

GLEISSON ALISSON PEREIRA DE BRITO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

**FLEXIBILIDADE METABÓLICA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO E TECIDO
ADIPOSO EM MODELO DE OBESIDADE INDUZIDO POR GLUTAMATO
MONOSSÓDICO É MODIFICADA POSITIVAMENTE PELO EXERCÍCIO
CRÔNICO.**

CURITIBA

2012

GLEISSON ALISSON PEREIRA DE BRITO

**FLEXIBILIDADE METABÓLICA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO E TECIDO
ADIPOSO EM MODELO DE OBESIDADE INDUZIDO POR GLUTAMATO
MONOSSÓDICO É MODIFICADA POSITIVAMENTE PELO EXERCÍCIO
CRÔNICO.**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes

CURITIBA

2012

Dedico este trabalho aos meus pais, Alexandre e Maria Helena, por seu amor e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha família, Alexandre, Maria Helena, Rafael e Lilian. Muito obrigado por todo cuidado, carinho e dedicação. Perdão pelas horas ausentes e obrigado pelos momentos presentes. Amo vocês!

Ao professor Dr. Luiz Claudio Fernandes, pela oportunidade e pela orientação. Por todas as portas profissionais abertas, e pela contínua prontidão em atender e nortear seus alunos. Muito Obrigado!

Ao professor. Dr. Ricardo Key Yamazaki, pelos quatro anos de parceria nos experimentos. Mais que um amigo, um co-orientador. Valeu memo!

Aos colegas do Laboratório de Metabolismo Celular, Isabela Coelho (tantos adipócitos e macrófagos que até perdi a conta...), Danielle Pequito e Adriana Aya Yamaguchi (neutralizar era a parte mais chata...ou seria preparar o tampão?), Júlia Aikawa (tem algo errado com esses anticorpos...ou com essa membrana...ou com esse filme...ou comigo???), Gina Borghetti (os tecidos no TRIzol não serão em vão...), Kátya Naliwaiko, Cíntia Rodacki, Dalton Schiessel, Everson Araújo Nunes (não temos mais o pé...mas sempre queremos uma mão...no citômetro...), Marcelo Kryczyk, Sandro Bonatto, Juliano Machado, Ricelli Endrigo, Thiago Massuda e tantos outros que de algum modo me auxiliaram nestes anos. Sem vocês este trabalho não existiria.

Muito Obrigado!

Ao programa de pós Graduação em Biologia Celular e Molecular.

À CAPES e CNPq pelo financiamento da pesquisa.

LISTA DE ABREVIÇÕES

AGL – Ácidos Graxos Livres

AMPK – Proteína quinase dependente de AMP

AP – Ácido palmítico

G-6-P – Glicose 6 fosfato

GLUT4 – Transportador de glicose isoforma 4

GMS – Glutamato Monossódico

HK – Hexoquinase

HSL – Lipase hormônio sensível

IL- Interleucina

IL-1ra - Antagonista do receptor de interleucina 1 β

IR – Receptor de insulina

IRS – Substrato para o receptor de insulina

LPL – Lipase de lipoproteína

ME – Músculo esquelético

NF-kB -fator nuclear kappa β

NRF - Fator respiratório nuclear

PDH – Piruvato desidrogenase

PFK – Fosfofrutoquinase

PGC-1 α - Coativador 1 α do PPAR

PI-3K – Fosfatidilinositol 3 fosfato

PKB – Proteína quinase B

PPAR - Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos

TA – Tecido adiposo

TAB – Tecido adiposo brando

TAG – Triacilgliceróis

TAM – Tecido adiposo marrom

TFAM - Fator de transcrição mitocondrial

TGIM – Triacilgliceróis intramusculares

TLR – Receptores Toll Like

TNF α – Fator de necrose tumoral α

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Obesidade e inflexibilidade metabólica.	2
Figura 02: Redução na expressão da AMPK, do PGC-1 α , e relação com o desenvolvimento do fenótipo metabólico observado na obesidade.....	4
Figura 03: Efeitos dos AG sobre o metabolismo de glicose estimulado por insulina. ...	7
Figura 04: Expansibilidade de adipócitos, ácidos graxos livres e armazenamento ectópico de lipídeos	9
Figura 05: Inflamação crônica e morbidades associadas à obesidade.....	10
Figura 06: Hipertrofia do tecido adiposo subcutâneo e acúmulo ectópico de lipídeos associados à infiltração de macrófagos.	13
Figura 07: Características fenotípicas de células imunitárias infiltradas no tecido adiposo.....	16
Figura 08: Inibição do NF- κ B mediada por AMPK.....	17
Figura 09: Papel da AMPK e PGC-1 α na biogênese mitocondrial induzida pelo exercício.	21
Figura 10: Papel do exercício sobre o metabolismo de glicose estimulado por insulina.	23
Figura 11: Efeitos do exercício sobre a inflamação crônica.....	26
Figura 12: Esquema do desenho experimental.	30
Figura 13: Sistema de natação utilizado no treinamento físico dos animais.....	31
Figura 14: Desenho esquemático do “enlenmeyer de descarboxilação”	38
Figura 15: Características do modelo aos 90 dias.	39
Figura 16: Glicemia de jejum, taxa de decaimento da glicose (KITT) durante ITT e decaimento da glicose durante teste de tolerância à insulina (ITT).....	40
Figura 17: Massa corporal dos animais a partir de 90 dias e ao longo de 8 semanas.	41
Figura 18: Consumo diário médio de ração e Índice Lee dos animais aos 150 dias. .	42
Figura 19: Peso do tecido adiposo e tamanho médio dos adipócitos.	44
Figura 20: A. Teste de tolerância à insulina e Insulinemia plasmática.....	45

Figura 21: Descarboxilação de U-[¹⁴ C]-ácido palmítico pelo músculo esquelético, descarboxilação de U-[¹⁴ C]-ácido palmítico pelo tecido adiposo epididimal, e incorporação de U-[¹⁴ C]-ácido palmítico em lipídeos (lipogênese).	49
Figura 22: Produção de lactato, descarboxilação de [U-14C]-glicose e síntese de [14C]-glicogênio estimulados por insulina no músculo esquelético e	51
Figura 23: Produção de lactato, descarboxilação de [U-14C]-glicose e síntese de [14C]-glicogênio estimulados por insulina pelo tecido adiposo.....	53
Figura 24: Efeito da exposição do músculo esquelético ao ácido palmítico.	55
Figura 25: Efeito da exposição do TA ao ácido palmítico	57
Figura 26: Expressão da enzima cinase dependente de AMP (AMP-K) no tecido adiposo.	58
Figura 27: Expressão do cofator de transcrição PGC-1 α no tecido adiposo.....	59
Figura 28: Infiltração de células imunitárias no tecido adiposo branco.....	60
Figura 29: Vias de sinalização da insulina.....	109
Tabela 01: Análises bioquímicas plasmáticas e teciduais.	47

RESUMO

Flexibilidade metabólica consiste na eficiência do organismo em utilizar diferentes substratos energéticos de acordo com sua disponibilidade. Esta aptidão fisiológica é dependente da capacidade oxidativa e da sensibilidade à insulina em tecidos periféricos, e apresenta-se comprometida em inúmeras situações patológicas. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da obesidade induzida por glutamato monossódico (GMS) sobre a flexibilidade metabólica no tecido adiposo (TA) e no músculo esquelético (ME). Foram também investigados os efeitos do exercício aeróbio crônico sobre este parâmetro. Ratos da linhagem Wistar, recém-nascidos, foram injetados, por cinco dias consecutivos, com solução de GMS (4mg/g p.c.), para indução de modelo de obesidade. O protocolo de exercício foi iniciado aos 90 dias de vida, e consistiu de natação com sobrecarga de 6% do peso corporal, uma hora por dia, cinco dias por semana, pelo período de 8 semanas. Aos 150 dias após o nascimento, os animais obesos sedentários apresentaram hiperadiposidade, hipertrofia de adipócitos, resistência à insulina e hiperinsulinemia. Apresentaram ainda dislipidemia e acúmulo ectópico de triacilgliceróis intra-hepáticos e intramusculares (TGIM). A flexibilidade metabólica no TA e ME destes animais foi avaliada *in vitro*. No TA houve redução na capacidade oxidativa de ácidos graxos, e dificuldade em elevar a oxidação de glicose quando estimulado por insulina, caracterizando a instalação de inflexibilidade metabólica, bem como dificuldade em elevar a produção de lactato e a síntese de glicogênio quando estimulado por insulina, e menor expressão protéica dos reguladores imunometabólicos AMPK α 1 e PGC-1 α . Citometria de fluxo revelou ainda maior infiltração de macrófagos e células TCD8⁺. O ME dos animais obesos sedentários não apresentou comprometimento da capacidade oxidativa. Contudo, este tecido não foi capaz de elevar a oxidação de glicose e a produção de lactato quando estimulado por insulina. Por outro lado, os animais obesos exercitados apresentaram menor adiposidade e não desenvolveram resistência à insulina, dislipidemia, ou acúmulo de TGIM. O exercício elevou a capacidade oxidativa de ácidos graxos no TA e ME, e promoveu aumento na oxidação de glicose em ambos, quando estimulados por insulina. O exercício preservou parcialmente a expressão de AMPK α 1, não afetou a de PGC-1 α , e evitou a infiltração de macrófagos e células TCD8⁺ no TA. Adicionalmente, foram investigados os efeitos da exposição do TA e ME ao ácido palmítico (AP) sobre o metabolismo de glicose estimulado por insulina. No ME dos animais obesos, a presença do AP reduziu a oxidação de glicose e a síntese de lactato. No ME dos animais controles, a presença do AP não afetou a oxidação de glicose, e elevou a síntese de glicogênio. A exposição do TA ao AP promoveu efeitos semelhantes nos animais obesos e controles, com redução na oxidação de glicose e elevação na síntese de glicogênio. O exercício não preveniu os efeitos deste ácido graxo nos tecidos do grupo controle ou obeso. Os resultados deste trabalho demonstram que, na obesidade induzida por GMS, ocorre comprometimento da flexibilidade metabólica tanto no TA como no ME. Porém, existem peculiaridades no que concerne a capacidade oxidativa de ácidos graxos e a sensibilidade à insulina nestes tecidos. O exercício aeróbio crônico previne o comprometimento destas funções fisiológicas, além de restringir a progressão da adiposidade e modular

vias imunometabólicas. Estes são mecanismos potenciais através dos quais o exercício preservou a flexibilidade metabólica no TA e ME.

ABSTRACT

Metabolic flexibility represents the body efficiency into use different energy sources, in accordance to their availability. Such physiological competence depends on the oxidative capacity and insulin sensitivity of the peripheral tissues, and might be impaired in a plethora of pathological conditions. Therefore, the aim of this study was to investigate the monosodium glutamate (MSG) induced obesity effects on both, the metabolic flexibility in adipose tissue (AT) and skeletal muscle (SM). In addition, chronic aerobic exercise effects on this parameter were also investigated. Newborns male *Wistar* rats were injected for five consecutive days with a MSG solution (4 mg/g bw), to induce a model of obesity. The exercise protocol was initiated when rats were 90 days old, and consisted of swimming with overload of 6% of body weight, one hour per day, five days a week, during 8 weeks. At 150 days old, obese sedentary animals developed hiper adiposity, hypertrophy of adipocytes, insulin resistance and hyperinsulinaemia. Dyslipidaemia and ectopic intra-hepatic and intramuscular (IMTG) triacylglycerols accumulation were also observed. The metabolic flexibility in AT and SM of these animals was evaluated *in vitro*. Adipose tissue oxidative capacity was reduced, and it was verified an inability to improve glucose oxidation when stimulated by insulin, characterizing a metabolic flexibility impairment. In this tissue, an inability to increase both lactate production and glycogen synthesis stimulated by insulin, and a lower proteic expression of the immunometabolic regulators AMPK α 1 and PGC-1 α were present. Furthermore, flow-cytometric study shows increased macrophage and CD8⁺ T cells infiltration. Oxidative capacity was not impaired in SM of obese sedentary animals. However, this tissue was not able to improve glucose oxidation and lactate production stimulated by insulin. Moreover, the exercised obese animals had lower adiposity, and did not develop insulin resistance, dyslipidaemia, or IMTG accumulation. Exercise improved the oxidative capacity of fatty acids in the AT and SM, as well the glucose oxidation-stimulated insulin in both of them. Exercise partially preserved the AMPK α 1 expression, did not affect PGC-1 α expression, and prevented the AT macrophages and CD8⁺ T cells infiltration. Additionally, the effects of palmitic acid (PA) on AT and SM glucose metabolism-stimulated insulin were investigated. In the SM of obese animals, PA reduced glucose oxidation and lactate synthesis. In the SM of the control animals, PA did not affect glucose oxidation, and increased glycogen synthesis. In AT, PA promoted similar effects in obese as well as in control group, reducing glucose oxidation and increasing glycogen synthesis. The exercise did not prevent the fatty acid effects on the tissues of obese or control groups. These results showed that, in MSG induced obesity, impairment of metabolic flexibility occurs in both AT and SM. However, there are unique features regarding to oxidative capacity of fatty acids and insulin sensitivity. Chronic aerobic exercise prevents the impairment of these physiological functions, constrains the adiposity progression, and modulates immunometabolic pathways. These are potential mechanisms by which exercise preserved AT and SM metabolic flexibility.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÕES	78
8. REFERÊNCIAS.....	80
ANEXOS.....	106

1. INTRODUÇÃO

1.1. Flexibilidade metabólica e obesidade

Flexibilidade metabólica consiste na eficiência do organismo em utilizar diferentes substratos energéticos de acordo com sua disponibilidade (BICKEL, 2004; KELLEY *et al.*, 2005). Esta função fisiológica está comumente comprometida em patologias associadas à obesidade, e diversos estudos aventam a hipótese de que disfunções intrínsecas de tecidos periféricos como o músculo esquelético, tecido adiposo e fígado, representem a base etiológica do desenvolvimento da inflexibilidade metabólica nesta doença (SALTIEL e KAHN, 2001; LIANG, 2006). Estes tecidos são os principais alvos de ação da insulina, hormônio essencial na homeostase energética, pois coordena o armazenamento, mobilização e utilização de ácidos graxos livres (AGL) e glicose (SALTIEL e KAHN, 2001). O desenvolvimento de resistência à insulina nestes tecidos é reconhecido como defeito fundamental que precede o estabelecimento da síndrome metabólica, também conhecida como síndrome de resistência à insulina (SHULDINER e MCLENITHAN 2004; STORLIEN, 2004; ZECCHIN CARVALHEIRA e SAAD, 2002). Esta síndrome é, de fato, caracterizada pela inflexibilidade metabólica devido à inabilidade em elevar a oxidação de glicose durante estímulo insulínico, bem como inabilidade em manter preferência pela oxidação de ácidos graxos durante o jejum (Figura 01) (STORLIEN *et al.*, 2004). Adicionalmente, os mecanismos fisiológicos que correlacionam obesidade, resistência à insulina e flexibilidade metabólica são complexos e, muitas vezes, é difícil estabelecer as relações de causa e efeito entre as peculiaridades metabólicas observadas em diferentes tecidos. Neste sentido destacam-se, por exemplo, o comprometimento da capacidade oxidativa no músculo esquelético e no tecido adiposo (KIM *et al.*, 2000; CHOO *et al.*, 2006), o excesso de substratos circulantes (WOLFE, 1998), o acúmulo ectópico de lipídeos (BAYS *et al.*, 2004), e a instalação de um quadro inflamatório crônico (OUCHI *et al.*, 2011).

