Renato Tadeu Nachbar

**Efeito dos ácidos palmítico e palmitoléico sobre o
Metabolismo de glicose no músculo sóleo de ratos**

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

São Paulo
2012

Renato Tadeu Nachbar

**Efeito dos ácidos palmítico e palmitoléico sobre o
metabolismo de glicose no músculo sóleo de ratos**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi

Versão original

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 não autorizada pelo autor

Nachbar, Renato Tadeu.

Efeito dos ácidos palmítico e palmitoléico sobre o metabolismo de glicose no músculo sóleo de ratos / Renato Tadeu Nachbar. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Controle do Metabolismo por ácidos graxos.

Versão do título para o inglês: Effect of palmitic and palmitoleic acids on glucose metabolism in soleus muscle of rats.

1. Ácidos graxos 2. Ácidos graxos monoinsaturados 3. Insulina
4. Músculo esquelético 5. Estresse oxidativo 6. Metabolismo de proteínas I. Curi, Prof. Dr. Rui II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0141/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renato Tadeu Nachbar.

Título da Tese: Efeito dos ácidos palmítico e palmitoléico sobre o metabolismo de glicose no músculo sóleo de ratos.

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

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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

Of.CEUA.037.11

São Paulo, 13 de outubro de 2011.

REF.: Protocolo nº101/08.

"Efeitos dos ácidos graxos na produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em cultura de células musculares esqueléticas de ratos"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **estará em vigência até 11.12.2014.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da Comissão de Ética
no Uso de Animal - ICB /USP

Ilmo. Sr.

Prof Dr. Rui Curi

Departamento de Fisiologia e Biofísica

Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Instituto de Ciências Biomédicas

ATESTADO

Atestamos, para os devidos fins que, no período entre 06/04/2010 e 12/04/2010, o(a) senhor(a) Renato Tadeu Nachbar, de número USP 6335895, cursou a(s) disciplina(s) abaixo na qualidade de aluno(a) regular do programa de pós-graduação em Ciências (Fisiologia Humana), área de concentração Fisiologia Humana.

Disciplina: Proteção Radiológica

Sigla: BMM5834-1/3 **Carga Horária:** 15 **Conceito:** A **Frequência:** 100 **Créditos:** 1

Início: 06/04/2010 **Término:** 12/04/2010

Este documento eletrônico dispensa carimbo e assinatura. Sua autenticidade pode ser comprovada fornecendo-se o código de controle na seguinte página da Universidade de São Paulo:
<http://sistemas.usp.br/webdoc>

Documento emitido às 21:42:52 horas do dia 21/08/2012 (hora e data de Brasília).

Código de controle: FRNA - 6LN2 - 1I4G - Q4J5

Código de controle válido até: 21/08/2013

Página 1 de 1

Eu dedico este trabalho a todas as pessoas que me apoiaram e sempre acreditaram em mim.

Minha querida mãe, Aparecida, que apesar de todos os seus problemas nunca me deixou faltar amor e carinho. Te amo muito mãe!

A minha tia e segunda mãe, Maria, por ter me criado desde criança, dando-me todo o suporte e educação necessários. Te amo titia!

A minha tia Sueli, por todo apoio e investimento em minha vida. Te amo tia Su!

A minha irmã Thais, por estar sempre ao meu lado e por sempre dizer que me admira. Você é muito importante pra minha vida!

Ao meu tio Pedro, por cada minuto que gastou comigo, orientando sobre a importância de ser justo e seguir o bom caminho.

Ao meu querido pai, o qual eu já não posso mais dar um abraço, mas tenho certeza que está muito orgulhoso de mim.

A todos os meus amigos que sempre me ajudaram, direta e indiretamente!

Muito obrigado por tudo. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de ter chegado até aqui. Por ter cuidado de mim e me agraciado com muita saúde, paz e alegria. Agradeço a Deus por minha família e por todos os meus amigos.

Agradeço ao Professor Rui Curi pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório. Agradeço pelos conselhos, pelo cuidado e orientação. E agradeço principalmente pelo exemplo de liderança e competência.

Agradeço muito aos meus amigos Tavane e Augusto. Muito obrigado por terem me acolhido como parte de sua família. Só Deus sabe de tudo o que já fizeram por mim. Amo muito vocês e sou muito grato por estarem sempre ao meu lado.

Agradeço a Professora Solange Marta Franzói de Moraes, a pessoa que me ensinou, motivou e sempre apoiou desde quando eu comecei a me envolver com a pesquisa.

Agradeço ao professor Sandro Massao Hirabara, um grande amigo e exemplo de competência e comprometimento.

Agradeço aos meus amigos Diogo Vasconcelos, Amanda Martins, Guga, Carlão, Kaio Vitzel, Haroldo, Calos Hermano, Rafael Lambertucci e Fernanda Machado. Obrigado por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também a todos os meus amigos, pelos conselhos, ajuda e por me fazerem feliz.

Agradeço a Tatiana Loureiro e ao José Roberto de Mendonça (Bob), por toda a ajuda e suporte no laboratório.

Agradeço a FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço também a minha família. Sem vocês eu nunca chegaria até aqui!

E agradeço ainda a minha namorada Valérie Desnoyers. Muito obrigado por sempre me ajudar e por cuidar de mim e me fazer feliz. *Je t'aime beaucoup!*

“Se deseja gloriar-se em algo, que seja em ser justo e fazer o bem. É incomparável a sensação de poder desfrutar das conquistas com a consciência pura”.

Renato Tadeu Nachbar

RESUMO

NACHBAR, R. T. **Efeito dos ácidos palmítico e palmitoléico sobre o metabolismo de glicose no músculo sóleo de ratos.** 2012. 90 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos dos ácidos palmítico (16:0) e palmitoléico (16:1 ω 7) sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), metabolismo de glicose e via de sinalização da síntese de proteínas em músculos sóleos incubados de ratos. Este músculo é predominantemente oxidativo, rico em mitocôndrias e responsivo à insulina. Os músculos foram incubados durante uma ou quatro horas, na presença dos ácidos palmítico (500 μ M), ou palmitoléico (500 μ M) ou do antioxidante ebselen (30 μ M). A produção de H_2O_2 foi mensurada utilizando sonda de fluorescência Amplex[®] e a captação de glicose e a síntese de glicogênio foram avaliadas pela incorporação de 2-desoxi-[2,6-³H]-D-glicose e [U-¹⁴C]-D-glicose. O tratamento com ácido palmítico aumentou a produção de H_2O_2 , captação de glicose e síntese de glicogênio após 1 hora de incubação. Estes efeitos foram abolidos pelo tratamento com ebselen (um antioxidante que mimetiza a ação da glutathione peroxidase) e wortmanina (inibidor da atividade da PI3K). O ácido palmitoléico não alterou os parâmetros avaliados neste período. Após 4 horas, o tratamento com ácido palmítico reduziu a fosforilação da Akt e GSK3 β e este efeito foi abolido pelo ebselen. Por outro lado, o tratamento com ácido palmitoléico aumentou a fosforilação da Akt e GSK3 β após quatro horas de incubação. Os resultados obtidos no presente estudo são sugestivos de que o aumento na captação de glicose induzido pelo tratamento com ácido palmítico, durante uma hora, ocorre por ativação da PI3K pela geração de H_2O_2 . O oposto ocorre em 4 horas, sendo mediado pela produção de H_2O_2 e óxido nítrico. O tratamento com ácido palmitoléico ativa a via Akt/GSK3 β , mas este efeito só ocorre após quatro horas de incubação.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Espécies reativas de nitrogênio. Espécies reativas de oxigênio. Resistência à insulina. Síntese de proteínas.

ABSTRACT

NACHBAR, R. T. **Effect of palmitic and palmitoleic acids on glucose metabolism of soleus muscle of rats.** Ph. D thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The aim of this study was to investigate the effects of palmitic acid (16:0) and palmitoleic acid (16:1 ω 7) on hydrogen peroxide (H_2O_2) production, glucose uptake and signaling pathway of protein synthesis in incubated rat soleus muscles. This is a predominantly oxidative muscle rich in mitochondria and responsive to insulin. The muscles were incubated for one or four hours, in the presence of palmitic acid (500 mM), palmitoleic acid (500 mM) or the antioxidant ebselen (30 mM). The production of H_2O_2 was measured by using the fluorescent probe Amplex[®] and glucose uptake and glycogen synthesis were assessed by incorporation of 2-deoxy-[2,6-³H]-glucose and D-[U-¹⁴C]-D-glucose. The treatment with palmitic acid increased H_2O_2 production, glucose uptake and glycogen synthesis after one hour of incubation. These effects were abolished by treatment with ebselen (an antioxidant that mimics the action of glutathione peroxidase) and wortmannin (inhibitor of PI3K activity). The palmitoleic acid did not change the parameters evaluated in this period. After four hours, treatment with palmitic acid reduced phosphorylation of Akt and GSK3 β and this effect was abolished by ebselen. The treatment with palmitoleic acid increased Akt and GSK3 β phosphorylation after four hours of incubation. These results indicate that an increase in glucose uptake induced by treatment with palmitic acid for one hour occurs by activation of PI3K through H_2O_2 Production. Opposite results are observed in four hours being mediated by H_2O_2 production. The treatment with palmitoleic acid activates the Akt/GSK3 β pathway but this effect occurs after four hours of incubation only.

Keywords: Fatty acids. Reactive nitrogen species. Reactive oxygen species. Insulin resistance. Protein synthesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química dos ácidos palmítico e palmitoléico.....	19
Figura 2- Ativação do complexo NAD(P)H oxidase.	21
Figura 3- Geração de ROS na mitocôndria.....	22
Figura 4- Visão geral de moléculas envolvidas no tráfico de GLUT4 regulado por insulina.....	26
Figura 5- Mecanismo de ativação da via das MAPK pelo receptor de insulina.	27
Figura 6- Mecanismo de ativação da síntese protéica via Akt/mTOR1.	30
Figura 7- Liberação de H ₂ O ₂ por músculos sóleos de ratos <i>Wistar</i> incubados por 1, 2, 3 ou 4 horas.	41
Figura 8- Liberação acumulada de H ₂ O ₂ por músculos sóleos de ratos <i>Wistar</i> detectada através da sonda fluorescente <i>Amplex[®] Ultra Red</i>	43
Figura 9- Área sob a curva (AUC) da liberação acumulada de H ₂ O ₂ por músculos sóleos de ratos.	44
Figura 10- Taxa de liberação de H ₂ O ₂ (unidades de fluorescência.mg ⁻¹ .min ⁻¹) no meio de incubação dos músculos sóleos de ratos em diferentes períodos.	45
Figura 11- Liberação acumulada de H ₂ O ₂ por músculos sóleos tratados com ácido palmítico e bromopalmitato.	47
Figura 12- Liberação de H ₂ O ₂ por músculos sóleos tratados com ácido palmítico, catalase, ebselen ou NAC.	48
Figura 13- Fosforilação da proteína Akt em músculos sóleos.....	50
Figura 14- Fosforilação da proteína GSK-3 β em músculos sóleos.	51
Figura 15- A captação de 2-desoxi-[2,6- ³ H]-D-glicose por músculos sóleos incubados.....	52

Figura 16- Efeito do PA e PO sobre o metabolismo de glicose após uma hora de tratamento.....	54
Figura 17- Fosforilação da proteína Akt em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmítico (PA) e ou 30 μ M de ebselen (Eb).....	56
Figura 18- Fosforilação da proteína Akt em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmitoléico (PO) e ou 30 μ M de ebselen (Eb).....	57
Figura 19- Fosforilação da proteína p38 em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmítico (PA) e ou 30 μ M de ebselen (Eb).	59
Figura 20- Fosforilação da proteína p38 em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmitoléico (PO) e ou 30 μ M de ebselen (Eb).	60
Figura 21- Fosforilação da proteína S6 em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmítico (PA) e ou 30 μ M de ebselen (Eb).	61
Figura 22- Fosforilação da proteína S6 em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmitoléico (PO) e ou 30 μ M de ebselen (Eb).	62
Figura 23- Imagem representativa da fosforilação da proteína 4EBP-1 em músculos tratados com 500 μ M de ácido palmítico, 500 μ M de ácido palmitoléico (PO) e ou 30 μ M de Ebselen (Eb).	63
Figura 24- Imagem representativa do conteúdo de proteínas conjugadas ao 4-hidroxinonenal (4HNE)	64
Figura 25- (A) Captação de 2-desoxi-[2,6- ³ H]-D-glicose por músculos sóleos incubados. (B) Aumento da captação de glicose estimulado pela insulina.	65
Figura 26- Fosforilação da proteína Akt em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmítico (PA) e ou 30 μ M de ebselen (Eb).....	66
Figura 27- Fosforilação da proteína GSK3 β em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmítico (PA) e ou 30 μ M de ebselen (Eb) durante quatro horas.....	67
Figura 28- Fosforilação da proteína S6 em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmítico (PA), 500 μ M de ácido palmitoléico (PO) e ou 30 μ M de ebselen (Eb) durante 4 h.....	68

Figura 29- Imagem representativa da expressão da proteína iNOS em músculos tratados com 500 μ M de ácido palmítico e ou 30 μ M de Ebselen (Eb) durante 4 horas.....69

Quadro 1- Visão geral dos efeitos do tratamento de músculos sóleos de ratos com PA ou PO durante uma ou quatro horas.....77

Figura 30- Efeitos do ácido palmítico (PA) e ácido palmitoléico (PO) na produção de H_2O_2 e metabolismo de glicose durante uma e quatro horas de tratamento.....78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA- análise de variância
AUC - área sob a curva
BSA – albumina sérica bovina
CAT – catalase
CEEa- Comitê de Ética em Experimentação Animal
CPT-I – carnitina palmitoil tranferase-I
CTE- cadeia de transporte de elétrons
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO - dimetilsulfóxido
Eb – ebselen
eIF2 - *eukaryotic initiation factor-2*
eIF-4F - *eukaryotic translation initiation factor-4F*
ERN- espécies reativas de nitrogênio
EROs – espécies reativas de oxigênio
GPX – glutational peroxidase
GSH – glutational reduzida
GSK3 β - *Glycogen synthase kinase 3 beta*
IKK – I κ B quinase
iNOS- óxido nítrico sintase induzível
IP₃- fosfatidil inositol trifosfato
4E-BP1 - *4E-binding protein-1*
IRS - substrato para o receptor da insulina
IUPAC- *International Union of Pure and Applied Chemistry*
JAK2 - janus quinase-2
mTOR - *target of rapamicin-2*
NAD(P)H - nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
NAC – N-acetilcisteína
NF- κ B – fator nuclear kappa B
NO- óxido nítrico
O₂^{•-} - ânion radical superóxido
ONOO⁻ - peroxinitrito
p38-MAPK - p38 mitogen-activated protein kinases

PA – ácido palmítico

PDH - piruvato desidrogenase

PDK-1 - proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos-1

PI3-K - fosfatidil-inositol 3-quinase

PIP2 - fosfatidil-inositol-2-fosfato

PIP3 - fosfatidil-inositol-3-fosfato

PKB – proteína quinase B

PKC – proteína quinase C

PO – ácido palmitoléico

RNS- espécies reativas de nitrogênio

SFB- soro fetal bovino

Shc - colágeno homólogo ao Src

SOD – superóxido dismutase

SOD1/Cu,Zn-SOD – cobre, zinco superóxido dismutase (isoforma citossólica)

SOD2/Mn-SOD – manganês superóxido dismutase (isoforma mitocondrial)

