HAROLDO FUJIWARA

**RESPOSTA À INSULINA NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATOS TRATADOS
COM APOCININA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

HAROLDO FUJIWARA

**RESPOSTA À INSULINA NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATOS TRATADOS
COM APOCININA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na biblioteca digital de teses e dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Fujiwara, Haroldo.

Resposta à insulina no músculo esquelético de ratos com apocinina / Haroldo Fujiwara. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Metabolismo Celular.

Versão do título para o inglês: Insulin response in skeletal muscle of rats treated with apocynin.

1. Ácido palmítico 2. Espécies reativas de oxigênio 3. Metabolismo
4. Glicose 5. AKT 6. AMPK I. Curi, Prof. Dr. Rui II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana. III. Título.

ICB/SBIB0200/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Haroldo Fujiwara.

Título da Dissertação: Resposta à insulina no músculo esquelético de ratos com apocinina.

Orientador(a): Prof. Dr. Rui Curi.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep-icb.usp.br

6

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **104** nas fls. **74** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Rui Curi, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Metabolismo do ácido palmítico e resposta à insulina no músculo esquelético de ratos tratados com apocinina** do qual participou(aram) o(s) alunos **Haroldo Fujiwara, Carlos Hermano de Justa Pinheiro**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)** em **04.08.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 05 de agosto de 2009.

Prof. Dr. WOTHIAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEa - ICB/USP

Profa. Dra. PATRICIA GAMA
Secretária
CEEa - ICB/USP

Aos meus pais e ao meu irmão por
tudo o que representam em minha
vida.

Aos meus amigos de laboratório, Prof.
Dr. Rui Curi, José Roberto de
Mendonça, Sandro Massao Hirabara,
Carlos Hermano da Justa Pinheiro,
Kaio Fernando Vitzel, Renato Tadeu
Nachbar e Mariana Papaléo Rosim
por toda ajuda tanto profissional
quanto pessoal.

À minha irmã, Talita Romanatto, que
foi a pessoa que me estendeu a mão
na hora quando mais precisei de
ajuda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que sempre iluminou o meu caminho, mesmo quando lhe dei as costas.

Aos meus pais e ao meu irmão por todo amor e carinho.

Ao meu amigo e orientador, Prof. Dr. Rui Curi, que me acolheu em seu laboratório e acreditou em mim mesmo quando eu havia desistido.

Aos meus grandes amigos, José Roberto de Mendonça, Kaio Fernando Vitzel e Mariana Papléo Rosim, por toda a ajuda profissional e por aguentarem minha chatice nos momentos de estresse e tristeza.

À minha querida irmã Talita Romanatto, que foi a pessoa que impediu que eu abandonasse a pós-graduação e me ofereceu ajuda no momento mais crítico da pós.

Aos meus amigos e parceiros Carlos Hermano Pinheiro, Sandro Hirabara e Renato Nachbar, que possibilitaram a realização deste trabalho.

Às técnicas, Dra. Tatiana Carolina Alba-Loureiro e Ms. Erica Portioli Sanchez por todo o apoio técnico. Sem vocês, o laboratório seria como um motor sem as engrenagens.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia Celular. Em especial, ao Jarlei, Amanda Roque, Diogo e Carlos Flores, que disponibilizaram seu escasso tempo para a realização dos experimentos para minha dissertação. Agradeço também aos meus amigos Renata Gorjão, Hilton e Leonardo por todo apoio quando eu ainda era aluno de iniciação científica.

Aos amigos do ICAFE. Em especial, Profa. Dra. Tânia Cristina Pithon-Curi, Adriana, Vinícius, Prof. Dr. Marcelo Paes de Barros, Tatiana, Prof. Dr. Rafael Lambertucci e Kim Caçula, que disponibilizaram seu tempo e recursos para a realização de meus experimentos.

Aos professores José Cipolla Neto, Vagner Roberto Antunes e Luciana Venturini Rossoni (que integravam a CPG durante meu ingresso), pela compreensão por todos os problemas que eu causei durante a pós-graduação.

Ao José Maria Rodrigues Junior, o pai do pós-graduando. Severo, porém nunca deixa seus filhos na mão.

Aos familiares, amigos do colégio, cursinho, da faculdade e dos outros laboratórios do ICB, cujos nomes não posso mencionar devido à falta de espaço.

À CAPES, CNPq e FAPESP por todo o apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

RESUMO

Fujiwara H. Resposta à insulina no músculo esquelético de ratos com apocinina. [dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Espécies reativas de oxigênio (EROs) controlam o metabolismo de glicose e a atividade da via de sinalização da insulina no músculo esquelético. Contudo, esse assunto ainda permanece controverso. Alguns autores defendem que as EROs antagonizam os efeitos da insulina, enquanto outros pesquisadores acreditam que estas moléculas são permissivas aos efeitos do hormônio. A apocinina (4-hidróxi-3-metoxiacetofenona ou acetovanilona) é um antioxidante bem conhecido por inibir a ação da NADPH oxidase em fagócitos. Contudo, no presente estudo, verificamos que o tratamento com apocinina (10 mg/kg de peso por dia durante 5 dias, i.p.) causa aumento da produção de peróxido de hidrogênio no músculo sóleo de ratos Wistar machos de 100 g de peso corpóreo. Esse aumento na produção de EROs não causou estresse oxidativo, uma vez que o conteúdo de TBARS no músculo e concentrações dos marcadores de estresse oxidativo no plasma não foram elevados. Os efeitos desse tratamento com apocinina sobre o metabolismo de glicose em um modelo de resistência à insulina induzida por ácido palmítico foram então estudados. Os ratos foram tratados como descrito acima, anestesiados e seus músculos sóleos removidos para incubação por uma hora. O tratamento com apocinina aumentou a produção de peróxido de hidrogênio no músculo sóleo, devido à inibição da atividade da glutathione peroxidase, bem como oxidação mais elevada do ácido palmítico. O mesmo tratamento reverteu a resistência à insulina induzida pelo ácido palmítico, restabelecendo a captação de [^3H]-2-desoxi-D-glicose e a [^{14}C]-glicogênio, através de via não dependente de Akt/PKB e AMPK.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Insulina. Apocinina. Espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Fujiwara H. Insulin response in skeletal muscle of rats treated with apocynin. [Masters thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Reactive oxygen species (ROS) control glucose metabolism and insulin signaling in skeletal muscle. However, this issue remains controversial. Yet some researchers postulate that ROS inhibit insulin signaling whereas others propose a permissive role. Apocynin (4-Hydroxy-3-methoxyacetophenone or acetovanillone) is a well-known antioxidant agent that inhibits NADPH oxidase activity in phagocytic cells. However, in the present study, apocynin treatment (10 mg/kg b.w. per day during 5 days) increased hydrogen peroxide production in soleus muscle from 100 g male Wistar rats. This increase did not cause oxidative stress as indicated by the content of muscle thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and plasma concentrations of oxidative stress markers. The effects of this treatment on glucose metabolism in an experimental model of palmitic acid-induced insulin resistance were then investigated. Rats were treated with apocynin, anesthetized and soleus muscles removed for 1 hr. incubation. The treatment increased hydrogen peroxide production in soleus muscle through glutathione peroxidase (GPX) activity inhibition and enhanced palmitic acid oxidation. Apocynin abolished palmitic acid-induced insulin resistance, restoring [^3H]-2-deoxy-D-glucose uptake and [^{14}C]-glycogen synthesis via an Akt/PKB and AMPK independent pathway.

Keywords: Skeletal muscle. Insulin. Apocynin. Reactive oxygen species.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC- acetil-CoA carboxilase

ACG- *cAMP-dependent protein kinase* (proteína quinases dependentes do monofosfato de adenosina cíclico)

ADP- *adenosine diphosphate* (difosfato de adenosina)

AG- ácido graxo

AGE- *advanced glycation end-products* (produtos finais da glicação avançada)

AICAR- *5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribotide* (5-aminoimidazol-4-carboxamida ribotídeo)

AMP- *adenosine monophosphate* (monofosfato de adenosina)

AMPK – *adenosine monophosphate activated protein kinase* (adenosina monofosfato ativada pela proteína quinase)

AMPKK- *AMPK kinase* (AMPK quinase)

ANOVA- análise de variância

APS- *ammonium persulphate* (persulfato de amônio)

AS160- *Akt substrate of 160kDa* (substrato de Akt de 160kDa, também conhecido como TBC1D4)

ATF6 - *activating transcription factor-6* (fator-6 de transcrição ativado)

ATGL- *adipose triglyceride lipase* (lipase de triacilgliceróis do tecido adiposo)

ATP- *adenosine triphosphate* (trifosfato de adenosina)

CAP- *Cbl associated protein* (Proteína Associada à Cbl)

CaMK- *calmodulin-dependent protein kinase* (quinase dependente de calmodulina)

CaMKK- *CaMK kinase* (CaMK quinase)

cAMP- *cyclic adenosine monophosphate* (adenosina monofosfato cíclico)

CoA- coenzima A

CPT-I- carnitina palmitoil-transferase-I

CuZnSOD- cobre-zinco SOD (citoplasmática)

DAG- diacilglicerol

DGAT- *diacylglyceride acyltransferase* (diacilglicerídeo aciltransferase)

DMEM- *Dulbelco's Modified Eagle Medium*

EDTA- *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EDL- extensor digital longo

EPM- erro padrão da média

ERK 1/2- *extracellular-signal-regulated kinases 1/2* (quinases reguladas por sinal extracelular 1/2)

EROs- espécies reativas de oxigênio

FABP_{PM}- *plasma membrane fatty acid binding protein* (proteína de membrana plasmática ligante de ácido graxo)

FAT/CD36- *fatty acid translocase* (translocase de AG)

FATP -*fatty acid transport proteins* (proteínas transportadoras de AGs)

FeSOD- ferro SOD

G6P- glicose-6-fosfatase

GLUT4 - *glucose transporter 4* (transportador de glicose-4)

GPAT- *glycerol-3-phosphate acetyltransferase* (glicerol-3-fosfato acetiltransferase)

GPX- glutationa peroxidase

GSH- glutationa reduzida

GSK3- *glycogen syntase kinase 3* (glicogênio sintetase quinase 3)

GSSG- glutationa oxidada

GDP- *guanidine diphosphate* (difosfato de guanidina)

Grb-2- *growth receptor binding-2* (receptor ligante de crescimento-2)

GTP- *guanidine triphosphate* (trifosfato de guanidina)

HRP- *horseradish peroxidase* (peroxidase de raiz forte)

HSL- *hormone sensitive lipase* (lipase hormônio sensível)

IKK β - *inhibitor kinase $\kappa\beta$* (inibidor $\kappa\beta$ quinase)

IL-6- interleucina-6

IRE1- *inositol requiring enzyme 1* (enzima 1 dependente de inositol)

IRS- *insulin receptor substrate* (substrato do receptor de insulina)

JNK- c-Jun N-terminal quinase

LPS- lipopolissacarídeo

MAGL- *monoacylglycerol lipase* (lipase de monoacilglicerol)

MAPK- *mitogen-activated protein kinase* (proteína quinase ativada por mitógeno)

MnSOD- manganês SOD (mitocondrial)

MPO- mieloperoxidase

NAC- N-acetilcisteína

NADPH- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NF- $\kappa\beta$ - *Nuclear Factor $\kappa\beta$* (fator nuclear $\kappa\beta$)

NiSOD- níquel SOD

p38 MAPK- p38 *Mitogen-Activated Protein Kinase* (p38 proteína quinase ativada por mitógeno)

PBS- *phosphate buffered saline* (salina tamponada por fosfato)

PDH- piruvato desidrogenase

PDK-1- *phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (proteína quinase dependente de fosfoinosítideo-1)

PERK - *PKR-like eukaryotic initiation factor 2a kinase* (PKR quinase)

PFK- *phosphofructokinase* (fosfofrutoquinase)

PI-3,4,5-P3/PIP3- *phosphatidilinositol-3,4,5-triphosphate* (fosfatidilinositol -3,4,5-trisfosfato)

PI3K- *phosphatidil inositol-3-kinase* (fosfatidil-inositol-3-quinase)

PKB/Akt- *protein kinase B* (proteína quinase B)

PKC- *protein kinase C* (proteína quinase C)

RAGE- receptor para AGE

Ser- serina

SOD- superóxido dismutase

SHC- *Src Homology Collagen*

TAG- triacilglicerol

TBARS- *thiobarbituric acid reactive species* (espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico)

TBP- *thiorredoxin binding protein* (proteína ligante de tiorredoxina)

TEMED- tetrametiletenodiamino

Thr- *threonine* (treonina)

TLR-4 -*Toll-Like Receptor-4*

TNF- α - *Tumoral Necrosis Factor- α* (fator de necrose tumoral α)

TRIS- *tris(hydroxymethyl)aminomethane* (tris-hidroximetil-aminometano)

TRX- tiorredoxina

U. A.- unidades arbitrárias

UCP- *uncoupling proteins* (proteínas desacopladoras)

SUMÁRIO

<u>1 INTRODUÇÃO</u>	15
1.1 Considerações Preliminares	15
1.2. Espécies Reativas de Oxigênio	15
1.3 Produção de EROs no Músculo Esquelético	16
1.3.1 Produção de EROs na Mitocôndria	17
1.3.2 Complexo NADPH Oxidase	18
1.3.3 Sistema Xantina-Xantina Oxidase	20
1.4 Sistemas Antioxidantes no Músculo Esquelético	21
1.4.1 Sistema Glutationa Peroxidase/Glutationa Redutase	22
1.4.2 Superóxidos Dismutases	23
1.4.3 Catalase	24
1.4.4 Tiorredoxina	25
1.5 Via de Sinalização da Insulina no Músculo Esquelético	26
1.6 Efeitos das EROs na Via de Sinalização da Insulina	29
1.6.1 Efeitos das EROs na Inibição da Via de Sinalização da Insulina	29
1.6.1.1 Ativação de Serina Quinases	30
1.6.1.2 Estresse de Retículo Endoplasmático	31
1.6.1.3 Efeito dos Ácidos Graxos Saturados Sobre a Produção de EROS	31
1.6.1.4 Vias de Sinalização da Resposta Inflamatória: TNF- α E TLR-4	32
1.6.1.5 Hiperglicemia	32
1.6.2 Evidências de que as EROs são Permissivas à Captação de Glicose	33
1.6.2.1 AMPK	34
1.6.2.2 p38 MAPK	35
1.6.2.3 Inibição da GPX/Depleção de GSH	35
1.6.2.4 Canais de Cálcio	35
1.6.2.5 Relações entre EROs e Espécies Reativas de Nitrogênio	36
1.7 Metabolismo de Ácido Graxo no Músculo Esquelético	36
1.8 Apocinina	39
<u>2 JUSTIFICATIVA</u>	43
<u>3 OBJETIVOS</u>	44
<u>4 MATERIAIS E MÉTODOS</u>	45

4.1 Tratamento com Apocinina na Produção de Peróxido de Hidrogênio em Células Musculares Cultivadas.....	45
4.2 Animais Utilizados nos Estudos <i>In Vivo</i>	45
4.3 Tratamento dos Ratos com Apocinina	46
4.4 Incubação dos Músculos Sóleo e EDL.....	46
4.5 Ensaio da Oxidação da Sonda AMPLEX Ultrared®.....	46
4.6 Determinação do Conteúdo de TBARS	47
4.7 Determinação da Atividade da Catalase.....	48
4.8 Determinação da Atividade da Glutathione Peroxidase.....	48
4.9 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase	49
4.10 Concentração de Glutathione Oxidada e Reduzida.....	49
4.11 Concentração de Ácido Úrico Plasmático	49
4.12 Concentração de Ferro Plasmático	50
4.13 Captação de [³ H]-2-Desoxi-D-Glicose e Síntese de [¹⁴ C]-Glicogênio.....	50
4.14 Preparação da Solução de Ácido Palmítico e Albumina.....	51
4.15 Oxidação do [U- ¹⁴ C]-Ácido Palmítico	51
4.16 Análise do Conteúdo Proteico por <i>Western Blotting</i>	52
4.17 Determinação de Proteínas pelo Método de Bradford.....	54
4.18 Análise Estatística.....	55
5 RESULTADOS	56
5.1 Produção de EROs em Células Musculares Cultivadas	56
5.2 Avaliação da Produção de EROs em Músculo Sóleo e EDL.....	57
5.3 Conteúdo de TBARS	58
5.4 Atividade da Catalase.....	59
5.5 Atividade da Glutathione Peroxidase.....	60
5.6 Atividade da Superóxido Dismutase.....	61
5.7 Concentração de Glutathione Oxidada e Reduzida	62
5.8 Concentração de Ácido Úrico Plasmático	64
5.9 Concentração de Ferro Plasmático	64
5.10 Captação de [³ H]-2-Desoxi-D-Glicose.....	65
5.11 Síntese de [¹⁴ C]-Glicogênio a Partir da [¹⁴ C]-D-Glicose	66
5.12 Oxidação do [U- ¹⁴ C]-Ácido Palmítico	67
5.13 Análise do Conteúdo Proteico por <i>Western Blotting</i>	68
6 DISCUSSÃO	71

6.1 Produção de EROs.....	71
6.2 Efeitos da Apocinina na Captação e Metabolismo de Glicose.....	72
6.3 Efeitos da Apocinina no Metabolismo de Ácidos graxos	74
<u>7 CONCLUSÕES</u>.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICE- Artigos Publicados e em Publicação	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Preliminares

A apocinina é um antioxidante bem conhecido por inibir a ação do complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) oxidase em fagócitos. Contudo, alguns pesquisadores (Castor et al., 2010; Riganti et al., 2006) demonstraram que o tratamento com injeções diárias de apocinina pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em alguns tecidos, como o músculo esquelético.

