6 promoveu aumentos de 25% nas taxas respiratórias em estado *ROUTINE* [Estado *R*, no qual o substrato glicose (10 mM) presentes no meio utilizado para o experimento (Krebs) e os substratos endógenos (glicogênio e IMCL) suportam a respiração e cuja taxa depende da demanda de ATP celular], 28% no estado de *LEAK* (Estado *L*, no qual a fosforilação oxidativa é inibida por oligomicina e o consumo de O_2 reflete desacoplamento intrínseco, tal como causado pelo *leak* de prótons pela mmi), e 50% no estado de máxima respiração ou *NONCOUPLED* (Estado *E*, no qual o desacoplador químico CCCP promove o retorno de H⁺ para a matriz através da membrana mitocondrial interna, reduzindo o potencial de eletroquímico de H⁺ e consequentemente estimulando a máxima velocidade de transferência de elétrons e consumo de O_2). Juntos, esses resultados indicam elevado conteúdo e/ou capacidade mitocondrial induzidos pelo silenciamento da ACSL6.



Figura 29: Traçado representativo do experimento de consumo de O₂ por células de músculo esquelético de rato, transfectadas com scramble ou siRNA da ACSL6, realizado no oxígrafo Oroboros. Onde indicado com setas foram adicionados as células (10^6), oligomicina (oligo, 2 µg/mL) ou Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP, 2 µM). Estado *R* (ROUTINE), Estado *L* (LEAK) e Estado *E* (NONCOUPLED).



Figura 30: Taxas do consumo de O₂ em células de músculo esquelético de rato, transfectadas com scramble ou siRNA ACSL6. Estado *R* (ROUTINE), Estado *L* (LEAK) e Estado *E* (NONCOUPLED). Média \pm EPM. N= 6.

Medimos a atividade da enzima Citrato Sintase, a qual é considerada classicamente como um marcador da densidade mitocondrial (Fig. 31). O silenciamento gênico de ACSL6 promoveu um aumento na atividade dessa enzima, em concordância aos experimentos de respiração celular que também indicaram uma maior densidade mitocondrial. Além disso encontramos um maior nível de fosforilação de Proteína Quinase Dependente de Adenosina monofosfato (AMPK), evidenciada pelo aumento de p-AMPK/AMPK, demonstrando a ativação deste promotor de biogênese mitocondrial (Fig. 32), e a expressão elevada de PGC-1a, importante regulador da biogênese mitocondrial (Fig. 33). Além disso, a expressão gênica de proteínas desacopladoras UCP2 e UCP3 também aumentaram nas células silenciadas para ACSL6 (Fig. 33). Estas proteínas são conhecidas por desacoplarem a fosforilação oxidativa e dessa forma aumentarem a respiração mitocondrial e a utilização de substratos. O aumento da respiração mitocondrial reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (Mailloux e Harper, 2011) por diminuir a meia vida dos intermediários da cadeia respiratória capazes de doar elétrons ao oxigênio e formar o anion superóxido. De fato, encontramos uma diminuição da liberação de H₂O₂ em células com knockdown para ACSL6 (Fig. 34A e B). Embora não tenhamos encontrado diferenças na expressão da 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HAD) (Fig. 33), uma enzima de β -oxidação de AG, observamos uma maior oxidação de 14C-palmitato (15%) nas células silenciadas para ACSL6 (Fig. 35).



Figura 31 - Atividade Enzimática de Citrato Sintase em células de músculo esquelético de rato, transfectadas com scramble ou siRNA ACSL6. Média \pm EPM . N= 6. ** P < 0,01.



Figura 32 - Expressão proteica de pAMPK e AMPK em extrato de lizado de células de músculo esquelético de rato, transfectadas com scramble ou siRNA ACSL6, analisadas por Western Blot.



Figura 33 - Expressão relativa de mRNA de genes oxidativos e de metabolismo de AGs em células de músculo esquelético de rato, transfectadas com scramble ou siRNA ACSL6. Média \pm EPM . N= 6.

A





Figura 34 - Taxa de produção de H_2O_2 em células de músculo esquelético de rato, transfectadas com scramble ou siRNA ACSL6. A) Gráfico representativo da fluorescência da resorufina/tempo. B) Taxa de produção H_2O_2 calculado por uma curva padrão de H_2O_2 , expressão em nmol de H_2O_2 por min 0.5×10^6 células. Média \pm EPM. N= 6.



Figura 35 - Oxidação de palmitato marcado radioativamente em células de músculo esquelético de rato, transfectadas com scramble ou siRNA da ACSL6. Média \pm EPM. N= 6.

Ainda a respeito das vias energéticas celulares, encontramos um aumento de 57% na produção de lactato em células com o silenciamento para ACSL6 (Fig. 36). Podemos observar que a presença do desacoplador químico CCCP também aumenta a produção de lactato, indicando que a elevada produção de lactato nas células silenciadas para ACSL6

pode estar relacionada à atividade de UCP. Rotenona, inibidor do complexo I da CTE foi usada como controle positivo nesse experimento, uma vez que a inibição do complexo I impede que NADH seja oxidado na CTE, consequentemente inibindo o ciclo de Krebs e a entrada de piruvato na mitocondria.



Figura 36 - Produção de lactato em células de músculo esquelético de rato, transfectadas com scramble ou siRNA ACSL6 e incubadas com CCCP (100nM por 2h) ou com rotenona (1 μ M por 2h). * p < 0.05; ** p<0,01; *** p<0,001. Média ± EPM . N= 6.