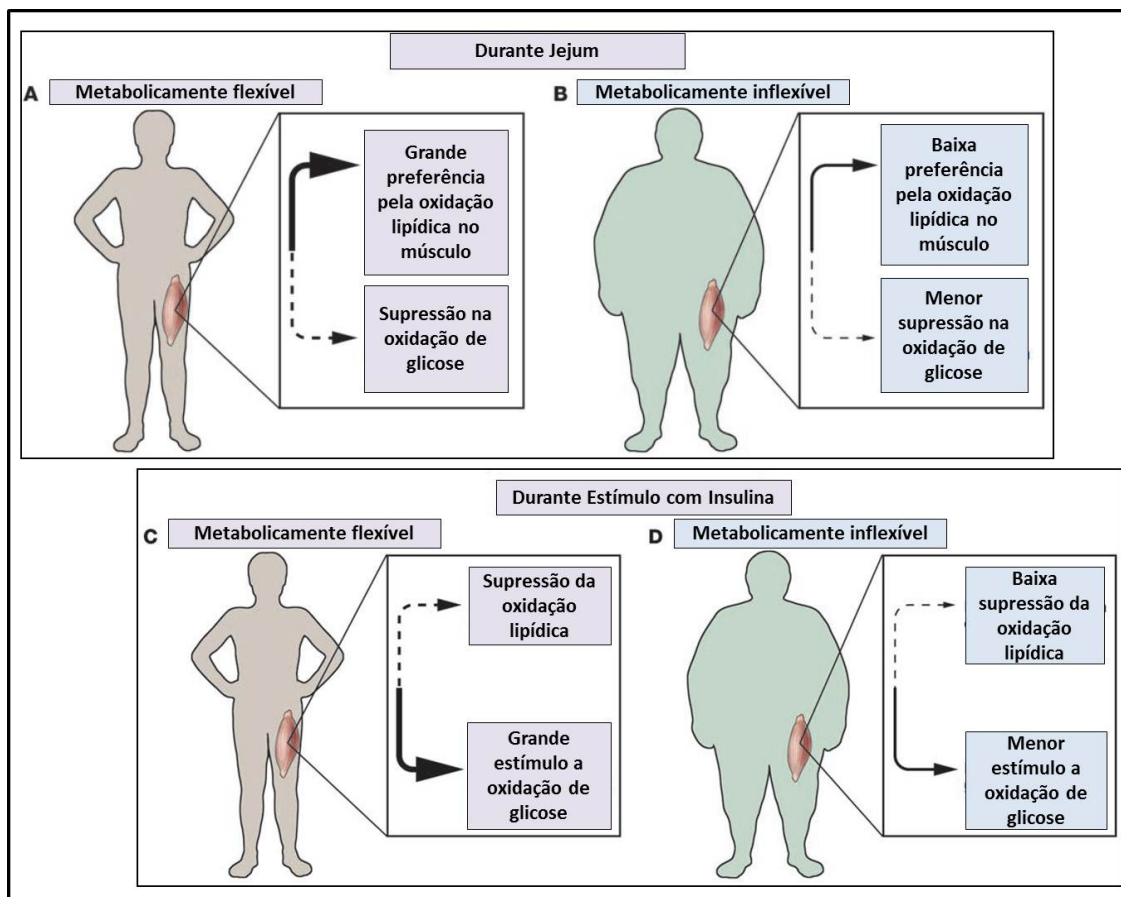


Figura 01: Obesidade e inflexibilidade metabólica. Estão representadas as diferenças nos padrões de metabolização de glicose e ácidos graxos pelo músculo esquelético durante o jejum ou estado pós-absortivo (**Quadro superior**) e durante estímulo insulínico ou estado pós-prandial (**Quadro inferior**). **A e C:** indivíduo metabolicamente flexível. **B e D:** indivíduo metabolicamente inflexível. Indivíduos metabolicamente flexíveis apresentam oxidação preferencial de ácidos graxos durante o jejum. Nestes indivíduos, o estímulo insulínico suprime a oxidação de ácidos graxos e induz oxidação preferencial de glicose. Indivíduos metabolicamente inflexíveis transitam de maneira ineficiente entre a oxidação destes substratos nestas situações. Adaptado de KELLEY *et al.*, 2005.

1.2. Obesidade, metabolismo oxidativo e a via AMPK/PGC-1 α

Redução da capacidade oxidativa no músculo esquelético e no tecido adiposo é observação comum na obesidade e na resistência à insulina (KIM *et al.*, 2000; THYFAULT *et al.*, 2004; SUTHERLAND *et al.*, 2009; CHOO *et al.*, 2006; VALERIO *et al.*, 2006). Este fenômeno é devido, em parte, à redução na expressão e na atividade de importantes enzimas mitocondriais (PELUSO e

MARGARUCCI *et al.*, 2002; KELLEY *et al.*, 2002; WACKERHAGE , 2006; WACKERHAGE e WOODS, 2002). De modo interessante, agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR)- γ são hábeis em induzir biogênese mitocondrial no tecido adiposo e músculo esquelético, melhorando a capacidade oxidativa destes indivíduos (CHOO *et al.*, 2006). Este efeito é associado com expressão aumentada do coativador 1 α do PPAR- γ (PGC-1 α) (WILSON-FRITCH *et al.*, 2004; HANDSCHIN e SPIEGELMAN, 2008), o qual está atrelado a diversas alterações metabólicas características da obesidade (Figura 02) (SHULDINER e MCLLENITHAN, 2004). De fato, foi demonstrado que ocorre redução na expressão de PGC-1 α em tecidos de indivíduos resistentes à insulina, e que o aumento na expressão desta proteína no tecido adiposo promove melhora na sensibilidade à insulina do organismo (HAMMARSTEDT *et al.*, 2003).

O PGC-1 α é membro de uma família de co-fatores de transcrição que desempenham papel central na regulação do metabolismo celular. É capaz de modificar o fenótipo do músculo esquelético, tornando-o mais oxidativo e menos glicolítico (LIANG *et al.*, 2006), bem como do tecido adiposo branco (TAB), induzindo características metabólicas similares as do tecido adiposo marrom (TAM) (SUTHERLAND *et al.*, 2009). De fato, PGC-1 α foi originalmente descoberto como regulador da termogênese adaptativa em resposta a exposição ao frio, evidenciando sua importante função no metabolismo do TAM (CANNIN e NEDERGAARD, 2004). O PGC-1 α é também importante regulador da biogênese mitocondrial no tecido adiposo e no músculo esquelético (LIANG *et al.*, 2006). Sua atividade é mediada pela interação com os fatores de transcrição NRF 1 e 2 (fatores respiratórios nucleares 1 e 2) e pela expressão de Tfam (fator de transcrição mitocondrial). Estes fatores estão envolvidos na regulação coordenada da expressão de genes codificados no DNA nuclear e mitocondrial respectivamente (SCARPULLA, 2008; WU *et al.*, 1999; SCARPULLA, 1997; PARISI e CLAYTON, 1991; SHORT *et al.*, 2003). Assim, quando expresso, o PGC-1 α eleva a expressão de proteínas da cadeia respiratória e de enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético e tecido adiposo (TIRABY *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2001).

Adicionalmente, existe interação entre a atividade da proteína quinase dependente de AMP (AMPK) e a ativação de PGC-1 α . Por exemplo, foi demonstrado que o AICAR, um ativador da AMPK, aumenta a expressão de PGC-1 α e a biogênese mitocondrial em músculo de roedores (LEE *et al.*, 2006). A AMPK é uma quinase serina/treonina com função crucial na homeostase energética (STEINBERG e KEMP, 2009). De fato, a sinalização mediada por AMPK estimula vias de produção de energia, incluindo o catabolismo de glicose e lipídeos, ao passo que inibe vias consumidoras de energia, incluindo a síntese de lipídeos e colesterol (LAGE *et al.*, 2008). Foi observado que distúrbios na sinalização mediada por AMPK também se correlacionam com o desenvolvimento de resistência à insulina, redução na oxidação de lipídeos e elevação no conteúdo de diacilglicerol no músculo esquelético (STEINBERG *et al.*, 2006; STEINBERG e KEMP, 2009). O mecanismo de interação entre AMPK e PGC-1 α não encontra-se totalmente estabelecido, mas as evidências demonstram que a AMPK fosforila PGC-1 α , bem como regula a transcrição de seu gene (JAGER *et al.*, 2007; WACKERHAGE, 2006).

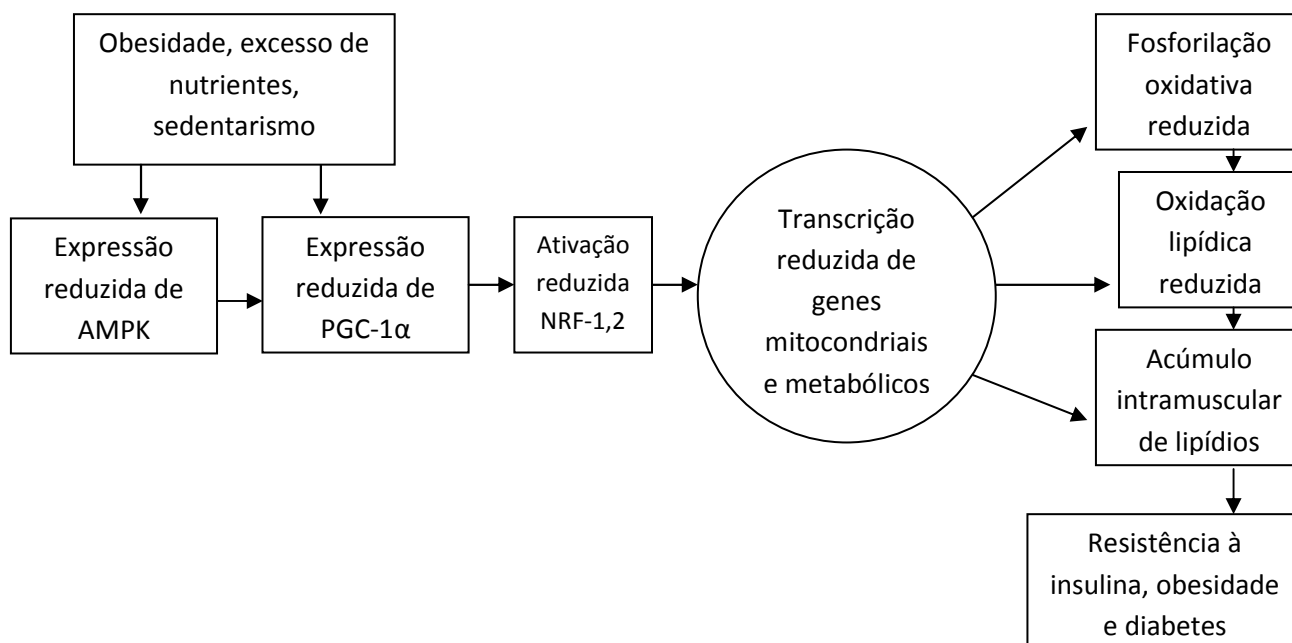


Figura 02: Redução na expressão da proteína quinase dependente de AMP (AMPK), do co-ativador-1 α dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PGC-1 α), e relação com o desenvolvimento do fenótipo metabólico observado na resistência à insulina e na obesidade. Adaptado de LIANG, 2006.

1.3. Ácidos graxos livres, armazenamento ectópico de lipídeos e resistência à insulina (Interação metabólica entre substratos).

A obesidade é comumente acompanhada de elevação nas concentrações plasmáticas de AGL, o que representa fator associado ao desenvolvimento de resistência à insulina em tecidos periféricos (BODEN *et al.*, 1997; BODEN *et al.*, 2001). De fato, os AGL são considerados importantes moduladores do metabolismo da glicose e da sensibilidade à insulina (Figura 03) (DRESNER *et al.*, 1999; RANDLE, 1998; RANDLE, 1994; BODEN *et al.*, 1994). Por exemplo, KELLEY *et al.*, (1993) demonstraram que, durante estímulo com insulina, a manutenção experimental das concentrações de jejum de ácidos graxos é suficiente para reduzir a captação e a oxidação de glicose estimulada por este hormônio. Em consonância, tanto estudos epidemiológicos como experimentais apontam relação dos AGL com a etiologia da síndrome metabólica (VAN AMELSVOORT *et al.*, 1986; RANDLE *et al.*, 1963; KRAEGER *et al.*, 1991).

A interação entre o metabolismo de glicose e ácidos graxos tem sido amplamente investigada desde a demonstração feita por Randle de que concentrações elevadas deste substrato reduzem a oxidação da glicose (RANDLE *et al.*, 1963). O mecanismo proposto pelo autor para a explicação deste fenômeno foi denominado Ciclo de Randle, ou ciclo da glicose-ácido graxo, e os pontos-chave desta hipótese são encadeados da seguinte maneira: o aumento na disponibilidade de AGL ao tecido induz a beta oxidação (β -oxidação) deste substrato, com conseqüente aumento da produção de acetil-CoA. O acúmulo de acetil-CoA leva a inibição da enzima piruvato desidrogenase (PDH), mediada pela ação da enzima piruvato desidrogenase kinase, com conseqüente redução da oxidação do piruvato. Concomitantemente, ocorre aumento de citrato e ATP, os quais inibem a fosfofrutoquinase (PFK), resultando em acúmulo da glicose-6-fosfato (G-6-P), que pode ser direcionada para outras vias metabólicas. Por fim, a G6P pode

inibir a atividade da hexoquinase (HK), com redução da fosforilação e da captação de glicose (HIRABARA *et al.*, 2003; RASMUSSEN e WOLFE, 1999).