O efeito de EROs no metabolismo de glicose no músculo esquelético também é ainda controverso. Há autores indicando que o aumento da produção de EROs inibe o metabolismo de glicose e reduz os efeitos da insulina (Chambers et al., 2009). Outros autores, por sua vez, defendem o oposto: as EROs seriam permissivas à captação e metabolismo de glicose e potencializariam a ação da insulina (Loh et al., 2009).

O presente estudo teve como objetivos investigar os efeitos do tratamento com apocinina na produção de EROs no sóleo, bem como no metabolismo e captação de glicose no músculo esquelético. Foram investigadas as alterações no metabolismo de glicose e ácidos graxos e na resposta à insulina no músculo sóleo, assim como a produção de EROs, induzida pelo tratamento com apocinina durante 5 dias, na dose de 10 mg por quilograma de animal. Os resultados são importantes para compreender a participação do estresse oxidativo no controle do metabolismo do músculo esquelético.

1.2 Espécies Reativas de Oxigênio

As EROs são moléculas que apresentam alta reatividade com compostos orgânicos. Essas espécies podem ser: 1) radicalares, quando possuem um elétron *spin* desemparelhado na última camada e, por isso, são mais reativas, como o ânion radicalar superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$); e 2) não radicalares, que não possuem elétron desemparelhado na última camada e, por isso, são mais estáveis, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio molecular (O_2).

As EROs regulam várias funções celulares e são importantes durante a ação da insulina no músculo esquelético, quando há aumento no influxo de cálcio mediado por peróxido de hidrogênio (Espinosa et al., 2008), na proliferação, contração muscular (Reid, 1992) e na regeneração muscular (Tidball, 2005). As EROs em excesso causam danos nas células por oxidação de fosfolipídios de membranas, proteínas, e DNA. É importante, portanto, a depuração do excesso de EROs produzidas. A concentração intracelular de EROs é controlada pelo equilíbrio entre a síntese e a degradação dessas moléculas. Em altas concentrações, as EROs (pelo excesso de produção ou insuficiência de depuração) levam à condição de estresse oxidativo.

As células mantêm equilíbrio entre a síntese e a degradação das EROs através da ação de antioxidantes (Bloch-Damti, Bashan, 2005), as quais diminuem, previnem ou reparam danos causados por estas espécies em macromoléculas (Halliwell, Gutteridge, 2007). Há antioxidantes que convertem radicais livres e EROs em produtos menos reativos (Harris, 1992). Outros agentes antioxidantes são oxidados pelas EROs, reduzindo seu conteúdo na célula (Adachi et al., 2004; Ferreira, Reid, 2008), ou por outras moléculas anteriormente oxidadas, revertendo-as à sua forma inicial reduzida, contribuindo para a redução de danos causados pela oxidação (Halliwell, Gutteridge, 2007).

1.3 Produção de EROS no Músculo Esquelético

As EROs participam de vários processos no músculo esquelético, como a sobrevivência celular, inflamação, diferenciação e regeneração, além da gênese e função das mitocôndrias (Barbieri, Sestili, 2011). As EROs ainda apresentam importância na contração das fibras musculares.

Há três sistemas principais de produção de EROs no músculo esquelético: cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, o complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) oxidase e o sistema xantina-xantina oxidase.

1.3.1 Produção de EROS na Mitocôndria

As mitocôndrias são a principal fonte de EROs no músculo esquelético em repouso (Figura 1). As mitocôndrias obtêm elétrons a partir do NADH pelo complexo I e do succinato pelo complexo II. A ubiquinona faz a transferência destes elétrons para o complexo III, que reduz o complexo IV. Este, por sua vez, reduz o oxigênio molecular, ao mesmo tempo que captura prótons da matriz para o espaço intermembrana, formando moléculas de água (conforme revisado por Irrcher et al., 2011). As mitocôndrias produzem o ânion radicalar superóxido pela redução incompleta do O_2 com elétrons dos componentes iniciais e intermediários da cadeia de transporte de elétrons. Para Dikalov (2011), os complexos I e III são os principais sítios de produção de EROs em condições fisiológicas. As reações catalisadas pelas enzimas α -cetoglutarato desidrogenase (formação de NADH a partir da oxidação do α -cetoglutarato), acil-CoA desidrogenase (geração de elétrons a partir da oxidação de acil-CoA) e glicerol-3-fosfato desidrogenase (geração de elétrons a partir da oxidação de glicerol-3-fosfato) são outras fontes de produção de superóxido na mitocôndria (Brand, 2010; St. Pierre et al., 2002; Starkov et al., 2009; Tahara et al., 2009). Estima-se que 2 a 5 % do oxigênio consumido pelo ser humano é convertido a superóxido (Powers et al., 2011). Para outros autores (Barja, 1999; Boveris, Chance, 1973; Loschen et al., 1974; Muller et al., 2004), porém, os complexos I e III da mitocôndria são os principais locais de “vazamento” de elétrons devido aos sítios ferro-enxofre e semiquinona Q_0 , respectivamente (Muller et al., 2004). Uma porção do complexo III se situa em ambos os lados da membrana interna da mitocôndria, fazendo com que parte da produção de superóxido seja lançada no citoplasma. Uma fração do ânion radicalar superóxido produzido é dismutada pela atividade da superóxido dismutase a peróxido de hidrogênio, espécie menos reativa. As mitocôndrias possuem, ainda, as proteínas desacopladoras 2 e 3 (*Uncoupling Protein 2/3* –UCP 2/3), cuja função é ainda controversa, mas atribui-se a elas o controle da produção de peróxido de hidrogênio e superóxido. As EROs produzidas pela mitocôndria causa a formação do 4-hidroxinonenal, através da peroxidação de ácidos graxos insaturados. Esta molécula causa a ativação das UCPs, as quais permitem a entrada de prótons na matriz mitocondrial, levando a atenuação da atividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Brand, Esteves, 2005).

Conforme já mencionado, a mitocôndria é a principal fonte de produção de EROs no músculo esquelético no estado de repouso (Reid et al., 1992; Sahlin et al., 1992). Contudo, durante o exercício físico, outros sítios de produção de EROs tornam-se importantes (St. Pierre et al., 2002).

Figura 1 - Representação esquemática da cadeia de transporte de elétrons e produção de superóxido

Cada complexo da cadeia de transporte de elétrons causa redução do oxigênio molecular a superóxido, retirando elétrons pela oxidação de NADH a NAD^+ , da oxidação de succinato a fumarato e da oxidação da semiquinona (Q_0). Tais oxidações geram gradiente de prótons para o espaço intermembrana mitocondrial. Esses prótons são, mais tarde, captados pelo complexo IV e usados para a formação de água ou peróxido de hidrogênio após reduções posteriores do superóxido. Fonte: Dikalov (2011).

1.3.2 Complexo NADPH Oxidase

O complexo NADPH oxidase (Lambeth, 2004) utiliza o NADPH como doador de elétrons para o oxigênio molecular, levando a formação de ânion superóxido. Existem cinco isoformas da NADPH oxidase, conhecidas também como NOX de 1 a 5 (Bedard, Krause, 2007). A isoforma NOX2 é a mais abundante no músculo esquelético, sendo também capaz de oxidar NADH (Javesghani et al., 2002). O músculo esquelético do ser humano apresenta as isoformas NOX2 e NOX4 (Cheng

et al., 2001). A NOX2 apresenta duas subunidades integrais na membrana plasmática (gp91^{phox} e p22^{phox}) e três subunidades citossólicas reguladoras (p40^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox}) (Babior, 2000; Vignais, 2002). Além disso, a NOX2 pode ser regulada pela proteína G Rac (Booch, Diebold, 2002; Vignais, 2002). Li e Reid (2000) mostraram que o processo de ativação das NOXs no músculo esquelético é muito semelhante a de fagócitos. O complexo NADPH oxidase está presente no sarcolema, no retículo sarcoplasmático e túbulos das células musculares. O peróxido de hidrogênio é gerado via dismutação do superóxido produzido (Dikalov, 2011). Há evidências de que o complexo NADPH oxidase é ativado pela via de sinalização de receptores do tipo 1 de angiotensina II (Javesghani et al., 2002; Wei et al., 2006). Esses receptores de angiotensina ativam a proteína quinase C, fosforilando a subunidade p47^{phox} da NADPH oxidase, ativando seu acoplamento às subunidades transmembrana (Dikalov, 2011). O mesmo receptor também pode ativar a c-Src, levando à ativação da proteína G Rac, possibilitando o acoplamento das subunidades da enzima (Figura 2). Há, ainda, *cross-talking* entre NADPH oxidase e mitocôndria conforme revisado por Dikalov (2011), onde canais de potássio mitocondriais dependentes de ATP podem ser ativados por peróxido e superóxido oriundos da NADPH oxidase. Por outro lado, o superóxido produzido na mitocôndria pode ativar a NADPH oxidase na membrana plasmática.

Figura 2 - Representação esquemática da ativação do complexo NADPH oxidase e da produção de superóxido

A formação de GTP permite o acoplamento das subunidades citossólicas às subunidades de membrana, ativando a NADPH oxidase. Com isso, esse complexo é oxidado a NADP^+ e os elétrons gerados no processo são utilizados para a redução do oxigênio molecular a superóxido e, posteriormente, peróxido de hidrogênio.

Fonte: Assari (2006).

1.3.3 Sistema Xantina – Xantina Oxidase

Outra fonte de EROs no músculo esquelético é a reação catalisada pela xantina oxidase (Figura 3), principalmente durante condições de hipóxia-reoxigenação (Clanton et al., 1999). A atividade da xantina oxidase é muito elevada no citoplasma de células musculares de ratos, mas é muito baixa em células musculares humanas (Powers et al., 2011). A xantina oxidase é formada pela oxidação dos grupos tióis da xantina desidrogenase, ambas isoenzimas da xantina oxirredutase. No estado basal, há prevalência da atividade da xantina desidrogenase, porém, em situações como a de hipóxia-reperfusão, há maior formação de xantina oxidase. A xantina desidrogenase transfere elétrons liberados durante as oxidações da hipoxantina para o NAD^+ , gerando NADH (Gomez-Cabrera et al., 2009; Kayani et al., 2008). A xantina oxidase, contudo, catalisa a oxidação de hipoxantina em xantina e, posteriormente, a oxidação de xantina em ácido úrico. Os elétrons perdidos pela hipoxantina e pela xantina causam redução incompleta do

oxigênio molecular gerando superóxido (Gomez-Cabrera et al., 2009; Kayani et al., 2008; Sachdev, Davies, 2008). O aumento da formação de hipoxantina ocorre em condições de hipóxia ou isquemia, aumentando a conversão de ATP em ADP, AMP, inosina e, finalmente, hipoxantina (Amaya et al., 1990; Nishino et al., 2005; Nishino, Nishino, 1997; Rasmussen et al., 2000).

Figura 3 - Representação esquemática da produção de superóxido através da oxidação da hipoxantina a ácido úrico pela xantina oxidase.

A xantina desidrogenase e a xantina oxidase causam oxidação da hipoxantina em xantina e depois em ácido úrico, diferindo apenas noceptor final dos elétrons (NAD⁺ para xantina desidrogenase e oxigênio molecular para xantina oxidase). Situações de hipóxia-reperfusão favorecem a conversão do ATP a hipoxantina e da xantina desidrogenase para xantina oxidase, aumentando a produção de superóxido.

Fonte: Sachdev, Davies (2008).

1.4 Sistemas Antioxidantes no Músculo Esquelético

São conhecidos três sistemas enzimáticos antioxidantes importantes no músculo esquelético: o sistema glutatona peroxidase/glutatona redutase, as isoformas da enzima superóxido dismutase e a enzima catalase.

1.4.1 Sistema Glutationa Peroxidase/Glutationa Redutase

Entre os sistemas antioxidantes do tecido muscular destaca-se aquele composto pela glutathiona (GSH), glutathiona peroxidase (GPX) e glutathiona redutase (GR). A GSH é um tripeptídeo formado pelas moléculas de cisteína, glutamina e glicina. Devido a presença do resíduo de cisteína, a GSH possui um grupo tiol em sua molécula que é facilmente oxidado por EROs ou moléculas anteriormente oxidadas. A GPX catalisa a oxidação de duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH) para uma molécula de glutathiona oxidada (GSSG), formando uma ligação dissulfeto entre as duas moléculas de GSH, reduzindo o peróxido de hidrogênio à água pela transferência de elétrons da glutathiona. A GR converte a molécula de GSSG em duas de GSH, oxidando NADPH em NADP^+ , com rompimento da ligação dissulfeto da GSSG e restauração dos os grupos tíois reduzidos do GSH, restabelecendo a capacidade antioxidante do sistema (Ferreira, Reid, 2008; Ji, 2007; Oktyabrsky, Smirnova, 2007) (Figura 4).

Figura 4 - Reação de redução do peróxido de hidrogênio a água pela glutathiona reduzida (GSH).

A glutathiona peroxidase catalisa a redução de peróxido de hidrogênio a água através da oxidação de duas moléculas de GSH para uma de glutathiona oxidada (GSSG). A glutathiona redutase reduz uma molécula de GSSG para duas de GSH, através da oxidação de uma molécula de NADPH para NADP^+ .

Fonte: Ferreira e Reid (2007-modificado)

1.4.2 Superóxido Dismutases (SOD)

As enzimas SOD (Figura 5) apresentam atividades significativas no tecido muscular, catalisando a conversão do $O_2\bullet^-$ em H_2O_2 , oxidando o íon metálico complexado em sua composição para ceder elétrons ao superóxido (Turrens, 2003). As atividades dessas enzimas no músculo esquelético foram descritas por Ferreira e Reid (2008) e Turrens (2003). Há uma isoforma mitocondrial (MnSOD – que possui manganês complexado em sua estrutura) e outra citoplasmática (CuZnSOD –que possui cobre e zinco complexados em sua estrutura) da SOD. Há, ainda, a FeSOD (possui ferro em sua estrutura) que foi isolada de plantas e bactérias e a NiSOD (possui níquel em sua estrutura) e que foi isolada de organismos procariotos.

Figura 5 - Representação esquemática da atividade das superóxidos dismutases (SOD) mitocondrial (MnSOD) e citossólica (CuZnSOD).

As isoformas da SOD promovem redução do superóxido a peróxido de hidrogênio por meio da oxidação dos íons metálicos complexados na enzima (cobre, manganês ou zinco, dependendo da isoforma).

Fonte: Jackson (2009).

1.4.3 Catalase

A catalase converte duas moléculas de H_2O_2 em duas de H_2O e uma de O_2 , mas apresenta baixa atividade na musculatura esquelética (Ferreira, Reid, 2008; Turrens, 2003)(Figura 6). A catalase possui um grupo HEME e, portanto, contém íons ferro III (Fe^{3+}) complexados em sua molécula. A catalase reduz a primeira molécula de peróxido a água, formando um intermediário iônico radicalar através da oxidação do Fe^{3+} para Fe^{4+} pelo átomo de oxigênio retirado do peróxido. Em seguida, esse intermediário reage com outra molécula de peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio molecular, restaurando a enzima ao seu estado inicial.

Figura 6 - Reação de redução do peróxido de hidrogênio a água catalisada pela catalase

A enzima causa redução de uma molécula de peróxido de hidrogênio através da retirada de um átomo de oxigênio, que se complexa com a própria molécula. Em seguida, o átomo de oxigênio complexado na enzima reage com outra molécula de peróxido, promovendo uma segunda redução e a restauração da enzima ao seu estado inicial.

Fonte: <http://metallo.scripps.edu/promise/CATALASE.html> (2012).

1.4.4 Tiorredoxina

As tiorredoxinas (TRX) são polipeptídeos que contêm dois resíduos de cisteína. Estes reduzem grupos dissulfetos a tióis, doando elétrons aos átomos de enxofres de cisteínas e de outros (poli) peptídeos como a glutatona. Existem duas isoformas: a TRX-1 (presente no citossol das células) e a TRX-2 (presente nas mitocôndrias). As TRXs são novamente reduzidas ao oxidarem moléculas de NADPH. A ação das TRX é regulada, principalmente, pela proteína ligante da tiorredoxina (*thiorredoxin binding protein* -TBP, também conhecida como Txnip ou VDUP-1), a qual se liga à TRX, impedindo sua ação (Yoshioka et al., 2006).

Embora tenham sido melhor estudadas em músculo liso (Berndt et al., 2007; Yoshioka et al., 2006), Yoshihara et al. (2010) mostraram que a inibição da TBP-2 causa aumento da sensibilidade à insulina no músculo esquelético. Os autores demonstraram no mesmo estudo, ainda, que a superexpressão da TBP-2 aumenta a resistência à insulina no músculo esquelético.