TBARS - *Thiobarbituric Acid-Reactive Substances*

TNF- α – fator de necrose tumoral – alfa

TSC - *tuberous sclerosis*

W – wortmanina

XO – xantina oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 ÁCIDOS GRAXOS.....	18
1.2 ÁCIDOS GRAXOS E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	19
1.3 ÁCIDOS GRAXOS E METABOLISMO DE GLICOSE NO MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	24
1.4 ÁCIDOS GRAXOS E A REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	29
2 OBJETIVOS.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 ANIMAIS.....	33
3.2 MATERIAIS.....	33
3.3 INCUBAÇÕES.....	34
3.3.1 Diluição dos ácidos graxos e drogas utilizadas.....	34
3.3.2 Meio de incubação.....	34
3.3.3 Incubação do músculo sóleo	35
3.4 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE H ₂ O ₂ UTILIZANDO A SONDA FLUORESCENTE AMPLEX [®] ULTRA-RED.....	35
3.5 CAPTAÇÃO DE GLICOSE E SÍNTESE DE GLICOGÊNIO NO MÚSCULO SÓLEO ISOLADO E RESPOSTA À INSULINA.....	36
3.6 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE GLICOSE E SÍNTESE DE PROTEÍNAS.....	36
3.6.1 Quantificação de proteínas.....	37

3.6.2 <i>Western Blotting</i> da oxido nítrico sintase induzível (iNOS) e proteínas reguladoras das vias de metabolismo de glicose e síntese de proteínas.....	37
3.7 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS	38
3.7.1 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	38
3.7.2 Determinação de proteínas ligadas ao 4-hidroxinonenal (4HNE).....	39
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	39
4 RESULTADOS	40
4.1 EFEITO DO PA E PO SOBRE A LIBERAÇÃO DE H ₂ O ₂ DURANTE QUATRO HORAS DE INCUBAÇÃO DOS MÚSCULOS SÓLEOS.....	40
4.2 EFEITOS DOS TRATAMENTOS POR UMA HORA.....	42
4.2.1 Efeito do PA no aumento da liberação de H ₂ O ₂ inicia-se antes de 30 min de tratamento.....	42
4.2.2 A liberação de H ₂ O ₂ pelo músculo sóleo não depende da oxidação do PA.....	46
4.2.3 Tratamentos com N-acetil-L-cisteína (NAC) e ebselen (Eb) suprimem a liberação de H ₂ O ₂	47
4.2.4 O peróxido de hidrogênio aumenta e os antioxidantes NAC e Eb diminuem a fosforilação da Akt e GSK-3β.....	48
4.2.5 Efeito do PA e PO sobre a captação de glicose estimulada com dose suprafisiológica de insulina (7nM).....	52
4.2.6 O PA aumenta a síntese de glicogênio e a captação de glicose estimulada com dose fisiológica de insulina (0,7nM).....	53
4.2.7 O PA aumenta a fosforilação da Akt e este efeito é abolido pelo antioxidante Eb.....	55
4.2.8 O efeito do PA sobre a captação de glicose é independente da ativação da p38-MAPK.....	58
4.2.9 PA e PO não alteram a fosforilação das proteínas S6 e 4EBP-1.....	61
4.3 EFEITOS DOS TRATAMENTOS POR QUATRO HORAS.....	63

4.3.1 O PA aumenta a peroxidação lipídica.....	63
4.3.2 O PA reduz a captação de glicose em músculo esquelético tratado por quatro horas.....	64
4.3.3 O PA reduz e o PO aumenta a fosforilação da Akt e GSK3 β em músculo esquelético tratado por quatro horas.....	65
4.3.4 PA e PO não alteram a fosforilação da proteína S6.....	68
4.3.5 O PA aumenta a expressão da proteína iNOS.....	69
5 DISCUSSÃO.....	70
6 CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	79
APÊNDICE – PUBLICAÇÕES.....	92
ARTIGOS PUBLICADOS OU ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO.....	92
CAPITULOS DE LIVROS INTERNACIONAIS.....	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são moléculas constituídas de uma cadeia hidrocarbonada e um grupamento carboxila, sendo classificados como saturados ou insaturados (quando apresentam pelo menos uma dupla ligação na cadeia carbônica). Os ácidos graxos também são classificados como de cadeia curta (dois a quatro átomos de carbonos), média (seis a catorze átomos de carbonos) e longa (dezesesseis ou mais átomos de carbonos) (CHRISTIE, 1989). A numeração dos átomos de carbono nos AGs começa a partir do carbono da carboxila, designado como 1 (um) na nomenclatura da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). O próximo átomo de carbono é designado como 2 (dois), também chamado de α na nomenclatura tradicional. O carbono metílico terminal é designado como "n" de acordo com a nomenclatura IUPAC, e como " ω ", segundo a nomenclatura tradicional. A posição de uma dupla ligação pode ser indicada pela contagem decrescente a partir do final da cadeia. Se, por exemplo, uma dupla ligação está presente entre o terceiro e o quarto átomos de carbono contados a partir do final do terminal metil é descrita como n-3 ou ω -3 (omega-3). O produto final da ácido graxo sintetase é o ácido palmítico (16:0), que pode ser alongado a ácido esteárico (18:0) e a outros ácidos de cadeia longa, ou ainda ser insaturado pela Δ^9 dessaturase sendo convertido ao ácido palmitoléico ω -7 ou 9 (cis-9-hexadecanoico), com uma única insaturação no sétimo ou nono átomo de carbono a partir do carbono oposto ao hidrocarboneto terminal, o carbono *omega*. Os ácidos palmítico (PA) e palmitoléico (PO), além de serem sintetizados pelos mamíferos, também são obtidos na dieta (NETTLETON, 1995). O PA é um ácido graxo saturado, de cadeia longa e muito abundante na circulação (Figura 1A). Em relação aos ácidos graxos totais, a porcentagem de PA no plasma é de 26,7% em homens e 27,8% em mulheres na faixa etária de 20 a 25 anos de idade. O PO é um ácido graxo monoinsaturado (Figura 1B) e representa 4,5% da porcentagem plasmática de ácidos graxos em homens e 4,1 % em mulheres (LENTNER, 1984).

Figura 1 - Estrutura química dos ácidos palmítico e palmitoléico.

(A) Ácido palmítico; (B) ácido palmitoléico.

Os efeitos do PA sobre o metabolismo de glicose foram abundantemente estudados, devido a sua alta concentração plasmática em condições fisiológicas e patológicas. O tratamento do músculo esquelético com PA por períodos prolongados está implicado no desencadeamento da resistência à ação da insulina (HIRABARA; CURI; MAECHLER, 2010; TSUCHIYA et al., 2010; WANG et al., 2010). Por outro lado, a exposição aguda a este ácido graxo pode induzir aumento na captação e oxidação de glicose, além de elevação na síntese de glicogênio (HIRABARA et al., 2006; PU et al., 2011). Alguns pesquisadores demonstraram que o PA aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no músculo esquelético, o mesmo não ocorre com o PO (LAMBERTUCCI et al., 2008; YUZEFOVYCH; WILSON; RACHEK, 2010). O PO foi recentemente classificado como uma lipocina pois aumenta a sensibilidade periférica à insulina e reduz o estresse de retículo e morte de hepatócitos em estudos *in vitro* (AKAZAWA et al., 2010; CAO et al., 2008). Vários autores demonstraram correlação positiva entre a quantidade de PO circulante e a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos (MOZAFFARIAN et al., 2010; STEFAN et al., 2010).

1.2 ÁCIDOS GRAXOS E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

As espécies reativas derivadas do oxigênio podem ser radicalares e não-radicalares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Um radical livre é qualquer espécie capaz de existência independente (daí o termo livre) que contém um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Um elétron

desemparelhado ocupa um orbital atômico ou molecular por si só. O mais simples dos radicais livres é o hidrogênio atômico. Uma vez que um átomo de hidrogênio tem apenas um elétron, este deve ser não emparelhado. As EROS são produzidas continuamente durante as reações metabólicas e medeiam a transferência de elétrons em diversos processos bioquímicos, exercendo regulação do metabolismo. Estas moléculas podem ser geradas exógena ou endogenamente no citoplasma, mitocôndrias e membrana plasmática. Carboidratos, proteínas, lipídeos e DNA são alvos da oxidação pelas EROS (ANDERSON, 1996; YU; ANDERSON, 1997). O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é constantemente produzido nas células e reage com centros de ferro-enxofre existentes em proteínas, destruindo-os e levando à liberação de ferro dentro da célula (KEYER, 1996). O radical hidroxil ($HO^{\cdot}$), apesar de possuir baixa capacidade de difusão, é a ERO que mais induz lesões em componentes celulares. O H_2O_2 é uma ERO não-radicalar, mas possui alta capacidade de atravessar as membranas celulares e induzir danos, inclusive na molécula de DNA (ANDERSON, 1996).

O H_2O_2 pode se difundir pela membrana nuclear e reagir com Fe^{2+} , através da reação de Fenton (Equação 1), levando à formação do $HO^{\cdot}$, que causa lesões por oxidação no DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). O ânion superóxido mobiliza ferro da ferritina, proteína responsável pelo armazenamento de ferro intracelular, e promove dano oxidativo a partir da geração de HO (ARÓSIO; LEVI, 2002).

A formação de H_2O_2 no organismo ocorre principalmente pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$, que ocorre espontaneamente ou catalisada por oxidases, dentre elas a superóxido dismutase (SOD). Um dos principais sítios de produção de $O_2^{\cdot-}$ é a mitocôndria, que possui atividade da SOD em seu interior. Assim, o $O_2^{\cdot-}$ é formado e dismutado em H_2O_2 , que é em seguida parcialmente eliminado pela catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX). Parte do H_2O_2 produzido atravessa a membrana mitocondrial sendo transferido ao citoplasma da célula (HALLIWELL; CLEMENTB; LONGA, 2000).

Diversos sítios podem gerar EROS no músculo esquelético, incluindo o sistema NADPH-oxidase (Figura 2) (BEJMA; JI, 1999; ESPINOSA, 2006;

JAVESGHANI et al., 2002), xantina-xantina oxidase (APPLE et al., 1991) e principalmente os complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (BALABAN et al., 2005; BARJA, 1999; LOSCHEN et al., 1974). Durante a respiração mitocondrial, cerca de 1 % a 5% do oxigênio consumido pelas células é convertido em EROS devido ao vazamento de elétrons pela cadeia de transporte de elétrons, mais especificamente nos complexos I e III (Figura 3) (DURHAM, 2002; PAPA, 1996; REID; WEI; LEE, 2002).

Figura 2 - Ativação do complexo NAD(P)H oxidase.

O heterodímero gp91^{phox}-p22^{phox} reside na membrana plasmática. Entretanto, o complexo p47^{phox}-p67^{phox}-p40^{phox} fica no citossol. A ativação da NAD(P)H oxidase inicia-se pela fosforilação (em serina) da subunidade citoplasmática p47^{phox}, desencadeando sua migração para a membrana, onde, juntamente com a Rac, associa-se ao citocromo b558, promovendo a atividade catalítica da enzima.

Fonte: Modificado de Nauseef, 2008.

Figura 3 - Geração de ROS na mitocôndria.

Elétrons dos complexos desidrogenase I ou II são transferidos para a coenzima Q (Q), também conhecida como ubiquinona. A forma reduzida resultante (QH₂) da coenzima Q sofre, em seguida, duas eletrorreduções (o ciclo Q) usando formas oxidada e reduzida dos citocromos B e C. O intermediário instável do ciclo Q (üQ1) pode levar à formação de superóxido através da transferência de elétrons diretamente para o oxigênio no tecido muscular.

Fonte: Modificado de Baughman e Mootha, 2006.

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio no balanço entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes causando efeitos deletérios aos tecidos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O estresse oxidativo pode causar danos celulares, assim como alterações na comunicação intracelular e na expressão de genes, mutações e morte celular (RATTAN, 2006).

Para evitar excesso do conteúdo de EROs no interior da célula e prevenir danos oxidativos a moléculas, atuam sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (RODRIGUEZ et al., 2004). Dentre os agentes antioxidantes não-enzimáticos encontram-se a glutatona reduzida (GSH), cisteína, melatonina, β-

caroteno e as vitaminas C e E. As principais enzimas antioxidantes são: catalase (CAT), superóxido dismutases (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e glutathione reductase (GR) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; WEI; LEE, 2002). A SOD converte o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e possui isoforma citossólica (Cu,Zn-SOD), intramitocondrial (Mn-SOD) e extracelular (EC-Cu,Zn-SOD) (FERREIRA; REID, 2008; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; TURRENS, 2003). A CAT possui o íon ferro no seu sítio ativo, que reage com o H_2O_2 formando água e oxigênio. É uma proteína tetramérica e sua atividade não é saturada em concentrações fisiológicas de H_2O_2 (LLEDIAS; RANGEL; HANSBERG, 1998; RODRIGUEZ et al., 2004). A GPX reduz o H_2O_2 utilizando glutathione reduzida (GSH), formando água e glutathione oxidada (GSSG). Em seguida, a enzima glutathione reductase (GR) recicla a GSH a partir da GSSG (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Outra importante espécie reativa é o óxido nítrico (NO), porém, como se origina do nitrogênio, é chamado de espécie reativa de nitrogênio (ERN). O NO possui funções biológicas importantes como a de neurotransmissor, vasodilatador e regulador da resposta imunitária e do metabolismo de glicose (BREDT, 1999, REID, 2001). O NO é gerado a partir de arginina e O_2 por uma família de três isoformas da óxido nítrico sintase (NOS): NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e a NOS induzível (iNOS). Essas isoformas exibem uma distribuição tecidual ampla incluindo o tecido muscular esquelético (KOBZIK et al., 1994). O NO é consideravelmente menos reativo que o radical $\cdot OH$, porém, sua interação com o $O_2^{\cdot-}$ produz peroxinitrito ($ONOO^-$), como mostrado na Equação 2. Ao contrário de outras EROs e a exemplo do $\cdot OH$, o NO bem como o $ONOO^-$ não são substratos para uma enzima antioxidante específica, sendo suas concentrações reguladas pelo conteúdo de antioxidantes não enzimáticos e principalmente pelas concentrações de $O_2^{\cdot-}$ disponíveis (KOOY et al., 1997; RAO et al., 1992). Portanto, um aumento desproporcional do $O_2^{\cdot-}$ pode resultar em redução substancial das concentrações de NO (Equação 2).

O NO regula vários processos biológicos pela modificação de resíduos de cisteínas em diferentes proteínas (S-nitrosilação). Segundo Carvalho-Filho et al.

(2005), o aumento na expressão de iNOS provoca aumento da produção de NO que pode induzir a S-nitrosação IR β , IRS-1 e Akt, induzindo *downregulation* de sinalização de insulina. Pilon et al. (2010) demonstraram, em experimentos com ratos, camundongos e miócitos L6 em cultura, que o ONOO⁻ é um controlador importante no músculo esquelético da indução de RI causado pela iNOS. Segundo estes autores, este derivado oxidante inibe a ação da insulina através de nitração da tirosina do IRS-1, que impede a fosforilação da tirosina nessa proteína e a atividade da PI3K. Têm sido demonstrado que o PA aumenta a expressão e atividade de iNOS em diversos tipos celulares, assim como ilhotas pancreáticas (MEIDUTE et al., 2008), Macrófagos (DE LIMA et al., 2006), cardiomiócitos (TSANG; COWIE; RABKIN, 2004) e célula muscular esquelética (LAMBERTUCCI et al., 2012).

1.3 ÁCIDOS GRAXOS E METABOLISMO DE GLICOSE NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

O músculo esquelético representa 40% da massa corporal e desempenha função importante na manutenção da glicemia (RICQUIER; BOUILLAUD, 2000). A regulação da captação de glicose pelo músculo é, principalmente, estimulada pela insulina (PESSIN; SALTIEL, 2000).