Adicionalmente, os ácidos graxos podem também interferir na via de sinalização insulínica no ME, fígado e tecido adiposo (HIRABARA *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2006; SENN, 2006). Uma revisão sobre a via de sinalização insulínica é apresentada no anexo 01. De fato, estudos recentes evidenciaram que os AG inibem a captação de glicose estimulada pela insulina, e foi observado que levam a redução na ativação de proteínas envolvidas na sinalização insulínica como, por exemplo, o receptor da insulina (IR), o substrato para o receptor da insulina (IRS), a fosfatidil inositol 3-quinase (PI-3K) e a proteína quinase B (PKB). Estes efeitos conseqüentemente diminuem a captação, oxidação e armazenamento de glicose (DRESNER *et al.*, 1999). A regulação de tal fenômeno é dependente de vários fatores, incluindo o tipo de AG predominante e tempo de exposição à molécula (HIRABARA *et al.*, 2007). Por exemplo, os ácidos graxos saturados (como o ácido palmítico) podem induzir resistência à insulina em vários tipos celulares (RODEN, 2004). De fato, EPPS-FUNG (1997) demonstrou que a exposição de adipócitos de ratos a ácidos graxos saturados e de cadeia longa, por período de 4h, resulta em insensibilidade à insulina devido a comprometimento da ativação do GLUT4. Estes dados são corroborados por experimentos onde a ingestão aumentada de AGL desencadeou resistência à insulina em adipócitos, músculo esquelético e fígado (VAN AMELSVOORT *et al.*, 1986; KRAEGEN *et al.*, 1991).

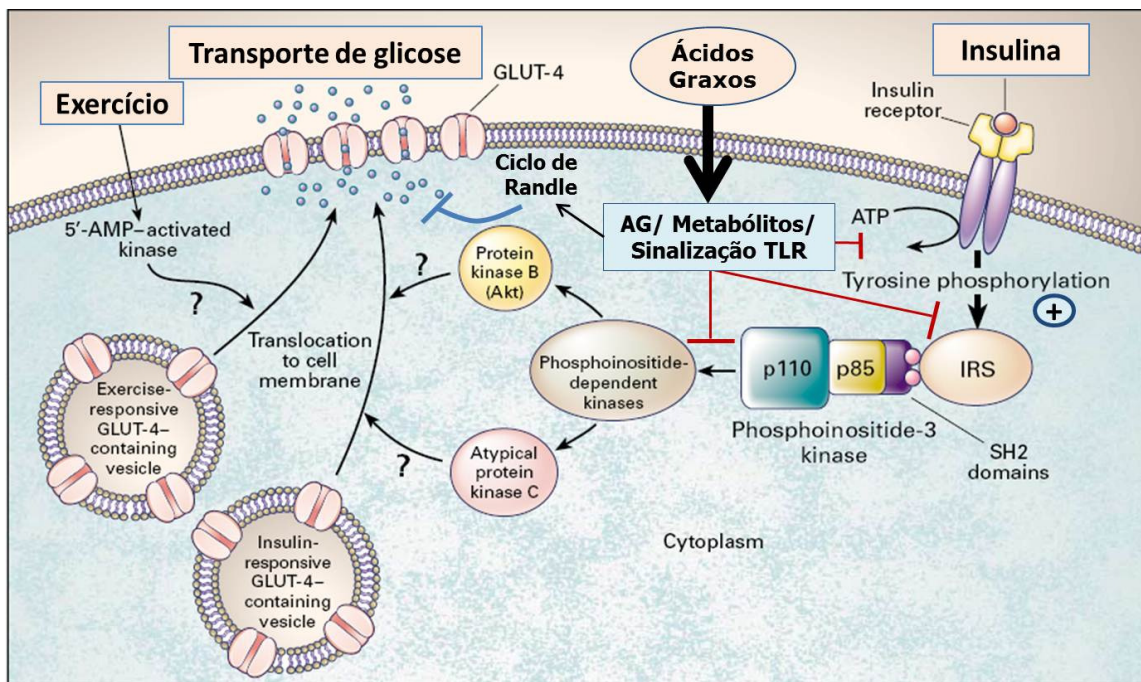


Figura 03: Efeitos dos AG sobre o metabolismo de glicose estimulado por insulina. Estão representados os efeitos mediados pelo ciclo de Randle, e pela modulação da sinalização insulínica. AG: Ácidos Graxos, GLUT-4: Transportador de glicose isoforma 4, TLR: Receptores Toll-Like. O papel do exercício e dos receptores Toll-Like são abordados adiante no texto. Adaptado de SHEPHERD e KHAN, 1999.

É importante notar que cenários similares podem ser observados se os AGL forem derivados do plasma ou dos TAG intramusculares (TGIM) (BAYS *et al.*, 2004). De fato, fenômeno comum na obesidade é o acúmulo ectópico de triacilgliceróis em tecidos periféricos, provavelmente consequência da expansibilidade limitada dos adipócitos que, uma vez atingida, promove fluxo excessivo de AGL aos tecidos periféricos (Figura 04) (BAYS *et al.*, 2004). Corrobora esta hipótese o fato de que animais com adipogênese transgênicamente comprometida apresentam significativa infiltração de lipídeos no fígado e músculo esquelético, e o transplantes de tecido adiposo para estes animais atenua de maneira importante este quadro (GAVRILOVA *et al.*, 2000). De modo interessante, camundongos que não expressam colágeno VI, importante componente da matriz extracelular do tecido adiposo, tem menor limitação da expansibilidade dos adipócitos, e tornam-se imunes a diversos distúrbios metabólicos quando submetidos a dieta de alto teor lipídico, não desenvolvendo, por exemplo, acúmulo hepático de lipídeos (KHAN *et al.*,

2009). O acúmulo de lipídeos no fígado e no músculo esquelético agrava o estado de resistência à insulina (CORCORAN *et al.*, 2007; PERSEGHIN *et al.*, 1999) e promove a atividade de vias inflamatórias, como o recrutamento e ativação de células imunitárias (macrófagos/células de Kupffer) (HUMMASTI e HOTAMISGIL, 2010). Adicionalmente, o conteúdo de TGIM é melhor preditor de resistência à insulina que a adiposidade visceral (GOODPASTER *et al.*, 1997), e as necessidades de insulina requeridas para o tratamento de diabéticos tipo II tem alta correlação com o conteúdo intra-hepático de lipídeos (RYYSY *et al.*, 2000). Os triacilgliceróis no músculo esquelético e no fígado estão em constante *turnover*, sendo que metabólitos derivados de sua lipólise (ex. diacilglicerol, ceramidas) parecem ser reponsáveis pelo comprometimento da sensibilidade à insulina nesta situação (BAYS *et al.*, 2004).

Por outro lado, atletas de endurance apresentam elevado conteúdo de TGIM (GOODPASTER *et al.*, 2001), e não desenvolvem resistência à insulina. Aparentemente, nestes indivíduos, o TGIM representa uma reserva para elevadas taxas de oxidação, o que é corroborado pelo fato de que as gotas de lipídios intramusculares estão localizadas circundando mitocôndrias (MARTIN, 1996; ABERNETHY *et al.*, 1990). Já em indivíduos diabéticos tipo II, estas gotas distribuem-se de maneira mais difusa pela célula muscular (KELLEY *et al.*, 2002). De fato, o acúmulo de TGIM associa-se a resistência à insulina quando acompanhado de uma baixa capacidade oxidativa de lipídeos neste tecido (KELLEY 2005).

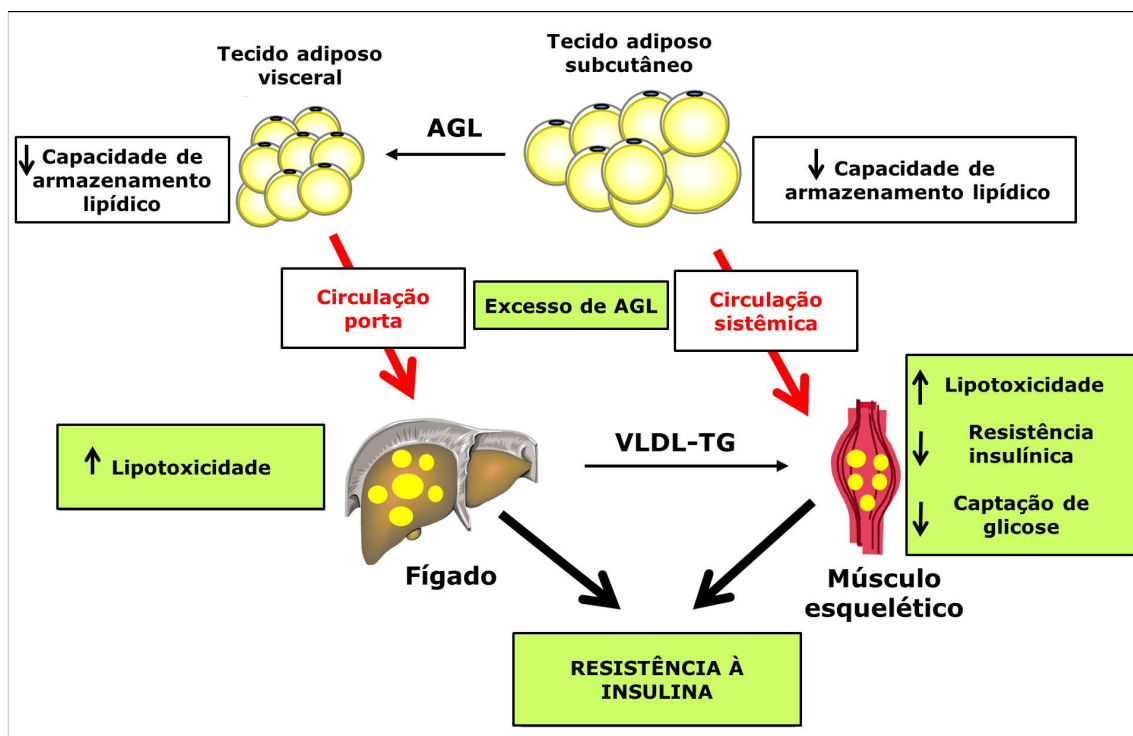


Figura 04: Expansibilidade de adipócitos, ácidos graxos livres e armazenamento ectópico de lipídeos. O comprometimento na capacidade do tecido adiposo armazenar lipídeos gera fluxo aumentado de ácidos graxos, causando deposição ectópica de lipídeos no tecido adiposo visceral, fígado e músculo esquelético. Em consequência ocorre lipotoxicidade e comprometimento da sensibilidade à insulina. Adaptado de GALGANI *et al.*, 2008.

1.4. Mecanismos inflamatórios associados à obesidade e a resistência à insulina

O papel do componente inflamatório na fisiopatologia da obesidade vem ganhando destaque, principalmente no que diz respeito a seus efeitos sobre o metabolismo. De fato, a inflamação é outro mecanismo que relaciona o estilo de vida sedentário e a obesidade com o desenvolvimento de resistência à insulina, e também ao desenvolvimento de morbidades como aterosclerose, doenças neurodegenerativas e câncer (Figura 05) (HANDSCHIN e SPIEGELMAN, 2008).

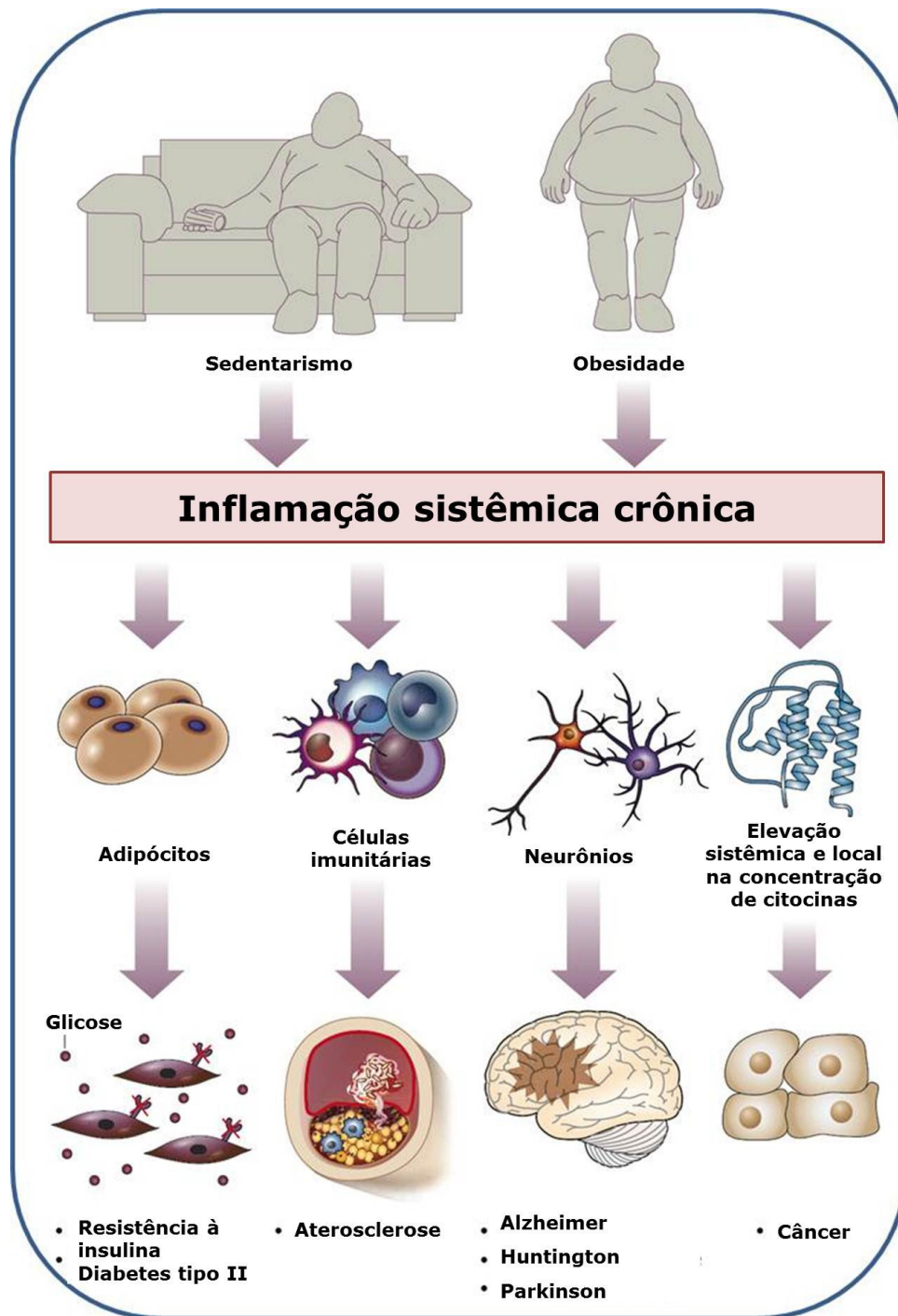


Figura 05: Inflamação crônica e morbidades associadas à obesidade. O sedentarismo e a obesidade ativam um quadro de inflamação crônica de baixo grau. Citocinas inflamatórias liberadas do tecido adiposo são associadas ao desenvolvimento de resistência à insulina, e diabetes tipo II. Respostas inflamatórias de células imunitárias e em tecido neuronal estão associadas à aterosclerose e doenças neurodegenerativas, respectivamente. A produção local e sistêmica de citocinas também contribui com a etiologia de certos tipos de câncer. Adaptado de HANDSCHIN e SPIEGELMAN, 2008