1.5 Via de Sinalização à Insulina no Músculo esquelético

As vias de sinalização à insulina no músculo esquelético foram revisadas por vários pesquisadores, entre eles Rowland et al.(2010) e Wu et al. (2010). O receptor transmembrana de insulina é formado por duas subunidades alfa e duas beta. A ligação do hormônio na subunidade alfa do receptor ativa a tirosina quinase da subunidade beta, causando autofosforilação do receptor. Uma vez fosforilado, substratos citossólicos ligam-se ao receptor e também são fosforilados, dentre eles o substrato do receptor de insulina (*insulin receptor substrate* –IRS). Existem quatro isoformas de IRS de 1 a 4 (Pearce et al., 2010; Turban, Hajduch, 2011), sendo o IRS-1 o principal substrato do receptor de insulina no músculo esquelético. O IRS-1 fosforilado recruta a fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K) através da subunidade reguladora p85, levando à ativação da subunidade catalítica p110. PI3K catalisa a formação do fosfatidilinositol -3,4,5-trisfosfato (*phosphatidilinositol-3,4,5-triphosphate* -PI-3,4,5-P3; PIP3) na membrana plasmática. O PIP3 age como segundo mensageiro e ativa várias vias de sinalização, resultando na ativação de proteínas serina (Ser)/treonina (Thr) quinases, dentre elas a proteína quinase B (PKB, também conhecida como Akt), resultando na fosforilação de vários substratos dependentes da Akt. Essa quinase está envolvida em vários efeitos biológicos da insulina, dentre eles, a translocação do transportador de glicose-4 (*glucose transporter 4* –GLUT4) de vesículas intracelulares para a membrana plasmática, permitindo a captação de glicose pelo tecido. A fosforilação da Akt também causa ativação de vias metabólicas, como a fosforilação da glicogênio sintetase quinase 3 (GSK3), ativando a síntese do glicogênio. As proteínas quinases C (PKC) atuam como contra-reguladores da PI3K, diminuindo a translocação de GLUT4 mediada por insulina. Pertencem à família das proteína quinases dependentes do monofosfato de adenosina cíclico (*cAMP-dependent protein kinase* -ACG) e são ativadas por lípidos, como o diacilglicerol (DAG) e as ceramidas. Existem vários tipos de PKC: as convencionais (α , β 1, β 2 e γ), as enoveladas (δ , ϵ , η e θ), e as atípicas (ζ e λ/τ), conforme revisado por Pearce et al. (2010) e Turban, Hajduch (2011). As PKC atípicas são ativadas por ceramidas, enquanto as convencionais e enoveladas são ativadas por DAG.

A Akt apresenta três isoformas conhecidas: Akt1, Akt2 e Akt3. A Akt2 é a mais frequente no músculo esquelético. A ativação requer translocação do citoplasma para a membrana plasmática. A Akt possui vários sítios regulatórios ativados por fosforilação. A fosforilação em Thr³⁰⁸ pela PI(3,4,5)P3 é mediada pela proteína quinase dependente de fosfoinosítideo-1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase-1* -PDK-1) e resulta na translocação da Akt para a membrana plasmática. Outro sítio regulador conhecido é a Ser⁴⁷³, presente no carbono terminal na porção hidrofóbica da Akt. Animais com nocaute para este sítio apresentam baixa translocação de GLUT4 para a membrana plasmática na presença de insulina.

O GLUT4 contém 12 domínios transmembrana, conforme revisado por Huang, Czech (2007), e pertence à família de proteínas transportadoras de glicose através da membrana via difusão facilitada. O substrato de Akt de 160kDa (*Akt substrate of 160kDa* -AS160, também conhecido como TBC1D4) é o intermediário entre os processos de ativação da Akt e a translocação do GLUT4 das vesículas intracelulares para a membrana plasmática. O AS160 está presente na superfície das vesículas que contém GLUT4, estando voltado ao citossol, ligado a uma Rab-GTPase. A fosforilação da AS160 pela Akt causa a sua inativação e o fornecimento de GTP a Rab, permitindo a translocação do GLUT4 das vesículas para a membrana plasmática. Porém, o GLUT4 pode ser translocado para a membrana por vias independentes da insulina no músculo esquelético, como ocorre durante a contração. Nesse caso, a fosforilação do AS160 no músculo esquelético é mediada pela adenosina monofosfato ativada pela proteína quinase (AMPK). Contudo, mesmo ocorrendo inibições nas vias de Akt e AMPK, ainda pode haver alguma translocação do GLUT4 para a membrana do músculo esquelético durante a contração muscular, sugerindo que outras vias estão envolvidas nesse processo (Huang, Czech, 2007).

A GSK3 é uma serina/treonina quinase que possui duas isoformas: alfa e beta, cujo peso varia entre de 51~53 kDa e 47 kDa, respectivamente. Animais nocaute para a isoforma alfa são viáveis, enquanto deleções da isoforma beta são letais (Henriksen, 2010). Como descrito anteriormente, a ativação/fosforilação da GSK3 é mediada pela Akt. Suas ações incluem a inibição da síntese de glicogênio e de proteínas, além da fosforilação em Ser³³² do IRS-1 e Ser⁴⁸⁴ do IRS-2, inibindo, assim, a ação da insulina. Esse último efeito constitui um dos mecanismos de

resistência à insulina, uma vez que as fosforilações em serina fazem com que o IRS deixe de responder à ativação do receptor de insulina (Figura 7).

Figura 7 - Representação esquemática da via de sinalização da insulina e translocação da proteína transportadora de glicose (GLUT-4) do citossol para a membrana plasmática

A ligação da insulina ao seu receptor promove a autofosforilação das subunidades transmembranas, levando a fosforilações posteriores do substrato do receptor de insulina (IRS), proteína quinase B (Akt) e glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3). Esses eventos levam à translocação do transportador de glicose (GLUT-4) para a membrana e à síntese de glicogênio.

Fonte: Henriksen (2010).

Outras vias de translocação da GLUT-4 através da sinalização de insulina envolvem a proteína associada à Cbl (*Cbl associated protein*- CAP) e a proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*- MAPK), ambas revisadas por Hirabara et al. (2012). A via da CAP foi revisada por Baumann et al. (2000), Hu et al. (2003), Liu et al. (2002), Liu et al. (2005), Mitra et al. (2004) e consiste no recrutamento da proteína substrato associada pelo receptor de insulina, após sua ativação. Esse recrutamento leva à fosforilação da Cbl e posterior recrutamento da CAP, causando a conversão de GDP-TC10 em GTP-TC10, que, por sua vez, irá causar a translocação de GLUT-4. A via da MAPK consiste na ativação

desta pela associação do receptor ligante de crescimento-2 (*growth receptor binding-2* - Grb-2) com a *Src Homology Collagen* (Shc), após a ativação do receptor de insulina (Chardin et al., 1993; Egan et al., 1993; Skolnik et al., 1993). Esta ativação faz com que a MAPK fosforile a GSK3, permitindo a translocação de GLUT-4, mas a participação desta via na captação de glicose é pequena (Nystrom, Quon, 1999).

1.6 Efeito das EROS na Via de Sinalização à Insulina

1.6.1 Efeitos das EROS na Inibição da Via de Sinalização à Insulina

Há evidências de que as EROs causam ou estão associadas à resistência à insulina (Bonnetfont-Rousselot, 2002; Chambers et al., 2009; Yu, 1994). As EROs são produzidas em situações de inflamação pela via de sinalização do receptor do fator de necrose tumoral beta ou interleucina-6 (Hotamisligil, 2006), através da ativação da NADPH oxidase, via angiotensina 2 (Henriksen et al., 2011), ou na mitocôndria por ação de ácidos graxos saturados, em especial do ácido palmítico (Hotamisligil, 2006; Kraegen, Cooney, 2008; Silveira et al., 2008) (Figura 8). Os principais mecanismos de inibição de resistência à ação da insulina induzido por EROs são: ativação de serina quinases, estresse de retículo endoplasmático, associação com efeitos dos ácidos graxos (AGs), vias de sinalização inflamatória (TNF- α e TLR-4) e hiperglicemia.

Figura 8 - Representação esquemática das principais fontes de produção de EROs no músculo esquelético e as vias por elas ativadas levando à resistência à insulina

As espécies reativas de oxigênio podem ser produzidas através do complexo NADPH oxidase (diretamente, ou ativada pelo receptor tipo 1 de angiotensina II –AT₁R) ou por disfunções mitocondriais (por excesso de glicose ou por ácidos graxos saturados). As EROs produzidas podem ativar as serinas quinases (JNK - c-Jun N-terminal quinase-, IKK β -inibidor κ quinase, GSK-3 - glicogênio sintase quinase-3- e p38 MAPK -p38 proteína quinase ativada por mitógeno) diretamente ou indiretamente (através de estresse de retículo ou vias inflamatórias).

Fonte: Henriksen et al. (2011).

1.6.1.1 Ativação de Serina Quinases

As EROs causam resistência à insulina pela ativação do inibidor κ quinase (IKK β) e/ou c-Jun N-terminal quinase (JNK), as quais fosforilam o receptor de insulina e o IRS em serina, tornando a célula menos responsiva à insulina (Aguirre et al., 2002; Hotamisligil et al., 1996; Paz et al., 1997; Tobar et al., 2011). A JNK possui duas isoformas (JNK1 e JNK2) que estão ligadas ao ganho excessivo de peso corporal, sendo fortemente relacionada à obesidade (Boden et al., 2008; Gregor et al., 2009; Sourris et al., 2009; Vallerie, Hotamisligil, 2010) e diabetes melito tipo 2 (Waeber et al., 2000). A inibição direta (animais nocaute para JNK1) ou indireta (*Heat Shock Protein 70*) da JNK aumenta a sensibilidade do músculo esquelético à insulina (Chung et al., 2008; Leng et al., 2004; Morino et al., 2008; Sabino et al., 2010).

A IKK β é outra serina quinase ativada por EROs e estresse de retículo

endoplasmático (Henriksen et al., 2011; Solinas, Karin, 2010). Ela ativa a I κ B que, por sua vez, ativa o fator nuclear κ B (*Nuclear Factor κ B* –NF- κ B) (Hacker, Karin, 2006) aumentando a produção de TNF- α e interleucina-6 (IL-6), ambas citocinas estão associadas com a resistência à insulina. A ligação entre as EROs e a ativação de IKK β , contudo, ainda não está totalmente elucidada.

1.6.1.2 Estresse de Retículo Endoplasmático

O estresse de retículo endoplasmático ocorre devido ao acúmulo de lipídios no interior das células ou excesso de glicose, levando à produção de proteínas malformadas (*unfolded protein*). Estas são eliminadas via resposta contra proteínas malformadas (*unfolded protein response* -UPR), que consiste na ativação de três vias: do fator-6 de transcrição ativado (*activating transcription factor-6* -ATF6), da enzima 1 dependente de inositol (*inositol requiring enzyme 1* -IRE1) e do fator eucariótico de iniciação semelhante à PKR quinase (*PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase* -PERK). Os três fatores são mantidos inativos por uma chaperona. Quando ocorre a geração de proteínas malformadas, a chaperona é removida, iniciando a ativação dessas vias. As três vias levam à ativação de respostas inflamatórias; todas ativam NF- κ B, causando inflamação. As vias da ATF6 e da PERK também levam à ativação de serina quinases (JNK e IKK β) (Hotamisligil, 2010). As vias descritas visam a preservação de integridade celular. Contudo, situações como obesidade e hiperglicemia levam à saturação das vias, podendo causar resistência à insulina ou mesmo morte celular por apoptose.

Hotamisligil (2006) demonstrou em revisão que as EROs desencadeiam estresse de retículo endoplasmático no músculo esquelético. Contudo, Rieusset et al. (2012) mostraram que a contribuição do estresse de retículo na geração de resistência à insulina no músculo esquelético é muito pequena, sendo esta mais importante no fígado e tecido adiposo.

1.6.1.3 Efeito dos Ácidos Graxos Saturados Sobre a Produção de EROS

Os ácidos graxos provocam aumento da produção de EROs através do desacoplamento mitocondrial (Silveira et al., 2008), levando à formação de peróxido

de hidrogênio e íon radical superóxido. O ácido palmítico (Boden, 2011) também causa resistência à ação de insulina através de outros mecanismos, como descrito por Randle et al. (1963). Esses autores propuseram que o aumento da oxidação de ácidos graxos livres causa inibição da oxidação e captação de glicose. Ácidos graxos livres causam aumento de DAG e ceramidas no músculo esquelético, ativando as PKCs (Boden, 2011). Estas causam fosforilação em serina em IRS1 e 2, diminuindo sua atividade e levando à resistência a ação da insulina.

1.6.1.4 Vias de Sinalização da Resposta Inflamatória: TNF- α E TLR-4

O fator de necrose tumoral α (*Tumoral Necrosis Factor- α* –TNF- α) também causa ativação direta da JNK via receptor (Hotamisligil, 2006), além de aumentar a produção de EROs (Houstis et al., 2006). O TNF- α é um mediador pró-inflamatório com importância na diferenciação e na regeneração do músculo esquelético (Reid, Moylan 2012). O TNF- α também está relacionado à fraqueza muscular e os seus efeitos podem ser mimetizados pelas EROs (Andrade et al., 1998; Reid, Moylan, 2012). Os ácidos graxos livres também ativam o NF- $\kappa\beta$, causando aumento de TNF- α e interleucina-6 (IL-6), ambas causadoras de resistência à ação da insulina. Existem, ainda, evidências de que a ativação da IKK β e da NF- $\kappa\beta$ pelos AGs é intermediada pelo *Toll-Like Receptor-4* (TLR-4) (Frisard et al., 2010). O ácido palmítico e outros AGs saturados mimetizam o efeito do lipopolissacarídeo (LPS) e através do TLR-4, ativando o NF- $\kappa\beta$ e causando resistência à insulina (Gupta et al., 2012 ; Schaeffler et al., 2008).

1.6.1.5 Hiperglicemia

Há três mecanismos propostos para explicar o estresse oxidativo gerado por hiperglicemia (Brownlee, 2001; Rolo, Palmeira 2006). O primeiro consiste na ativação da enzima aldose redutase, que reduz grupos carbonil, utilizando NADPH e NADH como doadores de elétrons. A aldose redutase polimeriza a glicose em polióis. Em uma situação de hiperglicemia, a atividade da enzima é exacerbada, levando a maior geração de EROs e depleção de GSH. O segundo mecanismo proposto consiste na síntese de AGEs, derivados da reação entre glicose e

aminoácidos, onde o aldeído da glicose reage com o grupo amina do aminoácido, formando a imina. Os AGEs sofrem rearranjos moleculares e formam glioxal, metilglioxal e 3-desoxiglicosona. As espécies geradas reagem com outras proteínas intracelulares, formando novas iminas, que aumentam a produção de EROs (via receptor para AGE -RAGE) ou alteram a integridade da célula, modificando a função das proteínas. A hiperglicemia intracelular também pode gerar danos à mitocôndria ou ativar a NADPH oxidase via aumento de diacilgliceróis e, consequentemente, de PKC, causando estresse oxidativo. A contribuição destas vias para a geração de estresse oxidativo no músculo esquelético, contudo, ainda não foi elucidada, visto que tais vias foram propostas em leucócitos, fibroblastos e células de vasos sanguíneos.

1.6.2 Evidência de que as EROS são Permissivas à Captação de Glicose

Em oposição aos efeitos descritos acima, as EROs podem ativar o consumo/captação de glicose pelo músculo esquelético (Merry, McConell, 2011). Situações como o exercício físico e a proliferação/diferenciação de células musculares causam aumento na captação de glicose e no conteúdo de EROs. Sandström et al. (2006) demonstraram que a administração de N-acetilcisteína (um antioxidante) causa inibição da captação de glicose no músculo esquelético durante a contração, evidenciando que as EROs têm importância na regulação glicêmica. A representação desses mecanismos está na Figura 10. As principais vias de permissividade à captação de glicose são: AMPK, p38 MPK, depleção de GSH, associação com canais de cálcio e associação entre EROs e espécies reativas de nitrogênio.

Figura 10 - Representação esquemática das vias ativadas por EROs, levando ao aumento da translocação do GLUT4 do citossol para a membrana plasmática.

Note que estas vias são independentes da ativação por insulina. As contrações musculares levam à produção de EROs ou de espécies reativas de nitrogênio. Estas espécies ativam vias independentes de insulina que translocam o transportador de glicose (GLUT-4) como AMPK, CaMK e p38-MAPK. Fonte: Merry e McConell (2009).

1.6.2.1 AMPK

O H_2O_2 causa fosforilação da AMPK (Choi et al., 2001) em vários tecidos, inclusive no músculo esquelético, aumentando a captação de glicose por indução da translocação do GLUT-4 através de vias independentes de insulina (Jessen, Goodyear, 2005; Katz, 2006; Winder, Hardie, 1999). As vias de formação de AMPK são ativadas pelo aumento na conversão de ATP a AMP. A AMP ativa alostericamente a AMPK quinase (*AMPK kinase* -AMPKK). Por outro lado, o excesso de ATP inibe a ativação da AMPKK. Como a AMPK causa aumento da disponibilidade de glicose no interior das células, alguns autores acreditam que a ativação da AMPK é uma via para proteger as células contra a depleção de ATP (Davies et al., 1995; Hardie et al., 1999; Hawley et al., 1995).

1.6.2.2 p38 MAPK

O H_2O_2 também ativa a via da p38 proteína quinase ativada por mitógeno (p38 *Mitogen-Activated Protein Kinase* -p38 MAPK) no músculo esquelético (Chambers et al., 2009; Diamond-Stanic et al., 2011; Kim et al., 2006). Kim et al. (2006) demonstraram que a geração de peróxido de hidrogênio leva à fosforilação da p38-MAPK e que esta é acompanhada de aumento na captação de glicose. Existem quatro isoformas conhecidas da p38-MAPK - α , β , γ e δ . O músculo esquelético expressa primariamente as isoformas β e δ (Stein et al., 1997; Wang et al., 1997). Henriksen et al. (2011) mostraram que a fosforilação da p38 MAPK também pode levar à ativação da JNK e IKK β , causando fosforilação em serina no receptor de insulina e em IRS. Essas observações são sugestivas de que as diferentes isoformas da p38-MAPK podem ter funções distintas.