A insulina liga-se à subunidade α do seu receptor, levando à ativação da tirosina quinase intrínseca e autofosforilação dos resíduos de tirosina da subunidade β do próprio receptor (BALLOTTI et al., 1989; KASUGA, 1993; KUBAR; ROCHET, 1990). As subunidades β fosforiladas permitem a ligação e fosforilação de várias proteínas intracelulares, dentre essas os substratos para o receptor da insulina-1, 2, 3 e 4 (IRS-1, 2, 3 e 4), colágeno homólogo ao Src (Shc) (PRONK et al., 1993), pp60 (LAVAN; LIENHARD, 1993), Janus quinase-2 (JaK-2) (SAAD et al., 1996), ecto ATPase (PERROTTI et al., 1987).

O IRS-1, após fosforilado, associa-se a várias proteínas, entre elas a fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3-K) (NYSTROM; QUON, 1999). A PI3-K é uma enzima cinase muito conservada que ativa o grupamento 3' de fosfoinosítídeos, ativando, assim, cascatas de sinalização intracelulares que estimulam o metabolismo, crescimento e proliferação celulares. A família PI3-K é subdividida em três classes (ENGELMAN; LUO; CANTLEY, 2006). Os membros da classe I

correspondem a uma das principais vias de transmissão de sinal a partir de receptores de membrana. Estes são heterodímeros constituídos de subunidades regulatória e catalítica. O fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato é o principal substrato da PI3-K, sendo convertido pela mesma em fosfatidilinositol-3-4,5-trisfosfato, que atua como segundo mensageiro (para revisão: HAWKINS et al., 2006). A classe I das famílias é subdividida em duas subclasses: IA e IB. A subclasse IA corresponde às isoformas PI3K α , PI3K β , PI3K δ , que são ativadas por receptores tirosina cinase, como o receptor de insulina (HAWKINS et al., 2006). Depois de ativada, a PI3-K fosforila o fosfatidil-inositol-2-fosfato (PIP2) na posição 3 do anel inositol, resultando na formação do PI-3-fosfato (PIP3) (KAPELLER; CANTLEY, 1994). O PIP3 serve como sítio de ancoragem, através do domínio homólogo da pleckstrina (PH), para proteínas citoplasmáticas, permitindo sua interação e formação de sinalizadores complexos (WYMAN; ZVELEBIL; LAFFARGUE, 2003).

A proteína quinase B (PKB, Akt ou Rac) migra para a membrana plasmática e ancora-se no PIP3, onde é ativada por fosforilação no resíduo treonina 308 pela proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos-1 (PDK-1) e no resíduo serina 473 pelo complexo *target of rapamycin 2* (TOR2), ambas recrutadas para a membrana plasmática via fosforilação do PIP3 (ALESSI et al., 1996; VIVANCO; SAWYERS, 2002). A Akt regula diversas respostas da insulina tais como: translocação do GLUT4 à membrana plasmática, transporte de glicose (CHEATHAM et al., 1994; HARA et al., 1994; QUON et al., 1995), síntese de proteínas via mTOR/p70 S6 quinase (CHANG; TRAUGH, 1998), síntese de glicogênio, glicólise, oxidação de glicose e atividade da lipase sensível a hormônio (ASANO et al., 2000; CARLSEN et al., 1997). A Akt também fosforila e inativa a glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3), responsável pela inativação da glicogênio sintetase, havendo assim menor inibição desta e aumento na síntese de glicogênio (CROSS et al., 1995) (Figura 4).

Figura 4 - Visão geral de moléculas envolvidas no tráfico de GLUT4 regulado por insulina.

A ligação da insulina ao seu receptor desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que culmina com o recrutamento de Akt para a membrana plasmática (MP), onde é ativada por fosforilação. Após fosforilada, a Akt ativa uma cascata de sinalização a qual termina com a translocação de GLUT4 para a membrana, aumento na captação de glicose e na síntese de glicogênio a partir da fosforilação da glicogênio sintetase 3 beta quinase (GSK3β).

A insulina também ativa a cascata de sinalização das MAP quinases (BARON; VAN OBBERGHEN, 1995), resultando no aumento da proliferação e diferenciação celulares (COMBETTES-SOUVERAIN; ISSAD, 1998), bem como a síntese de glicogênio e a translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática (Figura 5) (SOMWAR et al., 2000; SWEENEY et al., 1999; YANO et al., 1993). 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 IKKβ, causando fosforilação em serina no receptor de insulina e em IRS, além disso, Chambers et al. (2009) e Clerk et al. (1998) encontraram ativação da p38 MAPK em condições de aumento da produção de EROs, assim como durante o exercício físico.

Figura 5 - Mecanismo de ativação da via das MAPK pelo receptor de insulina.

(1) A proteína *growth factor receptor-bound protein-2* (GRB2) se liga ao substrato do receptor de insulina (IRS) fosforilado em tirosina ou ao *Src-homology/collagen* (SHC) e recruta *Son of Sevenless* (SOS) para ativar a via Ras/Raf/MEK/ERK. O mecanismo que leva à ativação da p38 MAPK via receptor de insulina ainda é desconhecido.

Fonte: Modificado de Helmuth et al. (2010).

A resistência à insulina caracteriza-se por redução da concentração e da atividade quinase do receptor, da concentração e da fosforilação dos IRS-1 e -2, da atividade da PI 3-quinase e translocação dos transportadores de glicose (GLUTs) para a membrana plasmática (PESSIN; SALTIEL, 2000). Isso pode ocorrer em paralelo à ativação da via mitogênica, representada pela MAP quinase (CUSI; MAEZONO; OSMAN, 2000; JIANG et al., 1999; ZECCHIN et al., 2003). O aumento na concentração de AGL plasmáticos leva à redução da ativação insulínica do IRS-1 e da associação deste com a PI 3-quinase (SHULMAN, 2000). O ácido graxo saturado de cadeia longa (ácido palmítico) induz resistência à insulina em célula muscular esquelética, levando à redução na captação de glicose (DUVAL et al., 2007; MONTELL et al., 2001; THOMPSON et al., 2000; YU et al., 2002) e na síntese de glicogênio (HIRABARA et al., 2010, SCHMITZ-PEIFFER 2000; THOMPSON et

al., 2000). Por outro lado, este mesmo ácido graxo pode aumentar a captação de glicose e sua oxidação no tratamento agudo (até 60 minutos) (HIRABARA et al., 2007, 2006; PU et al., 2011).

Em 1963, Randle et al. descreveram o ciclo AG-glicose ou ciclo de Randle. Estes autores mostraram que o aumento na disponibilidade de ácidos graxos diminui a utilização de glicose em músculos cardíaco e diafragmático perfundidos de ratos. A explicação para este fenômeno seria que o aumento na disponibilidade de ácidos graxos para estes tecidos e conseqüente elevação na produção de acetil-CoA e NADH mitocondrial através da β -oxidação, diminuem a atividade da piruvato desidrogenase (PDH), reduzindo a conversão de piruvato em acetil-CoA. O aumento no conteúdo de acetil-CoA proveniente de ácidos graxos também eleva a produção de citrato, o qual, juntamente com a razão ATP/ADP elevada, inibem a atividade da fosfofrutoquinase, resultando em redução do fluxo de metabólitos pela via glicolítica. Como conseqüência, há aumento no conteúdo de glicose-6-fosfato, que passa a inibir a hexoquinase II, causando acúmulo de glicose no interior da célula e, portanto, redução do seu transporte. Assim, os AG causariam inibição da captação e utilização de glicose, resultando em resistência à insulina (RANDLE et al., 1963).

Ao realizar infusão lipídica com *clamp* glicêmico e insulinêmico, foi verificado que os ácidos graxos reduzem o conteúdo intracelular de glicose-6-fosfato e glicose e estes efeitos precedem a redução na captação de glicose estimulada pela insulina (PERSEGHIN et al., 2003; RODEN et al., 1996, 2004; SAVAGE et al., 2007; THOMPSON et al., 2000). Tais achados não confirmam a proposta do ciclo de Randle e sugerem a existência de outros mecanismos associados à resistência ao hormônio induzida por ácidos graxos. Segundo Usui et al. (1997), o PA inibe a atividade da MAPK em fibroblastos. Ainda, Soltys et al. (2002) demonstraram que o PA inibe a fosforilação e a atividade da Akt em coração perfundido de rato e células cardíacas HL-1. Em adipócitos, os ácidos graxos de cadeia longa diminuem a afinidade do receptor da insulina ao hormônio (GRUNFELD et al., 1981) e a translocação do GLUT-4 estimulada por este (VAN EPPS-FUNG et al., 1997), além de reduzirem a ligação da insulina ao seu receptor em hepatócitos isolados de rato (HENNES et al., 1990; SVEDBERG et al., 1990) e a atividade de tirosina quinase do receptor da insulina em células de hepatoma de rato (HUBERT et al., 1991). Além disso, o PA diminui a fosforilação de pp185 (IRS-1 e -2) e de Akt em miotubos pmi28

(STORZ et al., 1999), músculo esquelético de rato (HIRABARA et al., 2003; THOMPSON et al., 2000) e células musculares C2C12 (CAZZOLLI et al., 2001; CHAVEZ; SUMMERS, 2003) e L6 (HAJDUCH et al., 2001). O PA reduz ainda a fosforilação de GSK-3 em células musculares C2C12 (HAJDUCH et al., 2001; SCHMITZ-PEIFFER et al., 1999) e músculo esquelético de rato (HIRABARA et al., 2003, 2007). Porém, os mecanismos envolvidos na inibição da sinalização à insulina causada por ácidos graxos não estão completamente elucidados.

1.4 ÁCIDOS GRAXOS E A REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

O processo de tradução em eucariotos é composto de três etapas: iniciação, alongação e terminação. A iniciação é a etapa limitante e está sujeita a diferentes mecanismos de regulação. Esta etapa envolve o reconhecimento e recrutamento de mRNAs por uma maquinaria traducional que compreende as subunidades ribossomais 40S e 60S e diversas proteínas denominadas fatores de iniciação eucarióticos (eIFs) (HERSHEY, 1991). Um dos principais mecanismos de regulação da tradução em eucariotos é a fosforilação da subunidade α do fator eIF2, no resíduo de serina 51. A fosforilação de eIF2 α ocasiona bloqueio da tradução global, mas estimula a tradução de mRNAs específicos envolvidos na resposta ao estresse, tais como, ATF4 em mamíferos (HINNEBUSCH, 2000).

O complexo eIF4F é um heterotrímero composto por eIF4E, eIF4G e eIF4A. Durante a iniciação da tradução, ocorre ligação de eIF4E ao capacete de 7-metil-guanosina (cap) encontrado na extremidade 5' de mRNAs e subsequente ligação de eIF4A (helicase de RNA) e eIF4G (proteína importante para ligação entre eIF4E e eIF4A), possibilitando assim o recrutamento de transcritos específicos para a tradução (para revisão: GINGRAS; RAUGHT; SONENBERG, 2001). A disponibilidade de eIF4E é modulada por uma família de fatores repressores da tradução, as chamadas proteínas ligantes de eIF4E (4E-BPs) (RICHTER, 2005). 4E-BP1 desfosforilada liga-se à eIF4E, impedindo a formação do complexo eIF4F e inibindo a tradução de mRNAs dependente de cap. Quando fosforilada, 4E-BP1 se dissocia do eIF4E, permitindo que o mesmo se ligue a eIF4G para a formação do complexo eIF4F e ativação da síntese de proteínas (Figura 6) (GEBAUER; HENTZE, 2004).

Figura 6- Mecanismo de ativação da síntese protéica via Akt/mTOR1.

A proteína Akt ativa indiretamente o complexo *mammalian target of rapamycin-1* (mTOR1) via inibição do complexo *tuberous sclerosis 1 e 2* (TSC1/TSC2), o qual inibe a mTOR1. Após ativa, mTOR fosforila a *4E-binding protein-1* (4E-BP1), causando sua dissociação da proteína eIF4E para a formação do complexo eIF4F e conseqüente ativação da síntese de proteínas.

A via PI3K/AKT/mTOR é ativada por diferentes estímulos anabólicos como fatores de crescimento, mitógenos e hormônios, resultando em ativação da síntese protéica. A proteína mTOR estimula a tradução através da fosforilação e inativação de 4E-BP1 e ativação, via fosforilação, da proteína cinase ribossomal S6 (p70S6K). A enzima p70S6K ativa a síntese protéica e os processos de crescimento e proliferação celulares através da fosforilação da proteína S6 (para revisão: MAMANE et al., 2008). A proteína Akt ativa indiretamente mTOR1 via inibição do *tumor suppressor complex* (TSC1/TSC2), um heterodímero que suprime a atividade da mTOR1 (MANNING et al., 2002; POTTER; PEDRAZA; XU, 2002).

Zhou et al. (2007) demonstraram que o tratamento com PA por 48 h suprime a atividade da via PI3K/Akt, aumentando a degradação de proteínas em células

musculares esqueléticas em cultura. Lang (2006) evidenciou que o aumento de ácidos graxos livres no plasma reduz a síntese protéica basal em músculos sóleo e extensor digital longo (EDL) de ratos. Estes dados foram confirmados por Deldicque et al. (2010), que demonstraram, redução da síntese protéica pelo tratamento com PA inativando mTOR e S6. Em cultura de hepatócitos e células beta-pancreáticas tratadas com PA, foi evidenciado estresse de retículo e fosforilação de eIF2 α , que conforme mencionado acima, inibe a síntese de proteínas quando no estado fosforilado. Em outros estudos ficou demonstrado que o tratamento com PO reverte os efeitos do PA (AKAZAWA et al., 2010; DIAKOGIANNAKI; WELTERS; MORGAN, 2008).

Apesar dos dados citados dos efeitos dos ácidos palmítico e palmitoléico sobre o metabolismo de glicose e proteínas e produção de EROs no músculo esquelético, não há trabalhos em que os efeitos desses ácidos graxos foram comparados. Em vista disso, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito dos ácidos palmítico e palmitoléico na produção de EROs e metabolismo de glicose e proteínas no músculo sóleo de ratos.

2 OBJETIVOS

1. Avaliar o efeito dos ácidos palmítico e palmitoléico na produção de espécies reativas de oxigênio, captação de glicose, síntese de glicogênio e ativação de proteínas de vias de regulação da síntese de proteínas no músculo sóleo isolado de ratos e incubados por uma ou quatro horas;
2. verificar se os efeitos dos ácidos palmítico e palmitoléico no metabolismo de glicose no músculo esquelético de ratos ocorre via produção de EROs, utilizando agentes antioxidantes (ebselen e NAC).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), sob nº 32, pág. 85, livro 2, em 05/04/2010.

3.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando ± 70 g, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12h/12h), com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e receberam dieta balanceada (NUVILAB CR1-NUVITAL) e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram realizados pela manhã entre 9 e 11 horas, após 5 horas de restrição alimentar (AGOUNI, 2010). Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os músculos soleos foram imediatamente removidos e pesados em balança digital (Denver Instrument Company AA-200DS). Escolhemos trabalhar com o músculo sóleo porque este apresenta maior captação de glicose estimulada por insulina e maior conteúdo de GLUT 4 (HENRIKSEN et al., 1990), ainda, é rico em mitocôndrias, um sitio importante de formação de EROs.