O metabolismo energético e a inflamação estão intrinsecamente conectados, inclusive do ponto de vista evolutivo, e a área que investiga a interação entre os mesmos é denominada imunometabolismo (MATHIS, 2011). De modo interessante, verificou-se a existência de interação entre sistemas similares em organismos inferiores, como por exemplo, a *Drosophila melanogaster* (HOTAMISLIGIL, 2006). Neste organismo, um mesmo órgão (*fat body*) exerce funções de tecido adiposo, hepático e hematopoiético, e apresenta ainda funções homologas as da imunidade inata de mamíferos, produzindo peptídeos antimicrobianos. Em grande medida estas respostas são ativadas por vias de sinalização mediadas por receptores da família Toll Like (TLR) (ZHANG e LAURENCE, 2011). Em organismos superiores, apesar de o tecido adiposo, o fígado e o sistema imunitário serem diferenciados em unidades discretas, com funções significativamente especializadas, estes ainda mantêm diversas formas de conexões operacionais. Por exemplo, através de macrófagos infiltrados no tecido adiposo, de células de Kupffer no fígado, e de moléculas sinalizadoras circulantes (HOTAMISLIGIL, 2006). Ademais foi demonstrado, em mamíferos, presença de receptores da família TLR também em hepatócitos, adipócitos e no músculo esquelético (SEKI e BRENNER, 2008, SONG *et al.*, 2006; SENN, 2006). Foi observado ainda que alguns ácidos graxos, notadamente os saturados de cadeia longa, funcionam como ligantes para diversos receptores membros da família TLR, e que estes receptores ativam vias de sinalização inflamatórias cujos mediadores podem comprometer a sinalização insulínica (LEE *et al.*, 2003). Estes achados levaram a sugestão de que os receptores TLR atuariam como importante link entre ácidos graxos livres circulantes, inflamação e resistência à insulina na obesidade (ZEYDA e STULNIG, 2007). Especificamente no tecido adiposo e no músculo esquelético, a ativação mediada por ácidos graxos dos receptores TLR-2 e 4 desencadeia resistência à insulina modulando enzimas com atividade serina/treonina quinase (SONG *et al.*, 2006; SENN, 2006). Não obstante, a observação de que determinadas moléculas derivadas de patógenos também desencadeiam resistência à insulina foi entendida como um mecanismo adaptativo. Neste sentido, a resistência aguda à insulina, em situação de infecção, permitiria um “desvio” de substratos de tecidos periféricos para a atuação do sistema

imunitário no decurso da defesa, um processo de elevada demanda energética. De fato, para cada grau em que o mecanismo da febre eleva a temperatura corporal, ocorre uma elevação no consumo energético entre 7 e 13%, e na instalação da septicemia este valor pode aumentar em 30 a 60% (ROMANYUKHA *et al.*, 2006). Contudo, durante a obesidade, a ativação contínua de receptores TLR, mediada pelos elevados níveis de AGL, ativa vias inflamatórias desnecessárias, agravando o quadro crônico de resistência à insulina (ZHANG e LAURENCE, 2011).

1.5. Infiltração de células imunitárias no tecido adiposo

O tecido adiposo é reconhecido como órgão endócrino, produtor de diferentes moléculas com atuação periférica (ex. hormônios e citocinas), muitas das quais apresentam também importante ação inflamatória (GALICA *et al.*, 2010; PERSEGHIN *et al.*, 2003; AJUWON e SPURLOK, 2005; GHANIM *et al.*, 2004; JOVE *et al.*, 2005). Adicionalmente, o perfil de secreção de citocinas é o resultado da atividade de diferentes células presentes neste tecido. Por exemplo, em humanos em situação de repouso, aproximadamente 30% da interleucina 6 (IL-6) circulante é oriunda do tecido adiposo (MOHAMED-ALI, 1997), mas apenas 10% deste total pode ser atribuído aos adipócitos. O restante é produto principalmente de macrófagos infiltrados neste tecido (FRIED, 1998). De fato, a infiltração de células imunitárias é fator que contribui com a resistência à insulina nos diferentes tecidos onde ocorre hipertrofia de tecido adiposo (Figura 06), e é um fenômeno observado tanto em humanos como em roedores obesos (OUCHI *et al.*, 2011; CLEMENT e LANGING, 2007; WEISBERG *et al.*, 2003). Contribuem para este processo a ativação de receptores TLR por AGL, a hipóxia tecidual (uma vez que a angiogênese não acompanha, em proporção, a hipertrofia dos adipócitos), o estresse metabólico (ex. estresse oxidativo/estresse do retículo endoplasmático) e a morte de adipócitos (HOTAMISLIGIL, 2010; ZHOU *et al.*, 2010).

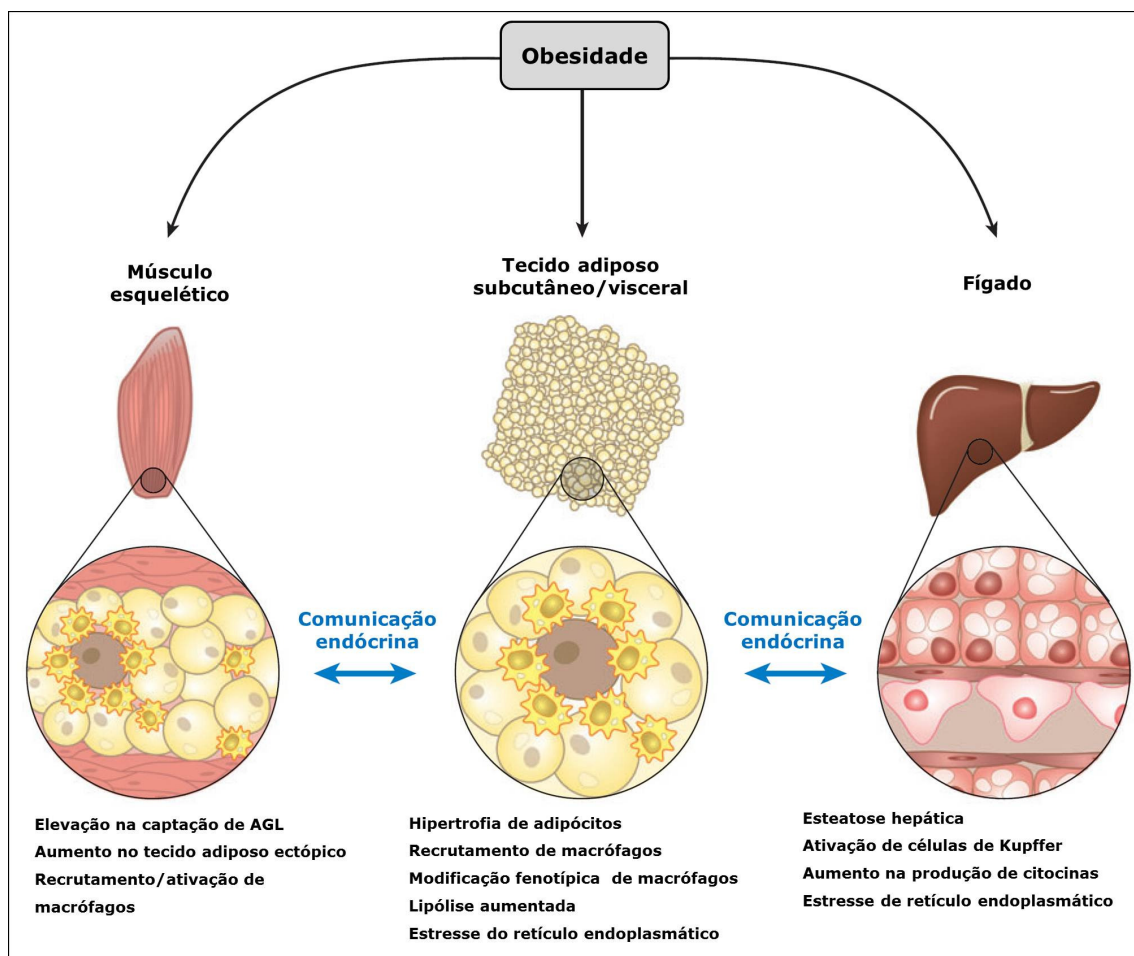


Figura 06: Hipertrofia do tecido adiposo subcutâneo e acúmulo ectópico de lipídeos associados à infiltração de macrófagos. Uma vez infiltradas, estas células contribuem com a produção aumentada de citocinas inflamatórias e com o comprometimento da sensibilidade à insulina. Adaptado de OLEFSKY e GLASS, 2010.

A resistência à insulina relacionada à infiltração de macrófagos no tecido adiposo não depende apenas da quantidade, mas também do estado de ativação destas células. Neste sentido, a literatura caracteriza dois extremos fenotípicos de macrófagos, conhecidos como macrófagos classicamente ativados, ou células M1, e macrófagos alternativamente ativados, ou células M2 (WISNEWSKY *et al.*, 2009). Estes estados de ativação são o reflexo da ação de diferentes vias de sinalização intracelulares, as quais modulam o padrão de expressão gênica e, conseqüentemente, o padrão de produção de citocinas. Resumidamente, o estado de ativação M1, caracterizado por ações pró-inflamatórias, é mantido por fatores de transcrição como o NF- κ B (fator nuclear κ B) e AP1 (proteína ativadora 1), e o estado de ativação M2,

caracterizado por ações anti-inflamatórias, é mantido por fatores de transcrição como STAT6 (transdutor de sinal e ativador da transcrição 6) e PPARs (receptores ativados por proliferadores de peroxissomos) (OLEFSKY e GLASS, 2010). A ativação de tais fatores é dependente de sinais oriundos do microambiente onde a célula está inserida, os quais são identificados por receptores de membrana, como por exemplo, os receptores TLR (GLASS 2009). De modo interessante (e contra intuitivo), foi demonstrado que macrófagos infiltrados no tecido adiposo de humanos obesos são primariamente caracterizados por um fenótipo M2 (ZEYDA *et al.*, 2007). Estas células são comumente identificadas por um conjunto de fatores, que incluem a expressão de marcadores de superfície como MR (receptor para manose), CD163 e integrina $\alpha\beta 5$, alta atividade endocítica e produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (Interleucina 10) e IL-1Ra (antagonista do receptor de interleucina 1 β). Contudo, os macrófagos M2 presentes no tecido adiposo de humanos obesos apresentam comportamento muito peculiar, pois também secretam grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias (ZEYDA *et al.*, 2007). Estas células apresentam ainda alta expressão de receptores *scavenger*, e elevada atividade endocítica, o que sugere um papel dos macrófagos do tecido adiposo na captação de lipídeos e lipoproteínas, bem como de células apoptóticas (FEBBRAIO *et al.*, 2001). Estas informações corroboram o papel de macrófagos M2 no desenvolvimento da aterosclerose (VAN TITS *et al.*, 2011), e dão suporte a teoria de que seu recrutamento ao tecido adiposo está associado com a presença de adipócitos mortos, os quais precisariam ser removidos (CINTI *et al.*, 2005).

Adicionalmente, ocorre modulação quantitativa e qualitativa em outros tipos celulares no tecido adiposo de indivíduos obesos. Por exemplo, os linfócitos T CD4⁺, que podem ser subdivididos em células com ação potencialmente pró-inflamatórias (TH1) ou potencialmente anti-inflamatórias (TH2), e ainda com ação reguladora (Treg ou Foxp3⁺) estão presentes em diferentes proporções no tecido adiposo hipertrofiado (Figura 07) (NISHIMURA *et al* 2009; WINER *et al* 2009; FEUERER *et al*, 2009). Por exemplo, Winer *et al*, (2009) mostraram que tanto em modelo de obesidade animal induzida por dieta quanto em humanos obesos, a razão de células T CD4⁺ TH1:TH2 e

TH1:Foxp3⁺ encontra-se aumentada. Estas células estão em constante interação e podem modular suas funções de maneira recíproca. Enquanto células TH1 ativam macrófagos M1, as células TH2 e as células T reguladoras os diferenciam em macrófagos M2. Outros estudos observaram também elevada concentração de linfócitos T CD8⁺ no tecido adiposo de animais obesos, e demonstraram que estas células secretam fatores humorais envolvidos na migração e ativação de macrófagos (NISHIMURA *et al.*, 2009). De modo interessante, a depleção de células T CD8⁺ com anticorpos anti-CD8 foi capaz de reduzir a infiltração de macrófagos no tecido. Notadamente, estes estudos fornecem evidências importantes de que rearranjos específicos nos receptores de células T (TCR) são selecionados no tecido adiposo, sugerindo que antígenos neste tecido podem se comunicar com o sistema imunitário adaptativo.