1.6.2.3 Inibição da GPX/Depleção de GSH

Loh et al. (2009) mostraram que a deleção da GPX aumenta a fosforilação da AKT no músculo sóleo de camundongos. Além disso, McClung et al. (2004) observaram que a superexpressão de GPX causa resistência à ação de insulina e obesidade. O tratamento com N-acetilcisteína (NAC), um aminoácido doador de cisteína e redutor do GSSG para GSH, causa resistência ao efeito da insulina em músculo esquelético via inibição da AMPK (Sandström et al., 2006).

1.6.2.4 Canais de Cálcio

São ainda mencionadas relações entre as vias de captação de glicose dependentes de cálcio e EROs. As quinases dependentes de calmodulina (*calmodulin-dependent protein kinase* -CaMK) podem ser ativadas por EROs, conforme Erickson e Anderson (2008) demonstraram em músculo cardíaco. No músculo esquelético (Jensen et al., 2007; Wright et al., 2004), a CaMK II tem função importante na captação de glicose durante a contração, sendo capaz de induzir a translocação de GLUT4 após sofrer fosforilação pela CaMK quinase (*CaMK kinase* -CaMKK) (Katz, 2007). O influxo de cálcio durante contrações musculares também

ativa as ATPases, levando ao aumento da VO_2 e da produção de superóxido e peróxido de hidrogênio, causando ativação da AMPK (Katz, 2007) e translocação do GLUT4 independente da insulina.

1.6.2.5 Relações entre EROS e Espécies Reativas de Nitrogênio

Alguns autores demonstraram que a contração muscular ativa a óxido nítrico sintase, aumentando a concentração de óxido nítrico e esta, por sua vez, a concentração de GMPc, causando translocação do GLUT-4 (McConell, Kingwell, 2006; Merry et al., 2010). Troy e McConell (2011) demonstraram que inibidores da síntese de óxido nítrico e de peroxinitrito (produto oriundo da reação entre EROs e óxido nítrico) inibem o aumento da captação de glicose no músculo esquelético durante a contração.

1.7 Metabolismo de Ácidos Graxos no Músculo Esquelético

O músculo esquelético utiliza preferencialmente os ácidos graxos (AGs) quando estes se encontram em maior abundância em relação aos carboidratos, ou em certas condições onde o tecido necessita economizar glicose, como no exercício leve e moderado (Hawley et al., 2006; Spriet, 2002). A oxidação AGs fornece cerca de 10 vezes mais energia que a glicose – 38 kJ g^{-1} contra $4,2 \text{ kJ g}^{-1}$ (Newsholme, Start, 1973). Os AGs utilizados pelo músculo esquelético durante a contração muscular provêm do tecido adiposo e dos triacilgliceróis musculares (Kiens et al., 1999; Newsholme, Start, 1973). O uso dos AGs em detrimento aos carboidratos permite manter a concentração de glicose no plasma.

Randle et al. (1967) demonstraram que concentrações plasmáticas elevadas de AGs causam o aumento da oxidação destes nos músculos cardíaco e esquelético e também diminuição da oxidação de glicose nestes mesmos tecidos. Tais efeitos foram acompanhados de elevação da concentração plasmática de acetil-coenzima-A (acetil-CoA) decorrente da oxidação dos AGs. Esse aumento na produção de acetil-CoA é acompanhado de aumento nas concentrações de citrato e da G6P. A acetil-CoA inibe a atividade do complexo piruvato desidrogenase (*pyruvate dehydrogenase*-PDH) através da fosforilação da enzima PDH quinase e o citrato

reduz a atividade da fosfofrutoquinase (*phosphofructokinase*-PFK). A inibição da PFK causa aumento da concentração de glicose-6-fosfato (G6P), inibindo a atividade da hexoquinase, enzima responsável pelo primeiro passo da via glicolítica.

Outros pesquisadores demonstraram que a inibição da captação de glicose pelos AGs deve-se a outros mecanismos, como inibição de translocação de GLUT-4, fosforilação de glicose (hexoquinase), glicogenólise (glicogênio fosforilase), fluxo glicolítico (fosfofrutoquinase), razão acetil CoA/CoA (piruvato desidrogenase) e razão ATP/ADP mitocondrial (Arkinstall et al., 2004; Hawley et al., 2006; Spriet, 2002).

O acúmulo de diacilglicerol (DAG), acil-CoA e ceramidas no músculo esquelético causam inibição da sinalização da Akt e ativação de transportadores de ácidos graxos. Os ácidos graxos são transportados para o interior das células através de três proteínas (O'Neill et al., 2012): a proteína ligante de ácido graxo de membrana plasmática (*plasma membrane fatty acid binding protein*-FABP_{PM}) de 40 kDa, localizada na camada externa da membrana celular (Isola et al., 1995; Schwieterman et al., 1988; Stremmel et al., 1985), a família das proteínas transportadoras de AGs 1~6 (*fatty acid transport proteins* FATP 1~6) de 60 kDa, possuindo pelo menos seis domínios transmembranas (Gimeno et al., 2003; Hirsch et al., 1998; Schaffer, Lodish, 1994) e a translocase de AG (*fatty acid translocase*), FAT/CD36, de 88 kDa, altamente glicosilada e possui pelo menos dois domínios transmembrana (Abumrad et al., 1993). Destas proteínas, a FAT/CD36 é a mais importante na translocação dos ácidos graxos (Nickerson et al., 2009). Além disso, em estudos com contração muscular aguda (Bonen et al., 2000), ou crônica de baixa frequência (Koonen et al., 2004) e desnervação (Koonen et al., 2004), foi mostrado que os FAT/CD36 são translocados de reservatórios intracelulares para a membrana plasmática (Bonen et al., 2004; Holloway et al., 2008).

A translocação das proteínas transportadoras de ácidos graxos é ativada por AMPK, conforme estudos realizados com 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribotídeo (*5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide*-AICAR) (Chabowski et al., 2005; Luiken et al., 2003). No entanto, outros mecanismos também estão envolvidos. Turcotte et al. (2005) demonstraram que a inibição das quinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (*extracellular-signal-regulated kinases* 1/2 -ERK 1/2) impede a translocação das FAT/CD36 durante a contração muscular. Abbott et al. (2009) verificaram que inibidores da CaMKII e da CaMKK também causam redução do transporte de AGs.

Os mesmos autores mostraram, ainda, que a cafeína causa aumento da captação de AGs pelos tecidos e concluíram que a concentração de Ca^{2+} está envolvido com o transporte de AGs. De fato, o Ca^{2+} intracelular causa ativação da AMPK.

A glicerol-3-fosfato acetiltransferase (*glycerol-3-phosphate acetyltransferase*-GPAT) e a diacilglicerídeo aciltransferase (*diacylglyceride acyltransferase*-DGAT) são as principais enzimas responsáveis pela esterificação de AGs com os gliceróis, formando os triacilgliceróis (TAGs). Existem duas isoformas da GPAT, sendo uma mitocondrial (mtGPAT) e outra localizada no retículo endoplasmático (GPAT microssomal). A mtGPAT é responsável por 90% da atividade no músculo esquelético e por 50% no fígado. A GPAT microssomal é responsável por 85% da atividade de esterificação de AGs no tecido adiposo branco, sendo sua atividade inibida por AICAR (Park et al., 2002) e pela leptina (Wendel et al., 2010). No entanto, o mesmo efeito não é observado no músculo esquelético quando a AMPK é ativada por exercício físico e jejum (Park et al., 2002; Ruderman et al., 2003; Watt et al., 2004).

As principais enzimas envolvidas na lipólise são: a lipase de triacilglicerídeo adiposa (*adipose triglyceride lipase*-ATGL), a lipase hormônio-sensível (*hormone sensitive lipase*-HSL) e a lipase monoacilglicerol (*monoacylglycerol lipase*-MAGL). A lipólise é mediada pela sinalização do cAMP, induzida por catecolaminas e pela subsequente ativação da PKA. A atividade da ATGL é acentuada pelo exercício físico (Alsted et al., 2009; Yao-Borengasser et al., 2011), mas a participação da AMPK na ativação desta enzima é pequena, uma vez que os músculos de animais *knockout* para ATGL não entram em fadiga prematura quando contraídos *ex vivo* (Huijsman et al., 2009). Os animais deficientes em ATGL apresentam baixa resistência à ação da insulina quando alimentados com dieta hiperlipídica, embora apresentem acúmulo de TAGs (Hoy et al., 2011). Tais efeitos, contudo, não são observados no músculo esquelético. A HSL é ativada por catecolaminas via PKA (Anthonsen et al., 1998) e esta ativação é contra-regulada pela AMPK (Garton et al., 1989; Roepstorff et al., 2004), bem como ativadores farmacológicos, como AICAR (Corton et al., 1994; Sullivan et al., 1994; Watt et al., 2004), metformina e tiazolidina (Bourron et al., 2010; Grisouard et al., 2011; Ren et al., 2006) e adipocinas (Qiao et al., 2011; Wedelova et al., 2011), enquanto IL-6 favorece a ativação (Mattacks, Pond, 1999; van Hall et al., 2003; Watt et al., 2005). Abbot et al. (2012) demonstraram que a ativação da AMPK α 2 causa aumento na oxidação basal de AGs, embora esta ativação não

tenha nenhum efeito na captação destes ácidos.

A acetil-CoA carboxilase (ACC) catalisa a formação do acetil-CoA em malonil-CoA, que inibe a atividade da carnitina palmitoil transferase-I (CPT-I). A regulação da ACC depende da ação da insulina que desfosforila e ativa a ACC (Witters et al., 1988), enquanto a AMPK fosforila e inibe da ACC (Carling et al., 1989). Desta forma, a inibição de ACC favorece a oxidação dos AGs pelos tecidos. São conhecidas duas isoformas da ACC: 1) a ACC1 localizada no citossol e participa da síntese *de novo* de AGs a partir do malonil-CoA, sendo mais abundante no tecido adiposo; 2) a ACC2, localizada na mitocôndria, que inibe a oxidação dos AGs pela mitocôndria (Glund et al., 2012). Vários autores demonstraram que a deleção ou inibição do gene para a ACC2 não causa a inibição da oxidação de AGs (Abu-Elheiga et al., 2001; Hoehn et al., 2010; Olson et al., 2010). Porém, o uso de inibidores farmacológicos provoca tal efeito. Acredita-se que a ACC2 esteja ligada à CPT-I, enzima que controla a translocação dos ácidos graxos citossólicos para a mitocôndria, favorecendo a β -oxidação (O'Neill et al., 2012).

1.8 Apocinina

Há substâncias externas ao organismo com propriedades antioxidantes, sendo que muitas são utilizadas para fins farmacológicos. Ácido alfa-linolênico e vitamina E melhoram a capacitação de glicose pelo músculo esquelético, porém, a vitamina C não altera a glicemia de jejum em animais diabéticos (Meier et al., 2012; Wright, Sutherland, 2008).

A apocinina (4-hidróxi-3-metoxiacetofenona ou acetovanilona) foi identificada de raízes da planta *Picrorhiza kurroa*, nativa das montanhas da Índia, Nepal, Tibet e Paquistão, em 1971. Esse composto tem peso molecular de 166,17 e adquire aspecto acúleo quando cristalizada com água. Possui odor suave de baunilha e ponto de fusão de 115 °C. (Hougee et al., 2006; Luchtefeld et al., 2008; Stefanska, Pawliczak, 2008). Esta droga é utilizada no tratamento de aterosclerose (Meyer et al., 2000) e na prevenção de lesões pulmonares causadas por isquemia seguida de reperfusão (Dodd-o et al., 2000).

A apocinina inibe a atividade da NADPH oxidase ao impedir o acoplamento da subunidade p47^{phox} da enzima, após sofrer dimerização pela mieloperoxidase (Stolk

et al., 1994) (Figuras 11 e 12). A apocinina também tem efeito direto sobre as EROs através de ação sequestrante/*scavenger* (Heumüller et al., 2008) (Figura 13). A apocinina atua como um agente seqüestrador de radicais livres no endotélio quando na presença da mieloperoxidase e, no entanto, não diminui a produção de EROs em células não-fagocíticas, conforme descrito por Vejrazka et al. (2004). Nesses casos, há o efeito inverso: maior produção de EROs.

Figura 11 - Reação de dimerização da apocinina para diapocinina

Fonte: Stefanska e Pawliczak (2009).

Figura 12 - Representação esquemática da inibição do complexo NADPH oxidase pela apocinina dimerizada

O dímero da apocinina impede o acoplamento da subunidade $p47^{phox}$ às subunidades transmembrana, impedindo sua ativação.
Fonte: Stefanska e Pawliczak (2009).

Figura 13 - Mecanismo de ação sequestradora/scavenger de uma molécula de catecol.

Foi demonstrado que uma molécula de apocinina age diretamente como antioxidante. Uma molécula de catecol apresenta várias estruturas de ressonância, o que lhe confere estabilidade após o sequestro de elétrons desemparelhados e espécies radiculares.
Fonte: Heumüller et al. (2008).

A apocinina causa depleção da GSH e aumento da GSSG, além de oxidação de grupos tióis, causando estresse oxidativo (Castor et al., 2010; Riganti et al., 2006) (Figura 14). Galati et al. (2002) mostraram que moléculas estruturalmente

semelhantes à apocinina (fenóis) causam oxidação de GSH para GSSG e consequente geração de ânion radical superóxido e peróxido de hidrogênio.

Figura 14 - Representação esquemática do efeito pró-oxidante da apocinina – depleção da glutathiona reduzida (GSH).

A apocinina aumenta a oxidação da glutathiona reduzida (GSH) para glutathiona oxidada (GSSG) após sofrer oxidação pela mieloperoxidase (MPO). Posteriormente, a apocinina pode ser reduzida pela NADH e NADPH e restaurada, permitindo novas oxidações.
Fonte: Castor et al. (2010).

Em nossos experimentos, o tratamento de ratos com apocinina (dose de 10 mg/kg de peso corpóreo por dia, durante 5 dias), como descrito por Saito et al., (2007), aumentou a produção de EROs em músculo sóleo incubado, avaliado pelo ensaio de AMPLEX. Os músculos sóleos de ratos tratados com a apocinina produziu cerca de 3 vezes mais EROs em comparação com o controle tratado apenas com o diluente (PBS). Em função desses dados, decidiu-se avaliar os efeitos do tratamento com apocinina no estresse oxidativo, no metabolismo de ácidos graxos e glicose e na resposta à insulina no músculo esquelético.

2 JUSTIFICATIVA

Há evidências de que antioxidantes melhoram a resposta à insulina. Em experimentos preliminares foi demonstrado que a apocinina melhora a resposta à insulina na resistência induzida por ácido palmítico. A apocinina, considerada como um agente antioxidante, causou aumento do conteúdo de EROs no músculo esquelético e este foi acompanhado de elevação a sensibilidade à ação da insulina. Dessa forma, estudou-se a apocinina como fármaco com potencial para ser utilizado no tratamento de resistência à insulina.

3 OBJETIVOS

Avaliar no músculo esquelético (sóleo) de ratos tratados com apocinina na dose de 10 mg/kg de peso corpóreo, durante 5 dias, o estresse oxidativo, metabolismo de glicose e ácidos graxos e a resistência à insulina induzida por palmitato.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tratamento com Apocinina na Produção de Peróxido de Hidrogênio em Células Musculares Cultivadas

Foi realizada cultura primária de células musculares de ratos como descrito por Hirabara et al. (2006) e Lynge et al. (2001). Os músculos sóleo, gastrocnêmio e quadríceps foram dissecados de ratos machos Wistar pesando cerca de 120 g e cortados em pedaços pequenos para digestão com 2% de colagenase tipo II, 0,25% de tripsina e 0,1% de DNase e isolamento dos mioblastos. As células foram semeadas em placas de 6 poços (240.000 células por poço) e mantidas em meio DMEM *Dulbelco's Modified Eagle Medium*) contendo 1% de penicilina, 10% de soro fetal bovino e 10% de soro de cavalo por 2-3 dias. Após este período, os mioblastos foram diferenciados em células musculares no mesmo meio contendo 1% de penicilina e 10% de soro de cavalo por 4-5 dias. Durante esse período, as células receberam apocinina nas seguintes concentrações: 100 μ M, 500 μ M, 1 mM e 10 mM. Um grupo que não recebeu apocinina foi usado como controle. No quinto dia, as células foram lavadas em PBS e incubadas em meio DMEM sem soro e com glicose e albumina sérica bovina durante alguns segundos. As células foram incubadas com a sonda AMPLEX Ultra Red® (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) durante uma hora a 37 °C. Ao término desta, uma alíquota de 20 μ L de meio foi retirada e a fluorescência foi mensurada em fluorímetro RF-1051 (Shimadzu, Kyoto, Japão) a 530 nm de excitação e 590 nm de emissão, para a determinação do conteúdo de EROs.

Para verificar se o tratamento com apocinina era tóxico às células, culturas de células foram fotografadas no quinto dia de tratamento. Estas células foram comparadas com o controle antes do primeiro dia de tratamento. Para as fotos, foi utilizado microscópio confocal (Zeiss Axiovert 100M Confocal Laser Scanning Microscope, Standort Göttingen, Alemanha).

4.2 Animais Utilizados nos Estudos *In Vivo*

Ratos machos da linhagem Wistar pesando em média 100 g foram utilizados.