3.2 MATERIAIS

Ácido palmítico, ortovanadato de sódio, N-acetil-L-cisteína (NAC), peroxidase (HRP) albumina sérica bovina (BSA), ácido palmitoléico ω -7, etomoxir, wortmanina e ebselen foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, EUA). Insulina regular foi obtida da Biobrás (Montes Claros, MG, Brasil). 2-Desoxi-[2,6-³H]-D-glicose e *kit* de *western blotting* ECL foram comprados da Amersham International Plc (Chalfont St. Giles, Bucks, Inglaterra). Foram utilizados anticorpos anti-fosfo-Akt (ser473) (produto 9271), anti-fosfo-GSK-3 β (ser21/9) (produto 9331) e anti-fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (produto 9211) da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EUA); e anticorpos policlonais anti-IgG conjugados à peroxidase da ICN Biomedicals, Inc (Irvine, CA, EUA). Membrana de nitrocelulose (0,45 μ m) foi obtida da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA). O meio de cultura DMEM -

Dulbecco's Modified Eagle Medium, soro fetal bovino, soro de cavalo e penicilina foram comprados da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). AMPLEX® Ultra-Red (a36006) foi adquirido da Molecular Probes (Eugene, Oregon, EUA). Da Labsynth (Diadema, SP, Brasil) obtivemos EDTA, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico e cloreto de potássio. Dimetilsulfóxido (DMSO), peróxido de hidrogênio (30%), etanol e glicose foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Anticorpo anti-iNOS foi adquirido da BD Biosciences (San Jose, California, EUA).

3.3 INCUBAÇÕES

3.3.1 Diluição dos ácidos graxos e drogas utilizadas

Os ácidos palmítico (PA) e palmitoléico (PO) foram inicialmente diluídos em etanol e estocados em congelador (-20 °C) na concentração de 100 mM. Para os experimentos, os ácidos graxos foram diluídos a concentração final de 500 µM sob forte agitação em vórtex (para evitar precipitação) no meio DMEM suplementado com 1% de BSA. Logo em seguida, o meio foi mantido sob agitação moderada durante 2 horas em temperatura ambiente para a conjugação. NAC, H₂O₂ e a peroxidase foram diluídos diretamente no DMEM. Ebselen e AMPLEX foram diluídos inicialmente em DMSO e estocados em congelador (-20 °C) à 100 mM e 3,5 mM, respectivamente.

3.3.2 Meio de incubação

O meio utilizado para realizar as incubações do músculo sóleo foi o DMEM. Este meio foi gaseificado com mistura de oxigênio/dióxido de carbono (95/5%) durante 30 minutos e suplementado com 5,5 mM de glicose, 1% de BSA e 3,79 g/L de bicarbonato de sódio imediatamente antes do início das incubações. Todas as drogas foram diluídas neste mesmo meio.

3.3.3 Incubação do músculo sóleo

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o músculo sóleo foi isolado e imediatamente imerso em meio de incubação. Em seguida, os músculos foram fixados, através dos tendões, em suporte de acrílico com alfinete entomológico inoxidável. Depois de fixados, os músculos foram pré-incubados durante 40 minutos em erlenmeyers contendo 4 mL de meio DMEM suplementado com glicose, BSA e bicarbonato de sódio, em agitação constante (100 rpm/min) e gaseificação (95% de O₂ e 5% de CO₂) a 37 °C. Em seguida, o meio da pré-incubação foi substituído pelo meio de incubação com as respectivas drogas e os músculos foram então incubados por diferentes períodos de tempo.

3.4 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE H₂O₂ UTILIZANDO A SONDA FLUORESCENTE AMPLEX[®] ULTRA-RED

Após extraídos e pesados, os músculos sóleos foram pré-incubados, como já descrito, durante 40 minutos. Após a pré-incubação, os músculos foram colocados em novo meio contendo 500 µM de ácido palmítico ou ácido palmitoléico e/ou 1 mM de NAC na presença de 50 µM de Amplex[®] Ultra-Red e 0,1 UI/mL de peroxidase durante 10, 20, 30, 60 e 120 minutos. O Amplex[®] (N-acetil-3,7-diidroxifenoxazina) atua como doador de elétrons para a reação de redução do H₂O₂ catalisada pela peroxidase, e forma a resorufina, um composto estável que, quando excitado, emite fluorescência (ZHOU et al., 1997). A fluorescência emitida foi avaliada em 530 nm (emissão) e 590 nm (excitação). A mensuração das EROs via Amplex[®], previamente calibrada usando 10 µM de H₂O₂ exógeno (controle positivo), foi realizada na presença e ausência de CAT (300 U/ml), GPX (5 U/ml) e GSH (0.5 mM) (PINHEIRO et al., 2010). As mensurações foram realizadas em meio DMEM, pH 7.4, a 35 °C. Foi realizado teste para verificar a influência dos alfinetes entomológicos na oxidação da sonda Amplex[®] e possível interferência nos resultados e não houve efeito significativo. Na realização dos experimentos para avaliar a liberação de H₂O₂, foram utilizados os músculos da pata contralateral como controle de cada tratamento. Os períodos de uma e quatro horas de incubação foram escolhidos baseados em estudos que demonstraram aumento (HIRABARA et al., 2006; PU et

al., 2011) e redução (HIRABARA et al., 2010; TSUCHIYA et al., 2010; WANG et al., 2010) da captação de glicose, respectivamente. As concentrações das drogas e ácidos graxos foram escolhidas de acordo com estudos prévios realizados em nosso laboratório.

3.5 CAPTAÇÃO DE GLICOSE E SÍNTESE DE GLICOGÊNIO NO MÚSCULO SÓLEO ISOLADO E RESPOSTA À INSULINA

Os músculos sóleos foram isolados e pré-incubados como previamente descrito. Após a pré-incubação, o meio foi trocado por novo meio contendo PA (500 μ M), Eb (30 μ M), PA+Eb ou PO (500 μ M). Após 40 minutos de incubação em agitação constante (100 rpm/min) e gaseificação (95% de O₂ e 5% de CO₂) a 35 °C, foram acrescentados ao meio 0,3 μ Ci/mL de [U-¹⁴C]-D-glicose, 0,2 μ Ci/mL de 2-desoxi-[2,6-³H]-D-glicose e 7 nM de insulina (concentração suprafisiológica) ou 0,7 nM de insulina (concentração fisiológica), durante 30 minutos, totalizando um período de 60 minutos de incubação. Ao final da incubação, os músculos foram brevemente lavados em salina (0,9% de NaCl) a 4 °C e congelados em nitrogênio líquido para mensuração da captação de 2-desoxi-[2,6-³H]-D-glicose segundo métodos descritos por Challiss et al. (1986) e Espinal, Dohn e Newsholme (1983). Nos experimentos de 4 horas, a [U-¹⁴C]-D-glicose, 2-desoxi-[2,6-³H]-D-glicose e insulina foram acrescentadas após 3,5 horas do início da incubação com os ácidos graxos, durante 30 min, totalizando quatro horas.

3.6 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE GLICOSE E SÍNTESE DE PROTEÍNAS

Após uma ou quatro horas de incubação em banho maria à 37 °C na presença de PA (500 μ M), PO (500 μ M), NAC (1 mM), Eb (30 μ M), wortmanina (1 μ M) ou H₂O₂ (0,050; 0,500 ou 50 μ M), os músculos foram homogeneizados em tampão de extração (100 mM Trizma, pH 7,5; 10 mM EDTA; 100 mM NaF; 10 mM fosfato de sódio; 10 mM ortovanadato de sódio; 2 mM PMSF; 0,01 mg/mL aprotinina) à 4 °C. Após homogeneização, Triton X-100 foi adicionado em quantidade suficiente para 1 % e os extratos foram incubados por 20 minutos a 4 °C com agitação ocasional em *vortex*. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, a

4 °C, por 20 minutos e os sobrenadantes foram submetidos a quantificação de proteínas.

3.6.1 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada segundo método proposto por Bradford (1976). A solução de Bradford foi preparada utilizando-se *coomassie blue* G-250 (100 mg), etanol a 95% (50 mL) e ácido fosfórico 85% (100 mL). O corante azul Coomassie brilhante G-250 se liga às proteínas, ocorrendo uma mudança de cor na solução. A reação é colorimétrica e a absorbância determinada a 595 nm. Os resultados de absorbância foram utilizados no cálculo da equação da reta de uma curva padrão de BSA. Para elaboração da curva padrão de proteínas foram utilizadas as seguintes concentrações de albumina: 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,0312 mg/mL.

3.6.2 *Western blotting* da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e proteínas reguladoras das vias de metabolismo de glicose e síntese de proteínas

Os ensaios de *western blotting* foram realizado segundo Towbin; Staehelin; Gordon (1979). Inicialmente o tampão (150 mM Tris-HCl pH 6.8; 6% SDS; 0.1% azul de bromofenol) foi adicionado em cada amostra de extrato protéico sendo estas aquecidas por 5 min a 98 °C. A seguir, 30 µg de proteína total de cada amostra foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo SDS (SDS-PAGE), utilizando tampão específico composto por: Tris 50 mM; glicina 0,38 M; EDTA 1,8 mM e SDS 0,1%. Em seguida, as proteínas fracionadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) por 1 hora a 100 V, utilizando tampão de transferência (24,8 mM Tris, 192 mM glicina, 10% metanol) (SHAPIRO; VINUELA; MAIZEL, 1967). A transferência foi avaliada por coloração com ponceau-S. As membranas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora em *tris-buffered saline tween* (TBS-T) (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM e tween-20 0,02%) contendo 5% de leite em pó desnatado para minimizar as ligações inespecíficas. A seguir, as membranas foram incubadas por tempo e diluição adequadas para cada anticorpo primário de

interesse em TBS-T contendo 5% de BSA. Posteriormente, as membranas foram lavadas quatro vezes durante 5 minutos com TBS-T e incubadas por uma hora com anticorpos secundários policlonais anti-*Rabbit* conjugados à peroxidase (p8250, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, EUA) e diluídos 1:5000 em TBS-T contendo 5% de BSA. Após quatro lavagens de 7 minutos com TBS-T, as membranas foram tratadas com reagentes quimioluminescentes (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences) e utilizadas na exposição de filmes de raios-X por períodos variados de tempo. Os filmes foram revelados de forma convencional e a intensidade das bandas obtidas nas autoradiografias foi quantificada utilizando o programa Image J desenvolvido pelo National Institutes of Health (NIH) (Bethesda, USA).

3.7 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS

3.7.1 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como indicador da ocorrência de peroxidação lipídica foi determinada a concentração de *Thiobarbituric Acid-Reactive Substances* (TBARS), como previamente descrito por Draper e Hadley (1990). O malonaldeído (MDA) é um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo. Este, reage com o ácido tiobarbitúrico. Os músculos incubados foram homogeneizados, em 1 mL de ácido tricloroacético 10% (TCA) e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67%. Posteriormente, as amostras foram aquecidas em banho maria por 30 min a 70 °C. O conteúdo de TBARS foi determinado por absorbância a 532 nm utilizando curva padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), que nas condições ácidas do teste, sofre hidrólise, resultando na liberação do MDA. Os Resultados foram expressos como equivalentes de TBARS (nmol/mg de proteína). Este ensaio, porém, apresenta algumas limitações, tais como: inespecificidade para o MDA, pois outras TBARS podem reagir com TBA; o aquecimento na etapa de destilação pode aumentar a quantidade de aldeídos e produzir certos produtos carbonílicos formados pelas reações entre malonaldeído e aminoácidos, pirimidinas ou proteínas; é pouco sensível (OSAWA et al., 2005).

3.7.2 Determinação de proteínas ligadas ao 4-hidroxinonenal (4HNE)

A quantidade de proteínas conjugadas com 4-HNE foi determinada por *western blotting* anti-4HNE. Foram avaliadas proteínas entre 40 e 100 kDa. O 4HNE é um aldeído insaturado, é o produto mais relevante da degradação peroxidativa dos ácidos graxos omega-6. É também tóxico para as células, especialmente por sua característica de gerar bases de Schiff devido a reação com aminoácidos, principalmente com os resíduos lisina e histidina presentes nas proteínas e de etenoadutos com bases do DNA (MOORE, 1998).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados estão apresentados com média $\pm$ erro padrão da média e a análise estatística dos resultados foi realizada usando o teste *one-way* ANOVA e pós teste de Tukey quando mais de dois grupos foram comparados. O teste “t” de *Student* foi usado para comparação entre dois grupos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $p < 0,05$. O programa utilizado foi o GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO PA E PO SOBRE A LIBERAÇÃO DE H_2O_2 DURANTE QUATRO HORAS DE INCUBAÇÃO DOS MÚSCULOS SÓLEOS

Músculos sóleos de ratos foram incubados com 500 μ M dos ácidos PA ou PO em D-MEM contendo 5,5 μ M de glicose durante 1, 2, 3 e 4 horas. Para avaliar a liberação de H_2O_2 foi utilizada a sonda fluorescente *Amplex[®] Ultra Red*. Nos músculos tratados com PA, houve aumento da liberação de H_2O_2 de 52,9, 55,0, 56,3 e 50,4%, respectivamente, após 1, 2, 3 e 4 horas de tratamento. O PO, por sua vez, não causou aumento significativo na liberação de H_2O_2 nos períodos de tempos estudados (Figura 7).

Figura 7 - Liberação de H_2O_2 por músculos sóleos de ratos *Wistar* incubados por 1, 2, 3 ou 4 horas.

O H_2O_2 foi avaliado utilizando-se a sonda fluorescente Amplex[®] Ultra Red. Os músculos foram incubados na presença de 500 μM de ácido palmítico (PA) ou ácido palmitoléico (PO). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados pelo teste da análise de variância (*one-way* ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey de dois experimentos independentes. Os valores médios foram obtidos de seis músculos por grupo.

4.2 EFEITOS DOS TRATAMENTOS POR UMA HORA

4.2.1 O efeito do PA no aumento da liberação de H_2O_2 inicia-se antes de 30 min de tratamento

O tratamento com PA aumentou a liberação acumulada de H_2O_2 em 2,3 vezes em 20 min, 3,5 vezes em 30 min e 2,7 vezes em 60 min quando comparado ao controle (Figura 8A). O tratamento com PO também aumentou a liberação de H_2O_2 , mas este só foi significativo após 60 minutos de incubação, com 2,3 vezes em relação ao controle (Figura 8B).

A área sob a curva (AUC) da liberação do H_2O_2 está apresentada na Figura 9. O tratamento com PA durante 60 min aumentou em duas vezes a AUC em relação ao controle (Figura 9A). Já a AUC da liberação de H_2O_2 estimulada pelo PO não foi diferente do controle (Figura 9B).

Figura 8 - Liberação acumulada de H_2O_2 por músculos sóleos de ratos avaliada através da sonda fluorescente *Amplex® Ultra Red*.

Os músculos foram incubados durante 10, 20, 30 e 60 min na presença de 500 μM de ácido palmítico (PA) ou ácido palmitoléico (PO). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way ANOVA*), seguido de pós-teste de Tukey. Os valores foram obtidos de seis músculos por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ para a comparação com o controle.

Figura 9 - Área sob a curva (AUC) da liberação acumulada de H_2O_2 por músculos sóleos de ratos.

Os músculos sóleos foram incubados com ácido palmítico (PA) ou ácido palmitoléico (PO). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados pelo teste t de Student. *** $p < 0,001$ para a comparação com o controle.

Ao dividir a liberação acumulada de H_2O_2 pelo tempo de incubação podemos estimar a liberação de H_2O_2 em função do tempo. O PA aumentou em 467% liberação de H_2O_2 entre 10 a 20 minutos quando comparado ao controle. Entre 20 a 30 e 30 a 60 minutos, esta diferença foi reduzida para 190,0 e 146% respectivamente (Figura 10). O PO não aumentou significativamente a liberação do H_2O_2 .