A importância da infiltração de células imunitárias na fisiopatologia da obesidade é evidenciada pela demonstração de que o bloqueio deste processo causa redução dramática da expressão de genes próinflamatórios no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Adicionalmente, esta intervenção previne o desenvolvimento de resistência à insulina, mesmo quando animais são submetidos à dieta de alto teor lipídico que desencadeie hiperadiposidade, esteatose hepática e elevado conteúdo intramuscular de triacilgliceróis (GLASS, 2009).

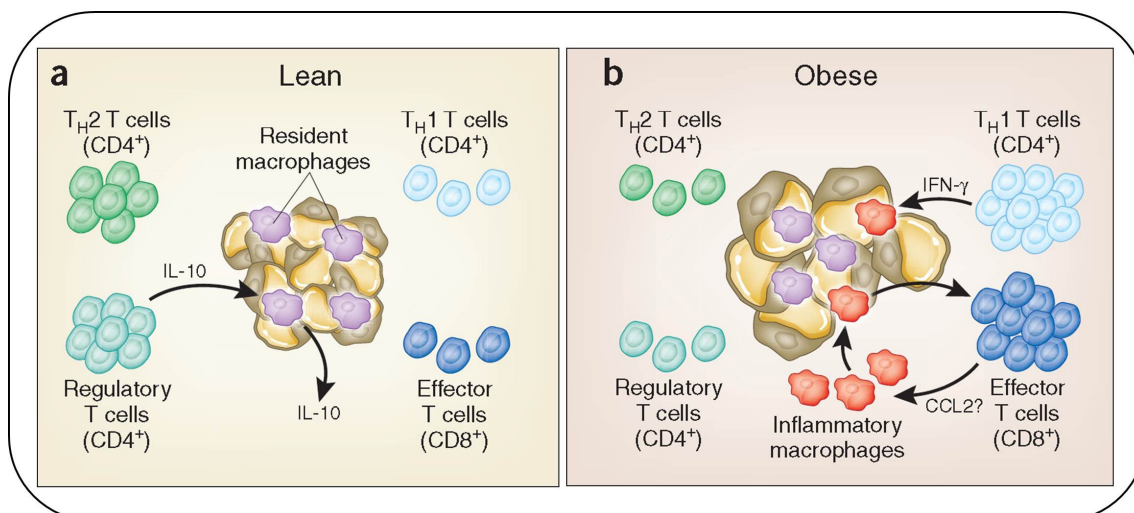


Figura 07: Características fenotípicas de células imunitárias infiltradas no tecido adiposo. (a) No tecido adiposo de indivíduos magros predominam células T com polarização CD4⁺ (Treg e TH2). Estas células são capazes de secretar IL-10, e estimular produção de IL-10 por macrófagos, atenuando a inflamação e melhorando a sensibilidade à insulina. (b) No tecido adiposo de indivíduos obesos predominam células T com polarização CD8⁺, e as células CD4⁺ são principalmente do subtipo TH1. Esta mudança fenotípica parece preceder e regular o influxo de macrófagos ao tecido adiposo. Adaptado de LUMENG et al., 2009.

1.6. Papel da via AMPK/PGC-1 α na inflamação

Reforçando a importância da integração entre o metabolismo e a inflamação, foi observado que via de sinalização AMPK/PGC1 α também esta associada com regulação de vias de inflamatórias tipicamente observadas na obesidade (Figura 08) (GAUTHIER *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2010; SALMINEN *et al.*, 2011). Por exemplo, demonstrou-se que a ativação da AMPK através do AICAR inibe o quadro inflamatório em diferentes doenças crônicas (BAI *et al.*, 2010; NATH *et al.*, 2005; MYERBURG *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2008), e que a ativação de AMPK inibe a ação inflamatória mediada por ácido palmítico em células endoteliais (CACICEDO *et al.*, 2004). A principal isoforma do AMPK no tecido adiposo é a α 1 (YANG *et al.*, 2010), e seus efeitos anti-inflamatórios são desencadeados por diferentes mediadores, como por exemplo, o PGC-1 α (KIM *et al.*, 2007; PALOMER *et al.*, 2009), a SIRT1 (sirtuina), a p53 (proteína de peso molecular 53 kDa) e o Forkhead box O (FoxO) (SALMINEN *et al.*, 2011), os quais inibem a ação do fator nuclear κ B (NF- κ B). De fato, Kim *et al.*, (2007)

demonstraram que o aumento na expressão de PGC-1 α bloqueia a atividade de NF- κ B, e a resposta inflamatória induzida por TNF- α , no músculo liso de aorta e em células endoteliais humanas. O mecanismo anti-inflamatório desta via não está completamente estabelecido, mas evidências demonstram que PGC-1 α é capaz de ligar-se subunidade p50 e p65 do NF- κ B (ALVAREZ-GUARDIA *et al.*, 2010; MORARI *et al.*, 2010), sugerindo que a interação molecular destes mediadores represente um mecanismo de integração imunometabólica.

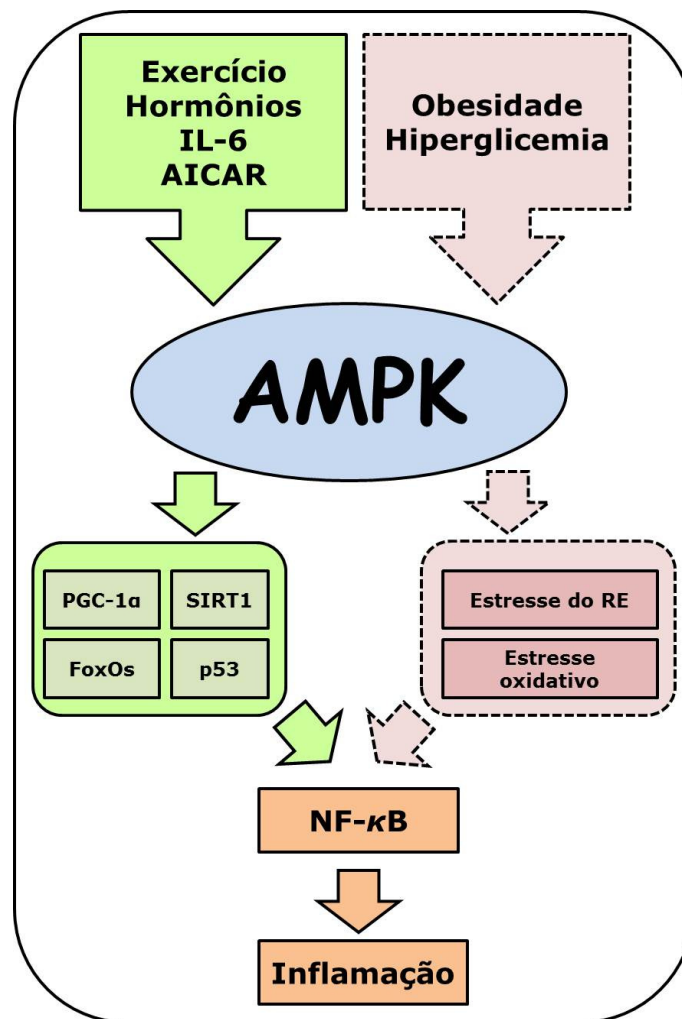


Figura 08: Inibição do NF- κ B mediada por AMPK. O exercício, diversos hormônios, e alguns fármacos ativam AMPK. Em contraposição, obesidade e hiperglicemia inibem a expressão de AMPK. AMPK estimula diversos mediadores como PGC-1 α , SIRT1, p53 e FoxO, os quais inibem a sinalização pela via do NF- κ B através de diferentes mecanismos. AMPK previne o desenvolvimento do estresse do retículo endoplasmático e do estresse oxidativo, os quais poderiam ativar a sinalização do NF- κ B. Adaptado de SALMINEN *et al.*, 2011.

1.7 Exercício e flexibilidade metabólica

A prática de atividade física é reconhecida como importante ferramenta terapêutica no tratamento e prevenção da obesidade e do diabetes mellitus tipo 2 (ACSM, 2001; ADA, 2003; PERES *et al.*, 2005). A contribuição do exercício na manutenção da flexibilidade metabólica esta na dependência de fatores como o tipo, volume e intensidade da atividade realizada (HOROWITZ *et al.* 2000 ; SPRIET, 2003; TURCOTTE *et al.*, 1992). Neste sentido, importante efeito do exercício aeróbio é a elevação da capacidade oxidativa no músculo esquelético (HOROWITZ *et al.* 2000; SPRIET, 2003; SPRIET *et al.*, 2002; TURCOTTE *et al.*, 1992; TURCOTTE *et al.*, 1999; BAAR, 2004; HOLLOSZY e COYLE, 1984) e também no tecido adiposo (SUTHERLAND *et al.*, 2009), o que é acompanhado de importante redução na massa de tecido adiposo e no tamanho dos adipócitos. Nestes tecidos o exercício promove também melhora na sensibilidade à insulina, regulando diretamente as vias de sinalização ativadas por este hormônio (ARNER *et al.*, 1995; CHRISTY *et al.*, 2002; CRAIG *et al.*, 1981; CRAIG *et al.*, 1983). Adicionalmente, o exercício aeróbio apresenta diversos efeitos antiinflamatórios, modulando a síntese de citocinas em diferentes tipos celulares, bem como a migração e o fenótipo de células imunitárias infiltradas no tecido adiposo (PEDERSEN e PETERSEN, 2005; KAWANISHI *et al.*, 2010). Os mecanismos envolvidos na adaptação ao exercício são complexos, e envolvem a regulação de ampla variedade de vias de sinalização em diferentes tecidos. Por exemplo, a calcineurina, a CaMK (proteína kinase dependente de cálcio/calmodulina), a MAPK (proteína kinase ativada por mitógeno), a PKC (proteína kinase C), o NF-kB (fator nuclear kappa B), o IRS (substrato para o receptor de insulina), a AMPK (proteína quinase dependente de AMP), o PGC-1 α (coativador 1 α dos receptores ativador por proliferadores de peroxissomos), dentre outras (WACKERHAGE e WOODS, 2002; WACKERHAGE, 2006).

1.8. Efeitos do exercício sobre a capacidade oxidativa

Os efeitos do exercício sobre a capacidade oxidativa são decorrentes de ampla gama de adaptações fisiológicas sistêmicas e localizadas (SPRIET, 2002; HELGE *et al.*, 1999; GALBO, *et al.*, 1996). Por exemplo, foi demonstrado que o treinamento aeróbio é capaz de aumentar o leito vascular através do aumento no número de pequenas arteríolas (angiogênese) e do diâmetro dos grandes vasos (WATERS *et al.*, 2004; DESCHENES e OGILVIE, 1999; WHITE *et al.*, 1998), o que amplia de maneira importante a função de entrega de O₂ e substratos aos tecidos periféricos (KRAUS *et al.*, 2004; HAAS, 2002). De fato, a contração muscular cria potente estímulo para o remodelamento estrutural da vasculatura (PRIOR *et al.*, 2004) elevando a concentração de mRNA para o VEGF (fator de crescimento endotelial) (LHOYD *et al.*, 2003), e aumento da atividade mitótica das células endoteliais (DESCHENES e OGILVIE, 1999). Adicionalmente, o exercício modula os mecanismos de transporte pela membrana plasmática, bem como pela membrana mitocondrial da célula muscular. Neste sentido, ocorre elevação na expressão de proteínas como a FABP_{pm} (proteína ligante de AG da membrana plasmática), FAT/CD36 (translocase de AG) e FATP (proteína transportadora de ácidos graxos) em consequência de estimulação elétrica crônica ou treinamento aeróbio (CLARKE *et al.*, 2004; RASMUSSEN *et al.*, 1999; KIENS *et al.*, 1997, TURCOTTE *et al.*, 1992, TURCOTTE *et al.*, 1999). Estas adaptações localizadas promovem modificações sistêmicas nas concentrações de metabólitos. Por exemplo, IBRAHIMI *et al.*, 1999 mostrou que a expressão aumentada de FAT/CD36 foi hábil em reduzir as concentrações plasmáticas de triacilgliceróis e AG de cadeia longa (AGCL), além de elevar a oxidação de palmitato no músculo esquelético de camundongos. De modo interessante, a proteína FAT/CD36 parece ser agudamente translocada de um “pool” intracelular para a membrana muscular durante a contração, de maneira similar ao que acontece com o transportador GLUT-4, sugerindo um mecanismo para aumento agudo na captação de ácidos graxos durante o exercício (BONEN *et al.*, 2000). Adicionalmente, o treinamento aeróbio promove aumento da atividade de enzimas mitocondriais (STALLKNECHT *et al.*, 1991). Por exemplo, demonstrou-se que a atividade do complexo carnitina palmitoil transferase

(CPT) eleva-se com o treinamento aeróbio (BOYADJIEV, 1996). O complexo CPT consiste nas enzimas carnitina palmitoil transferase 1 (CPT 1), acilcarnitina translocase e carnitina palmitoil transferase 2 (CPT II), e possui importante função no transporte de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) para dentro da matriz mitocondrial, para a ocorrência da β oxidação (SPRIET, 2002).

O exercício estimula ainda a biogênese mitocondrial no músculo esquelético e no tecido adiposo, elevando a capacidade destes tecidos oxidarem ácidos graxos (TONKONOGLI *et al.*, 2002; SUTHERLAND *et al.*, 2009). A ativação deste processo esta na dependência de diversas vias regulatórias da expressão gênica, com notável atenção para a atividade da via AMPK/PGC-1 α . De fato, o exercício é potente ativador da via AMPK/PGC-1 α em diferentes tecidos incluindo o músculo esquelético, o tecido adiposo e também fígado e coração (RUDERMAN., 2009). Este efeito é mediado, em grande medida, pelas concentrações de catecolaminas circulantes, e no músculo esquelético as concentrações citoplasmáticas de AMP também exercem efeito importante (Figura 09) (HARDIE, 2004; WU *et al.*, 2002; SUTHERLAND *et al.*, 2009). De fato, foi demonstrado que agonistas β adrenérgicos podem elevar a expressão do mRNA para PGC-1 α em hepatócitos (DING *et al.*, 2006), no tecido adiposo marrom (PUIGSERVER *et al.*, 1998), no músculo esquelético (MIURA *et al.*, 2007), e no tecido adiposo branco (SUTHERLAND *et al.*, 2009). De modo interessante, SUTHERLAND *et al.*, (2009) observaram que o tratamento de ratos com propranolol (β -bloqueador não específico), causou redução parcial (40%) na expressão do mRNA de PGC-1 α induzida pelo exercício no tecido adiposo, confirmando que as concentrações de catecolamina circulantes eram mediadores de parte do efeito do exercício sobre esta via. Não obstante, outros fatores circulantes marcadamente elevados durante o exercício, como a IL-6 (abordada adiante), podem levar a ativação da AMPK (KELLY *et al.*, 2004; JAGER *et al.*, 2007).