Os animais foram fornecidos pelo Biotério “Lor Cury” do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Os ratos foram divididos em dois grupos: tratado (que recebeu injeção de apocinina) e controle (que recebeu injeção contendo apenas PBS). Os animais foram mantidos em biotério de experimentação com ciclo claro-escuro controlado de 12/12 horas, na temperatura de 23 °C, e ventilação controlada. Os animais receberam alimentação e água *ad libitum*.

4.3 Tratamento dos Ratos com Apocinina

A dose de apocinina injetada por via intraperitoneal foi de 10 mg/kg de peso corpóreo, diariamente, durante 5 dias, conforme descrito por Saito et al. (2007). A apocinina foi diluída em PBS. Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina e xilazina (2:1 – 1 µL por grama de peso corpóreo). As injeções foram aplicadas pela manhã por volta das 8 h, sendo que no dia do sacrifício, a última dose foi administrada 5h antes da realização do experimento. Para os ensaios de determinação de EROs (Amplex UltraRed), catalase e TBARS, os músculos sóleo e extensor digital longo (EDL) foram utilizados. Os animais foram mantidos em jejum por 4 h antes do sacrifício por deslocamento cervical e tiveram os músculos sóleo e EDL das patas posteriores retirados para incubação.

4.4 Isolamento e Incubação dos músculos sóleo e EDL

Os músculos extraídos de ambos os grupos foram incubados, conforme Challiss et al. (1983), Crettaz et al. (1980) e Hirabara et al. (2003), em frascos com tampão Krebs-Ringer contendo 5,6 mM de glicose, 1 % de albumina, pH 7,4, sob gaseificação com uma mistura de 95% O₂ e 5% CO₂ e agitação contínua (100 rpm) em banho-maria a 37 °C. Os músculos foram fixados pelos tendões em grampos de aço inoxidável.

4.5 Ensaio da Oxidação da Sonda Amplex UltraRed®

Método descrito por Guarino et al. (2007) e Zhou et al. (1997), modificado por

Pinheiro (2008), foi utilizado. O Amplex UltraRed é o nome comercial da molécula N-acetil-3,7-diidrofenoxazina (*N-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine*) que reage equimolarmente com o peróxido de hidrogênio, formando o composto fluorescente resorufina. Esta reação é catalisada pela peroxidase (Figura 15). Rhee et al. (2010) reportam, em revisão, que este método é muito sensível, capaz de detectar concentrações muito baixas de peróxido de hidrogênio (na ordem de 50 nM) e a sonda reage de forma muito específica com o peróxido de hidrogênio, evitando falsos positivos. Os músculos sóleos foram incubados conforme descrito na seção 4.4, porém, com a adição da sonda *Amplex Ultra Red*® (50 μM) e peroxidase (0,1 U/mL). A incubação foi realizada durante uma hora a 37 °C e, ao término desta, foi retirada uma alíquota de 20 μL do meio e a leitura de fluorescência foi realizada em fluorímetro RF-1051 (Shimadzu, Kyoto, Japão), a 530 nm de excitação e 590 nm de emissão.

Figura 15 - Reação da sonda Amplex UltraRed com o peróxido de hidrogênio

Formação do composto fluorescente resorufina, reação catalisada pela horseradish peroxidase (HRP -peroxidase de raiz forte). A reação entre sonda e peróxido é equimolar.
Fonte: Rhee et al. (2010).

4.6 Determinação do Conteúdo de TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances – Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico)

O conteúdo de TBARS foi determinado conforme descrito por Buege et al.

(1978) e Draper et al. (1993). Os tecidos foram processados com uma tesoura em solução contendo 5 mL de ácido tricloroacético a 30%. Para cada 1 g de músculo, adicionou-se 15 µL de hidroxitolueno butilado a 29,5 mM (diluído em álcool etílico absoluto). A solução obtida foi aquecida até a ebulição durante 30 minutos. A seguir, a solução foi centrifugada e misturada com ácido tiobarbitúrico a 0,73% na proporção 1:1. Por fim, a mistura obtida foi lida em espectrofotômetro SpectraMax Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, Estados Unidos) a 535 nm.

4.7 Determinação da Atividade da Catalase

Para a determinação da atividade de catalase (Aebi, 1984), os músculos sóleo e EDL foram homogeneizados em tampão fosfato. O homogenato foi centrifugado a 13.000 rpm durante 20 minutos e recolheu-se o sobrenadante, descartando-se o precipitado. Em seguida, coletou-se uma alíquota de 5 µL do sobrenadante, adicionou-se 340 µL da solução de peróxido de hidrogênio (0,34 mL de H₂O₂ a 30% diluído em 99,66 mL de tampão fosfato) e completou-se com 650 µL de tampão fosfato.

Realizou-se a leitura em espectrofotômetro durante 3 minutos a 240 nm. Calculou-se a diferença do valor lido no primeiro minuto pelo valor do terceiro minuto para determinação da catalase.

4.8 Determinação da Atividade da Glutathione Peroxidase (GPX)

Para a determinação da atividade da GPX (Mannervik, 1985; Wendel, 1981), procedeu-se com os músculos sóleo e EDL foram processados como descrito na seção 4.7 para catalase.

Em uma placa de 96 poços, adicionou-se em cada um, 100 µL de tampão fosfato 100 mM, 10 µL de amostra (no caso de músculo sóleo, acrescentou-se 5µL de amostra e 5 µL de tampão fosfato), 20 µL de solução de glutathione redutase (500 U diluídas em 1,1 mL de água) e 20 µL de solução de GSH (7,4 mg diluídos em 2,4 mL de água). Incubou-se as amostras a 37 °C durante 10 min. Adicionou-se 20 µL da solução de NADPH e incubou-se à 37 °C, durante 3 min, no escuro. Acrescentou-se, então, 20 µL da solução de t-butil e realizou-se leitura cinética a cada 30 segundos,

durante 6 minutos, a 340 nm.

4.9 Atividade da Superóxido Dismutase Total (SOD)

Para a determinação da atividade da SOD (McCord, Fridovich, 1969; Sambrook et al., 1989), procedeu-se com os músculos sóleo e EDL foram processados como descrito na seção 4.7 para catalase.

Preparou-se a solução de xantina (3,8 mg de xantina e 2 mg de hidróxido de sódio dissolvidos em 50 mL de água), a solução de citocromo C (12,4 mg de citocromo C e 1,8 mg de EDTA dissolvidos em 50 mL de tampão fosfato) e uma outra de xantina oxidase (0,2 U/mL de xantina oxidase e 1,8 mg de EDTA, dissolvidos em 50 mL de água). As soluções de xantina e de citocromo C foram misturadas na proporção de 1 para 10. Em uma placa de 96 poços, adicionou-se em cada um, 185 µL da solução de xantina e citocromo C, 10 µL da solução de xantina oxidase e 5 µL de amostra. Foi realizada leitura cinética em espectrofotômetro a 550 nm e 25 °C.

4.10 Concentração de Glutathiona Oxidada e Reduzida

Amostras de plasma foram obtidas dos ratos através de decapitação. O sangue foi coletado em tubos heparinizados e estes foram centrifugados a 1.300 rpm, durante 10 minutos, à 4 °C. Coletou-se o sobrenadante (plasma) em microtubos de 500 µL.

As concentrações de GSH e GSSG foram mensuradas através do método descrito por Rahman et al. (2006). A concentração de GSH foi avaliado em espectrofotômetro a 412 nm após reação com ditionitrobenzeno (DTNB). Em seguida, o GSSG contido na amostra foi reduzido a GSH através da reação com NADPH catalisada por glutathiona redutase (GR). Realizou-se nova reação com DTNB e nova leitura espectrofotométrica. Para obtenção dos valores de concentração de GSSG, subtraiu-se o valor da primeira leitura da segunda.

Para o cálculo do poder redutor, foi utilizado a seguinte equação, uma vez que a oxidação de GSH para GSSG ocorre na proporção de 2:1:

$$\text{Poder Redutor} = \frac{[\text{GSH}]}{[\text{GSH}] + 2 [\text{GSSG}]}$$

4.11 Concentração de Ácido Úrico Plasmático

Amostras de plasma foram obtidas conforme descrito na seção 4.10. A concentração de ácido úrico foi mensurado através do método descrito por Trivedi et al. (1976). Foi utilizado o kit Bio-Clin Quibasa (Belo Horizonte, Brasil). Peróxido de hidrogênio produzido a partir do ácido úrico na presença de uricase (formando alantoína) reage com o para-hidroxibenzoato, formando um composto rosado que absorve luz no comprimento de onda de 505 nm.

4.12 Concentração de Ferro Plasmático

Amostras de plasma foram obtidas conforme descrito na seção 4.10. A concentração de ferro foi determinada através do método descrito por Carter (1971) e Goodwin et al. (1966), utilizando um kit Doles-Bioquímica (Brasil). O método é baseado na detecção de ferrozina, que absorve luz a 560 nm. Os íons ferro são liberados da transferrina plasmática através do reagente FerrozineW® (0,36 M de cloreto de hidroxilamina, 0,10 M de glicina, 14 mM de tiosemicarbazida e 0,50 mM de octilfenolpolietoxietanol, pH 2,2).

4.13 Captação de [³H]-2-Desoxi-D-Glicose e Síntese de [¹⁴C] Glicogênio

Os ensaios de captação de glicose, e síntese de glicogênio foram realizados conforme descrito por Challiss et al. (1986), Espinal et al. (1983) e Hirabara et al. (2003).

Os músculos foram pré-incubados conforme descrito no item 6.3, durante 4 h na presença ou ausência de 400 µM de ácido palmítico. Na concentração, o ácido palmítico causa evidente resistência à ação da insulina. As incubações foram realizadas no mesmo tampão, mas na presença de 0,3 µCi/mL de [¹⁴C]-D-glicose

(para o ensaio de síntese de [^{14}C] glicogênio) ou 0,3 $\mu\text{Ci/mL}$ de [^3H]-2-desoxi-D-glicose (para o ensaio de captação de glicose) e tratados ou não com insulina (nas doses de 7 mM, durante 1 hora). Os músculos foram digeridos em solução 1 M de hidróxido de potássio, à 70° C. A alíquota de 100 μL do homogenato foi usada para avaliar a captação da [^3H]-2-desoxi-D-glicose. Para o ensaio de síntese do [^{14}C] glicogênio, adicionou-se ácido etílico absoluto previamente resfriado em nitrogênio líquido para precipitação do glicogênio. Este, em seguida, foi centrifugado a 2.000 rpm por 20 minutos. Em seguida, descartou-se a fração alcoólica, ressuspendeu-se o glicogênio em água destilada e separou-se uma alíquota de 100 μL para leitura. A leitura dos resultados foi obtida no contador beta modelo Tricarb 2100TR (Hewlett Packard®, Meriden, EUA).

4.14 Preparação da Solução de Ácido Palmítico e Albumina

O ácido palmítico foi solubilizado inicialmente em álcool etílico absoluto na concentração final de 80 mM. A solução obtida foi misturada lentamente albumina (1%) em tampão Krebs contendo albumina (1%), sob agitação. A concentração final de ácido palmítico no meio de incubação foi de 400 μM .

4.15 Oxidação do [U- ^{14}C]-Ácido Palmítico

Foi avaliada conforme descrito por Leighton et al. (1985) modificado, utilizando-se [^{14}C]-palmitato. Os músculos foram incubados como no item 4.13 e tratados com 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ de [^{14}C]-palmitato. Um flaconete contendo uma tira de papel de filtro imerso em 400 μL de feniletilamina em metanol (1:1) também foi adicionado nos frascos. Após a incubação, os músculos foram pesados. O papel contido nos flaconetes foi analisado em contador beta (Challiss et al., 1986; Espinal et al., 1983) Tricarb 2100TR (Hewlett Packard®, Meriden, EUA) e expressa por grama de músculo, obtendo-se, assim, o valor da oxidação do palmitato por grama de tecido.

4.16 Análise da Expressão Proteica por *Western Blotting*

Para análise da expressão de proteínas, foi utilizado o método descrito por Towbin et al. (1979). Os músculos foram pesados e homogeneizados em tampão de extração, contendo 5 mL de TRIS base (pH= 7,5), 2,5 mL de EDTA 0,2 M, 5 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, 0,225 g de pirofosfato de sódio, 0,21 g de fluoreto de sódio, 0,0945 g de ortovanadato de sódio, 0,018 g de fenilmetanosulfonilfluoreto (phenylmethanesulfonylfluoride- PMSF) e 500 µL de aprotinina 0,01 mg/mL. Então, completou-se o volume com água desionizada para 50 mL. Para cada miligrama de músculo, utilizou-se 10 µL de tampão para homogenização. Após homogenização, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, durante 20 minutos, 4 °C, e o sobrenadante foi coletado. Realizou-se quantificação de proteína pelo método de Bradford (descrito no item 4.19) com uma alíquota de 10 µL do sobrenadante.

Em seguida, adicionou-se tampão Laemmli (2 mL de azul de bromofenol 0,1%, 1 mL de fosfato de sódio 1 M, 10 mL de glicerol, 2 g de SDS e água desionizada suficiente para 20 mL de amostra) em cada amostra (o equivalente a 25% do volume da amostra) e ditioneitol (DTT –0,15g para cada 1 mL de amostra). Após a adição, cada amostra foi homogeneizada e incubada durante 5 minutos à 100°C.

Após a incubação, preparou-se o gel a 10% para eletroforese -1,9 mL de água desionizada, 2 mL de acrilamida 30%, 1,3 mL de TRIS pH 8,8, 0,05 mL de SDS 10%, 0,05 mL de persulfato de amônio (ammonium persulphate -APS) a 10% e 0,002 mL de solução de tetrametiletenodiamino (TEMED). Para o empacotamento das proteínas (*stacking*), foi preparado gel com 0,68 mL de acrilamida 30%, 0,17 mL de TRIS 1,0 M (pH=6,8), 0,13 mL de SDS a 10%, 0,01 mL de APS a 10% e 0,001 mL de solução de TEMED.

Em cada poço no gel de *stacking*, foi colocado o equivalente a 60 µg de proteína. Em seguida, adicionou-se tampão de corrida (48,45 g de TRIS aminometano, 228 g de glicina, 5,35 g de EDTA, 8 g de SDS e água suficiente para 2 L de solução -esta solução foi diluída 4x em água antes do uso) e realizou-se a eletroforese a 30 V por uma hora (para o *stacking*) e depois a 90 V durante cerca de 4 horas para a separação das proteínas. Foi utilizado o padrão Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards, 500 µL (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EUA).

Realizou-se, então, a transferência das proteínas do gel a uma membrana de nitrocelulose a 100 V, durante uma hora, em tampão de transferência (6,05 g de TRIS aminometano, 28,82 g de glicina, 400 mL de metanol e água desionizada suficiente para 2 L). A qualidade da transferência foi avaliado utilizando-se solução de Ponceau. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes durante 10 minutos cada, com 8 mL de solução basal (10 mL de TRIS aminometano 1 M, 30 mL de solução de cloreto de sódio 5 M, 500 µL de Tween 20 e água destilada suficiente para 1 L, pH 7,6).

Após as lavagens, a membrana foi incubada durante 1 h à temperatura ambiente com 10 mL de solução bloqueadora (10 mL de solução basal e 0,5 g de leite em pó). A membrana foi novamente lavada 3 vezes com 8 mL de solução basal e, em seguida, foi incubada por cerca de 12 h com anticorpo (*Phospho-Akt (Ser473) (193H12) rabbit monoclonal antibody*, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, EUA - 1 µL de anticorpo diluído para cada 1000 µL de solução basal em 3 g de albumina sérica bovina). A incubação foi realizada a 4°C sob agitação.

Após a incubação, a membrana foi lavada novamente com solução basal (3 vezes) e incubada com anticorpo secundário (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, EUA), 2 µL em 5 mL de solução basal contendo 50 mg de leite. A incubação foi realizada durante 1 h sob agitação em temperatura ambiente.

Após isso com anticorpo secundário, a membrana foi novamente lavada mais três vezes com solução basal e incubada com Amersham ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare, Fairfield, Connecticut, EUA). Após a incubação, foi exposto um filme fotossensível sobre a membrana, utilizando-se o cassete radiológico. Após a exposição (cujo tempo variou entre 1 minuto e 1 hora), o filme foi revelado de forma convencional. As imagens foram digitalizadas em *scanner* para posterior análise quantitativa das bandas obtidas através do programa ImageJ (NIH, EUA).

Após a revelação, a membrana foi lavada com mais 8 mL de solução basal, e com 10 mL de solução de *stripping* Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) para remoção dos anticorpos primários e secundários. Em seguida, a membrana foi lavada mais três vezes com 8 mL de solução basal durante 10 minutos, bloqueada com solução bloqueadora durante 1

hora, lavada mais três vezes com 8 mL de solução basal e depois incubada com anticorpo Akt (Akt Antibody, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, EUA -1 μ L de anticorpo diluído para cada 1000 μ L de solução basal em 3 g de albumina sérica bovina). Após novas lavagens, incubação com anticorpo secundário e revelação, a membrana foi novamente lavada com solução para *stripping*, lavada e incubada com anticorpo constitutivo (GAPDH). A proteína constitutiva (GAPDH) foi escolhida porque o tratamento com insulina não altera a expressão desta (Figura 16). Foram preparadas novas membranas para incubação com anticorpos anti-pAMPK e depois anti-AMPK total (Cell Signaling).

Figura 16 - Conteúdo da GAPDH.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 5 incubações. Para a análise estatística foi utilizada one-way ANOVA.

4.17 Determinação de Proteínas pelo Método de Bradford

Os resultados obtidos nos ensaios de TBARS, glutathione peroxidase e catalase foram expressos por miligrama de proteínas, determinada pelo método descrito por Bradford (1976).