4. Efeitos da Superexpressão de ACSL6 em células de Músculo Esquelético de Humanos

À medida que a ingestão de refeição hiperlipídica aguda aumentou a expressão gênica de ACSL6 no músculo esquelético humano (Fig. 18), investigamos os efeitos da superexpressão da ACSL6 em cultura de células de músculo esquelético humano. A eficiência de transfecção foi de aproximadamente 40%, verificado por meio de fluorescência de GFP (Fig. 37). À medida que as células foram transfectadas quando estavam na fase de mioblastos, confirmou-se que a transfecção era permanente até a diferenciação em miotubos. As células transfectadas apresentaram 600 vezes mais mRNA
de ACSL6 (Fig. 38) e 3 vezes mais o conteúdo de proteína ACSL6 (Fig. 39) comparadas às células transfectadas com vetor vazio.



Figura 37 - Eficiência de transfecção de ACSL6 verificada pela fluorescência do GFP em células de músculo esquelético humano transfectadas com GFP e ACSL6 ou vetor vazio. Nota-se que a trasnfecção permanece estável durante a diferenciação das células.



Figura 38 - Expressão relativa de mRNA da ACSL6 em células de músculo esquelético humano transfectadas com vetor vazio ou plasmídeo ACSL6. *** P < 0,001. Média \pm EPM. N= 5.



Figura 39 - Expressão proteica da ACSL6 em células de músculo esquelético humano transfectadas com vetor vazio ou plasmídeo ACSL6, analisadas por Western Blot. A proteína alfa-tubulina foi utilizada como controle de carregamento do gel. N= 3.

Sob estas condições, observou-se um conteúdo TAG semelhante entre as células transfectadas, analisado pela fluorescência do Bodipy (Fig. 40A e B) e pela intensidade relativa de íons TAG por espectrometria de massas (Fig. 41). Além disso, maiores intensidades relativas dos íons de fosfolipídeos foram observadas por espectrometria de massas (íons 725, 756 e 782 no espectro de massas).

A





Figura 40 - A) Figura representativa do acúmulo do marcador fluorescente Bodipy (verde) em em células de músculo esquelético humano transfectadas com vetor vazio ou plasmídeo ACSL6, visualizadas por microscopia de fluorescência (493/503). As gotas lipídicas são consideradas os pontos lipídicos (círculos) com intensidade mais alta. N = 3 replicatas biológicas (culturas diferentes) e N = 7 replicatas experimentais (placas e trasnfecções diferentes na mesma cultura).. **B**) Densidade das gotas lipídicas (número de gotas/área de célula) nestas células. As gotas foram contadas automaticamente através do programa Image J, utilizando uma saturação de fluorescência de 80% e a ferramenta para contagem de partículas. * p<0,05. Média ± EPM . N = 3 replicatas biológicas (culturas diferentes) e N = 7 replicatas biológicas (culturas diferentes) e N = 7 replicatas biológicas (culturas diferentes) e N = 7 replicatas biológicas (culturas diferentes) e N = 3 replicatas biológicas (culturas diferentes) e N = 7 replicatas biológicas (culturas diferentes) e N = 3 replicatas biológicas (culturas diferentes) e N = 7 replicatas experimentais (placas e trasnfecções diferentes na mesma cultura).



Figura 41 - Espectro representativo das análises das espécies lipídicas em células de músculo esquelético humano transfectadas com vetor vazio ou plasmídeo ACSL6. N= 4. Foi utilizado o TAG com massa de 901 (TAG que não está presente nas amostras) para normalização da ionização das espécies lipídicas analisadas. Não houve diferenças nas espécies de triglicerídeos 881, 855 e 808 quando comparamos as células transfectadas com vetor vazio ou ACSL6. Já para os íons das espécies de fosfatidilcolina, encontramos maiores valores para as células que superexpressam a ACSL6 (para a normalização do íon 725 pelo 901, um aumento de 61%; para a normalização do íon 756 pelo 901, um aumento de 60% e; para a normalização do íon 782 pelo 901, um aumento de 89%).

A superexpressão da ACSL6 não aumentou a expressão da proteína DGAT1 (Fig. 42). Além disso, as células que superexpressaram a ACSL6, apresentaram redução da oxidação de palmitato (Fig. 43) e da expressão do mRNA de PGC1α (Fig. 44).



 ^{1 –} Extrato proteico das células trasnfectadas com vetor vazio
 2 – Extrato proteico das células trasnfectadas com ACSL6

Figura 42 - Expressão proteica da DGAT1 em lisado de células de músculo esquelético humano transfectadas com vetor vazio ou plasmídeo ACSL6, analisadas por Western Blot). A proteína tubulina foi utilizada como controle de carregamento. N= 4.



Figura 43 - Oxidação de palmitato em células de músculo esquelético humano transfectadas com vetor vazio ou plasmídeo ACSL6. Etomoxir, um inibidor farmacológico da CPT1, foi usado como controle negativo da beta-oxidação. Média \pm EPM. N= 6.



Figura 44 - Expressão relativa de mRNA de PGC1 α em células de músculo esquelético humano transfectadas com vetor vazio ou plasmídeo de ACSL6. Média ± EPM. N= 4.