Figura 10 - Liberação de H_2O_2 em função do tempo (unidades de fluorescência. $\text{mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) no meio de incubação dos músculos sóleos de ratos em diferentes períodos.

Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados pelo teste t de student. Os valores foram obtidos de seis músculos por grupo. ** $p < 0,01$; *** $P < 0,001$ para a comparação com o controle.

4.2.2 A liberação de H_2O_2 pelo músculo sóleo não depende da oxidação do PA

Uma vez que o PA induziu aumento na liberação de H_2O_2 , realizamos experimentos com α -bromopalmitato para avaliar se este ácido graxo precisa ser oxidado para que este efeito ocorra. O α -bromopalmitato é uma molécula de ácido palmítico ligada ao bromo, o que o torna não metabolizável nas células. Músculos sóleos foram incubados com 500 μM de PA ou α -bromopalmitato durante 20 e 60 minutos na presença da sonda Amplex[®]. Em 20 minutos, ambos PA e α -bromopalmitato aumentaram a liberação de H_2O_2 em 48%, quando comparados ao controle. Em 60 minutos, o aumento na liberação de H_2O_2 foi de 78,5% para o PA e de 56,1% para o α -bromopalmitato em relação ao controle. Apesar do maior aumento na liberação de H_2O_2 induzido pelo PA no período de 1 hora, não houve diferença significativa entre PA e α -bromopalmitato ($p=0,187$) (Figura 11). Estes dados são indicativos de que o aumento na liberação de H_2O_2 induzido por PA não é dependente de sua oxidação.

Figura 11 - Liberação acumulada de H_2O_2 por músculos sóleos tratados com ácido palmítico e bromopalmitato.

Os músculos foram incubados durante 20 e 60 min na presença de 500 μM de PA ou α -bromopalmitato (BRO). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados pelo teste da análise de variância (*one-way* ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey.

4.2.3 Tratamentos com N-acetil-L-cisteína (NAC) e ebselen (Eb) suprimem a liberação de H_2O_2

O NAC é uma molécula derivada do aminoácido L-cisteína e possui um grupo acetil ligado ao átomo de nitrogênio. Esta molécula apresenta potencial antioxidante devido à existência de resíduos de cisteína em sua estrutura molecular, o que confere a esta a capacidade de seqüestrar EROs e ou doar resíduos de cisteína para a síntese de GSH, uma molécula antioxidante. Já o Ebselen é um mimético da enzima antioxidante GPX. Músculos tratados com NAC (1 mM), Ebselen (30 μM) e catalase (300 U/ml) (enzima antioxidante específica para H_2O_2), apresentaram menor conteúdo de H_2O_2 (Figura 12).

Figura 12 - Liberação de H_2O_2 por músculos sóleos tratados com ácido palmítico, catalase, ebselen ou NAC.

Os músculos foram tratados durante 60 min com 500 μM de ácido palmítico (PA), catalase (300 U/mL) (CAT), 30 μM de ebselen (Eb) ou 1 mM de N-acetil-L-cisteína (NAC). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way* ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey.

4.2.4 O peróxido de hidrogênio aumenta e os antioxidantes NAC e Eb diminuem a fosforilação da Akt e GSK-3 β

Avaliou-se a fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β em músculos sóleos de ratos incubados com H_2O_2 (0,050, 0,500 e 50 μM), NAC (1 mM) e Eb (30 μM) por uma hora. Os músculos foram tratados com estas drogas durante 30 minutos. Logo em seguida, foi acrescentada dose suprafisiológica de insulina (7 nM), e a incubação foi mantida por mais 30 minutos. Neste ensaio, foram utilizados anticorpos para as formas fosforilada e não fosforilada de Akt e GSK-3 β . A proteína Akt, após a ativação da PI3K, é atraída para a membrana e ativada por meio de fosforilação em resíduos Thr³⁰⁸ e Ser⁴⁷³. Nos músculos estimulados com insulina, o H_2O_2 , nas

concentrações de 50 nM, 500 nM e 50 μ M, aumentou a fosforilação da proteína Akt em 39, 49 e 45%, respectivamente, quando comparado ao controle. Já os antioxidantes NAC e Eb reduziram a fosforilação da Akt em 39 e 60%, respectivamente, indicando a importância das EROs na regulação da atividade destas proteínas. Nos músculos não estimulados com insulina, não houve diferença significativa entre os grupos na fosforilação da proteína Akt (Figura 13). A GSK-3 β é fosforilada (em resíduo Ser-9) e inativada pela Akt. As doses de H₂O₂ utilizadas (0,050, 0,500 e 50 μ M) induziram aumento de 49, 50,1 e 40%, respectivamente, na fosforilação da GSK-3 β . O NAC e o Eb não alteraram a fosforilação e o Eb induziu uma tendência de redução da fosforilação da GSK-3 β (Figura 14).

Figura 13- Fosforilação da proteína Akt em músculos sóleo.

Os músculos foram incubados durante 60 min na presença de H_2O_2 (0,050, 0,500 e 50 μM), N-acetil-L-cisteína (NAC) (1 mM) e ebselen (Eb) (30 μM), com (+) e sem (-) insulina (7 nM). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way ANOVA*), seguido de pós-teste de Tukey. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Figura 14- Fosforilação da proteína GSK-3 β em músculos sóleos.

Os músculos foram incubados durante 60 min na presença de H₂O₂ (0,050, 0,500 e 50 μ M), N-acetil-L-cisteína (NAC) (1 mM) e ebselen (Eb) (30 μ M), com (+) e sem (-) insulina (7 nM). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way* ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

4.2.5 Efeito do PA e PO sobre a captação de glicose estimulada com dose suprafisiológica de insulina (7nM)

A captação de glicose foi avaliada em músculos sóleos incubados com PA (500 μ M), Eb (30 μ M), PA + Eb e PO (500 μ M). Os músculos foram incubados com estas drogas durante 30 minutos. Logo em seguida, foram adicionados insulina (7 nM) e de 2-desoxi-[2, 6- 3 H]-D-glicose (0,2 μ Ci/mL) e a incubação foi mantida por mais 30 minutos. Após a incubação, os músculos foram coletados e processados para avaliar a captação de glicose. Quando comparados ao controle, os tratamentos não alteraram significativamente a captação de glicose estimulada pela insulina nesta dose suprafisiológica. Por outro lado, na condição não estimulada com insulina, o PA aumentou a captação de glicose em 35% quando comparado ao controle. Quando combinado com o Eb, o aumento na captação de glicose estimulado pelo PA foi abolido, indicando possível participação do H_2O_2 (Figura 15A).

Figura 15 - (A) Captação de 2-desoxi-[2,6- 3 H]-D-glicose por músculos sóleos incubados.

(B) Aumento da captação de glicose estimulado pela insulina. Os músculos foram incubados durante 60 min na presença de 500 μ M de ácido palmítico (PA) ou ácido palmitoléico (PO) e ou 30 μ M de ebselen (Eb). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados por análise de variância (one-way ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey.

4.2.6 O PA aumenta a síntese de glicogênio e a captação de glicose estimulados com dose fisiológica de insulina (0,7 nM).

Após avaliar os efeitos do PA sobre a captação de glicose com dose suprafisiológica de insulina (7 nM), investigamos os efeitos deste ácido graxo com dose fisiológica (0,7 nM) deste hormônio e com wortmanina (1 μ M), um inibidor da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3-K). Os músculos foram incubados com estas drogas durante 30 minutos e logo em seguida foram adicionados insulina (0,7 nM), [U- 14 C]-D-glicose (0,3 μ Ci/mL) e 2-desoxi-[2,6- 3 H]-D-glicose (0,2 μ Ci/mL) e a incubação foi mantida por mais 30 minutos. Após a incubação, os músculos foram coletados e processados para se avaliar a captação de glicose e a síntese de glicogênio. Quando comparados ao controle, o PA aumentou em 29% a captação de glicose estimulada pela insulina. Nos músculos tratados com PA + wortmanina e PA + Eb, a captação de glicose retornou ao valor do controle. O tratamento com wortmanina reduziu em 19% a captação de glicose estimulada pela insulina (Figura 16A). Já a síntese de glicogênio foi aumentada em 21% pelo PA e este efeito foi atenuado pela wortmanina, mas não pelo Eb. A wortmanina reduziu em 27 % a síntese de glicogênio estimulada por insulina (0,7 nM) (Figura 16C).

Figura 16 - Efeito do PA e PO sobre o metabolismo de glicose após uma hora de tratamento

(A) Captação de 2-desoxi-[2,6-³H]-D-glicose. (B) Aumento da captação de glicose estimulado pela insulina. (C) Incorporação de [U-¹⁴C]-D-glicose em glicogênio. (D) Aumento da síntese de glicogênio estimulado pela insulina. Os músculos sóleos foram incubados durante 60 min na presença de 500 μM de ácido palmítico (PA) ou ácido palmitoléico (PO), 1 mM de ebselen (Eb) ou 30 μM de wortmanina (W). Os resultados estão expressos como média ± EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way* ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

4.2.7 O PA aumenta a fosforilação da Akt e este efeito é abolido pelo antioxidante Eb

Depois de constatado que o PA aumenta a captação de glicose e este efeito é revertido pelo antioxidante Eb, músculos sóleos de ratos foram incubados com 500 μ M de PA ou 30 μ M de Eb para avaliar a fosforilação da proteína Akt. O tratamento com PA aumentou a fosforilação da Akt nos músculos estimulados com insulina e este efeito foi abolido pelo Eb. O aumento foi mais evidente nos músculos não estimulados com insulina, onde o PA aumentou em 70% a fosforilação da Akt e o Eb aboliu totalmente este efeito (Figura 17). O PO, nas mesmas condições que o PA, não induziu qualquer alteração na fosforilação da proteína Akt, na presença ou não de insulina (Figura 18).

Figura 17 - Fosforilação da proteína Akt em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmítico (PA) e ou 30 μ M de ebselen (Eb).

Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way* ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Figura 18 - Fosforilação da proteína Akt em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmitoléico (PO) e ou 30 μ M de ebselen (Eb).

Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way ANOVA*) seguido de pós-teste de Tukey. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

4.2.8 O efeito do PA sobre a captação de glicose é independente da ativação da p38-MAPK

Tendo em vista o efeito do PA aumentando a captação de glicose e a fosforilação da proteína Akt, o próximo passo foi avaliar se PA e PO ativam a via p38-MAPK e se este efeito está relacionado com a captação de glicose independente da insulina. Músculos sóleos de ratos foram incubados com 500 μ M de PA ou PO e ou 30 μ M de Eb. Não houve alteração na fosforilação da p38-MAPK em músculos estimulados com PA ou PO na presença ou ausência de insulina (7 nM) ou Eb (Figuras 19 e 20).

Figura 19 - Fosforilação da proteína p38 em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmítico (PA) e ou 30 μ M de ebselen (Eb).

Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way ANOVA*) seguido de pós-teste de Tukey. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Figura 20 - Fosforilação da proteína p38 em músculos sóleos tratados com 500 μM de ácido palmitoléico (PO) e ou 30 μM de ebselen (Eb).

Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way ANOVA*) seguido de pós-teste de Tukey. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

4.2.9 PA e PO não alteram a fosforilação das proteínas S6 e 4EBP-1

A fosforilação das proteínas 4EBP-1 e S6, que fazem parte da via Akt/mTOR, foi também avaliada. Apesar do aumento na fosforilação da Akt, o PA não alterou a fosforilação da 4EBP-1 e S6 (Figuras 21, 22 e 23).

Figura 21 - Fosforilação da proteína S6 em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmítico (PA) e ou 30 μ M de ebselen (Eb).

Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way* ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Figura 22 - Fosforilação da proteína S6 em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmitoléico (PO) e ou 30 μ M de ebselen (Eb).

Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way ANOVA*) seguido de pós-teste de Tukey. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Figura 23 - Imagem representativa da fosforilação da proteína 4EBP-1 em músculos sóleo.

Os músculos tratados com 500 μ M de ácido palmítico, 500 μ M de ácido palmitoléico (PO) e ou 30 μ M de Ebselen (Eb).

4.3 EFEITOS DOS TRATAMENTOS POR QUATRO HORAS

4.3.1 O PA aumenta a peroxidação lipídica

Como relatado anteriormente, o PA induz aumento na liberação de H_2O_2 . Para determinar se o PA promove estresse oxidativo, usamos o biomarcador de peroxidação lipídica conhecido como 4-hidroxinonenal (4-HNE). O 4-HNE é um aldeído insaturado, que é gerado durante a cascata de peroxidação lipídica. As proteínas conjugadas ao 4-HNE são excelentes biomarcadores do estresse oxidativo. Os músculos foram incubados durante 4 horas na presença de PA (500 μ M) e ou Eb (30 μ M). O tratamento com PA aumentou a quantidade de proteínas conjugadas com 4-HNE (entre 40-100 kDa) no músculo sóleo de rato (Figura 24B). Este resultado é sugestivo de que o aumento da produção de H_2O_2 induzida pelo tratamento com PA causa estresse oxidativo neste músculo. O PA também aumentou a formação de TBARS (30% de aumento) em relação ao controle e o Eb atenuou este efeito, reforçando o resultado anterior (Figura 24A).

Figura 24- Efeito do PA sobre a peroxidação de lipídeos.

(A) Conteúdo de substância reagente ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); (B) imagem representativa do conteúdo de proteínas conjugadas ao 4-hidroxinonenal (4HNE) em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmítico (PA) e ou 30 μ M de ebselen (Eb) durante 4 horas.

4.3.2 O PA reduz a captação de glicose em músculo esquelético tratado por quatro horas

A captação de glicose foi avaliada em músculos sóleos incubados com PA (500 μ M), Eb (30 μ M), PA + Eb e PO (500 μ M). Os músculos foram incubados com estas drogas durante 3 horas e 30 minutos. Logo em seguida, foram adicionados insulina (7 nM) e 2-desoxi-[2, 6- 3 H]-D-glicose (0,2 μ Ci/mL) e a incubação foi mantida por mais 30 minutos. O tratamento com PA reduziu a captação de glicose estimulada por insulina em 18 % (Figura 25A). Quando avaliamos a diferença entre a captação de glicose basal e estimulada por insulina a redução na captação de glicose foi de 23% (Figura 25B).

Figura 25 - Efeito do PA e PO sobre o metabolismo de glicose após quatro horas de tratamento

(A) Captação de 2-desoxi-[2,6-³H]-D-glicose por músculos sóleos incubados. (B) Aumento da captação de glicose estimulado pela insulina. Os músculos foram incubados durante 4 horas na presença de 500 μM de ácido palmítico (PA) ou ácido palmitoléico (PO) e ou 30 μM de ebselen (Eb). Os resultados estão expressos como média ± EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way* ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey.

4.3.3 O PA reduz e o PO aumenta a fosforilação da Akt e GSK3β em músculo esquelético tratado por quatro horas

Músculos sóleos de ratos foram incubados com PA (500 μM), PO (500 μM) ou Eb (30 μM) para avaliar a fosforilação da proteína Akt. O tratamento com PA reduziu em 23% a fosforilação da Akt nos músculos estimulados com insulina e o Eb reverteu parcialmente este efeito. O PO, por sua vez, aumentou a fosforilação da Akt estimulada por insulina em 60%. Na ausência de insulina, houve aumento de 33% na fosforilação da Akt nos músculos tratados com PO (Figura 26). Com relação à GSK3β, houve redução de 25% na fosforilação desta proteína nos músculos estimulados com insulina e tratados com PA. Este efeito foi totalmente abolido pelo Eb. O tratamento com PO causou aumento na fosforilação da GSK3β (110%), mas somente na condição não estimulada por insulina (Figura 27).