Tomou-se uma alíquota de 1 μ L do sobrenadante obtido da centrifugação dos músculos processados e diluiu-se esta em 19 μ L de água. Adicionou-se a esta solução 980 μ L de solução de Bradford. Como padrão, foi utilizada uma solução de

albumina (1 mg/mL). O volume final de cada solução padrão foi de 20 μ L e adicionou-se 980 μ L da solução de Bradford. Como branco, foi utilizada água nanopura. As soluções obtidas foram incubadas no escuro durante 5 minutos. Tomou-se uma alíquota de 200 μ L de cada solução e realizou-se leitura a 595 nm em espectrofotômetro (SpectraMax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, Estados Unidos).

4.18 Análise Estatística

Os resultados foram analisados utilizando o teste t de *Student* quando comparados dois grupos ou *one-way* ANOVA seguido do pós-teste Tukey quando comparados três ou mais grupos, através do programa GraphPad Prism 4.

5 RESULTADOS

5.1 Produção de EROs em Células Musculares Cultivadas

A produção de peróxido de hidrogênio em cultura de células satélites de músculo esquelético mostrou-se diminuído em concentrações de apocinina a partir de 1 mM (Figura 17). Os valores estão expressos em fluorescência (em unidades arbitrárias) por número de células e apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Figura 17 - Produção de peróxido de hidrogênio em cultura de células satélites de músculo esquelético, avaliado pelo método Amplex Ultra Red®.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 12 ensaios. Para a análise estatística, foi utilizado o método de one-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

As células tratadas e os controles (antes do tratamento e após 5 dias de tratamento) não mostraram qualquer alteração morfológica. Assim, o tratamento com apocinina não foi citotóxico mesmo em concentrações elevadas (Figuras 17a a 17f).

Figura 18 - Fotografias das culturas das células satélites

Figura 18a: Controle 24h após diferenciação

Figura 18b: Controle após 5 dias de tratamento

Figura 18c: apocinina 100 µM após 5 dias de tratamento

Figura 18d: Apocinina 500 µM após 5 dias de tratamento

Figura 18e: Apocinina 1 mM após 5 dias de tratamento

Figura 18f: Apocinina 10 mM após 5 dias de tratamento

Fotografias das culturas das células satélites diferenciadas antes (Figura 18a) e após (Figuras 18b a 18f) o tratamento. As células tratadas aparentemente não apresentaram diferenças morfológicas em relação às células tratadas com PBS.

5.2 Avaliação da Produção de EROs em Músculos Sóleo e EDL

A produção de peróxido de hidrogênio mostrou-se aumentada em 38% nos músculos sóleos dos animais tratados em relação aos controles (Figura 19). Os valores estão expressos como fluorescência (em unidades arbitrárias) dividida por tempo (em minutos) e massa do tecido (em miligramas). Nos EDL não houve alteração significativa (Figura 20).

Figura 19 - Produção de peróxido de hidrogênio pelo músculo sóleo.

Avaliação pelo método Amplex Ultra Red®. Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 7 animais para o grupo controle e 13 para o grupo tratado. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

Figura 20 - Produção de peróxido de hidrogênio pelo músculo EDL.

Avaliação pelo método Amplex Ultra Red®. Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais para o controle e 5 para o tratado. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

5.3 Conteúdo de TBARS

O conteúdo de TBARS foi diminuído no músculo sóleo (Figura 21). Os valores obtidos estão expressos em absorbância por miligrama de proteína. No EDL, não houve diferença entre animais controles e tratados (Figura 22). O conteúdo de TBARS não foi aumentado em ambos os músculos pelo tratamento, indicando que o

aumento da produção de EROs não caracterizou uma situação de estresse oxidativo.

Figura 21 - Conteúdo de TBARS no músculo sóleo

Os valores do tratado estão apresentados como média $\pm$ EPM de 7 animais controle e 12 tratados. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

Figura 22 - Conteúdo de TBARS no músculo EDL.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 10 animais para o controle e 11 para o tratado. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

5.4 Atividade da Catalase

A atividade da catalase nos músculos sóleos e EDL não foi diferente entre animais controles e tratados com apocinina (Figuras 23 e 24). Os valores estão expressos em μMol por massa de proteína (em miligramas) e tempo (em minutos).

Figura 23 - Atividade da catalase no músculo sóleo.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 10 animais controle e 9 tratados. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

Figura 24 - Atividade da catalase no músculo EDL.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 10 animais controle e 9 tratados. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

5.5 Atividade da Glutathione Peroxidase

O tratamento com apocinina causou diminuição da atividade da GPX no músculo sóleo (Figura 25). Os valores expressos em μmol por massa de proteína (em miligramas) e por tempo (em minutos). No EDL tratamento não causou alteração (Figura 26).

Figura 25 - Atividade da GPX no músculo sóleo.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM 8 animais controle e 9 tratados. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

Figura 26 - Atividade da GPX no músculo EDL.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM 10 animais controle e 11 tratados. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

5.6 Atividade da Superóxido Dismutase Total

A atividade da SOD nos músculos sóleos não foi diferente entre animais controles e tratados com apocinina (Figuras 27). Os valores obtidos estão expressos em absorção por massa de proteína (em miligramas) por segundo. Para o EDL, o tratamento causou o aumento na atividade da SOD (Figura 28).

Figura 27- Atividade da SOD total no músculo sóleo.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 4 animais controle e 4 tratados. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

Figura 28 - Atividade da SOD total no músculo EDL.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 6 animais controle e 6 tratados. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

5.7 Concentração de Glutathiona Reduzida e Oxidada

A concentração plasmática de GSH e GSSH, bem como o poder redutor, não foram diferentes entre animais controles e tratados com apocinina (Figuras 29, 30 e 31). Os valores obtidos da concentração plasmática de GSH e GSSH estão

expressos em mM, enquanto o poder redutor está expresso em unidades arbitrárias (U.A.).

Figura 29 - Concentração plasmática de GSH.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais controle e 5 tratados. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

Figura 30 - Concentração plasmática de GSSG.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais controle e 5 tratados. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

Figura 31 - Poder redutor plasmático.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais controle e 5 tratados. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

5.8 Concentração de Ácido Úrico

A concentração plasmática de ácido úrico não foi diferente entre animais controles e tratados com apocinina (Figura 32). Os valores obtidos do conteúdo plasmático de ácido úrico estão expressos em mg/dL.

Figura 32 - Concentração de ácido úrico plasmático.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais controle e 5 tratados. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

5.9 Concentração de Ferro Plasmático

A concentração plasmática de ferro não foi diferente entre animais controles e

tratados com apocinina (Figura 33). Os valores obtidos do conteúdo plasmático de ferro estão expressos em μM .

Figura 33 - Concentração de ferro no plasma.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais controle e 5 tratados. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de Student.

5.10 Captação da [^3H]-2-Desoxi-D-Glicose

O tratamento com apocinina reverteu a resistência à insulina induzida pelo ácido palmítico na captação de [^3H]-2-desoxi-D-glicose (Figura 34). O grupo controle tratado com insulina apresentou aumento na captação de [^3H]-2-desoxi-D-glicose em 78% em relação ao grupo controle. O tratamento com ácido palmítico reduziu o efeito da insulina em 31%. A administração com apocinina, contudo, aboliu a ação do ácido palmítico na resposta à insulina, causando incremento de 51% em relação ao controle com ácido palmítico e insulina e incremento de 87% com relação ao grupo controle sem insulina e sem palmitato. Os achados estão expressos em valores relativos à média do controle sem insulina e sem palmitato.

Figura 34 - Captação de [^3H]-2-desoxi-D-glicose pelo músculo sóleo

P+=tratado com ácido palmítico, P-=sem tratamento com ácido palmítico, I+= tratado com insulina, I-=sem tratamento com insulina. Valores foram normalizados pela média do controle (P-/I-). Os valores estão apresentados como média± EPM de pelo menos 6 incubações. Para a análise estatística, foi utilizada one-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

5.11 Síntese de [^{14}C] Glicogênio a Partir da [^{14}C]-D-Glicose

O tratamento com a apocinina reverteu os efeitos do ácido palmítico na síntese de glicogênio no músculo sóleo (Figura 35). O tratamento com insulina no controle aumentou a síntese de glicogênio em 114%. O tratamento com ácido palmítico reduziu a ação da insulina em 39%. O tratamento com apocinina, contudo, aboliu a ação do ácido palmítico na resposta à insulina, causando incremento de 65% em relação ao grupo controle com palmitato e insulina e de 112% em relação ao controle sem palmitato e sem insulina. Os resultados estão expressos em valores relativos à média do controle sem insulina e sem palmitato.

Figura 35 - Síntese de [^{14}C] glicogênio a partir da [^{14}C] glicose no músculo sóleo.

P+=tratado com ácido palmítico, P-=sem tratamento com ácido palmítico, I+= tratado com insulina, I-=sem tratamento com insulina. Os valores foram normalizados pela média do controle (P-/I-). Os valores estão apresentados como média ± EPM de pelo menos 8 incubações. Para a análise estatística foi utilizada one-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

5.12 Oxidação do [U- ^{14}C]-Ácido Palmítico

O tratamento com apocinina causou aumento da oxidação de [U- ^{14}C]-palmitato pelo músculo sóleo (Figura 36). O tratamento com apocinina aumentou em 127% a oxidação do AG em relação ao controle sem insulina e AG não radioativo. A insulina causou diminuição da oxidação ou não teve efeito na oxidação do AG radioativo. As diminuições da oxidação nos músculos tratados com AG não radioativo se devem, provavelmente, à competição do AG marcado com o não marcado.

Figura 36 - Oxidação de [U-¹⁴C]-palmitato no músculo sóleo.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de pelo menos 8 incubações. Para a análise estatística foi utilizada one-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey .

5.13 Análise do Conteúdo Proteico por *Western Blotting*

O tratamento com apocinin não alterou a fosforilação da Akt. A insulina causou aumento da fosforilação da Akt tanto em animais controle quanto tratados (Figura 37). A normalização da Akt total pela proteína constitutiva (GAPDH) mostrou que não houve alteração da Akt total pelo tratamento (Figura 38).

Figura 37 - Conteúdo da pAkt em relação à Akt total.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de pelo menos 4 incubações. Para a análise estatística foi utilizada one-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

Figura 38 - Conteúdo da Akt total em relação a proteína constitutiva (GAPDH)

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 5 incubações. Para a análise estatística foi utilizada one-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

A fosforilação da AMPK foi aumentada pelo tratamento com apocinina e insulina em relação ao controle sem insulina em cerca de 120% (Figura 39). A normalização da AMPK total pela proteína constitutiva (GAPDH) mostrou que não houve alteração da AMPK total pelo tratamento (Figura 40).

Figura 39 - Conteúdo da pAMPK em relação à AMPK total.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 3 incubações. Para a análise estatística foi utilizada one-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

Figura 40 - Conteúdo da AMPK em relação ao GAPDH.

Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de pelo menos 3 incubações. Para a análise estatística foi utilizada one-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

6 DISCUSSÃO

6.1 Produção de EROs

O tratamento com apocinina em cultura de células satélite causou diminuição da produção de EROs em concentrações a partir de 1 mM, o que corrobora com os trabalhos realizados em fagócitos (Stolk et al., 1994) e músculo diafragmático (McClung et al., 2009). O tratamento com o mesmo antioxidante, quando realizado *in vivo*, no entanto, resultou em efeito contrário no sóleo, causando aumento da produção de EROs. A ausência de efeitos do tratamento no EDL é sugestivo de que a ação pró-oxidante da apocinina envolve mecanismo mitocondrial, uma vez que o músculo EDL é rico em fibras brancas ou glicolíticas. Fibras musculares brancas apresentam menor conteúdo de mitocôndrias que as fibras vermelhas ou oxidativas. O músculo sóleo é rico em fibras vermelhas.

A discrepância observada entre os resultados obtidos em cultura e *in vivo* pode ser explicada pelo fato de que a apocinina possui ação sequestradora de EROs quando colocada em contato direto com estas (Heumüller et al., 2008). Outra possibilidade é de que quando as células satélites são diferenciadas em cultura, apresentam baixo conteúdo mitocondrial com semelhanças às fibras glicolíticas (Pinheiro et al., 2010).

O resultado observado no ensaio do conteúdo de TBARS é sugestivo que o aumento de EROs causado pelo tratamento com apocinina *in vivo* não foi suficiente para causar efeitos deletérios à integridade dos tecidos musculares e geração de produtos de peroxidação lipídica. Além disso, nos ensaios realizados no plasma dos animais (concentração de GSH, GSSG, ferro e ácido úrico), o tratamento com apocinina não causou efeitos sistêmicos. Assim, o aumento na produção de EROs não causou estresse oxidativo. Provavelmente, o tratamento com apocinina causa *burst* de EROs, semelhante ao que ocorre durante, por exemplo, a contração muscular e, portanto, mimetizam o efeito deste.

Poucos autores (Castor et al., 2010; Riganti et al., 2006) consideram a apocinina um agente pró-oxidante. Castor et al. (2010) mostraram que a apocinina causa depleção do conteúdo de glutathiona reduzida. Experimentos reportados no presente estudo são indicativos de que uma diminuição da atividade da GPX

contribui para o aumento de EROs observado. Com a inibição da atividade da GPX, a glutathione reduzida não pode oxidar-se novamente, gerando glutathione oxidase e, dessa forma, não há redução do peróxido de hidrogênio. A apocinina não alterou a atividade da catalase e da SOD. É possível ter havido, de fato, a inibição de NADPH oxidase, uma vez que o sistema GPX/GR necessita da oxidação da NADPH para NADP^+ para que a GSSG seja novamente reduzida a GSH. Em cultura, contudo, é pouco provável que isso tenha ocorrido, uma vez que a atividade da NADPH oxidase em células cultivadas, tanto linhagens primárias quanto imortalizadas, é baixo (Hutchinson et al., 2007).

O aumento na oxidação do $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -palmitato leva-nos a especular que o tratamento com apocinina poderia elevar a produção de EROs através da maior oxidação deste metabólito. A oxidação de AG sabidamente aumenta a produção de EROs (conforme revisado por Boden, 2011; Silveira et al., 2008). Como essa oxidação ocorre na mitocôndria, esse efeito não foi observado em cultura de células nem no EDL, que possui menor conteúdo mitocondrial.

Muitos pesquisadores (Inoue et al., 2012; Yokota et al., 2009) observaram diminuição na produção de EROs no músculo esquelético. Contudo, não consideraram a importância da via de administração da apocinina, oferecendo-a aos animais por via oral ou misturando-a na água de beber, tornando-a suscetível aos efeitos da acidez estomacal ou metabolização pelo fígado (chamado de efeito de primeira passagem) após a absorção no intestino. Quando administrada por via parenteral, contudo, a droga não fica suscetível ao efeito de primeira passagem. Possivelmente, estes autores obtiveram resultados diferentes aos do presente estudo devido a metabolização da droga no estômago ou no fígado.

6.2 Efeitos da Apocinina na Captação e Metabolismo de Glicose

O mecanismo pelo qual o aumento na produção de EROs causado pelo tratamento com apocinina reverteu a resistência à insulina ainda não está elucidada. A maior parte dos trabalhos que associam o aumento da produção de EROs a elevação na captação de glicose pelo músculo esquelético (Merry, McConnell, 2011) mostra que as EROs ativam vias de translocação do GLUT-4 independente da ligação da insulina ao seu receptor, incluindo as vias da AMPK, p-38/MAPK,

calmodulina e associação entre EROs e espécies reativas de nitrogênio. Todas estas vias são ativadas quando ocorre a contração muscular durante o exercício físico.

O único estudo em que o aumento da produção de EROs foi associado com a elevação da sensibilidade à insulina foi publicado por Loh et al. (2009). Neste trabalho, foi demonstrado que camundongos *knockout* para GPX apresentam aumento da sensibilidade à insulina (fosforilação da Akt e GSK-3 foi mais intensa que os animais *background*) e maior conteúdo de peróxido de hidrogênio. Estes animais, quando tratados com NAC, apresentaram menor sensibilidade aos efeitos do hormônio, mostrando que o aumento da disponibilidade de glutatona reduzida causa resistência à insulina. Corroborando com esses dados, Sandström et al. (2006) demonstraram que o tratamento com NAC diminui a captação de 2[³H]-desoxiglicose no músculo em contração. O fato da apocinina ter inibido a atividade da GPX no músculo sóleo e estes animais terem apresentado reversão da resistência à insulina induzida por palmitato corrobora com os resultados obtidos por Loh et al. (2009).

Nos trabalhos em que as EROs reduziram os efeitos da insulina no músculo esquelético, verificou-se que estas espécies causam ativação de serina quinases (JNK, IKK, GSK3-β) direta ou indiretamente, tornando o receptor menos responsivo ao hormônio. Essa proposição, contudo, está descartada no presente estudo porque em nossos experimentos observou-se que o músculo do animal tratado com apocinina apresenta resposta à insulina semelhante ao controle na presença e na ausência do ácido palmítico. Além disso, a fosforilação da Akt não foi alterada no músculo do animal tratado com apocinina, mesmo frente ao aumento da produção de EROs.

Outro aspecto que deve ser considerado é o fato da inibição da NADPH oxidase ter efeitos permissivos à ação da insulina. Há forte relação entre angiotensina II e a ativação da NADPH oxidase em músculo esquelético (Henriksen et al., 2011; Ogihara et al., 2002). A ativação do receptor do tipo 1 para angiotensina II causa resistência à insulina, bem como inibição da fosforilação de Akt e GSK-3β. Wei et al. (2006) demonstraram que a inibição da angiotensina II diminui a ativação da NADPH oxidase, causando reversão da resistência à insulina.