DISCUSSÃO

Apesar da síntese e armazenamento de lipídeos no músculo esquelético estarem associados ao desenvolvimento da resistência à insulina em indivíduos sedentários, até o presente momento nenhum estudo havia demonstrado qual das isoformas das ACSLs estão associadas à síntese de lipídeo no músculo esquelético. Dessa maneira, mostramos aqui pela primeira vez que a ACSL6 é responsável pela distribuição das acil-CoA para a síntese de lipídeos. Além disso, outras importantes contribuições pioneiras foram evidenciadas neste estudo: 1 – presença do mRNA da ACSL6 em tecidos de músculos esqueléticos de humanos saudáveis e obesos; 2 – modulação do mRNA da ACSL6 pela dieta hiperlipídica e pela obesidade no músculo de humanos e do exercício físico em músculo de ratos; 3 – associação entre a baixa expressão da ACSL6 e ativação do metabolismo mitocondrial em células de ratos; 4 – associação entre a alta expressão da ACSL6 e repressão do metabolismo mitocondrial em células de ratos.

Os únicos estudos com seres humanos realizados, analisaram isoformas da ACSL em células cancerígenas imortalizadas (Wu et ai, 2011;. Cao et al; 2010; Parkes et al .; 2006) ou a partir de biópsias de tumores da próstata (Fujimura et al, 2014) e intestino (Heimerl et al., 2006), onde foram encontradas uma regulação positiva dos genes de ACSL3 e ACSL1/ACSL4, respectivamente. Até o momento, não havia nenhum estudo na literatura abordando a função das ACSLs em tecidos de seres humanos saudáveis. Aqui, nós descrevemos pela primeira vez a expressão gênica (mRNA) e função da ACSL6 no músculo esquelético humano. A regulação positiva induzida pela refeição hiperlipídica aguda e a β-oxidação inibida em células superexpressando a ACSL6, indicam que a função desta enzima músculo esquelético é distribuir o acil-CoA para a síntese de lipídeos, o que representa uma função ainda não identificada para esta isoforma de ACSL quando superexpressamos a ACSL6 no tecido humano. Porém, observou-se um aumento de espécies de fosfolipídeos, que representam intermediários na síntese de triacilglicerol na via do ácido fosfatídico. Tal fato pode ser explicado por não encontramos diferenças na expressão de proteína DGAT1, o que é essencial para conversão destas espécies em TAGs. A função ACSL6 foi anteriormente descrita em células neuronais de ratos (PC12) e permanecia descrito apenas no cérebro (Soupene et al., 2010; Chen et al, 2011), onde está envolvida na incorporação de ácidos graxos insaturados em TAG e fosfolipídeos (Marszalek et al., 2005).

Caracterizamos adicionalmente a função da ACSL6 no músculo esquelético, utilizando um modelo animal com roedores (ratos wistar). Situações que induzem a β oxidação e inibem a síntese de lipídeos, como jejum de 48h e treinamento aeróbio crônico, diminuíram a expressão gênica de ACSL6. Por outro lado, uma situação que induz síntese de lipídeos, a ingestão aguda de uma refeição rica em lipídeos e açucares, promoveu a regulação positiva da ACSL6. Achados semelhantes foram encontrados anteriormente usando estudos com ratos de jejum (Mashek et al., 2006). Além disso, nas nossas células musculares esqueléticas submetidas ao silenciamento gênico da ACSL6 observou-se uma diminuição dos DAG, TAG e do conteúdo de gotas lipídicas, além de incrementos na oxidação de ácidos graxos. No entanto, estes resultados não foram relacionados com incrementos na expressão ACSL1, responsável por distribuir a acil-CoA para a β oxidação no músculo esquelético (Li et al., 2015). Em contrapartida, observou-se uma regulação negativa desta enzima após o silenciamento da ACSL6. Coletivamente, nossos resultados sugerem que a função da ACSL6 é distribuir acil-CoA para a síntese e armazenamento de TAG.

Surpreendentemente, os ratos submetidos à dieta hiperlipídica crônica e seres humanos obesos demonstraram níveis mais baixos de ACSL6 no músculo esquelético. Como ACSL6 é regulada pelo estado alimentar, provavelmente a expressão deste gene pode ser coordenada pela insulina, assim como demonstrado em cardiomiócitos (Durgan, et al., 2009); por isso, especula-se que os níveis mais baixos de ACSL6 encontrados nos indivíduos pode ser uma consequência da resistência à insulina no músculo esquelético. No entanto são necessários mais estudos para descrever esse mecanismo.

Além disso, a inibição gênica da ACSL6 foi associada à maior capacidade e biogênese mitocondrial em células do músculo esquelético de ratos. Associamos estes efeitos ao aumento dos AGs livres encontrados. Estas moléculas podem atuar como ligantes de PPAR α , um receptor nuclear que regula positivamente a expressão de UCP (Grav et al., 2003). De fato, encontramos maior expressão gênica UCP-2 e UCP-3 e maior respiração no estado *Leak* (estabelecido por oligomicina). As UCPs podem comprometer a eficiência da produção de ATP, aumentando as razões AMP/ATP ou ADP/ATP, um estado energético que ativa a AMPK (Hardie, 2015), como demonstrado aqui pela alta razão p-AMPK/AMPK. A ativação de AMPK regula positivamente a expressão do gene do PGC-1 α (Lee et al., 2006), um importante fator de transcrição de vários genes da cadeia de transporte de elétrons, biogênese mitocondrial, e β -oxidação (Wu et ai, 1999). A regulação positiva da β -oxidação também ocorre por meio da co-ativação de PGC-1 α e das taxas de consumo de oxigênio nos estados respiratórios mitocondriais como *Routine, Leak e Uncoupled*, bem como taxas elevadas de oxidação de palmitato.