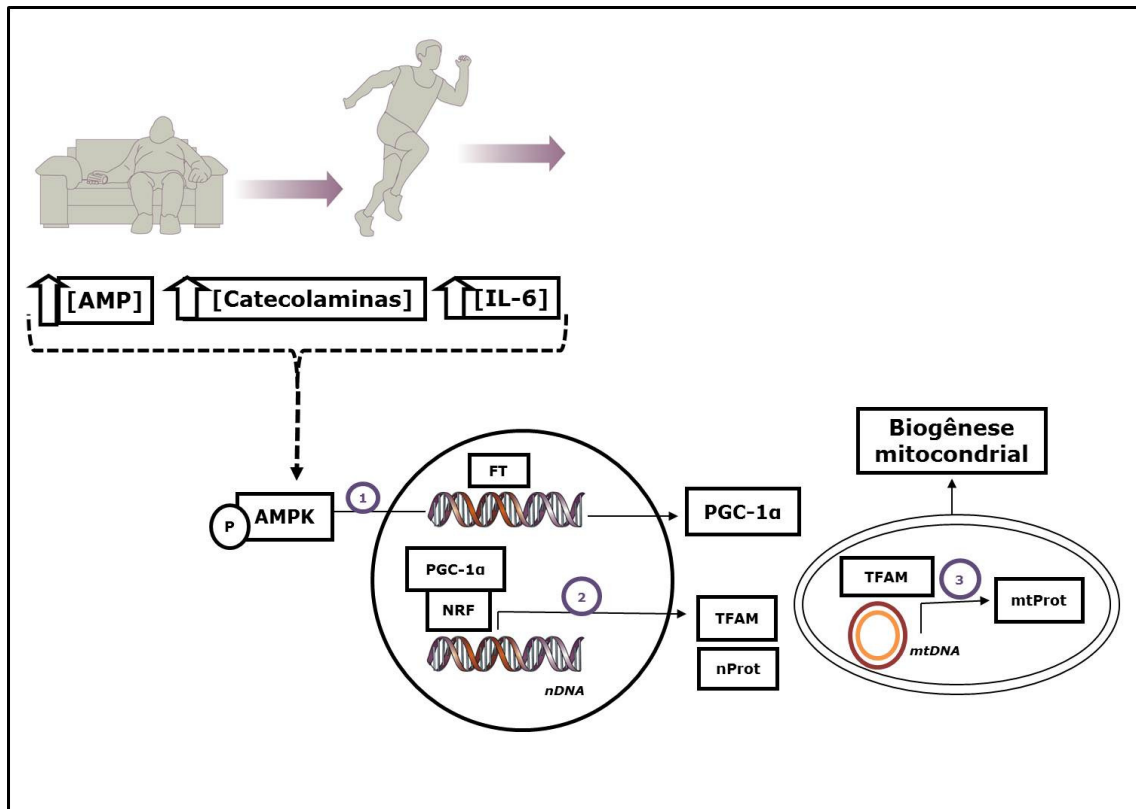


Figura 09: Papel da AMPK e PGC-1 α na biogênese mitocondrial induzida pelo exercício. (1) O aumento no *turnover* energético causado pelo exercício eleva as concentrações intracelulares de AMP, e às de catecolaminas e IL-6 circulantes. Estes fatores induzem fosforilação e ativação da AMPK pela quinase LKB-1 (não mostrada). Uma vez ativada, AMPK modula a expressão gênica do co-fator PGC-1 α . (2) PGC-1 α liga-se ao fator de transcrição NRF, (e a outros não mostrados), aumentando a expressão de TFAM e de proteínas mitocondriais codificadas no DNA nuclear. (3) TFAM migra para a mitocôndria onde modula a expressão de proteínas mitocondriais codificadas no DNA mitocondrial. AMP: Adenosina monofosfato; IL-6: Interleucina 6; AMPK: Proteína quinase dependente de AMP; FT: Fator de transcrição; PGC-1 α : Coativador 1 α dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomos; NRF: Fator respiratório nuclear; nDNA: Ácido desoxirribonucleico nuclear; TFAM: Fator de transcrição mitocondrial; nProt: Proteínas mitocondriais codificadas no DNA nuclear; mtDNA: Ácido desoriribonucleico mitocondrial; mtProt: Proteínas mitocondriais codificadas no DNA mitocondrial. Adaptado de WACKERHAGE (2006).

1.9. Efeitos do exercício sobre as vias de sinalização da insulina

O exercício aeróbio promove melhora na sensibilidade à insulina no músculo esquelético e em adipócitos (CHRISTY *et al.*, 2002). Este efeito é mediado por modificações sistêmicas nas concentrações de metabólitos circulantes, bem como por modificações locais, como por exemplo, alterações nos fosfolípídeos de membrana (GALBO *et al.*, 1996; HELGE *et al.*, 1999; ANDERSSON *et al.*, 1998), e na atividade e expressão de proteínas envolvidas na sinalização insulínica (Figura 10) (JESSEN *et al.*, 2003; CHRISTY *et al.*, 2002; EZAKI *et al.*, 1992). De fato, foi demonstrado que o treinamento físico de animais saudáveis potencializa etapas críticas da cascata de sinalização insulínica, incluindo aumento da expressão protéica e da funcionalidade do receptor de insulina, de IRS-1, PI3-kinase, da proteína quinase B (PKB/AKT) e do transportador de glicose responsivo à insulina (GLUT-4), (CHIBALIN *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 1999; JESSEN *et al.*, 2003; CHRISTY *et al.*, 2002; EZAKI *et al.*, 1992). Não obstante, o treinamento físico de animais resistentes à insulina leva a aumento da fosforilação em tirosina do receptor de insulina e aumento da expressão de IRS-1, sem alteração na expressão protéica da subunidade β do receptor de insulina, da subunidade p85 da PI3-kinase, ou da Akt/PKB (HEVENER *et al.*, 2000).

O treinamento de endurance também melhora a ação da insulina sobre o metabolismo da glicose em humanos resistentes à insulina (ROGERS *et al.*, 1988) ou diabéticos tipo II (HUGHES *et al.*, 1993). Por exemplo, PERSEGHIN (1996) mostrou que indivíduos resistentes à insulina submetidos a seis semanas de treinamento aeróbio tiveram melhora no transporte de glicose e na fosforilação de glicose estimulada por insulina no músculo esquelético. Adicionalmente, o treinamento aeróbio eleva a expressão protéica de GLUT-4 no músculo esquelético (HOUMARD *et al.*, 1991; OUMARD *et al.*, 1993; DELA *et al.*, 1994), e aumenta a atividade da PI3-kinase (HOUMARD *et al.*, 1999; KIRWAN *et al.*, 2000) em humanos. Alguns trabalhos encontraram aumento no número de receptores de insulina após treinamento (KIM *et al.*, 1995), enquanto outros não evidenciaram tal adaptação (CHRIST *et al.*, 2002). De modo interessante, o exercício agudo é estímulo capaz de induzir translocamento de GLUT-4 para a membrana plasmática muscular, mesmo na

ausência de insulina. Este efeito parece ser mediado pela ação da AMPK, ativada em resposta ao exercício (MUSI *et al.*, 2001).

Os efeitos do exercício sobre a sensibilidade à insulina em adipócitos são, em grande medida, dependente de redução da massa de tecido adiposo e do diâmetro da célula (BROZINICK *et al.*, 1994; BURSTEIN *et al.*, 1992). Não obstante, são observados também diversos efeitos sobre a via de sinalização insulínica. Por exemplo, PERES (2005), investigou o efeito do treinamento aeróbio sobre a ação da insulina em adipócitos isolados e no tecido adiposo intacto. Foi observado que a fosforilação induzida por insulina de IRS-1 e 2 foi significativamente aumentada, e que o número dos receptores de insulina e a fosforilação em tirosina induzida por insulina da subunidade β do receptor não foi alterada. A associação de IRS-1/PI3K (mas não de IRS-2/PI3K), e fosforilação em serina de AKT também foi maior após o período de treinamento. O conteúdo proteico da subunidade β do receptor de insulina, e de IRS-1 e 2 não diferiu entre os grupos controle e treinado.

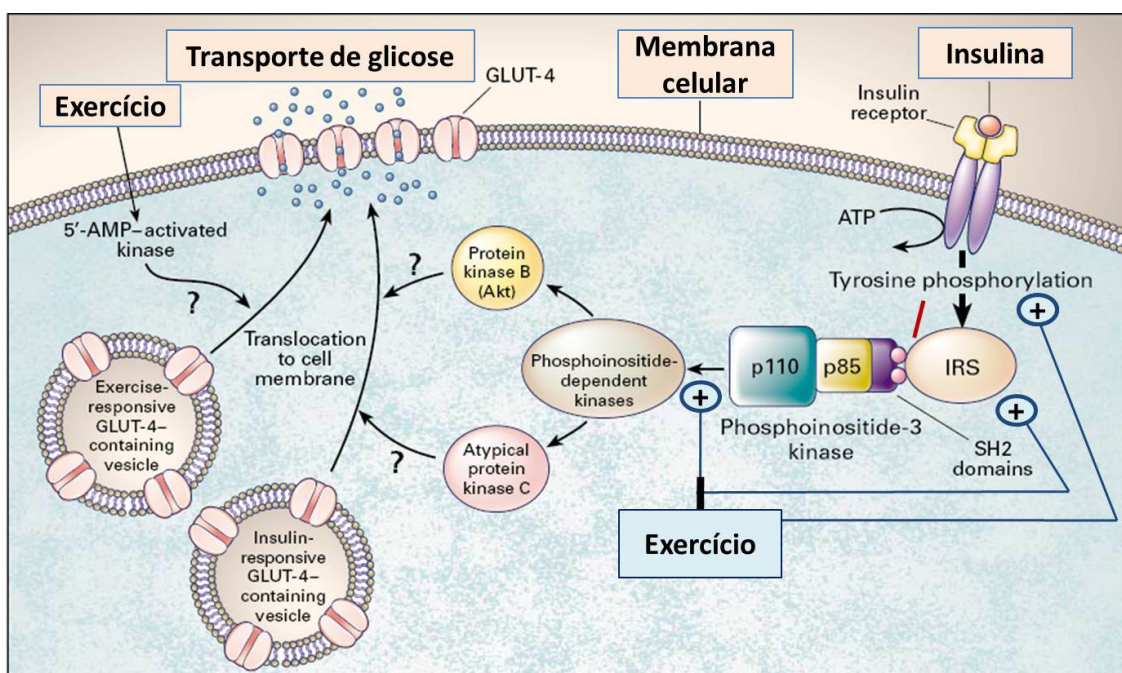


Figura 10: Papel do exercício sobre o metabolismo de glicose estimulado por insulina. Estão representados os efeitos do exercício sobre diferentes mediadores da via de sinalização insulínica, bem como o efeito do exercício sobre a translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática de maneira independente da insulina. Adaptado de SHEPHERD e KHAN, 1999

1.10. Efeitos do exercício sobre mecanismos inflamatórios

O exercício é uma intervenção com importantes efeitos anti-inflamatórios (GLEESON *et al.*, 2011), os quais podem ser mediados por redução da massa adiposa e consequente redução de citocinas inflamatórias circulantes, mas também por ampla variedade de estímulos que promovem ambiente fisiológico com potencial para atenuar a atividade de vias da inflamação (Figura 11) (PETERSEN e PEDERSEN, 2005; MATHUR e PEDERSEN, 2008). Por exemplo, a interleucina 6 (IL-6), molécula produzida por uma variedade de tecidos e células, incluindo leucócitos, adipócitos, macrófagos, cérebro, fígado e músculo esquelético (GLEESON *et al.*, 2011), é elevada no plasma em até 100 vezes os valores de repouso, como resposta ao exercício. Este fenômeno é decorrente de produção desta interleucina pelo músculo esquelético (PEDERSEN e EDWARD, 2009; FISCHER, 2006). A elevação nas concentrações plasmáticas de IL-6 promove elevação de outros fatores com reconhecida ação anti-inflamatória, como por exemplo, elevação da interleucina 10 (IL-10), a qual bloqueia a síntese de Interleucina 1 (IL-1) e do fator de necrose tumoral α (TNF- α), elevação do antagonista do receptor de interleucina 1 (IL1ra), o qual bloqueia a ação da IL-1 β , e elevação do cortisol, que medeia diversos mecanismos anti-inflamatórios (STEENSBERG *et al.*, 2003; PETERSEN e PEDERSEN, 2005). O papel da IL-6 é independente de outros estímulos desencadeados pelo exercício, o que é evidenciado pela infusão de IL-6, que mimetiza estes mesmos efeitos, suprimindo também a elevação nas concentrações de TNF α estimulada por endotoxina (STARKIE *et al.*, 2003; STEENSBERG *et al.*, 2003). Muitos destes efeitos estão associados à prevenção da resistência à insulina induzida por lipídeos, melhora na sensibilidade à insulina e prevenção da infiltração de células imunitárias (HONG *et al.*, 2006). Apesar de as concentrações plasmáticas de IL-6 retornarem aos valores de repouso em aproximadamente 1 hora pós-exercício, foi demonstrado que sua concentração nas fibras musculares pode permanecer elevada por até 24 horas após o final da sessão (PENKOWA, *et al.*, 2003). Não obstante, é importante destacar que a IL-6 tem sido motivo de acirrado debate científico. De fato, não está completamente estabelecido qual seu papel como modulador da atividade inflamatória e também do metabolismo de nutrientes

(KRISTIANSEN e MANDRUP-POULSEN, 2005; GABAY, 2006; PEDERSEN *et al.*, 2007). Em adição, outros importantes imunomoduladores secretados em resposta ao exercício incluem os hormônios adrenalina, cortisol, hormônio do crescimento, e outros fatores como proteínas de choque térmico, que em conjunto, contribuem com a indução de um ambiente anti-inflamatório (CUPPS e FAUCI., 1982; BERGMANN., 1999; GLEESON *et al.*, 2011).