As evidências até agora obtidas são sugestivas de que a apocinina interfere no sistema antioxidante GSH/GSSG, causando, assim, aumento no conteúdo de EROs

sem levar a um quadro de estresse oxidativo. Essa condição metabólica previne a resistência à insulina induzida por palmitato.

6.3 Efeitos da Apocinina no Metabolismo de Ácidos graxos

A apocinina causou aumento da oxidação de [U-¹⁴C]-palmitato. Este resultado não está de acordo com os estudos realizados por outros autores. A ativação da AMPK α 1 causa inibição da ACC2, aumentando a translocação e oxidação de AGs na mitocôndria. Choi et al. (2001) demonstraram que o aumento do conteúdo de EROs ativa a AMPK. Os próprios ácidos graxos ativam a AMPK, uma vez que a resistência à insulina induzida por esses metabólitos causa diminuição da produção de ATP devido ao menor aporte e metabolismo de glicose nas células musculares, causando elevação da síntese de AMPKK no tecido. Dessa forma, na presença de AMPK o músculo apresenta aumento da translocação dos FATs, possibilitando maior captação de AGs pelo tecido, como foi revisado por O'Neill et al. (2012). Os resultados obtidos são indicativos de que o tratamento com AGs não ativam a AMPK.

7 CONCLUSÕES

1. O tratamento com apocinina não causou aumento de EROs em cultura de células satélite provavelmente por ação sequestradora do composto.
2. O tratamento com apocinina (1 mg administrado em animais de 100 g, via intraperitoneal, uma vez por dia durante 5 dias) causou aumento da produção de EROs em músculo sóleo (fibra oxidativa), mas não em EDL (fibra branca). O aumento do conteúdo de EROs deve-se, pelo menos parcialmente, à diminuição da atividade da GPX. Esse aumento de EROs, contudo, não foi suficiente para causar estresse oxidativo.
3. O tratamento com apocinina (1 mg administrado em animais de 100 g, via intraperitoneal, uma vez por dia durante 5 dias) reverte a resistência à insulina induzida por ácido palmítico no músculo sóleo, conforme avaliado pelo ensaio de captação de 2-[³H]-desoxiglicose e síntese de [¹⁴C]-glicogênio.
4. O tratamento com apocinina aumentou a oxidação do [U-¹⁴C]-palmitato, porém esse efeito foi independente de AMPK.
5. O tratamento com apocinina não teve influência nas vias de captação de glicose dependentes (Akt) e nem nas independentes (AMPK) de insulina.

REFERÊNCIAS*

- Abbott MJ, Constantinescu S, Turcotte LP. AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ is an essential signal in the regulation of insulin-stimulated fatty acid uptake in control-fed and high-fat-fed mice. *Exp Physiol*. 2012 May;97(5):603-17.
- Abbott MJ, Edelman AM, Turcotte LP. CaMKK is an upstream signal of AMP-activated protein kinase in regulation of substrate metabolism in contracting skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 Dec;297(6):R1724-32.
- Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, Wakil SJ. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science*. 2001 Mar 30;291(5513):2613-6.
- Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem*. 1993 Aug 25;268(24):17665-8.
- Adachi T, Pimentel DR, Heibeck T, Hou X, Lee YJ, Jiang B, Ido Y, Cohen RA. S-Glutathiolation of Ras mediates redox-sensitive signaling by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2004;279(28):29857-62.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
- Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem*. 2002; 277(2):1531-7.
- Alsted TJ, Nybo L, Schweiger M, Fledelius C, Jacobsen P, Zimmermann R, Zechner R, Kiens B. Adipose triglyceride lipase in human skeletal muscle is upregulated by exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Mar;296(3):E445-53.
- Amaya Y, Yamazaki K, Sato M, Noda K, Nishino T, Nishino T. Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *J Biol Chem*. 1990; 265(24):14170-5.
- Andrade FH, Reid MB, Allen DG, Westerblad H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J Physiol*. 1998; 509 (Pt 2):565-75.

---

* De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Anthonsen MW, Rönstrand L, Wernstedt C, Degerman E, Holm C. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem*. 1998 Jan 2;273(1):215-21.

Arkininstall MJ, Tunstall RJ, Cameron-Smith D, Hawley JA. Regulation of metabolic genes in human skeletal muscle by short-term exercise and diet manipulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287:E25–E31.

Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 2004;16:42–7.

Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*. 2000L;109(1):33-44.

Barbieri E, Sestili P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J Signal Transduct*. 2012;2012:982794 (in press)

Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr*. 1999;31(4):347-66.

Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, Thurmond DC, Mora S, Shigematsu S, Bickel PE, Pessin JE, Saltiel AR. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):202-7.

Bellin C, de Wiza DH, Wiernsperger NF, Rösen P. Generation of reactive oxygen species by endothelial and smooth muscle cells: Influence of hyperglycemia and metformin. *Horm Metab Res*. 2006;38;732–9.

Berndt C, Lillig CH, Holmgren A. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(3):H1227-36

Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2005;11-12;1553-1567.

Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, Song W, Perez O, Cheung P, Merali S. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes*. 2008;57:2438–44.

Boden G, Merali S. Measurement of the increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Methods Enzymol*. 2011;489:67-82.

Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2011;18(2):139-43.

Bokoch GM, Diebold BA. Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood*. 2002;100(8):2692-6.

Bonen A, Campbell SE, Benton CR, Chabowski A, Coort SL, Han XX, Koonen DP, Glatz JF, Luiken JJ. Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36. *Proc Nutr Soc.* 2004 May;63(2):245-9.

Bonen A, Luiken JJ, Arumugam Y, Glatz JF, Tandon NN. Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J Biol Chem.* 2000 May 12;275(19):14501-8.

Bourron O, Daval M, Hainault I, Hajdouch E, Servant JM, Gautier JF, Ferré P, Fougère F. Biguanides and thiazolidinediones inhibit stimulated lipolysis in human adipocytes through activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia.* 2010 Apr;53(4):768-78.

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973;134(3):707-16.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol.* 2010;45(7-8):466-72

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414;813-20.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10

Chardin P, Camonis JH, Gale NW, van Aelst L, Schlessinger J, Wigler MH, Bar-Sagi D. Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science.* 1993 May 28;260(5112):1338-43.

Carling D, Clarke PR, Zammit VA, Hardie DG. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem.* 1989 Dec 8;186(1-2):129-36.

Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Anal Biochem* 1971;40:450–8.

Castor LR, Locatelli KA, Ximenes VF. Pro-oxidant activity of apocynin radical. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(12):1636-43

Chabowski A, Coort SL, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. The subcellular compartmentation of fatty acid transporters is regulated differently by insulin and by AICAR. *FEBS Lett.* 2005 Apr 25;579(11):2428-32.

Challiss RA, Espinal J, Newsholme EA. Insulin sensitivity of rates of glycolysis and

glycogen synthesis in soleus, stripped soleus, epitrochlearis, and hemi-diaphragm muscles isolated from sedentary rats. *Biosci Rep*. 1983 Jul;3(7):675-9.

Chambers MA, Moylan JS, Smith JD, Goodyear LJ, Reid MB. Stretch-stimulated glucose uptake in skeletal muscle is mediated by reactive oxygen species and p38 MAP-kinase. *J Physiol*. 2009;587(Pt 13):3363-73.

Choi SL, Kim SJ, Lee KT, Kim J, Mu J, Birnbaum MJ, Soo Kim S, Ha J. The regulation of AMP-activated protein kinase by H₂O₂. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;287(1):92-7.

Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MH, Mesa JL, Lancaster GI, Southgate RJ, Bruce CR, Duffy SJ, Horvath I, Mestrl R, Watt MJ, Hooper PL, Kingwell BA, Vigh L, Hevener A, Febbraio MA. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(5):1739-44

Clanton TL, Zuo L, Klawitter P. Oxidants and skeletal muscle function: Physiologic and pathophysiologic implications. *Pro Soc Exp Biol Med*. 1999;222(3):253-62.

Corton JM, Gillespie JG, Hardie DG. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr Biol*. 1994 Apr 1;4(4):315-24.

Crettaz M, Prentki M, Zaninetti D, Jeanrenaud B. Insulin resistance in soleus muscle from obese Zucker rats. Involvement of several defective sites. *Biochem J*. 1980;186(2):525-34.

Davies SP, Helps NR, Cohen PT, Hardie DG. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett*. 1995;377(3):421-5.

Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radical Biology & Medicine*. 2011;51:1289–301

Dodd-O JM, Pearse DB. Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ischemia-reperfusion lung injury. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol*. 2000;279:303-7.

Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med*. 1993 Oct;15(4):353-63

Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM, Weinberg RA. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature*. 1993 May 6;363(6424):45-51.

Engel PC, Jones JB. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD⁺ in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. *Anal Biochem*. 1978;88(2):475-84.

Erickson JR, Anderson ME. CaMKII and its role in cardiac arrhythmia. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2008;19(12):1332-6.

Espinal J, Challiss RA, Newsholme EA. Effect of adenosine deaminase and an adenosine analogue on insulin sensitivity in soleus muscle of the rat. *FEBS Lett*. 1983 Jul 11;158(1):103-6.

Espinosa A, García A, Härtel S, Hidalgo C, Jaimovich E. NADPH oxidase and hydrogen peroxide mediate insulin-induced calcium increase in skeletal muscle cells. 2009;284(4):2568-75.

Ferreira LF, Reid MB. Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. *J Appl Physiol*. 2008;104(3):853-60.

Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 2002;177:91–104.

Garton AJ, Campbell DG, Carling D, Hardie DG, Colbran RJ, Yeaman SJ. Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *Eur J Biochem*. 1989 Jan 15;179(1):249-54.

Gimeno RE, Ortegon AM, Patel S, Punreddy S, Ge P, Sun Y, Lodish HF, Stahl A. Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein. *J Biol Chem*. 2003 May 2;278(18):16039-44.

Glund S, Schoelch C, Thomas L, Niessen HG, Stiller D, Roth GJ, Neubauer H. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase 2 enhances skeletal muscle fatty acid oxidation and improves whole-body glucose homeostasis in db/db mice. *Diabetologia*. 2012 Jul;55(7):2044-53.

Gomez-Cabrera MC, Close GL, Kayani A, McArdle A, Viña J, Jackson MJ. Effect of xanthine oxidase-generated extracellular superoxide on skeletal muscle force generation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(1):R2-8

Goodwin JF, Murphy B: The colorimetric determination of iron in biological material with reference to its measurement during chelation therapy. *Clin Chem* 1966;12:58–69.

Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, Klein S. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes*. 2009;58:693–700.

Grisouard J, Timper K, Bouillet E, Radimerski T, Dembinski K, Frey DM, Peterli R, Zulewski H, Keller U, Müller B, Christ-Crain M. Metformin counters both lipolytic/inflammatory agents-decreased hormone sensitive lipase phosphorylation at

Ser-554 and -induced lipolysis in human adipocytes. *Arch Physiol Biochem.* 2011 Oct;117(4):209-14.

Guarino MP, Cong P, Cicala M, Alloni R, Carotti S, Behar J. Ursodeoxycholic acid improves muscle contractility and inflammation in symptomatic gallbladders with cholesterol gallstones. *Gut.* 2007;56(6):815-20.

Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE.* 2006(357):re13.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* New York: Oxford University Press; 2007.

Hardie DG, Salt IP, Hawley SA, Davies SP. AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *Biochem J.* 1999;338(Pt 3):717-22.

Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 1992;6:2674–8.

Hawley JA, Hargreaves M, Zierath JR. Signalling mechanisms in skeletal muscle: Role in substrate selection and muscle adaptation. *Essays Biochem.* 2006;42:1–12

Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of treonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1996;271(44):27879-87.

Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(5):993-9

Henriksen EJ. Dysregulation of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2010;6(5):285-93.

Heumüller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HH, Busse R, Schröder K, Brandes RP. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension.* 2007;51:211-7.

Hidalgo C, Sanchez G, Barrientos G and Aracena-Parks P. A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S-glutathionylation. *J Biol Chem.* 2006;281:26473-82.

Hink U, Tsilimingas N, Wendt M, Münzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Therapeutic implications. *Treat Endocrinol.* 2003;2(5):293-304.

Hirabara SM, de Oliveira Carvalho CR, Mendonça JR, Piltcher Haber E, Fernandes LC, Curi R. Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolization (Randle cycle). *FEBS Lett.* 2003;541(1-

3);109-14.

Hirabara SM, Gorjão R, Vinolo MA, Rodrigues AC, Nachbar RT, Curi R. Molecular targets related to inflammation and insulin resistance and potential interventions. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:379024. doi: 10.1155/2012/379024.

Hirabara SM, Silveira LR, Abdulkader F, Carvalho CR, Procopio J, Curi R. Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism. *J Cell Physiol.* 2007;210(1);7-15.

Hirabara SM, Silveira LR, Alberici LC, Leandro CV, Lambertucci RH, Polimeno GC, Cury Boaventura MF, Procopio J, Vercesi AE, Curi R. Acute effect of fatty acids on metabolism and mitochondrial coupling in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757(1);57-66.

Hirsch D, Stahl A, Lodish HF. A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8625-9.

Hoehn KL, Turner N, Swarbrick MM, Wilks D, Preston E, Phua Y, Joshi H, Furler SM, Larance M, Hegarty BD, Leslie SJ, Pickford R, Hoy AJ, Kraegen EW, James DE, Cooney GJ. Acute or chronic upregulation of mitochondrial fatty acid oxidation has no net effect on whole-body energy expenditure or adiposity. *Cell Metab.* 2010 Jan;11(1):70-6.

Holloway GP, Luiken JJ, Glatz JF, Spriet LL, Bonen A. Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview. *Acta Physiol (Oxf).* 2008 Dec;194(4):293-309.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science.* 1996;271(5249):665-8.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006 Dec 14;444(7121):860-7

Hougee S, Hartog A, Sanders A, Graus YM, Hoijer MA, Garssen J, van den Berg WB, van Beuningen HM, Smit HF. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *Eur J Pharmacol.* 2006 Feb 15;531(1-3):264-9.

Hoy AJ, Bruce CR, Turpin SM, Morris AJ, Febbraio MA, Watt MJ. Adipose triglyceride lipase-null mice are resistant to high-fat diet-induced insulin resistance despite reduced energy expenditure and ectopic lipid accumulation. *Endocrinology.* 2011 Jan;152(1):48-58.

Huang S and Czech MP. The GLUT4 Glucose Transporter *Cell Metab.* 2007;5(4):237-52.

Hu J, Liu J, Ghirlando R, Saltiel AR, Hubbard SR. Structural basis for recruitment of the adaptor protein APS to the activated insulin receptor. *Mol Cell.* 2003

Dec;12(6):1379-89.

Huijsman E, van de Par C, Economou C, van der Poel C, Lynch GS, Schoiswohl G, Haemmerle G, Zechner R, Watt MJ. Adipose triacylglycerol lipase deletion alters whole body energy metabolism and impairs exercise performance in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Aug;297(2):E505-13.

Hutchinson DS, Csikasz RI, Yamamoto DL, Shabalina IG, Wikström P, Wilcke M, Bengtsson T. Diphenylene iodonium stimulates glucose uptake in skeletal muscle cells through mitochondrial complex I inhibition and activation of AMP-activated protein kinase. *Cell Signal*. 2007 Jul;19(7):1610-20.

Inoue N, Kinugawa S, Suga T, Yokota T, Hirabayashi K, Kuroda S, Okita K, Tsutsui H. Angiotensin II-induced reduction in exercise capacity is associated with increased oxidative stress in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302(5):H1202-10

Irrcher, I.; Ljubicic, V.; Hood, D. A. Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1 α transcription in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;296:C116–C123.

Isola LM, Zhou SL, Kiang CL, Stump DD, Bradbury MW, Berk PD. 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Oct 10;92(21):9866-70.

Jackson MJ, McArdle A. Age-related changes in skeletal muscle reactive oxygen species generation and adaptive responses to reactive oxygen species. *J Physiol*. 2011;589(Pt 9):2139-45

Javesghani D, Magder SA, Barreiro E, Quinn MT, Hussain SN. Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(3):412-8.

Jellinger PS. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance. *Clinical Cornerstone*. 2007;8(7):30-42.

Jessen N, Goodyear LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2005;99(1):330-7.

Ji LL. Antioxidant signaling in skeletal muscle: A brief review. *Exp Gerontol*. 2007;42;582–93.

Katz A. Modulation of glucose transport in skeletal muscle by reactive oxygen species. *J Appl Physiol*. 2007;102(4):1671-6

Kayani AC, Close GL, Jackson MJ, McArdle A. Prolonged treadmill training increases HSP70 in skeletal muscle but does not affect age-related functional deficits. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294;R568–R576.

Kiens B, Roeman THM, Van der Vusse GJ. Muscular long-chain fatty acid content during graded exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1999;276:E352–E357.

Koonen DP, Benton CR, Arumugam Y, Tandon NN, Calles-Escandon J, Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Different mechanisms can alter fatty acid transport when muscle contractile activity is chronically altered. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Jun;286(6):E1042-9.

Kraegen EW, Cooney GJ. Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19(3):235-41.

Lambertucci RH, Hirabara SM, Silveira L dos R, Levada-Pires AC, Curi R, Pithon-Curi TC. Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol*. 2008;216(3):796-804.