Ao provocarmos o silenciamento gênico da ACSL6 observamos também a redução da produção de H₂O₂. Esta queda pode estar associada ao aumento do teor de UCPs na membrana mitocondrial interna (Mailloux e Harper, 2011). Estas proteínas são conhecidas por promover uma discreta redução do potencial de membrana mitocondrial, o que diminui a meia vida dos elétrons na cadeia respiratória e consequentemente a

redução da formação de superóxido (Boveris et ai, 1972;. St-Pierre et ai, 2002). O ânion superóxido é subsequentemente convertido em H₂O₂ pela enzima superóxido dismutase. Embora estas espécies funcionem como moléculas de sinalização, sob condições patológicas elas podem causam estresse oxidativo (para revisão, ver Figeuira et al., 2013). Portanto, a elevada expressão das UCPs induzida pelo silenciamento gênico da ACSL6, poderia proteger a célula contra danos oxidativos. Assim como no estudo de Barreiro et al. (2009), onde miotubos de ratos trasnfectados com vetor para superexpressar a UCP3 reduziram o estresse oxidativo induzido hiperóxia (aumento anormal de O₂). Neste mesmo sentindo, Seifert e colaboradores (2008) mostrarm que mitocôndrias de músculo isoladas de camundongos *knockout* para UCP3, possuem maior produção de EROs.

O desacoplamento brando promovido pela atividade das UCPs pode estar relacionado ao aumento da produção de lactato também observado por nós. Esse desacoplamento pode reduzir a produção de ATP mitocondrial e forçar a célula a aumentar a oxidação de glicose com consequente produção de lactato já que esta seria uma fonte adicional para a síntese de ATP extramitocondrial. De fato, encontramos um aumento da produção de lactato induzido por baixas concentrações (100 nM) do desacoplador químico CCCP. Outros autores demonstraram este fato em diferentes modelos com a utilização do desacoplador mitocondrial clássico, o 2,4-dinitrofenol (DNP). Rognstad e Joseph Katz (1969), demonstraram que o uso de DNP (de 100 nM à 300 nM) em tecido adiposo epididimal de ratos diminuiu a produção total de ATP celular e aumentou a produção de ATP citosólico. Já Desquire et al. (2006), demonstraram em uma linhagem de células tumorais 143B TK⁻ que o tratamento com DNP em baixas concentrações (10 μ M e 50 μ M) por 3 dias também aumentou a produção de lactato.

CONCLUSÃO

Demonstramos pela primeira vez o papel da ACSL6 na distribuição das Acil-CoA em músculo esquelético. Ao contrário das ACSL1 que está relacionada à distribuição de lipídeos para a mitocôndria e consequente β -oxidação (Li et ai, 2015; Ellis et ai, 2011), a ACSL6 conduz as acil-CoA para a síntese de lipídeos evitando que estas sejam oxidadas na mitocôndria.

Além disso, se por um lado a superexpressão da ACSL6 está relacionada à redução da capacidade mitocondrial, sua inibição está envolvida na modulação positiva da capacidade mitocondrial e da oxidação de lipídeos, envolvendo a ativação da via AMPK/PGC1-α. Resumimos todos os mecanismos de ação da ACSL6 na figura 45.



Figura 45 - Mecanismos de ação da ACSL6. Sob condições fisiológicas (**A**), a ACSL1 direciona os acil-CoA para oxidação mitochondrial (Li et al., 2015). Neste estudo, propomos a ACSL6 distribui o acil-CoA para síntese de lipídeos, já que exercício físico e jejum diminuem a expressão gênica de ACSL6 enquanto, o estado alimentado aumenta sua expressão. Em uma situação de silenciamento da ACSL6 (**B**), um aumento no conteúdo de AG, pode induzir a expressão das UCPs. A atividade destas proteínas, podem reuzir a razão ATP/ADP resultando em um aumento da ativação de AMPK, o que por sua vez aumenta a biogênese mitoncdrial e oxidação de ácidos graxos via PGC1 α . Com a superexpressão da ACSL6 (**C**), **a** ACSL6 distribui os acil-CoA para sítios diferentes da mitôndria, aumentando a síntese de fosfolipídeos e diminuendo a expressão de PGC1 α e a oxidação de ácidos graxos. Setas pretas indicam aumento (^) ou diminuição (\downarrow) avaliadas por este estudo, enquanto as setas cinzas indicam mecanismos propostos.