Figura 26 - Fosforilação da proteína Akt em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmítico (PA) e ou 30 μ M de ebselen (Eb) durante quatro horas.

Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way ANOVA*) seguido de pós-teste de Tukey. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Figura 27 - Fosforilação da proteína GSK3 β em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmítico (PA) e ou 30 μ M de ebselen (Eb) durante quatro horas.

Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way ANOVA*) seguido de pós-teste de Tukey. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

4.3.4 PA e PO não alteram a fosforilação da proteína S6

A fosforilação da proteína S6, que faz parte da via Akt/mTOR, foi também avaliada. Apesar da alteração na fosforilação da Akt, PA e PO não alteraram a fosforilação da S6 (Figura 28A e B).

Figura 28 - Fosforilação da proteína S6 em músculos sóleos tratados com 500 μ M de ácido palmítico (PA), 500 μ M de ácido palmitoléico (PO) e ou 30 μ M de ebselen (Eb) durante quatro horas.

Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way* ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

4.3.5 O PA aumenta a expressão de proteína iNOS

Após evidenciado o efeito do PA causando estresse oxidativo e resistência a ação da insulina, decidimos avaliar o efeito deste AG na expressão da proteína iNOS, a qual é expressa em situações de estresse e está diretamente relacionada à causa da resistência à insulina. Músculos sóleos de ratos foram incubados com PA (500 μ M) e ou Eb (30 μ M) para avaliar a expressão desta proteína. O PA aumentou a expressão de iNOS após tratamento durante quatro horas e este efeito não foi revertido pelo tratamento com Eb (Figura 29).

Figura 29 - Expressão da proteína iNOS em músculos sóleos.

Os músculos foram tratados com 500 μ M de ácido palmítico e ou 30 μ M de Ebselen (Eb) durante 4 horas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM e foram analisados por análise de variância (*one-way ANOVA*) seguido de pós-teste de Tukey. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

As EROs são constantemente produzidas no músculo esquelético. Os principais sítios de produção de EROs nesse tecido são: a redução parcial do O_2 na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, o complexo NAD(P)H oxidase na membrana e o sistema xantina/xantina oxidase no citosol, sendo esta última mais importante em fibras musculares menos oxidativas. O H_2O_2 é uma das principais EROs produzidas no tecido muscular e esta molécula, apesar de sua alta reatividade, tem grande capacidade de difusão através das membranas, podendo migrar para o interior do núcleo e até mesmo para o meio extracelular. No presente trabalho, foi avaliado o efeito do tratamento com 500 μM dos ácidos PA ou PO sobre a liberação de H_2O_2 nos períodos de 1, 2, 3 e 4 horas através do ensaio de oxidação da sonda fluorescente *Amplex[®] Ultra Red*. Constatamos que o PO não altera a liberação de H_2O_2 , porém, o PA aumenta significativamente a liberação desta EROS. Verificamos também que a maior liberação de H_2O_2 estimulada pelo PA ocorre entre 20-30 minutos de incubação e este efeito é menos pronunciado nos próximos períodos. Lambertucci et al. (2008) demonstraram que o PA (25 μM) aumenta a produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) em células musculares após uma hora de incubação. No trabalho citado, nas células tratadas com Etomoxir (10 μM) e α -bromopalmitato (25 μM), inibidor da CPT-1 e competidor alosterico do PA, respectivamente, o aumento na produção de $O_2^{\cdot -}$ foi suprimido, indicando que o PA necessita ser oxidado pela mitocôndria para elevar a produção de EROS. Já no trabalho de Duval et al. (2007), também foi encontrado efeito do PA (1 mM) sobre a produção de EROs, porém, mesmo tratando as células com Etomoxir, essa produção continuou aumentada. O Etomoxir é um inibidor irreversível da CPT1- α e, consequentemente, da β -oxidação dos ácidos graxos (WOLF, 1992). Foi demonstrado por Cabrero et al. (2002) que o Etomoxir aumenta a produção de EROS e este efeito provavelmente ocorre via ativação do complexo NAD(P)H oxidase (LISTENBERGER; ORY; SCHAFFER, 2001). Diante destes resultados, utilizamos o α -bromopalmitato. O α -bromopalmitato é uma molécula de PA ligada ao bromo, o que o torna não metabolizável nas células (GRIMALDI et al., 1992). Nos músculos sóleos tratados com 500 μM de PA ou α -bromopalmitato, houve aumento na liberação de H_2O_2 , indicando que o PA não depende de sua oxidação para elevar a produção de H_2O_2 . Já foi demonstrado que o PA pode aumentar a atividade do

complexo NAD(P)H oxidase (DHAUNSI et al., 2005) e este efeito ocorre via ativação da proteína cinase C (PKC) (INOGUCHI et al., 2000).

O tratamento com os antioxidantes NAC ou Eb aboliu a liberação de H_2O_2 pelos músculos sóleos incubados. O mesmo foi observado com a enzima CAT, demonstrando a eficiência destes antioxidantes no estresse oxidativo do músculo esquelético. O NAC é um agente antioxidante não específico que atua como doador de L-cisteína para a síntese de GSH no músculo (COTGREAVE, 1997; DE FLORA et al., 1985). Também atua como seqüestrador de EROs, devido à presença de resíduos de cisteína em sua estrutura (COTGREAVE, 1987). Já o Eb, é um mimético da GPX, sendo este específico para H_2O_2 (COTGREAVE, 1987). Por esta razão, o H_2O_2 é a principal ERO avaliada no presente estudo.

Diferentes períodos de tratamento com ácidos graxos de cadeia longa podem levar a efeitos metabólicos distintos e até mesmo opostos. Já foi demonstrado que a exposição ao PA durante uma hora aumenta a captação e oxidação de glicose e a síntese de glicogênio pelo músculo esquelético (HIRABARA et al., 2006; PU et al., 2011). Já a exposição a este AG por um período de 5 horas reduz a ativação da via PI3K/Akt pela insulina e a captação de glicose (KIM; SHULMAN; KAHN, 2002; YU et al., 2002). Alguns estudos têm demonstrado efeito benéfico do PO na resistência à insulina (MOZAFFARIAN et al., 2010; YANG et al., 2011). Dimopoulos et al. (2006) demonstraram, em cultura de célula muscular, que o PO melhora a sensibilidade à insulina e aumenta a captação de glicose. Diante destes fatos, realizamos incubações dos músculos sóleos com PA e PO durante uma e quatro horas para comparar o efeito destes ácidos graxos nestes dois períodos.

Em músculos sóleos incubados durante uma hora com H_2O_2 , verificamos aumento na fosforilação da proteína Akt estimulada por insulina (7 nM). Já na presença dos antioxidantes NAC e Eb, a fosforilação da Akt foi inferior à do controle. A Akt fosforila e inativa a GSK-3 β , enzima responsável pela inibição da síntese de glicogênio (CROSS et al., 1995). Evidenciamos que a fosforilação da GSK-3 β segue a mesma resposta da Akt. O H_2O_2 aumentou a fosforilação da GSK-3 β em 45% e o Eb reduziu a mesma em 40,3% quando comparados ao controle. Estes efeitos indicam envolvimento de EROs na via de sinalização à insulina. Os efeitos do Eb foram mais pronunciados que os do NAC em relação à sinalização da via Akt/ GSK-3 β , corroborando com os resultados de Pinheiro et al. (2010). Esses autores

demonstraram que esta ERO está diretamente envolvida na ativação do metabolismo de glicose.

Loh et al. (2009) mostraram em camundongos geneticamente modificados, com deleção completa da enzima antioxidante glutathione peroxidase-1 (Gpx1^{-/-}), que o aumento no conteúdo de H₂O₂ é eficiente em aumentar a sensibilidade à ação da insulina no músculo esquelético e este efeito é abolido pelo NAC. A regulação da captação de glicose e da síntese de glicogênio no tecido muscular é realizada, principalmente, pela insulina através da via PI3K/Akt (D'ALESSANDRO et al., 2000; PESSIN; SALTIEL, 2000).

A sensibilidade à ação da insulina é avaliada através de curvas dose-respostas para transporte de glicose, síntese de glicogênio e síntese protéica na presença de concentrações basais e máximas do hormônio (MIKINES, 1992). Utiliza-se como indicador de sensibilidade à insulina, a concentração do hormônio que causa 50% da resposta máxima (GREEN; NEWSHOLME, 1979; ESPINAL et al., 1983; STIREWALT et al., 1985). Por outro lado, a responsividade à ação da insulina é dada pelo efeito biológico máximo do hormônio (MIKINES, 1992).

Utilizamos duas concentrações de insulina para avaliar a resposta muscular em condição fisiológica (0,7 nM) (FRYER, 1995) ou sob concentração máxima do hormônio (7 nM) (HIRABARA, 2005). Dessa forma, avaliou-se, respectivamente, a sensibilidade e a responsividade do músculo sóleo à ação deste hormônio. No presente trabalho, os tratamentos com PA, PO ou Eb não alteraram a resposta da captação de glicose estimulada por dose máxima de insulina (7 nM) durante uma hora de incubação. Isto mostra que não houve alteração quanto à responsividade à ação do hormônio. Já na dose fisiológica de insulina (0,7 nM), a captação de glicose e a síntese de glicogênio foram aumentadas no grupo tratado com PA, indicando elevação na sensibilidade à ação do hormônio. Esta resposta foi abolida pelo Eb, indicando possível efeito do H₂O₂ no aumento da captação de glicose. Higaki et al. (2008) demonstraram que o H₂O₂ aumenta o transporte de glicose em músculo esquelético via ativação da PI3K. Utilizamos um inibidor específico da PI3K (wortmanina) para avaliar se há envolvimento da mesma nesses resultados. Em músculos sóleos tratados com PA + wortmanina, o efeito do PA no aumento da captação de glicose e síntese de glicogênio estimulados por insulina foi abolido, assim como no tratamento com PA + Eb. Este resultado é indicativo de que o efeito do PA ocorre via ativação de PI3K pelo aumento na produção de H₂O₂. Pu et al.

(2011) também observaram aumento na captação de glicose com o tratamento com PA. Constataram também que este efeito ocorre via ativação da PI3K, corroborando com os nossos resultados. As observações foram evidentes nos grupos não estimulados com insulina, onde o aumento na captação de glicose e síntese de glicogênio induzidas pelo tratamento com PA foi, também, abolido pelo Eb e pela wortmanina.

As vias de sinalização que levam ao aumento na captação de glicose estimulada por insulina no músculo esquelético são a PI3K/Akt (GAROFALO et al., 2003) e a proteína ativada por mitógeno quinase-p38 (p38-MAPK) (HARRELL et al., 2007). Encontramos aumento na fosforilação da proteína Akt em músculos sóleos incubados durante uma hora com PA, estimulados ou não com insulina (0,7 nM) e este efeito foi abolido pelo tratamento com Eb. Este resultado é sugestivo do envolvimento do H_2O_2 produzido pela ação do PA na ativação da via PI3K/Akt. Estes dados corroboram com o efeito encontrado por Pu et al. (2008), que demonstraram efeito do PA em aumentar a captação de glicose em até uma hora de tratamento *in vitro*. Já nos músculos tratados com PO, não houve diferença na fosforilação da Akt, o que já era esperado, pois não foram encontrados na literatura evidências que demonstrem efeitos do PO no metabolismo de glicose em tratamentos inferiores ao período de 4 horas. Avaliamos também a ativação da p38-MAPK e não houve alteração nesta via nos músculos tratados com PA ou PO.

Os músculos tratados com PA e PO durante quatro horas apresentaram resposta diferente na ativação da Akt em relação àqueles tratados por uma hora. O PA reduziu a captação de glicose estimulada por insulina e este efeito foi atenuado pelo Eb. Diversos autores demonstraram que o PA causa resistência à ação da insulina (HIRABARA et al., 2003; KIM et al., 2002; REYNOLDS et al., 2012; YU et al., 2002). Este efeito pode estar relacionado ao ciclo ácido graxo-glicose. Randle et al. (1963) propuseram que o aumento na concentração plasmática de ácidos graxos e da sua oxidação reduz o consumo de glicose aumentando a concentração dos metabólicos intermediários da via glicolítica, inibindo a atividade das enzimas chave desta via. Porém, em trabalhos posteriores com infusão lipídica e *clamp* glicêmico e insulinêmico, observou-se redução da atividade da via PI3K/Akt, conseqüente redução na captação de glicose e conteúdo de glicose 6-fosfato, contrariando a proposta de Randle (CURI et al., 2002; DRESNER et al., 1999; SAVAGE et al., 2007). Atualmente se sabe que as EROs podem causar resistência à insulina

(EVANS et al., 2002) e este efeito ocorre via proteínas ativadas por estresse (JNK e IKK β) e conseqüente inativação da via de sinalização do receptor de insulina e redução nos transportadores de glicose (NEWSHOLME et al., 2007). Corroborando com estes resultados, em nosso trabalho, após incubação por quatro horas, a liberação de EROs foi maior nos músculos tratados com PA, nos quais a via Akt/GSK3 β está suprimida, indicando resistência da mesma à ação da insulina. Nos músculos tratados com Eb, a fosforilação de Akt e GSK3 β foi restabelecida, confirmando a participação da produção de EROs induzida pelo PA na resistência à ação da insulina. Os músculos tratados com PA apresentaram conteúdo aumentado de TBARS e proteínas conjugadas ao 4HNE e estes efeitos foram abolidos pelo tratamento com Eb, demonstrando que este ácido graxo causa estresse oxidativo e peroxidação lipídica. Já em relação ao PO, Cao et al. (2008) identificaram efeitos positivos deste ácido graxo na sensibilidade à insulina, aumentando a captação de glicose e revertendo o efeito supressor do PA sobre esta via em cultura de hepatócitos. Efeitos semelhantes foram encontrados em células β pancreáticas (MAEDLER et al., 2003) e em células musculares esqueléticas (DIMOPOULOS et al., 2006). Além disso, correlação positiva entre a sensibilidade à insulina e o conteúdo sérico de PO foi evidenciado por alguns autores (MOZAFFARIAN et al., 2010; STEFAN et al., 2010). Em nosso estudo, o PO ativou a via da Akt nos músculos não estimulados com insulina. Este efeito corrobora com os resultados de Dimopoulos et al. (2006). Porém, ao contrário do esperado, não observamos diferenças em relação à captação de glicose nos músculos após quatro horas de tratamento com PO e estimulados ou não com insulina. Em contrapartida com o que vem sendo demonstrado, Fabbrini et al. (2011) evidenciaram que o ácido palmitoléico não é um regulador fisiológico importante da sensibilidade à insulina em humanos. Demonstraram ainda que a resistência à insulina em pessoas obesas não está associada a uma diminuição de ácido palmitoléico na circulação. Nossos resultados, quando comparados com os resultados de Dimopoulos et al. (2006), são sugestivos de que o PO tem efeito positivo na captação de glicose em períodos mais longos de exposição ao PO.

O aumento na expressão da iNOS eleva a produção de NO, que pode induzir S-nitrosilação do IR β , IRS-1 e Akt, causando resistência à ação da insulina (CARVALHO-FILHO et al., 2005). Pilon et al. (2010) demonstraram, em ratos, camundongos e miócitos L6 em cultura, que o peroxinitrito, induz resistência à ação

da insulina no músculo esquelético. Segundo estes autores, este derivado oxidante inibe a ação da insulina por nitração da tirosina do IRS-1, que impede a fosforilação desta e a consequente atividade da PI3K. Observamos em nosso estudo que após quatro horas de tratamento, o PA aumenta a expressão da iNOS e este efeito não é revertido pelo tratamento com Eb. Este resultado é sugestivo do envolvimento do estresse nitrosativo na resistência à ação da insulina nos músculos tratados com PA durante quatro horas. O aumento na expressão da iNOS também foi encontrado por Lambertucci et al. (2012), os quais realizaram experimentos em cultura primária de célula muscular de ratos. Além disso, diversos estudos vêm demonstrando aumento tanto na expressão, quanto na atividade de iNOS em diferentes tipos celulares (DE LIMA et al., 2006; MEIDUTE et al., 2008; TSANG; COWIE; RABKIN, 2004).