Estas moléculas contribuem ainda com a prevenção da infiltração de células imunitárias no tecido adiposo. De fato, o exercício reduz a quantidade de macrófagos e outros tipos celulares infiltrados neste tecido, além de estimular nestas células mudanças fenotípicas em sentido notadamente anti-inflamatório (Kawanishi *et al.*, 2010). Em consonância com estes achados, estudos em humanos demonstraram que o exercício reduz o número de monócitos fenotipicamente pro-inflamatórios circulantes (CD14^{low}CD16⁺), e eleva o número de células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺ TReg) (TIMMERMAN *et al.*, 2008; YEH *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2011). A demonstração de que o tratamento com glicocorticoides depleta seletivamente a população de monócitos CD14^{low}CD16⁺ (FINGERLE-ROWSON *et al.*, 1998) corrobora a suposição de que alterações transientes nas concentrações de cortisol medeiam os efeitos do exercício sobre este parâmetro. Foi observado ainda que o exercício induz mudança no perfil de macrófagos infiltrados no tecido adiposo de camundongos obesos, notadamente para o fenótipo anti-inflamatório M2 (KAWANISHI *et al.*, 2010), e reduz expressão de receptores Toll Like em monócitos e macrófagos (PETERSEN e PEDERSEN, 2005; PEDERSEN e FEBBRAIO, 2008; GLEESON *et al.*, 2006). Adicionalmente, o exercício pode modular diretamente os mecanismos que medeiam a migração de células imunitárias ao tecido adiposo. Este efeito inclui a redução na síntese de quimiocinas e de moléculas de adesão (CAM's) no endotélio vascular (ROBERTS *et al.*, 2006; ZOPPINI *et al.*, 2006; KAWANISHI *et al.*, 2010), as quais, de fato, apresentam maior expressão no tecido adiposo de indivíduos obesos (BOSANSKÁ *et al.*, 2010). A modulação deste processo se dá pela inibição de vias que regulam a expressão gênica das CAM's como, por exemplo, o NFkB, onde a via AMPK/GGC-1 α pode apresentar papel relevante (HANDSCHIN, 2009; HANDSCHIN e SPIEGELMAN, 2008).

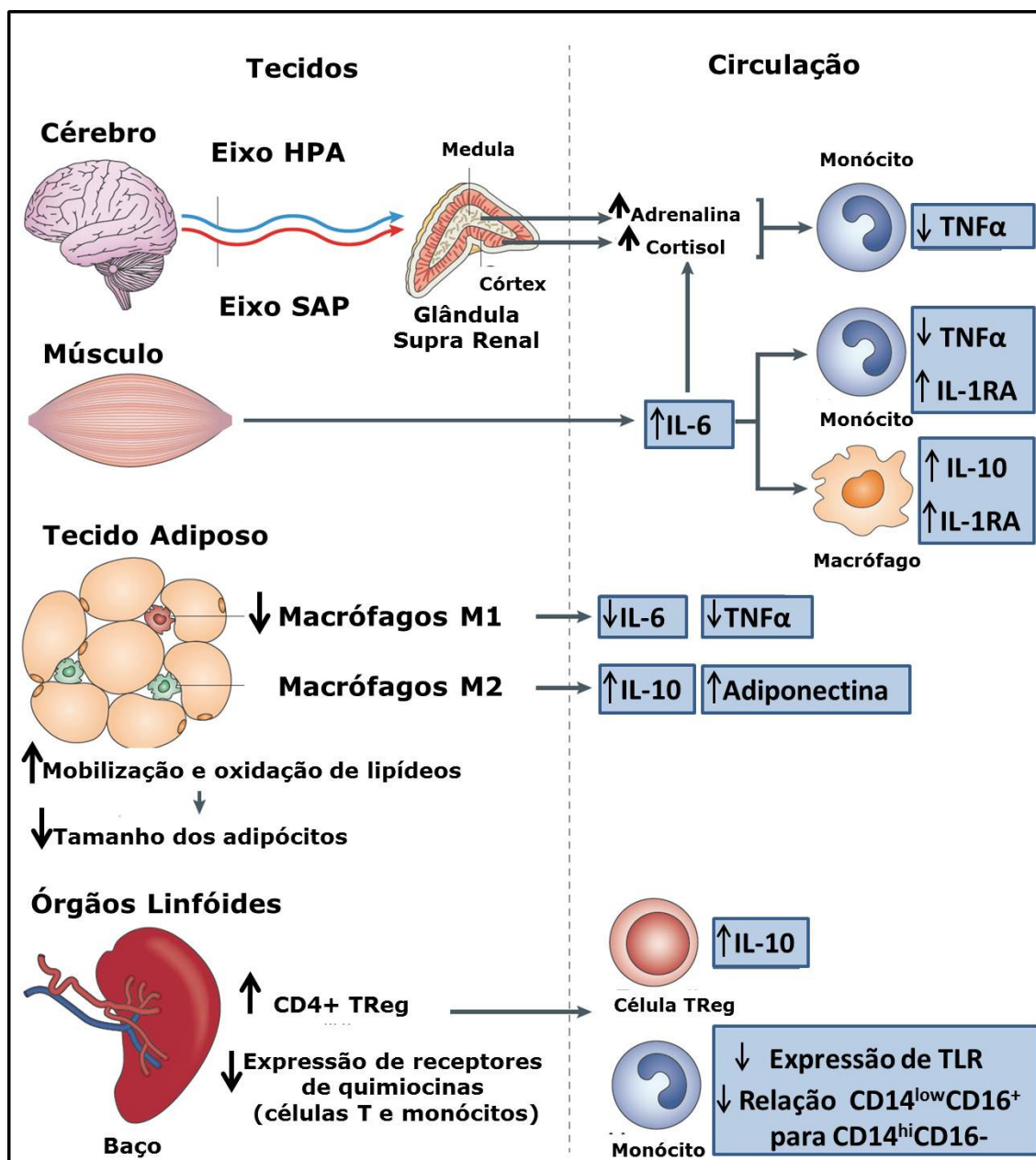


Figura 11: Efeitos do exercício sobre a inflamação crônica. A prática de atividade física induz perfil anti-inflamatório no tecido adiposo, caracterizado por adipócitos de menor tamanho, e presença de células imunitárias fenotipicamente anti-inflamatórias (macrófagos M2 e células T regulatórias). Os mecanismos envolvem a redução de substratos circulantes, como glicose e ácidos graxos livres, a elevação transitória de moléculas como cortisol, adrenalina e interleucina 6, e a ativação de vias de sinalização anti-inflamatórias, como a via AMPK/GGC-1 α (não mostrada). Adaptado de GLEESON et al., 2011.

2. JUSTIFICATIVA

Na obesidade, perturbações do perfil bioquímico plasmático e disfunções metabólicas peculiares em tecidos periféricos comprometem a flexibilidade metabólica. Por outro lado, o exercício físico é intervenção que modula as concentrações de substratos circulantes, e interfere de maneira significativa nas características metabólicas de tecidos como o músculo esquelético e o tecido adiposo.

Deste modo, é relevante o entendimento dos mecanismos responsáveis pela instalação da inflexibilidade metabólica em diferentes tecidos, bem como dos mecanismos responsáveis pelos efeitos preventivos do exercício sobre esta disfunção.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Estudar os efeitos da obesidade induzida por glutamato monossódico sobre a flexibilidade metabólica em músculo esquelético e tecido adiposo, bem como os efeitos do exercício aeróbio crônico sobre estes parâmetros.

Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil bioquímico plasmático e tecidual.
- Avaliar, *in vitro*, a capacidade oxidativa de ácidos graxos do tecido adiposo branco e do músculo esquelético.
- Avaliar, *in vitro*, o metabolismo de glicose estimulado por insulina no tecido adiposo branco e no músculo esquelético.
- Investigar, *in vitro*, a influência do ácido palmítico sobre o metabolismo da glicose estimulado por insulina no tecido adiposo branco e no músculo esquelético.
- Avaliar a expressão de proteínas relevantes às funções do metabolismo e da atividade inflamatória no tecido adiposo branco, a saber: AMPK e PGC-1 α .
- Avaliar o percentual de macrófagos e linfócitos T CD8⁺ infiltrados no tecido adiposo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albinus), provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (3 animais por gaiola), em sala com ciclo claro/escuro invertido (12/12 horas), temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com livre acesso a água e ração. A ração, contendo 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos, foi obtida da Nuvilab CRI, (Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, PR). Foram constituídos quatro grupos experimentais, cada qual contendo 6 animais, a saber: Controles Sedentários (CS), Controles exercitados (CEX), Obesos Sedentários (OBS), Obesos Exercitados (OBEX). Foram realizados 6 experimentos, totalizando 144 animais. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

4.2. Desenho experimental

Animais recém-nascidos foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos: obesos (OB) e controles (C). Nos animais do grupo OB foram administradas injeções subcutâneas de glutamato monossódico (4mg/g p.c.), diluído em PBS, consecutivamente nos cinco primeiros dias após o nascimento (Figura 12) (FREITAS MATHIAS *et al.*, 2007). O glutamato monossódico possui ação hipotalâmica no núcleo arqueado e eminência mediana, levando a modificações metabólicas que promovem o desenvolvimento de significativa adiposidade (Uma revisão sobre o modelo de obesidade induzida por glutamato monossódico é apresentada no anexo 02). Nos animais do grupo controle foram administradas injeções de solução salina hiperosmótica (1.25mg/g) pelo mesmo período. Após 90 dias, os animais do grupo OB foram aleatoriamente distribuídos nos grupos OBS e OBEX, e os animais do grupo C foram aleatoriamente distribuídos nos grupos CS e CEX. Os animais dos

grupos EX foram submetidos um protocolo de exercício, enquanto os animais do grupo S permaneceram sedentários até os 150 dias.

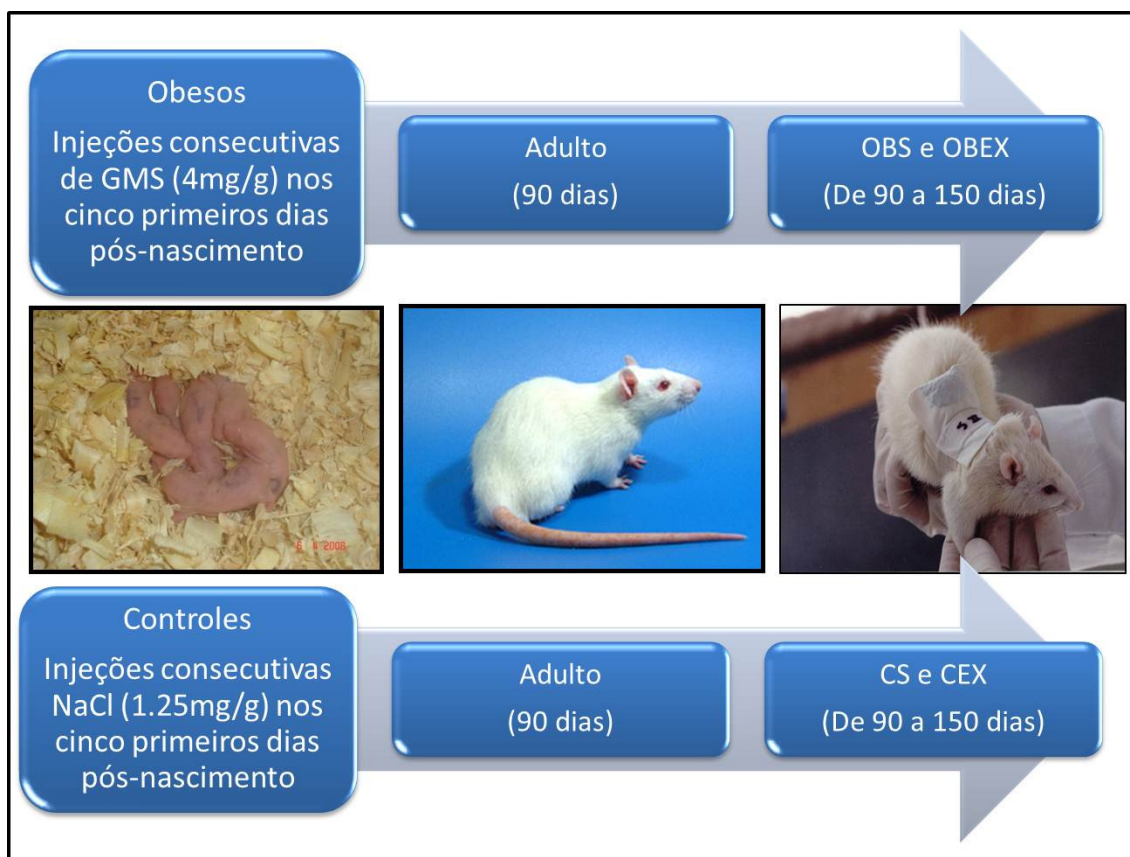


Figura 12: Esquema do desenho experimental. GMS: Glutamato monossódico; NaCl: Cloreto de Sódio; OBS: Grupo Obeso Sedentário; OBEX: Grupo Obeso Exercitado; CS: Grupo Controle Sedentário; CEX: Grupo Controle Exercitado.

4.3. Protocolo de exercício

Após período de adaptação ao meio líquido (2 dias, 30 minutos, sem sobrecarga) os animais foram submetidos a protocolo de exercício físico com duração de 8 semanas, consistindo de sessões de 1 hora de natação, cinco vezes por semana, com sobrecarga de até 6% do peso corporal (BRITO *et al.*, 2010; GOBATTO *et al.*, 2002). Para a realização das sessões de exercício foi utilizado sistema de natação composto por tubos de PVC, com 250 mm de diâmetro e 60 cm de altura. Cada tubo comportou um animal, e a temperatura da água foi mantida em 30°C - 32°C (Figura 13).



Figura 13: Sistema de natação utilizado no treinamento físico dos animais.

4.4. Teste de tolerância à insulina

Os animais, em jejum de 12 horas, foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg). Foi administrada solução de insulina endovenosa (0,75 mU/Kg) e mensurada a glicemia nos tempos 0, 4, 8, 12 e 16 minutos (SERAPHIM *et al.*, 2001; TOMIE FURUYA *et al.*, 2005). Os valores da glicemia foram utilizados para calcular a constante de decaimento da glicose (Kitt) (BONORA *et al.*, 1989).