REFERÊNCIAS

- ALBERICI, L.C. Camundongos hiperlipidêmicos transgênicos para a apolipoproteína-CIII tem aumento de catabolismo e atividade do canal mitocondrial de K+ sensível a ATP. Tese de Doutorado (137p). Universidade Estadual de Campinas.
- ALBERICI, R.M.; SIMAS, R.C.; SANVIDO, G.B.; ROMÃO, W.; LALLI, P.M.; BENASSI, M. et al. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the real world. Anal Bioanal Chem. v. 398, p.265–294, 2010.
- ALBERICI. L.C.; OLIVEIRA, H.C.; CATHARINO, R.R.; VERCESI, A.E.; EBERLIN, M.N.; ALBERICI, R.M. Distinct hepatic lipid profile of hypertriglyceridemic mice determined by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. v.401, p.1651–1659, 2011.
- ANDREYEV AY, BONDAREVA TO, DEDUKHOVA AVI, MOKHOVA EM, SKULACHEV VP, TSOFINA LM. The ATP/ADP - antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acid on mitochondria. Eur J Biochem, v.182, p.585-92, 1989.
- ANDREYEV AYU et al. The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria. Eur J Biochem, v. 182, n. 3, p. 585-92, Jul 1989..
- BACHMANN, O.P.; DAHL, D.B.; BRECHTEL, K.; MACHANN, J.; HAAP, M.; MAIER, T.; LOVISCACH;, JACOB, S. Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. **Diabetes**. v.50, p.2579–2584, 2001.
- BARBOSA, M.R.; SAMPAIO, I.H.; TEODORO, B.G.; SOUSA, T.A.; ZOPPI, C.C.;, QUEIROZ, A.L.; PASSOS, M.A.; ALBERICI, L.C.; TEIXEIRA, F.R.; MANFIOLLI, A.O.; BATISTA, T.M.; CAPPELLI, A.P.; REIS, R.I.; FRASSON, D.; KETTELHUT, I.C.; PARREIRAS-E-SILVA, L.T.; COSTA-NETO, C.M.; CARNEIRO, E.M.; CURI, R.; SILVEIRA, L.R. Hydrogen peroxide production regulates the mitochondrial function in insulin resistant muscle cells: effect of catalase overexpression. **Biochim Biophys Acta**. v.1832, n.10, p.1591-604, 2013.
- 8. BARREIRO, E.; GARCIA-MARTÍNEZ, C.; MAS, S.; AMETLLER, E.; GEA, J; ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S; LÓPEZ-SORIANO, F.J. UCP3 overexpression

neutralizes oxidative stress rather than nitrosative stress in mouse myotubes. **FEBS Lett.** v.583, n.2, p.350-6, 2009.

- 9. BERGMEYER, H.U. Methods of Enzymatic Analysis, second edition, Academic Press, New York (NY), 1974.
- BHARADWAJ, M. S.; TYRRELL, D. J.; LENG, I.; DEMONS, J. L.; LYLES, M. F.; CARR, J. J.; NICKLAS, B. J.; MOLINA, A. J. A. Relationships between mitochondrial contente and bioenergetics with obesity, body composition and fat distribution in healthy older adults. BMC Obesity, 2 (40): 01-11, 2015.
- BIZEAU, M.E.; MACLEAN, P.S.; JOHNSON, G.C.; WEI, Y. Skeletal muscle sterol regulatory element binding protein-1c decreases with food deprivation and increases with feeding in rats. J Nutr. v.133, n.7, p.1787-92, 2003.
- BLANC, J. et al. Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis.
 Circulation. v. 107, n. 3, p. 388-90, 2003.
- 13. BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**. v.37, p.911–917, 1959.
- 14. BOSMA, M. Lipid droplet dynamics in skeletal muscle. Exp Cell Res, 2015 Nov6. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.10.023. [Epub ahead of print].
- 15. BOVERIS, N.; OSHINO, B; CHANCE, The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochem. J**. v.128, p.617–630, 1972.
- CAO, A.; LI, H.; ZHOU, Y.; WU, M.; LIU, J. Long chain acyl-CoA synthetase-3 is a molecular target for peroxisome proliferator-activated receptor delta in HepG2 hepatoma cells. J Biol Chem. v.285, n.22, p.16664-74, 2010.
- CASES, S.; SMITH, S.J.; ZHENG, Y.W.; MYERS, H.M.; LEAR, S.R.; SANDE, E.; NOVAK, S.; COLLINS, C.; WELCH, C.B.; LUSIS, A.J.; ERICKSON, S.K.; FARESE, RV JR. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.92, n.22, p.13018-23, 1998.
- CHEN HC, FARESE RV JR. Inhibition of triglyceride synthesis as a treatment strategy for obesity: lessons from DGAT1-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. v.25, n.3, p.482-6, 2005.
- 19. CHEN, J.; BRUNZELL, D.H.; JACKSON, K.; VAN DER VAART, A.; MA, J.Z.; PAYNE, T.J.; SHERVA, R.; FARRER, L.A.; GEJMAN P, LEVINSON DF, HOLMANS P, AGGEN SH, DAMAJ I, KUO PH, WEBB BT, ANTON R, KRANZLER HR, GELERNTER J, LI MD, KENDLER KS, CHEN X. ACSL6 is

associated with the number of cigarettes smoked and its expression is altered by chronic nicotine exposure. **PLoS One**. v.6, n.12, 2011.