Os efeitos de PA e PO sobre a ativação das proteínas da via de síntese protéica também foram avaliados. A Akt fosforila e ativa mTOR que, por sua vez, fosforila as proteínas S6 e 4EBP-1, responsáveis pela regulação da síntese protéica (CORTOT et al., 2006). Apesar da modulação na fosforilação da Akt, após uma ou quatro horas de incubação com o PA e quatro horas com PO, não houve alteração significativa na ativação de S6k e 4EB-P1, sugerindo que não há modificação no metabolismo de proteínas frente a exposição a estes AGs nas condições apresentadas. Evidências dos efeitos de PA e PO na a síntese de proteínas e/ou ativação de proteínas de regulação desta via (AKAZAWA et al., 2010; DIAKOGIANNAKI; WELTERS; MORGAN, 2008), foram obtidos após exposição a estes AGs por períodos prolongados. Assim, Deldicque et al. (2010), encontraram redução na síntese de proteínas pelo tratamento com PA somente após 17 horas.

6 CONCLUSÕES

- O tratamento com PA aumenta a produção de H_2O_2 no músculo esquelético durante 1, 2, 3 e 4 horas de incubação e este efeito não depende de sua oxidação;
- o PA aumenta a captação de glicose e síntese de glicogênio em uma hora de incubação e este efeito ocorre por ativação da via Akt/GSK3 β estimulada por H_2O_2 ;
- o PA suprime a captação de glicose e a ativação da via PI3K/Akt/GSK3 β em músculo sóleo após quatro horas de incubação e este efeito é atenuado pelo antioxidante Eb, sugerindo envolvimento de H_2O_2 ;
- o tratamento com PA por quatro horas aumenta a expressão da proteína iNOS, indicando o envolvimento do estresse nitrosativo na resistência à insulina após este período;
- o PO não altera a produção de H_2O_2 até quatro horas de incubação;
- o PO não altera o metabolismo da glicose em uma hora, porém, ativa a via Akt/GSK3 β após quatro horas de incubação.

Quadro 1 - Resumo dos efeitos do tratamento de músculos soleos de ratos com PA ou PO durante uma ou quatro horas.

	UMA HORA		QUATRO HORAS	
	PA	PO	PA	PO
Produção de EROs	↑	–	↑	–
TBARS			↑	–
4HNE	–	–	↑	
Captação de glicose	↑	–	↓	–
Síntese de glicogênio	↑	–		
Fosforilação da Akt/PKB	↑	–	↓	↑
Fosforilação da GSK3β	↑	–	↓	↑
Fosforilação da p38-MAPK	–	–		
Fosforilação da 4E-BP1	–	–	–	–
Fosforilação da S6	–	–	–	–

Akt/PKB (*Protein Kinase B*); GSK3β (*Glycogen synthase kinase 3 beta*); p38-MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*); S6 (*ribosomal protein s6*); TBARS (*Thiobarbituric Acid-Reactive Substances*); 4E-BP1 (*4E-binding protein-1*); 4HNE ();

(↑) aumento; (↓) reduz; (–) não altera; () não realizado.

Figura 30 - Efeitos do ácido palmítico (PA) e ácido palmitoléico (PO) na produção de H_2O_2 e metabolismo de glicose durante uma e quatro horas de tratamento.

Após uma hora de tratamento o PA aumenta a produção de H_2O_2 , que ativa a via PI3K/Akt, levando ao aumento da captação de glicose e síntese de glicogênio. Após quatro horas de tratamento o PA aumenta a produção de H_2O_2 induz resistência na via PI3K/Akt por meio do aumento da produção de H_2O_2 e expressão de $iNOS$. Já o PO causou ativação da proteína Akt após quatro horas de tratamento.

REFERÊNCIAS*

- AGOUNI, A. et al. In vivo differential effects of fasting, re-feeding, insulin and insulin stimulation time course on insulin signaling pathway components in peripheral tissues. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 401, n. 1, p. 104-111, 2010.
- AKAZAWA, Y. et al. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. **J. Hepatol.**, v. 52, n. 4, p. 586-593, 2010.
- ALESSI, D. R. et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. **Embo. J.**, v. 15, n. 2, p. 6541-6551, 1996.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutat. Res.**, v. 350, n. 1, p.103-108, 1996.
- APPLE, F. S. et al. Geographic distribution of xanthine oxidase, free radical scavengers, creatine kinase, and lactate dehydrogenase enzyme systems in rat heart and skeletal muscle. **Am. J. Anat.**, v. 192, p. 319–323, 1991.
- AROSIO, P.; LEVI, S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, n. 4, p. 457-463, 2002.
- ASANO, T. et al. p110beta is up-regulated during differentiation of 3T3-L1 cells and contributes to the highly insulin-responsive glucose transport activity. **Journal Biological Chemistry**, v. 275, n. 23, p. 17671-17676, 2000.
- BALABAN, R. S. et al. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 483-495, 2005.
- BALLOTTI, R. et al. Antiphosphotyrosine antibodies modulate insulin receptor kinase activity and insulin action. **Cell Signal**, v. 1, n. 2, p. 195-204, 1989.
- 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.**, v. 31, p. 347–366, 1999.
- BARON, V.; VAN OBBERGHEN, E. Mechanism of insulin action. **C R Seances Soc. Biol. Fil.**, v. 189, n. 1, p. 25-41, 1995.
- BAUGHMAN, J. M.; MOOTHA, V. K. Buffering mitochondrial DNA variation. **Nat. Genet. Nov.**, v. 38, n. 11, p. 1232-1233, 2006.
- BECKMAN, J. S. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, n. 4, p. 1620-1624, 1990.

* De acordo com:

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

BEJMA, J.; JI, L. L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 87, n. 1, p. 465-470, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREDT, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radic. Res.** v. 31, n. 6, p. 577-596, 1999.

CABRERO, A. et al. Increased reactive oxygen species production down-regulates peroxisome proliferator-activated alpha pathway in C2C12 skeletal muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 12, p. 10100-10007, 2002.

CAO, H. et al. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. **Cell**, v. 134, n. 6, p. 933-944, 2008.

CARLSEN, J. et al. Insulin stimulated glycogen synthesis in isolated rat hepatocytes: effect of protein kinase inhibitors. **Cell Signal**, v. 9, n. 6, p. 447-450, 1997.

CARVALHO-FILHO, M. A. et al. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. **Diabetes**, v. 54, n. 4, p. 959-967, 2005.

CAZZOLLI, R. et al. A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase Czeta, in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. **Diabetes**, v. 50, n. 10, p. 2210-2218, 2001.

CHALLISS, R. A. et al. Effects of the beta-adrenoceptor agonist isoprenaline on insulin- sensitivity in soleus muscle of the rat. **Biochem. J.**, v. 233, n. 2, p. 377-381, 1986.

CHAMBERS, M. A. Et al. Stretch-stimulated glucose uptake in skeletal muscle is mediated by reactive oxygen species and p38 MAP-kinase. **J. Physiol.**, v. 587, n. 13, p. 3363-3373, 2009.

CHANG, Y. W.; TRAUGH, J. A. Insulin stimulation of phosphorylation of elongation factor 1 (eEF-1) enhances elongation activity. **Eur. J. Biochem.**, v. 251, n. 1-2, p. 201-207, 1998.

CHAVEZ, J. A.; SUMMERS, S. A. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 419, n. 2, p. 101-109, 2003.

CHEATHAM, B. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. **Mol. Cell Biol.**, v. 14, n. 7, p. 4902-4911, 1994.

CLERK, A. et al. Stimulation of "stress-regulated" mitogen-activated protein kinases (stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 13, p. 7228-7234, 1998.

COMBETTES-SOUVERAIN, M.; ISSAD T. Molecular basis of insulin action. **Diabetes Metab.**, v. 24, n. 6, p. 477-489, 1998.

CORTOT, A. et al. [PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitors]. **Bull. Cancer**, v. 93, n. 1, p. 19-26, 2006.

COTGREAVE, I. A.; MOLDEÚS, P. Lung protection by thiol-containing antioxidants. **Bull. Eur. Physiopathol. Respir.**, v. 23, n. 4, p. 275-277, 1987.

COTGREAVE, I. A. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. **Adv. Pharmacol.**, v. 38, p. 205-227, 1997.

CHRISTIE, W. W. **Gas chromatography and Lipids: a practical guide**. Dundee: The Oily Press, 1989.

CROSS, D. A. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 785-789, 1995.

CURI, R.; PERES, C. M. Ácidos graxos como moduladores intercelulares. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, M. I. Y.; PROCÓPIO, J. **Entendendo as gorduras: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002. p. 201-214.

CUSI, K.; MAEZONO, K.; OSMAN, A. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. **J. Clin. Invest.**, v. 105, p. 311-320, 2000.

DE FLORA, S. et al. In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. **Carcinogenesis**, v. 6, n. 12, p. 1735-1745, 1985.

DHAUNSI, G. S. et al. Very long chain fatty acids activate NADPH oxidase in human dermal fibroblasts. **Cell Biochem. Funct.**, v. 23, n. 1, p. 65-68, 2005.

DELDICQUE, L. et al. The unfolded protein response is activated in skeletal muscle by high-fat feeding: potential role in the downregulation of protein synthesis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 299, n. 5, p. E695-705, 2010.

D' ALESSANDRO, M. E. et al. Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, p. 273-280, 2000.

DIAKOGIANNAKI, E.; WELTERS, H. J.; MORGAN, N. G. et al. Differential regulation of the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells exposed to long-chain saturated and monounsaturated fatty acids. **J. Endocrinol.**, v. 197, n. 3, p. 553-563, 2008.

DIMOPOULOS, N. et al. Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. **Biochem. J.**, v. 399, n. 3, p. 473-481, 2006.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.**, v. 186, p. 421-431, 1990.

DRESNER, A. et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1 associated phosphatidylinositol 3- kinase activity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 2, p. 253-259, 1999.

DUVAL, C. et al. Overexpression of mitochondrial uncoupling protein-3 does not decrease production of the reactive oxygen species, elevated by palmitate in skeletal muscle cells. **FEBS Lett.**, v. 581, n. 5, p. 955-961, 2007.

ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 8, p. 606-619, 2006.

ESPINAL, J.; DOHN; NEWSHOLME, E. A. Sensitivity to insulin of glycolysis and glycogen synthesis of isolated soleus-muscle strips from sedentary, exercised and exercised-trained rats. **Biochemical Journal**, v. 212, n. 2, p. 453-458, 1983.

ESPINOSA, A. et al. Myotube depolarization generates reactive oxygen species through NAD(P)H oxidase; ROS-elicited Ca^{2+} stimulates ERK, CREB, early genes. **J. Cell. Physiol.**, v. 209, p. 379-388, 2006.

EVANS, J. L. et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocr. Rev.**, v. 23, n. 5, p. 599-622, 2002.

FABBRINI, E. et al. Insulin sensitivity is not associated with palmitoleate availability in obese humans. **J. Lipid. Res.**, v. 52, n. 4, 808-812, 2011.

FERREIRA, L. F.; REID, M. B. Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. **J. Appl. Physiol.**, v. 104, n. 3, p. 853-860, 2008.

FRYER, G. D. et al. The long-term regulation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase kinase by dietary lipid is dependent on fatty acid composition. **Eur. J. Biochem.**, v. 229, p. 741-748, 1995.

GAROFALO, R. S. "Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta". **J. Clin. Invest.**, v. 112, n. 2, p. 197-208, 2003.

GEBAUER, F.; HENTZE, M. W. Molecular mechanisms of translational control. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 5, p. 827-835, 2004.

GINGRAS, A. C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. **Genes Dev.**, v. 115, n. 7, p. 807-826, 2001.

GRAPHPAD PRISM. Version 5. San Diego, CA, USA: Graph Pad *Software*, Inc.

GREEN, A.; NEWSHOLME, E. A. Sensitivity of glucose uptake and lipolysis of white adipocytes of rat to insulin and effects of some metabolites. **Biochemical Journal**, v. 180, p. 365-370, 1979.

GRIMALDI, P. A. et al. Induction of aP2 gene expression by nonmetabolized long-chain fatty acids. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 89, n. 22, p. 10930-10934, 1992.

GRUNFELD, C. K. L. et al. Maintenance of 3T3-L1 cells in culture media containing saturated fatty acids decreases insulin binding and insulin action. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 103, n. 1, p. 219-226, 1981.

HAJDUCH, E. A. et al. Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of protein kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 173-183, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York, USA: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed. Clarendon: Oxford, 2000. 936 p.

HALLIWELL, B.; CLEMENTS, M. V.; LONGA, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Lett.**, v. 486, n. 1, p. 10-13, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. Oxford: Clarendon Press, 2006.

HARA, K. et al. 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 91, n. 16, p. 7415-7419, 1994.

HARRELL, N. B. et al. Essential role of p38 MAPK for activation of skeletal muscle glucose transport by lithium. **Arch. Physiol. Biochem.**, v. 113, n. 4-5, p. 221-227, 2007.

HAWKINS, P. T. et al. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 34, n. 5, p. 647-662, 2006.

HELMUTH, G. Signalling in cellular metabolism: stress or wellness? **EMBO Reports**, v. 11, p. 834-840, 2010.

HENNES, M. M. et al. Receptor and postreceptor effects of free fatty acids (FFA) on hepatocyte insulin dynamics. **Int. J. Obes.**, v. 14, n. 10, p. 831-841, 1990.

HENRIKSEN, E. J. et al. Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles. **Am. J. Physiol.**, v. 259, n. 4, pt. 1, p. E593-598, 1990.

HENRIKSEN, E. J.; DIAMOND-STANIC, M. K.; MARCHIONNE, E. M. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 51, n. 5, p. 993-999, 2011.

HERSHEY, J. W. Translational control in mammalian cells. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 60, p. 717-755, 1991.

HIGAKI, Y. et al. Oxidative stress stimulates skeletal muscle glucose uptake through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 294, n. 5, p. E889-897, 2008.

HINNEBUSCH, A., **Translational control of gene expression**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

HIRABARA, S. M. et al. Acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolization (Randle cycle). **FEBS Lett.**, v. 541, n. 1-3, p.109- 114, 2003.

HIRABARA, S. M. **Efeito agudo de ácidos graxos no metabolismo de glicose em músculo esquelético**. 2005. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HIRABARA, S. M. et al. Acute effect of fatty acids on metabolism and mitochondrial coupling in skeletal muscle. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1757, n. 1, p. 57-66, 2006.

HIRABARA, S. M. et al. Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism. **J. Cell. Physiol.**, v. 210, n. 1, p. 7-15, 2007.

HIRABARA, S. M.; CURI, R.; MAECHLER, P. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 222, n. 1, p. 187-194, 2010.

HUBERT, P. et al. Lipid-induced insulin resistance in cultured hepatoma cells is associated with a decreased insulin receptor tyrosine kinase activity. **Cell. Regul.**, v. 2, n. 1, p. 65-72, 1991.

IMAGE J. Version 1.46. Bethesda, USA: National Institutes of Health (NIH). Software. INOBUCHI, T et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1939-1945, 2000.