Leighton B, Budohoski L, Lozeman FJ, Challiss RA, Newsholme EA. The effect of prostaglandins E1, E2 and F2 alpha and indomethacin on the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis to insulin in stripped soleus muscles of the rat. *Biochem J*. 1985 Apr 1;227(1):337-40.

Leng Y, Steiler TL, Zierath JR. Effects of insulin, contraction, and phorbol esters on mitogen-activated protein kinase signaling in skeletal muscle from lean and ob/ob mice. *Diabetes*. 2004;53(6):1436-44.

Li YP, Reid MB. NF-kappaB mediates the protein loss induced by TNF-alpha in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279(4):R1165-70.

Liu J, Kimura A, Baumann CA, Saltiel AR. APS facilitates c-Cbl tyrosine phosphorylation and GLUT4 translocation in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol*. 2002 Jun;22(11):3599-609.

Liu J, Deyoung SM, Zhang M, Dold LH, Saltiel AR. The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 2005 Apr 22;280(16):16125-34.

Loh K, Deng H, Fukushima A, Cai X, Boivin B, Galic S, Bruce C, Shields BJ, Skiba B, Ooms LM, Stepto N, Wu B, Mitchell CA, Tonks NK, Watt MJ, Febbraio MA, Crack PJ, Andrikopoulos S, Tiganis T. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell Metab*. 2009;10(4):260-72.

Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohé L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett*. 1974;42(1):68-72

Luchtefeld R, Luo R, Stine K, Alt ML, Chernovitz PA, Smith RE. Dose formulation and

analysis of diapocynin. *J Agric Food Chem*. 2008 Jan 23;56(2):301-6.

Luiken JJ, Coort SL, Willems J, Coumans WA, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JF. Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes*. 2003 Jul;52(7):1627-34.

Lyngø J, Juel C, Hellsten Y. Extracellular formation and uptake of adenosine during skeletal muscle contraction in the rat: role of adenosine transporters. *J Physiol*. 2001;537(2):597-605.

Maccarrone M, Ullrich V. Redox regulation in disease and ageing. *Cell Death Differ*. 2004;11;949–51.

Mannervik B. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1985;113;490–5.

Mattacks CA, Pond CM. Interactions of noradrenalin and tumour necrosis factor alpha, interleukin 4 and interleukin 6 in the control of lipolysis from adipocytes around lymph nodes. *Cytokine*. 1999 May;11(5):334-46.

McClung JM, Van Gammeren D, Whidden MA, Falk DJ, Kavazis AN, Hudson MB, Gayan-Ramirez G, Decramer M, DeRuisseau KC, Powers SK. Apocynin attenuates diaphragm oxidative stress and protease activation during prolonged mechanical ventilation. *Crit Care Med*. 2009;37(4):1373-9.

McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk DJ, Langlais P, Liu F, Lei XG. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(24):8852-7

McConnell GK, Kingwell BA. Does nitric oxide regulate skeletal muscle glucose uptake during exercise? *Exerc Sport Sci Rev*. 2006;34(1):36-41.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *J Biol Chem*. 1969;244:6049-55

Meier P, Renga M, Hoppeler H, Baum O. The impact of antioxidant supplements and endurance exercise on genes of the carbohydrate and lipid metabolism in skeletal muscle of mice. *Cell Biochem Funct*. 2012 Aug 3. In press.

Merry TL, Lynch GS, McConnell GK. Downstream mechanisms of nitric oxide-mediated skeletal muscle glucose uptake during contraction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;299(6):R1656-65

Merry TL, McConnell GK. Do reactive oxygen species regulate skeletal muscle glucose uptake during contraction? *Exerc Sport Sci Rev*. 2012;40(2):102-5

Merry TL, McConnell GK. Skeletal Muscle Glucose Uptake During Exercise: A Focus on Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Signaling. *IUBMB Life*. 2009;61(5):479–84.

Meyer JW, Schmitt ME. A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS Lett.* 2000;472:1-4.

Mitra P, Zheng X, Czech MP. RNAi-based analysis of CAP, Cbl, and CrkII function in the regulation of GLUT4 by insulin. *J Biol Chem.* 2004 Sep 3;279(36):37431-5

Morino K, Neschen S, Bilz S, Sono S, Tsigotis D, Reznick RM, Moore I, Nagai Y, Samuel V, Sebastian D, White M, Philbrick W, Shulman GI. Muscle-specific IRS-1 Ser->Ala transgenic mice are protected from fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes.* 2008;57(10):2644-51

Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 2004;279:49064-73.

Newsholme EA, Start C. Adipose tissue and the regulation of fat Metabolism. In: *Regulation in metabolism.* Oxford, England: John Wiley & Sons. 1973. p. 195-243.

Nickerson JG, Alkhateeb H, Benton CR, Lally J, Nickerson J, Han XX, Wilson MH, Jain SS, Snook LA, Glatz JF, Chabowski A, Luiken JJ, Bonen A. Greater transport efficiencies of the membrane fatty acid transporters FAT/CD36 and FATP4 compared with FABPpm and FATP1 and differential effects on fatty acid esterification and oxidation in rat skeletal muscle. *J Biol Chem.* 2009 Jun 12;284(24):16522-30.

Nishikawa T, Kukidome D, Sonoda K, Fujisawa K, Matsuhisa T, Motoshima H, Matsumura T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2007;77S:S161-S164.

Nishino T, Nishino T. The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *J Biol Chem.* 1997;272:29859-64.

Nishino T, Okamoto K, Kawaguchi Y, Hori H, Matsumura T, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant. *J Biol Chem.* 2005;1;280(26):24888-94

Nystrom FH, Quon MJ. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell Signal.* 1999 Aug;11(8):563-74.

O'Neill HM, Holloway GP, Steinberg GR. AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: Implications for obesity. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Jun 28. In press.

Ogihara T, Asano T, Ando K, Chiba Y, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Onishi Y, Fujishiro M, Katagiri H, Fukushima Y, Kikuchi M, Noguchi N, Aburatani H, Komuro I, Fujita T. Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. *Hypertension.* 2002;40(6):872-9.

Ogihara T, Asano T, Katagiri H, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Fujishiro M, Kushiyaama A, Fukushima Y, Kikuchi M, Noguchi N, Aburatani H, Gotoh Y, Komuro I, Fujita T. Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor- κ B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetologia*. 2004;47;794–805.

Oktyabrsky ON, Smirnova GV. Redox regulation of cellular functions. *Biochem (Moscow)*. 2007;72(2);132-45.

Olson DP, Pulinkunnil T, Cline GW, Shulman GI, Lowell BB. Gene knockout of *Acc2* has little effect on body weight, fat mass, or food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 20;107(16):7598-603.

Park H, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB, Saha AK. Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem*. 2002 Sep 6;277(36):32571-7.

Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 1997;272(47):29911-8.

Pearce LR, Komander D, Alessi DR. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Jan;11(1):9-22.

Pinheiro CHJ. Espécies reativas de oxigênio como sinalizadores das respostas metabólicas mediadas por contração no músculo esquelético. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2008.

Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, and Jackson MJ. Reactive Oxygen Species: Impact on Skeletal Muscle. *Compr Physiol*. 2011;1;941-69.

Qiao L, Kinney B, Schaack J, Shao J. Adiponectin inhibits lipolysis in mouse adipocytes. *Diabetes*. 2011 May;60(5):1519-27.

Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*. 2006;1:3159–65.

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*. 1963;13:785–9.

Rasmussen JT, Rasmussen MS, Petersen TE. Cysteines involved in the interconversion between dehydrogenase and oxidase forms of bovine xanthine oxidoreductase. *J Dairy Sci*. 2000;83(3);499-506.

- Reid MB, Shoji T, Moody MR, Entman ML. Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals. *J Appl Physiol*. 1992;73:1805-9.
- Ren T, He J, Jiang H, Zu L, Pu S, Guo X, Xu G. Metformin reduces lipolysis in primary rat adipocytes stimulated by tumor necrosis factor- α or isoproterenol. *J Mol Endocrinol*. 2006 Aug;37(1):175-83.
- Rhee SG, Chang TS, Jeong W, Kang D. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Mol Cells*. 2010;29(6):539-49.
- Rieusset J, Chauvin MA, Durand A, Bravard A, Laugerette F, Michalski MC, Vidal H. Reduction of endoplasmic reticulum stress using chemical chaperones or Grp78 overexpression does not protect muscle cells from palmitate-induced insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;417(1):439-45.
- Riganti C, Costamagna C, Bosia A, Ghigo D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin (acetovanillone) induces oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;212(3):179-87.
- Roepstorff C, Vistisen B, Donsmark M, Nielsen JN, Galbo H, Green KA, Hardie DG, Wojtaszewski JF, Richter EA, Kiens B. Regulation of hormone-sensitive lipase activity and Ser563 and Ser565 phosphorylation in human skeletal muscle during exercise. *J Physiol*. 2004 Oct 15;560(Pt 2):551-62.
- Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;212(2):167-78.
- Rowland AF, Fazakerley DJ, James DE. Mapping insulin/GLUT4 circuitry. *Traffic*. 2011;12(6):672-81.
- Ruderman NB, Park H, Kaushik VK, Dean D, Constant S, Prentki M, Saha AK. AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. *Acta Physiol Scand*. 2003 Aug;178(4):435-42.
- Sabio G, Kennedy NJ, Cavanagh-Kyros J, Jung DY, Ko HJ, Ong H, Barrett T, Kim JK, Davis RJ. Role of muscle c-Jun NH2-terminal kinase 1 in obesity-induced insulin resistance. *Mol Cell Biol*. 2010;30(1):106-15.
- Sahlin K, Cizinsky S, Warholm M, and Hoberg J. Repetitive static muscle contractions in humans--a trigger of metabolic and oxidative stress? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1992;64:228-36.
- Saito Y, Geisen P, Uppal A, Hartnett ME. Inhibition of NAD(P)H oxidase reduces apoptosis and avascular retina in an animal model of retinopathy of prematurity. *Mol Vis*. 2007;13:840-53.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T., editors. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Sandström ME, Zhang SJ, Bruton J, Silva JP, Reid MB, Westerblad H, Katz A. Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle. *J Physiol*. 2006;575(Pt 1):251-62.

Schaffer JE, Lodish HF. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*. 1994 Nov 4;79(3):427-36.

Schwiertman W, Sorrentino D, Potter BJ, Rand J, Kiang CL, Stump D, Berk PD. Uptake of oleate by isolated rat adipocytes is mediated by a 40-kDa plasma membrane fatty acid binding protein closely related to that in liver and gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jan;85(2):359-63.

Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106(2):171-6.

Silveira LR, Fiamoncini J, Hirabara SM, Procópio J, Cambiaghi TD, Pinheiro CH, Lopes LR, Curi R. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. *J Cell Physiol*. 2008;217(1):1-12.

Skolnik EY, Batzer A, Li N, Lee CH, Lowenstein E, Mohammadi M, Margolis B, Schlessinger J. The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science*. 1993 Jun 25;260(5116):1953-5.

Sourris KC, Lyons JG, de Courten MP, Dougherty SL, Henstridge DC, Cooper ME, Hage M, Dart A, Kingwell BA, Forbes JM, de Courten B. c-Jun NH2-terminal kinase activity in subcutaneous adipose tissue but not nuclear factor-kappaB activity in peripheral blood mononuclear cells is an independent determinant of insulin resistance in healthy individuals. *Diabetes*. 2009;58(6):1259-65;

Spriet LL. Regulation of skeletal muscle fat oxidation during exercise in humans. *Med Sci Sports Exer*. 2002;34:1477-14.

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, and Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*. 2002;277;44784-90.

Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci*. 2004;24(36):7779-88.

Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm*. 2008;2008:106507.

Stein B, Yang MX, Young DB, Janknecht R, Hunter T, Murray BW, Barbosa MS. p38-2, a novel mitogen-activated protein kinase with distinct properties. *J Biol Chem*. 1997;272(31):19509-17.

Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;11;95-102.

Stremmel W, Lotz G, Strohmeyer G, Berk PD. Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *J Clin Invest*. 1985 Mar;75(3):1068-76.

Sullivan JE, Brocklehurst KJ, Marley AE, Carey F, Carling D, Beri RK. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett*. 1994 Oct 10;353(1):33-6.

Tahara EB, Navarete FD, Kowaltowski AJ. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(9):1283-97.

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(2):R345-53.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4.

Trivedi RC, Rebar L, Berta E, Stong L. New enzymatic method for serum uric acid at 500 nm. *Clin Chem*. 1978;24:1908–11.

Turban S, Hajduch E. Protein kinase C isoforms: mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS Lett*. 2011 Jan 21;585(2):269-74.

Turcotte LP, Raney MA, Todd MK. ERK1/2 inhibition prevents contraction-induced increase in plasma membrane FAT/CD36 content and FA uptake in rodent muscle. *Acta Physiol Scand*. 2005 Jun;184(2):131-9.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003;552(2):335–44.

Vallerie SN, Hotamisligil GS. The role of JNK proteins in metabolism. *Sci Transl Med*. 2010;2(60):60rv5.

van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M, Fischer C, Keller C, Schjerling P, Hiscock N, Møller K, Saltin B, Febbraio MA, Pedersen BK. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Jul;88(7):3005-10.

Vejrazka M, Mícek R, Stípek S. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocyte cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005;1722:143-7.

Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(9):1428-59.

Waeber G, Delplanque J, Bonny C, Mooser V, Steinmann M, Widmann C, Maillard A, Miklossy J, Dina C, Hani EH, Vionnet N, Nicod P, Boutin P, Froguel P. The gene

MAPK8IP1, encoding islet-brain-1, is a candidate for type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2000;24(3):291-5.

Wang XS, Diener K, Manthey CL, Wang S, Rosenzweig B, Bray J, Delaney J, Cole CN, Chan-Hui PY, Mantlo N, Lichenstein HS, Zukowski M, Yao Z. Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1997;272(38):23668-74.

Watt MJ, Carey AL, Wolsk-Petersen E, Kraemer FB, Pedersen BK, Febbraio MA. Hormone-sensitive lipase is reduced in the adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus: influence of IL-6 infusion. *Diabetologia.* 2005 Jan;48(1):105-12.

Watt MJ, Holmes AG, Steinberg GR, Mesa JL, Kemp BE, Febbraio MA. Reduced plasma FFA availability increases net triacylglycerol degradation, but not GPAT or HSL activity, in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004 Jul;287(1):E120-7.

Wedellová Z, Dietrich J, Siklová-Vítková M, Kološťová K, Kováčiková M, Dušková M, Brož J, Vedral T, Stich V, Polák J. Adiponectin inhibits spontaneous and catecholamine-induced lipolysis in human adipocytes of non-obese subjects through AMPK-dependent mechanisms. *Physiol Res.* 2011;60(1):139-48.

Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS, Ibdah JA, Sowers JR. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;294;R673–R680.

Wei Y, Sowers JR, Nistala R, Gong H, Uptergrove GM, Clark SE, Morris EM, Szary N, Manrique C, Stump CS. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 2006 Nov 17;281(46):35137-46.

Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1981;77:325–33.

Wendel AA, Li LO, Li Y, Cline GW, Shulman GI, Coleman RA. Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 deficiency in ob/ob mice diminishes hepatic steatosis but does not protect against insulin resistance or obesity. *Diabetes.* 2010 Jun;59 (6):1321-9.

Winder WW, Hardie DG. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol.* 1999;277(1 Pt 1):E1-10.

Witters LA, Watts TD, Daniels DL, Evans JL. Insulin stimulates the dephosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Aug;85(15):5473-7.

Wright D, Sutherland L. Antioxidant supplementation in the treatment of skeletal muscle insulin resistance: potential mechanisms and clinical relevance. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008 Feb;33(1):21-31.

Wu M, Falasca M, Blough ER. Akt/protein kinase B in skeletal muscle physiology and pathology. *J Cell Physiol.* 2011;226(1):29-36.

Yao-Borengasser A, Varma V, Coker RH, Ranganathan G, Phanavanh B, Rasouli N, Kern PA. Adipose triglyceride lipase expression in human adipose tissue and muscle. Role in insulin resistance and response to training and pioglitazone. *Metabolism*. 2011 Jul;60(7):1012-20.

Yokota T, Kinugawa S, Hirabayashi K, Matsushima S, Inoue N, Ohta Y, Hamaguchi S, Sobirin MA, Ono T, Suga T, Kuroda S, Tanaka S, Terasaki F, Okita K, Tsutsui H. Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(3):H1069-77.

Yoshihara E, Fujimoto S, Inagaki N, Okawa K, Masaki S, Yodoi J, Masutani H. Disruption of TBP-2 ameliorates insulin sensitivity and secretion without affecting obesity. *Nat Commun*. 2010;23:127.

Yoshioka J, Schreiter ER, Lee RT. Role of thioredoxin in cell growth through interactions with signaling molecules. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(11-12):2143-51.

Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogenperoxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem*. 1997;253(2):162-8.

APÊNDICE - Artigos Publicados e em Publicação*

- Rodrigues HG, Vinolo MA, Magdalon J, **Fujiwara H**, Cavalcanti DM, Farsky SH, Calder PC, Hatanaka E, Curi R. Lipids. Dietary free oleic and linoleic acid enhances neutrophil function and modulates the inflammatory response in rats. 2010 Sep;45(9):809-19.
- Silva MM, Modolin M, Faintuch J, Yamaguchi CM, Zandoná CB, Cintra W Jr, **Fujiwara H**, Curi R, Gemperli R, Ferreira MC. Systemic inflammatory reaction after silicone breast implant. Aesthetic Plast Surg. 2011 Oct;35(5):789-94.

*Até novembro de 2012