- COLEMAN, R.A.; LEWIN, T.M.; VAN HORN, C.G.; GONZALEZ-BARÓ, M.R. Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? J Nutr. v.132, n.8, p.2123-6, 2002.
- COOPER, DE; YOUNG, P.A.; KLETT, E.L.; COLEMAN, R.A. Physiological consequences of compartmentalized acyl-CoA metabolism, J. Biol. Chem. v.290, p.20023-31, 2015.
- 22. CORTRIGHT, R.N.; BASILIO, J.L., BERGGREN, J.R.; HICKNER, R.C.; HULVER, M.W.; DOHM, G.L.; HOUMARD, J.A. Skeletal muscle fat oxidation is increased in African American and white women after 10-days of endurance exercise training. **Obesity.** v.14, p.1201-1210, 2006.
- 23. DESQUIRET V, LOISEAU D, JACQUES C, DOUAY O, MALTHIÈRY Y, RITZ P, ROUSSEL D. Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells. Biochim Biophys Acta. v.1757, n.1, p.21-30, 2006.
- 24. EBERLÉ D, HEGARTY B, BOSSARD P, FERRÉ P, FOUFELLE F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie.** v.86,n.11, p.839-48, 2004.
- 25. EIGENTLER, A.; DRAXL, A.; WIETHÜCHTER, A.; KUZNETSOV, A. V.; LASSING, B.; GNAIGER, E. Laboratory Protocol: Citrate synthase a mitochondrial marker enzyme. Mitochondrial Physiology Network, 17.04(03): 1-11, 2015.
- 26. ELLIS, J.M.; MENTOCK SM, DEPETRILLO MA, KOVES TR, SEN S, WATKINS SM, MUOIO DM, CLINE GW, TAEGTMEYER H, SHULMAN GI, WILLIS MS, COLEMAN RA. Mouse cardiac acyl coenzyme a synthetase 1 deficiency impairs Fatty Acid oxidation and induces cardiac hypertrophy. Mol Cell Biol.v.31, n.6, p.1252-62, 2011.
- 27. FLEURY, C. et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nat Genet**, v. 15, n. 3, p. 269-72, 1997.
- 28. FUJIMURA T, TAKAHASHI S, URANO T, TAKAYAMA K, SUGIHARA T, OBINATA D, YAMADA Y, KUMAGAI J, KUME H, OUCHI Y, INOUE S, HOMMA Y. Expression of androgen and estrogen signaling components and stem cell markers to predict cancer progression and cancer-specific survival in

patients with metastatic prostate cancer. **Clin Cancer Res**. v.20, n.17, p.4625-35, 2014.

- 29. GARLID KD, OROSZ DE, JEZEK P. On the mechanism of fatty acid-induced próton trasnport by mitochondrial uncoupling protein. **J Biol Chem.** v.271, n.5, p.2615-20, 1996.
- GARLID, K. D. et al. How do uncoupling proteins uncouple? Biochim Biophys Acta, v. 1459, n. 2-3, p. 383-9, 2000
- 31. GARLID, K. D. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. **J Biol Chem**, v. 271, n. 5, p. 2615-20, 1996.
- 32. GRAV HJ, TRONSTAD KJ, GUDBRANDSEN OA, BERGE K, FLADMARK KE, MARTINSEN TC, WALDUM H, WERGEDAHL H, BERGE RK. Changed energy state and increased mitochondrial beta-oxidation rate in liver of rats associated with lowered proton electrochemical potential and stimulated uncoupling protein 2 (UCP-2) expression: evidence for peroxisome proliferatoractivated receptor-alpha independent induction of UCP-2 expression. J Biol Chem. v.278, n.15, p.30525-33, 2003.
- 33. GREVENGOED TJ, KLETT EL, COLEMAN RA. Acyl-CoA metabolism and partitioning. **Annu Rev Nutr.** v.34, p.1-30, 2014.
- HADDAD R, SPARRAPAN R, EBERLIN MN. Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. v.20, p.2901–2905, 2006.
- 35. HADDAD R, SPARRAPAN R, KOTIAHO T, EBERLIN MN. Easy ambient sonic-spray ionization-membrane interface mass spectrometry for direct analysis of solution constituents. Anal Chem. v.80, p.898–903, 2008.
- HAN, R.H.; WANG, M.; FANG, X.; HAN, X. Simulation of triacylglycerol ion profiles: bioinformatics for interpretation of triacylglycerol biosynthesis, J. Lipid Res. v.54 p.1023–1032, 2013.
- 37. HARDIE, D.G. AMPK: positive and negative regulation, and its role in wholebody energy homeostasis. **Curr Opin Cell Biol**. v.33, p.1-7, 2014.
- HE, J.; GOODPASTER, B.H.; KELLEY, D.E.. Effects of weight loss and physical activity on muscle lipid content and droplet size, **Obesity**. p.761-69, 2004.