JAVESGHANI, D. et al. Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 165, p. 412-418, 2002.

JIANG, Z. Y. et al. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. **J. Clin. Invest.**, v. 104, p. 447-457, 1999.

KAPELLER, R.; CANTLEY, L. C. Phosphatidylinositol 3-Kinase. **Bioessays**, v. 16, n. 8, p. 565-576, 1994.

KASUGA, M. Mechanism of insulin action--signal transductions after binding to insulin receptor. **Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi**, v. 69, n. 10, p. 1029-1034, 1993.

KEYER, K.; IMLAY, J. A. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 24, p. 13635-13640, 1996.

KIM, Y. B.; SHULMAN, G. I.; KAHN, B. B. Fatty acid infusion selectively impairs insulin action on Akt1 and protein kinase C lambda/zeta but not on glycogen synthase kinase-3. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 36, p. 32915-32922, 2002.

KOBZIK, L. et al. Nitric oxide in skeletal muscle. **Nature**, v. 372, n. 6506, p. 546-548, 1994.

KOOY, N. W. et al. Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite. **Crit. Care Med.**, v. 25, n. 5, p. 812-819, 1997.

KUBAR, J.; ROCHET, N. Basal autophosphorylation of insulin receptor occurs preferentially on the receptor conformation exhibiting high affinity for insulin and stabilizes this conformation. **Cell Signal**, v. 2, n. 6, p. 587-594, 1990.

LAMBERTUCCI, R. H. et al. Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. **J. Cell Physiol.**, v. 216, p. 796-804, 2008.

LANG, C. H. Elevated plasma free fatty acids decrease basal protein synthesis, but not the anabolic effect of leucine, in skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 291, n. 3, p. E666-674, 2006.

LAVAN, B. E.; LIENHARD, G. E. The insulin-elicited 60-kDa phosphotyrosine protein in rat adipocytes is associated with phosphatidylinositol 3-kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 5921-5928, 1993.

LENTNER, C. Geigy Scientific tables. Physical chemistry composition of blood hematology somatometric data. **Ciba-Geigy limited, West Caldwell, New Jersey**. v. 3, p. 122-123, 1984.

LISTENBERGER, L. L.; ORY, D. S.; SCHAFFER, J. S. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 14890-14895, 2001.

LLEDÍAS, F.; RANGEL, P.; HANSBERG, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 17, p. 10630-10637, 1998.

LOH, K. et al. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. **Cell Metab.**, v. 10, n. 4, p. 260-272, 2009.

LOSCHEN, G. et al. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. **FEBS Lett.**, v. 42, p. 68-72, 1974.

MAEDLER, K. et al. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. **Diabetes**, v. 52, n. 3, p. 726-733, 2003.

MAMANE, Y. et al. Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 25, p. 16961-16965, 2008.

MANNING, B. D. et al. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. **Mol. Cell.**, v. 10, n. 1, p. 151-162, 2002.

MIKINES, K. J. The influence of physical activity and inactivity on insulin action and secretion in man. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 146, p. 1-43, 1992.

MONTELL, E. et al. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 280, n. 2, p. E229-237, 2001.

MOORE, K.; ROBERTS, I. I. J. Measurement of lipid peroxidation. **Free Radical Res.**, v. 28, p. 659-671, 1998.

MOZAFFARIAN, D. et al. Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 92, n. 6, p. 1350-1358, 2010.

NAUSEEF, W. M. Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 25, p. 16961-16965, 2008.

NETTLETON, J. A. **Omega-3 fatty acids and health**. 9th ed. New York: Champman Hall, 1995.

NEWSHOLME, P. et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: Role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. **J. Physiol.**, v. 583, p. 9-24, 2007.

NYSTROM, H. F.; QUON, J. M. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. **Cellular Signalling**, v. 11, n. 8, p. 563-574, 1999.

OSAWA, C. C. et al. TBA test applied to meats and their products: traditional, modified and alternative methods. **Quím. Nova**, v. 28 n. 4, p. 655-663, 2005.

PAPA, S. Mitochondrial diseases and aging. **Mol. Aspects Med.**, v. 17, n. 6, p. 513-563, 1996.

PERROTTI, N. et al. Insulin stimulates phosphorylation of a 120-kDa glycoprotein substrate (pp120) for the receptor-associated protein kinase in intact H-35 hepatoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, n. 10, p. 3137-3140, 1987.

PERSEGHIN, G. et al. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 27, p. S6-11, 2003.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 106, p. 165-169, 2000.

PINHEIRO, C. H. et al. Regulation of glycolysis and expression of glucose metabolism-related genes by reactive oxygen species in contracting skeletal muscle cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 48, n. 7, p. 953-960, 2010.

PILON, G. et al. Endotoxin mediated-iNOS induction causes insulin resistance via ONOO⁻ induced tyrosine nitration of IRS-1 in skeletal muscle. **PLoS One.**, v. 5, n. 12, p. e15912, 2010.

POTTER, C. J.; PEDRAZA, L. G.; XU, T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. **Nat. Cell. Biol.**, v. 4, n. 9, p. 658-665, 2002.

PRONK, G. J. et al. Insulin-induced phosphorylation of the 46- and 52-kDa Shc proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 8, p. 5748-5753, 1993.

PU, J. et al. Palmitic acid acutely stimulates glucose uptake via activation of Akt and ERK1/2 in skeletal muscle cells. **J. Lipid. Res.**, v. 52, n. 7, p. 1319-1327, 2011.

QUON, M. J. et al. Roles of 1-phosphatidylinositol 3-kinase and ras in regulating translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. **Mol. Cell. Biol.**, v. 15, p. 5403-5411, 1995.

RANDLE, P. J. et al. The glucose fatty-acid cycle its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v. 1, p. 785-789, 1963.

RAO, K. M. Et al. Padmanabhan J, Kilby DL, Cohen HJ, Currie MS, Weinberg JB. Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. **J. Leukoc. Biol.**, v. 51, n. 5, p. 496-500, 1992.

RATTAN, S. I. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. **Free Radic Res.**, v. 40, n. 12, p. 1230-1238, 2006.

REID, M. B. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 33, n. 3, p. 371-376, 2001.

REID, M. B.; DURHAM, W. J. Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle: potential impact on aging. **Ann N-Y Acad. Sci.**, v. 959, p. 108-116, 2002.

REYNOLDS, C. M. et al. Dietary saturated fatty acids prime the NLRP3 inflammasome via TLR4 in dendritic cells-implications for diet-induced insulin resistance. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 56, n. 8, p. 1212-1222, 2012.

RICHTER, J. D.; SONENBERG, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. **Nature**, v. 433, p. 477-480, 2005.

RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. **J. Physiol.**, v. 529, pt. 1, p. 3–10, 2000.

RODEN, M. T. B. et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. **J. Clin. Invest.**, v. 97, n. 12, p. 2859-2865, 1996.

RODEN, M. How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. **News Physiol. Sci.**, v. 19, p. 92-96, 2004.

RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 36, n. 1, p. 1-9, 2004.

SAAD, M. J. et al. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 36, p. 22100-22104, 1996.

SAVAGE, D. B. et al. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 507-520, 2007.

SCHMITZ-PEIFFER, C. Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. **Cell Signal**, v. 12, n. 9-10, p. 583-594, 2000.

SCHMITZ-PEIFFER, C. et al. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 34, p. 24202-24210, 1999.

SHAPIRO, A. L.; VINUELA, E.; MAIZEL, J. V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 28, n. 5, p. 815-820, 1967.

SHULMAN, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 106, p. 171-176, 2000.

SOLTYS, C. L. et al. Phosphorylation of cardiac protein kinase B is regulated by palmitate. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 283, n. 3, p. H1056-1064, 2002.

SOMWAR, R. et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase α and β by insulin and contraction in rat skeletal muscle: potential role in the stimulation of glucose transport. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1794–1800, 2000.

STEIN, B. et al. p38-2, a novel mitogen-activated protein kinase with distinct properties. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 3, p. 19509-19517, 1997.

STIREWALT, D. S. et al. Insulin sensitivity and responsiveness of epitrochlearis and soleus muscles from fed and starved rats. **Biochemical Journal**, v. 227, p. 355-362, 1985.

STEFAN, N. et al. Circulating palmitoleate strongly and independently predicts insulin sensitivity in humans. **Diabetes Care**, v. 33, n. 2, p. 405-407, 2010.

STORZ, P. et al. Cross-talk mechanisms in the development of insulin resistance of skeletal muscle cells palmitate rather than tumour necrosis factor inhibits insulin-dependent protein kinase B (PKB)/Akt stimulation and glucose uptake. **Eur. J. Biochem.**, v. 266, p. 17-25, 1999.

SVEDBERG, J. et al. Free-fatty acid inhibition of insulin binding, degradation, and action in isolated rat hepatocytes. **Diabetes**, v. 39, n. 5, p.570-574, 1990.

SWEENEY, G. et al. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 10071–10078, 1999.

THOMPSON, A. L. et al. Effects of individual fatty acids on glucose uptake and glycogen synthesis in soleus muscle in vitro. **American Journal of Physiology-Endocrinology Metabolism**, v. 279, p. E577-E584, 2000.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TSUCHIYA, Y. Palmitate-induced down-regulation of sortilin and impaired GLUT4 trafficking in C2C12 myotubes. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 45, p. 34371-34381, 2010.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J. Physiol.**, v. 15, n. 552, pt. 2, p. 335-344, 2003.

USUI, I. et al. Fatty acid induced insulin resistance in rat-1 fibroblasts overexpressing human insulin receptors: impaired insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase activity. **Diabetologia**, v. 40, n. 8, p. 894-901, 1997.

VAN EPPS-FUNG, M. et al. Fatty acid-induced insulin resistance in adipocytes. **Endocrinology**, v. 138, n. 10, p. 4338-4345, 1997.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 7, p. 489-501, 2002.

WANG, X. S. et al. Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 38, p. 23668-23674, 1997.

WANG, X. et al. Palmitate induced insulin resistance by PKC θ -dependent activation of mTOR/S6K pathway in C2C12 myotubes. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v. 118, n. 9, p. 657-661, 2010.

WEI, Y. H.; LEE, H. C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 227, n. 9, p. 671-682, 2002.

WOLF, H. P. O. Possible new therapeutic approach in diabetes mellitus by inhibition of carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1). **Horm. Metab. Res.**, v. 26, p. 62–67, 1992. Suppl. 1.

WYMAN, M. P.; ZVELEBIL M.; LAFFARGUE, M. Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24, n. 7, p. 366-376, 2003.

YANG, Z. H. Et al. Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes. **Lipids. Health. Dis.**, v. 10, p. 120, 2011.

YANO, Y. et al. Primary sites of actions of staurosporine and H-7 in the cascade of insulin action to glucose transport in rat adipocytes. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 1176, n. 3, p. 327-332, 1993.

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-- induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutat. Res. Amsterdam**, v. 379, n. 2, p. 201-210, 1997.

YU, C. et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. **J. Biol. Chem.** v. 277, n. 52, p. 50230–50236, 2002.

YUZEFOVYCH, L.; WILSON, G.; RACHEK, L. Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 299, n. 6, p. E1096-1105, 2010.

ZECCHIN, H. G. et al. Insulin signaling pathways in aorta and muscle from two animal models of insulin resistance — the obese middle-aged and the spontaneously hypertensive rats. **Diabetologia**, v. 46, p. 479-491, 2003.

ZHOU, M. et al. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. **Anal. Biochem.**, v. 253, n. 2, p. 162-168, 1997.

ZHOU, Q. Evidence for adipose-muscle cross talk: opposing regulation of muscle proteolysis by adiponectin and Fatty acids. **Endocrinology**, v. 148, n. 12, p. 5696-5705, 2007.

APÊNDICE – PUBLICAÇÕES

ARTIGOS PUBLICADOS E ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

1. PINHEIRO, C. H. J.; VITZEL, K. F.; **NACHBAR, R. T.**; FUJIWARA, H.; CURTI, R. Oxidative stress in skeletal muscle from rats with experimental Parkinson's disease: Effect of moderate exercise training. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, 2012.
2. PINHEIRO, C. H. J.; VITZEL, K. F.; **NACHBAR, R. T.**; GUIMARAES-FERREIRA, L.; TAKAHASHI, H. K.; VINOLO, M. A. R.; FUJIWARA, H.; CURTI, R. Oleate inhibits Notch signaling pathway and impairs regenerative capacity of skeletal muscle stem cells. **International Journal of Obesity**, 2012.
3. MARTINS, A. R.; **NACHBAR, R. T.**; GORJÃO, R.; VINOLO, M. A.; FESTUCCIA, W. T.; LAMBERTUCCI, R. H.; CURY-BOAVENTURA, M. F.; SILVEIRA, L. R.; CURTI, R.; HIRABARA, S. M.; Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. **Lipids in Health and Disease**, v.11, p.30, 2012.
4. GUIMARÃES-FERREIRA, L.; PINHEIROS, C. H. J.; GERLINGER-ROMERO, F.; VITZEL, K. F.; **NACHBAR, R. T.**; CURTI, R.; NUNES, M. T. Short-term creatine supplementation decreases reactive oxygen species content with no changes in expression and activity of antioxidant enzymes in skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology** (Print). v. 1, p. 1-2, 2012.
5. VITZEL, K. F.; PINHEIRO, C. H. J.; **NACHBAR, R. T.**; FUJIWARA, H.; CURTI, R. Effect of N-acetylcysteine on skeletal muscle contractile dysfunction in streptozotocin-induced diabetes. **European Journal of Applied Physiology** (Print), 2011.
6. PINHEIRO, C. H. J.; QUEIROZ, J. C. F.; GUIMARÃES-FERREIRA, L.; VITZEL, K. F.; **NACHBAR, R. T.**; SOUSA, L. G. O.; SOUZA-JR, A. L.; NUNES, M. T.; CURTI, R. Local injections of adipose-derived mesenchymal stem cells modulate inflammation and increase angiogenesis ameliorating the dystrophic phenotype in dystrophin-deficient skeletal muscle. **Stem Cell Reviews**, v. 8, p. 363-374, 2011.
7. RODRIGUES, H. G.; VINOLO, M. A. R.; MAGDALON, J.; VITZEL, K. F.; **NACHBAR, R. T.**; PESSOA, A. F. M; DOS SANTOS, M. F.; HATANAKA, E.; CALDER, P. C.; CURTI, R. Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, p. 208-215, 2011.
8. VINOLO, M. A. R.; RODRIGUES, H. G.; **NACHBAR, R. T.**; CURTI, R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. **Nutrients**, v. 3, p. 858 - 876, 2011.
9. PINHEIRO, C. H. J.; SILVEIRA, L. R.; **NACHBAR, R. T.**; VITZEL, K. F.; CURTI, R. Regulation of glycolysis and expression of glucose metabolism-related genes by reactive oxygen species in contracting skeletal muscle cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, p. 953 - 960, 2010.

10. ALMEIDA, F. N.; ALMEIDA, K. N.; MASI, L. N., **NACHBAR, R. T.**; NATALI, M. R. M.; MORAES, S. M. F. A resposta do peso e da composição corporal à inclusão da dieta de cafeteria e treinamento físico aeróbio em diferentes fases do desenvolvimento. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 7, p. 1-8, 2008.

CAPÍTULOS DE LIVROS NO EXTERIOR

1. VINOLO, M. A. R.; RODRIGUES, H. G.; **NACHBAR, R. T.** Modulation of inflammatory and immune responses by short chain fatty acids In: CALDER, Philip C.; YAQOOB, Parveen (Org.) **Diet, immunity and inflammation**. UK, Cambridge: Woodhead Publishing, 2012.