- HEIMERL, S.; MOEHLE, C.; ZAHN A, BOETTCHER A, STREMMEL W, LANGMANN T, SCHMITZ G. Alterations in intestinal fatty acid metabolism in inflammatory bowel disease. Biochim Biophys Acta. v.1762, n.3, p.341-50, 2006.
- 40. HOUMARD JA, HORTOBAGYI, P. D. NEUFER, R. A. JOHNS, D. D. FRASER, R. G. ISRAEL AND G. L. DOHM. Training cessation does not alter Glut-4 protein levels in human skeletal muscle. J Appl Physiol. v.74, p.776-781, 1993.
- KANALEY, J.A.; SHADID, S.; SHEEHAN, M.T.; GUO, Z.; JENSEN, M.D. Relationship between plasma free fatty acid, intramyocellular triglycerides and long-chain acylcarnitines in resting humans, J. Physiol. v.587, p.5939–5950, 2010.
- 42. KANE DA, LIN CT, ANDERSON EJ, KWAK HB, COX JH, BROPHY PM, HICKNER RC, NEUFER PD, CORTRIGHT RN. Progesterone increases skeletal muscle mitochondrial H2O2 emission in nonmenopausal women. Am J Physiol Endocrinol Metab. v.300, n.3, p. E528-35, 2011.
- 43. KRAUSS, S.; ZHANG, C.Y.; LOWELL, B.B. The mitochondrial uncouplingprotein homologues. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v.6, n.3, p.248-61, 2005.
- 44. LEE WJ, KIM M, PARK HS, KIM HS, JEON MJ, OH KS, KOH EH, WON JC, KIM MS, OH GT, YOON M, LEE KU, PARK JY. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1. Biochem Biophys Res Commun. v.340, n.1, p.291-5, 2006.
- 45. LEHNINGER, Albert. Lehninger Principles Of Biochemistry & EBook Author: Albert Lehninger, David L. Nelson, Michael M. Cox, Publisher: W. H. 2008
- 46. LEWIN TM, KIM JH, GRANGER DA, VANCE JE, COLEMAN RA. Acyl-CoA synthetase isoforms 1, 4, and 5 are present in different subcellular membranes in rat liver and can be inhibited independently. J Biol Chem. v.276, n.27, p.24674-9, 2001.
- 47. LI, L.O.; ELLIS JM, PAICH HA, WANG S, GONG N, ALTSHULLER G, THRESHER RJ, KOVES TR, WATKINS SM, MUOIO DM, CLINE GW, SHULMAN GI, COLEMAN RA. Liver-specific loss of long chain acyl-CoA synthetase-1 decreases triacylglycerol synthesis and beta-oxidation and alters phospholipid fatty acid composition. J Biol Chem. v.284, n.41, p.27816-26, 2009.

- 48. LI, L.O.; GREVENGOED TJ, PAUL DS, ILKAYEVA O2, KOVES TR, PASCUAL F, NEWGARD CB, MUOIO DM, COLEMAN RA. Compartmentalized acyl-CoA metabolism in skeletal muscle regulates systemic glucose homeostasis. **Diabetes.** v.64, n.1, p.23-35, 2015.
- 49. LYNGE, C. JUEL, Y. HELLSTEN, Extracellular formation and uptake of adenosine during skeletal muscle contraction in the rat: role of adenosine transporters, **J. Physiol**. v.537, p.597–605, 2001.
- 50. MAILLOUX RJ, HARPER ME. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. Free Radic Biol Med. v.51, n.6, p.1106-15, 2011.
- MARSZALEK JR, KITIDIS C, DIRUSSO CC, LODISH HF. Long-chain acyl-CoA synthetase 6 preferentially promotes DHA metabolism. J Biol Chem. v.280, n.11, p.10817-26, 2005.
- 52. MASHEK DG, BORNFELDT KE, COLEMAN RA, BERGER J, BERNLOHR DA, et al. Revised nomenclature for the mammalian long chain acyl-CoA synthetase gene family. J. Lipid Res. v.45, p.1958–61, 2004.
- 53. MASHEK, D.G.; LI, L.O. COLEMAN, R.A. Rat long-chain acyl-CoA synthetase mRNA, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. J. Lipid Res. v.47, p.2004–2010, 2010.
- 54. NICHOLLS, D. G.; LOCKE, R. M. Thermogenic mechanisms in brown fat. **Physiol Rev**, v. 64, n. 1, p. 1-64, 1984.
- 55. PARKES HA, PRESTON E, WILKS D, BALLESTEROS M, CARPENTER L, WOOD L, KRAEGEN EW, FURLER SM, COONEY GJ. Overexpression of acyl-CoA synthetase-1 increases lipid deposition in hepatic (HepG2) cells and rodent liver in vivo. Am J Physiol Endocrinol Metab. v.291, n.4, p.E737-44, 2006.
- 56. RANDLE PJ, GARLAND PB, HALES CN, NEWSHOLME EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet I. v.13, p.785-9, 1963.
- 57. ROGNSTAD R, KATZ J. The effect of 2,4-dinitrophenol on adipose-tissue metabolism. **Biochem J**. v.111, n.4, p.431–444, 1969.
- 58. ROHAS LM, ST-PIERRE J, ULDRY M, JÄGER S, HANDSCHIN C, SPIEGELMAN BM. A fundamental system of cellular energy homeostasis

regulated by PGC-1alpha. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.104, n.19, p.7933-8, 2007.

- 59. ROUSSET, S. et al. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. Diabetes, v. 53 Suppl 1, p. S130-5, 2004.
- 60. SAKURAI, Y.; TAMURA, Y.; TAKENO, K.; KUMASHIRO;. SATO; KAKEHI, IKEDA; OGURA; SAGA; NAITO; KATAMOTO; FUJITANI;. HIROSE; KAWAMORI; WATADA, H. Determinants of intramyocellular lipid accumulation after dietary fat loading in non-obese men, J. Diabetes Investig. v.2, p.310-17, 2011.
- 61. SEIFERT, E.L.;, BÉZAIRE, V.; ESTEY, C.; HARPER, M.E. Essential role for uncoupling protein-3 in mitochondrial adaptation to fasting but not in fatty acid oxidation or fatty acid anion export. J Biol Chem. v.283, n.37, p.25124-31, 2008.
- 62. SIU, P. M.; DONLEY, D. A.; BRYNER, R. W.; ALWAYS, S. E. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. Journal of Applied Physiology, 94: 555-560, 2003.
- 63. SKULACHEV VP. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorilation. **FEBS Lett.** V.294, p.158-62, 1991.
- 64. SOUPENE E.; DINH NP, SILIAKUS M, KUYPERS FA. Activity of the acyl-CoA synthetase ACSL6 isoforms: role of the fatty acid Gate-domains. BMC Biochem. 2010.
- 65. SRERE, P. A. Citrate synthase. Methods in Enzymology, 13: 3-5, 1969.
- 66. ST-PIERRE, J.A. BUCKINGHAM, S.J. ROEBUCK, M.D. BRAND. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain, J. Biol. Chem. v.277, p.44784–44790, 2002.
- 67. SUZUKI, M.; SHINOHARA, Y.; OHSAKI, Y.; FUJIMOTO, T. Lipid droplets: size matters, J. Electron. Microsc. v.60, p.S101–S116, 2011.
- 68. VAN HORN CG, CAVIGLIA JM, LI LO, WANG S, GRANGER DA, COLEMAN RA. Characterization of recombinant long-chain rat acyl-CoA synthetase isoforms 3 and 6: identification of a novel variant of isoform 6. Biochemistry. v.44, n.5, p.1635-42, 2005.
- 69. VEGA RB, HUSS JM, KELLY DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor in transcriptional control of nuclear

genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. **Mol Cell Biol.** v.20, p.1868–1876, 2000.

- 70. VIDAL-PUIG, A. J. et al. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. **J Biol Chem**, v. 275, n. 21, p. 16258-66, 2000.
- 71. VOET D., VOET JG, PRATT CW. Fundamentals of Biochemestry. John Wiley and Sons, Inc, USA, 2001.
- 72. WALTER HG, GUTKNECHT J. Monocarboxylic acid permation through lipid bilayer membranes. **J Membr Biol**, v.77, n.3, p.255-64, 1984.
- WATKINS PA, MAIGUEL D, JIA Z, PEVSNER J. Evidence for 26 distinct acylcoenzyme A synthetase genes in the human genome. J. Lipid Res.v. 48, p.2736– 50, 2007.
- WENDEL, A.A.; LEWIN, T.M.;, COLEMAN, R.A. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta. v. 1791, p.501-506, 2009.
- 75. WU M, CAO A, DONG B, LIU J. Reduction of serum free fatty acids and triglycerides by liver-targeted expression of long chain acyl-CoA synthetase 3. Int J Mol Med. v.27, n.5, p. 655-62, 2011.
- 76. WU Z, PUIGSERVER P, ANDERSSON U, ZHANG C, ADELMANT G, MOOTHA V, TROY A, CINTI S, LOWELL B, SCARPULLA RC, SPIEGELMAN BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. Cell. v.98, n.1, p.115-24, 1999.
- 77. YAN S, YANG XF, LIU HL, FU N, OUYANG Y, QING K. Long-chain acyl-CoA synthetase in fatty acid metabolism involved in liver and other diseases: an update. World J Gastroenterol. v.21, n.12, p.3492-8, 2015.

ANEXO I – ARTIGOS PUBLICADOS

- Barbosa MR, Sampaio IH, Teodoro BG, Sousa TA, Zoppi CC, Queiroz AL, Passos MA, Alberici LC, Teixeira FR, Manfiolli AO, Batista TM, Cappelli AP, Reis RI, Frasson D, Kettelhut IC, Parreiras-e-Silva LT, Costa-Neto CM, Carneiro EM, Curi R, Silveira LR. Biochim Biophys Acta. 2013 Oct;1832(10):1591-604.
- Teodoro BG, Baraldi FG, Sampaio IH, Bomfim LH, Queiroz AL, Passos MA, Carneiro EM, Alberici LC, Gomis R, Amaral FG, Cipolla-Neto J, Araújo MB, Lima T, Akira Uyemura S, Silveira LR, Vieira E. Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle. J Pineal Res. 2014 Sep;57(2):155-67.
- 3. Deminice R, de Castro GS, Francisco LV, da Silva LE, Cardoso JF, Frajacomo FT, **Teodoro BG**, Dos Reis Silveira L, Jordao AA. Creatine supplementation prevents fatty liver in rats fed choline-deficient diet: a burden of one-carbon and fatty acid metabolism. J Nutr Biochem. 2015 Apr;26(4):391-7.
- 4. Lima TI, Monteiro IC, Valença S, Leal-Cardoso JH, Fortunato RS, Carvalho DP, **Teodoro BG**, Ceccatto VM. Effect of exercise training on liver antioxidant enzymes in STZ-diabetic rats. Life Sci. 2015 May 1;128:64-71.
- 5. da Silva MF, Natali AJ, da Silva E, Gomes GJ, Teodoro BG, Cunha DN, Drummond LR, Drummond FR, Moura AG, Belfort FG, de Oliveira A, Maldonado IR, Alberici LC. Attenuation of Ca2+ homeostasis, oxidative stress, and mitochondrial dysfunctions in diabetic rat heart: insulin therapy or aerobic exercise? J Appl Physiol (1985). 2015 Jul 15;119(2):148-56.
- Baraldi FG, Vicentini TM, Teodoro BG, Dalalio FM, Dechandt CR, Prado IM, Curti C, Cardoso FC, Uyemura SA, Alberici LC. The combination of conjugated linoleic acid (CLA) and extra virgin olive oil increases mitochondrial and body metabolism and prevents CLA-associated insulin resistance and liver hypertrophy in C57Bl/6 mice. J Nutr Biochem. 2016 Feb;28:147-54.