4.5. Índice Lee

O índice Lee, indicativo do grau de obesidade dos animais, foi assim calculado: $[\text{massa corporal (g)}^{1/3} / \text{comprimento naso-anal (cm)}] \times 1000$ (BERNARDIS e PATTERSON, 1968).

4.6. Análises plasmáticas

Após morte por decapitação, o sangue foi coletado e centrifugado. A partir do plasma procedeu-se a análise dos seguintes parâmetros bioquímicos:

- a) Glicemia

A glicemia foi determinada por método colorimétrico, utilizando-se sistema comercial Glicose E enzimática da labtest. Os ensaios foram realizados segundo as instruções do fabricante. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de placa a 505 nm, e a concentração de glicose foi calculada em mg/dL.

b) Colesterolemia

A colesterolemia foi determinada por método enzimático colorimétrico, conforme sistema comercial Colesterol COD-ANA da Labtest. As amostras foram preparadas segundo as instruções do fabricante. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de placa a 500 nm, e a concentração de colesterol foi calculada em mg/dL.

c) Triacilglicerolemia

A triacilglicerolemia foi determinada por método enzimático colorimétrico, conforme o sistema comercial TRIGLICÉRIDES GPO-ANA da Labtest. As amostras foram preparadas seguindo-se as instruções do fabricante. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de placa a 540 nm, e a concentração de triacilgliceróis foi calculada em mg/dL.

d) Determinação do Colesterol HDL

Foi utilizado o sistema para precipitação das lipoproteínas de baixa e de alta densidade (LDL e VLDL), e determinação do colesterol HDL no sobrenadante após centrifugação, utilizando-se o sistema comercial enzimático Colesterol HDL – precipitante, em associação com o sistema comercial Colesterol COD-ANA da Labtest. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de placa a 500 nm, e a concentração de HDL foi calculada em mg/dL.

e) Determinação da insulinemia

Alíquotas do plasma foram congeladas (-80° C) para posterior análise. A concentração de insulina foi determinada por imunoensaio enzimático de competição, e expressa em ng/mL, conforme metodologia descrita pelo fabricante (SPI-Bio Bertin Pharma – Montigny le Bretonneux; France).

4.7. Análises Teciduais

a) Determinação do conteúdo de triacilglicerol hepático e muscular

Os lipídeos foram extraídos a partir de 30 mg de tecido em CHCl₃-MeOH (2:1), e 0.6% NaCl (peso/volume) foi adicionado para separar da fase orgânica. Em seguida, os extratos orgânicos foram secos em nitrogênio gasoso e reconstituídos em etanol. O conteúdo de triacilgliceróis foi analisado pela dosagem do glicerol liberado após hidrólise enzimática (sistema comercial Triglicérides GPO-ANA da Labtest). Conforme BRONWYN *et al.*, 2000.

b) Diâmetro dos adipócitos

Aproximadamente 2 g do tecido adiposo epididimal foi cortado em pequenos pedaços e digerido por 30 min a 37 °C, em meio DMEM contendo colagenase (1mg/mL) e BSA (4%). Após filtração do tecido digerido em filtro de nylon (100 µm), o filtrado foi centrifugado a 400 g por 1 min. As frações das células estromais vasculares e de adipócitos foram obtidas através do “*pellet*” e do sobrenadante, respectivamente. A fração dos adipócitos foi analisada utilizando-se uma lente graduada. Foram mensurados o diâmetro de 100 adipócitos para cada grupo.

c) Isolamento e marcação das células estromais vasculares do tecido adiposo

Após o procedimento descrito acima, a fração das células estromais vasculares foram incubadas em solução hemolítica, a 37°C por 30 min. Em seguida, $2,5 \times 10^5$ células foram marcadas com 40 µL do anticorpo anti-CD8 (CD8-α, Santa Cruz Biotechnology) ou anticorpo anti-mac (Anti-Rat Macrophage PE, eBioscience). As células positivas para cada anticorpo foram quantificados por citometria de fluxo, utilizando-se o aparelho FACSCalibur (BD Biosciences).

d) Expressão protéica

O tecido adiposo congelado foi homogeneizado em tampão de lise na proporção de 1:7, com o auxílio de homogeneizador Politron (25.000 rpm/min). O homogenato foi centrifugado por 5 minutos a 13.000 rpm, e o sobrenadante coletado. A quantificação protéica foi feita pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Após a quantificação protéica, as amostras foram diluídas em tampão laemmli 5X, na concentração de 3 µg/µL. Desta solução, 15µL (45 µg de proteína) foram utilizados para separação de proteínas em gel de poliacrilamida (eletroforese SDS-PAGE: Dodecil de sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida), no equipamento Bio-rad Mini-PROTEAN. O gel resultante foi utilizado para a realização de imunoblotting (ou "Western blotting") conforme descrito por TOWBIN *et al*, (1979). Foi feita transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, em equipamento semi-dry (Biorad trans-blot), a 25v por 1 hora. Para detecção das proteínas de interesse, a membrana de nitrocelulose foi incubada em temperatura ambiente por período de 3 horas, na presença de anticorpos primários na diluição de 1:500. (Anticorpos policlonais para AMPK (AMPKα1, sc-19128, Santa Cruz Biotechnology) ou PGC-1α (PGC-1, sc-13067, Santa Cruz Biotechnology). Em seguida, as membranas foram incubadas na presença de anticorpos secundários, conjugados com HRP (Horseradish peroxidase) na diluição de 1:10.000, por período de 1 hora. A detecção foi realizada pela adição de

substrato quimioluminescente. As imagens foram analisadas por densitometria utilizando o programa Image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EUA). Como controle da quantidade de proteína aplicada nos ensaios, foi utilizado anticorpo comercial anti α -actina (1:1000- Chemicon).

4.8. Estudo *in vitro*

a) Descarboxilação de [U-¹⁴C]-ácido palmítico pelo músculo esquelético

O músculo sóleo foi cuidadosamente e rapidamente isolado, dividido longitudinalmente ao meio, pesado (25-35 mg) e pré-incubado em erlenmeyers contendo tampão de *Krebs-Ringer*, a 37 °C, sob agitação constante, com atmosfera de O₂/CO₂ (95%/5%) por período de 30 minutos.

Composição do Tampão Krebs-Ringer (KR)	
NaCl 0,9% + Hepes 100mM	150 mL
CaCl ₂ 0,11 M	2.25 mL
KH ₂ PO ₄ 2,11%	1.5 mL
MgSO ₄ 3,82%	1.5 mL
KCl 1,15%	6 mL
NaHCO ₃	31.5 mL
pH	7,4

Decorrido o período de pré-incubação, os músculos foram transferidos a outros erlenmeyers (erlenmeyers de descarboxilação), contendo tampão *Krebs Ringer* e 0,1 μ Ci/mL do [U-¹⁴C]-ácido palmítico. Em cada erlenmeyer de descarboxilação (Figura 14), a solução tampão Krebs-Ringer continha 1,5% de albumina complexada com ácido palmítico não marcado (0,9 mM). A complexação do ácido palmítico com a albumina foi realizada em banho maria a 37°C, sob agitação constante, durante período de 24 horas. Após este período o ácido palmítico marcado (0,1 μ Ci/ml) foi adicionado ao meio. O

músculo foi incubado neste ambiente por período de 1 hora. No segundo compartimento do erlenmeyer foi adicionado mistura de feniletilamina/metanol (1:1 em volume) para captação de [$^{14}\text{CO}_2$] produzido pela metabolização do ácido graxo. Decorrido 1 hora, a reação foi interrompida com a adição de ácido tricloroacético (TCA) no compartimento contendo o músculo, e a feniletilamina coletada para a determinação da radioatividade em cintilador (contador *beta Beckman-LS 6000 ic Liquid Scintillator*). Para obtenção do branco, as amostras foram injetadas com 200 μL DE TCA no início da incubação.

b) Metabolismo de [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-D-Glicose estimulado por insulina pelo músculo esquelético

O músculo sóleo foi pré-incubado da maneira descrita anteriormente. Após período de pré-incubação (30'), os músculos foram transferidos a enleynmeyers de descarboxilação contendo tampão *Krebs Ringer* e 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-D-glicose (Basal), ou tampão *Krebs Ringer* e 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-D-glicose acrescido de 10mU de insulina, para avaliação da descarboxilação da glicose, síntese de lactato e da produção de glicogênio pelo músculo esquelético. A concentração de 10 mU de insulina foi estabelecida previamente em nosso laboratório, através de curva dose-resposta, como a concentração que promove as respostas mais proeminentes sobre os parâmetros analisados. A síntese de [^{14}C]-glicogênio, a produção de lactato e a descarboxilação de [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-D-glicose, foram mensuradas segundo os métodos descritos por ESPINAL *et al.*, (1983), ENGEL; JONES, (1978) e LEIGHTON e COOPER, (1988), respectivamente.

c) Efeito do ácido palmítico sobre o metabolismo de glicose estimulado por insulina pelo músculo esquelético

Em experimento paralelo, após período de pré-incubação, os músculos foram transferidos a enleynmeyers contendo tampão *Krebs Ringer* e 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-D-glicose mais 10mU de insulina, e ainda 0, 50 ou 100 μM de ácido

palmítico. Estas concentrações do ácido palmítico estão dentro da faixa fisiológica (SENN, 2005). Para adição do ácido palmítico, este foi solubilizado em etanol (solução de 20mM). A quantidade de etanol presente em cada enlenmeyer foi de 0,5%, concentração que não interfere no metabolismo de glicose com relação aos parâmetros analisados (Hirabara et al., 2003).

d) Estudo *in vitro* do tecido adiposo

As análises descritas nos itens a, b e c foram também realizadas com o tecido adiposo. Fatias de 100mg de tecido adiposo epididimal foram incubados por 60 minutos a 37° C, sob agitação constante, em tampão Krebs Ringer contendo 2% de albumina bovina, livre de gordura, e 5,6 mM de glicose. Para o estudo do metabolismo de [U-¹⁴C]-D-glicose estimulado por insulina, e dos efeitos do ácido palmítico sobre o metabolismo de [U-¹⁴C]-D-glicose estimulado por insulina, foram utilizados 1 mU/mL de insulina. Adicionalmente, a partir do tecido adiposo utilizado no estudo da descarboxilação do [U-¹⁴C]-ácido palmítico, foi realizada avaliação da incorporação deste metabólito em lipídeos teciduais. Após o período de incubação, o tecido adiposo foi coletado dos enlenmeyers de descarboxilação e lavado repetidamente em solução PBS. A radioatividade nas soluções de lavagem foi quantificada a fim de verificar a completa retirada de remanescentes radioativos externos ao tecido. Em seguida, os lipídeos foram extraídos em CHCl₃-MeOH (2:1), e 0.6% NaCl (peso/volume) foi adicionado para separar as fases. Os extratos orgânicos foram então secos em nitrogênio gasoso e reconstituídos em CHCl₃-MeOH (2:1). A determinação da radioatividade presente no extrato lipídico foi realizada em cintilador (contador *beta Beckman-LS 6000 ic Liquid Scintillator*).

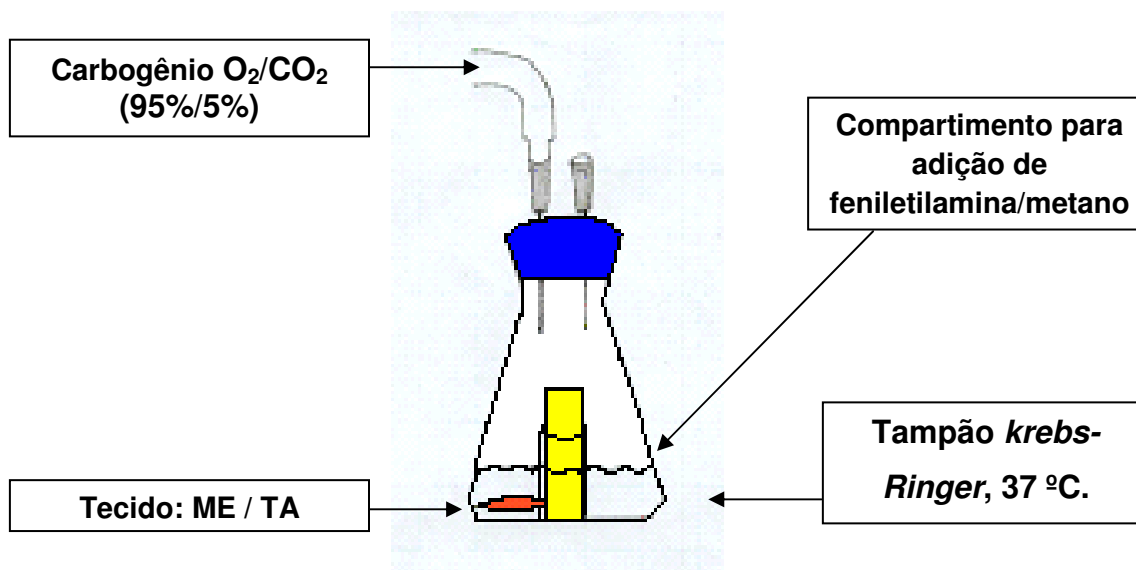


Figura 14: Desenho esquemático do “enlenmeyer de descarboxilação”, utilizado para o estudo do metabolismo de ácidos graxos e glicose pelo músculo esquelético e o tecido adiposo. ME: Músculo Esquelético; TA: Tecido Adiposo.

4.9. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Foi utilizado o teste de normalidade D’Agostinho Pearson para a verificação da distribuição normal. Foi realizada análise de variância de duas vias (two way-ANOVA), tendo como fatores exercício e obesidade, seguida de pós-teste de comparação múltipla de Tuckey. Para comparação de situações onde existiam grupos estimulados e não estimulados ou controle e obeso, foi empregado também o teste “t” de student para confirmação. O valor de $p < 0,05$ foi adotado como nível de significância. As análises estatísticas e a confecção dos gráficos foram realizadas no software graphpad prism v.5.01 (Graphpad Inc.; La Jolla, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Características do modelo aos 90 dias pós-nascimento

Decorridos noventa dias do nascimento, os animais injetados com glutamato monossódico (GMS) apresentaram menor massa corporal (Figura 15 A) quando comparados aos animais do grupo controle ($p < 0,001$). Não houve diferença no índice Lee (Figura 15 B) entre os animais controle e obesos aos noventa dias ($p > 0,05$), bem como não houve diferença na ingestão alimentar (Figura 15 C) entre os mesmos ($p > 0,05$).

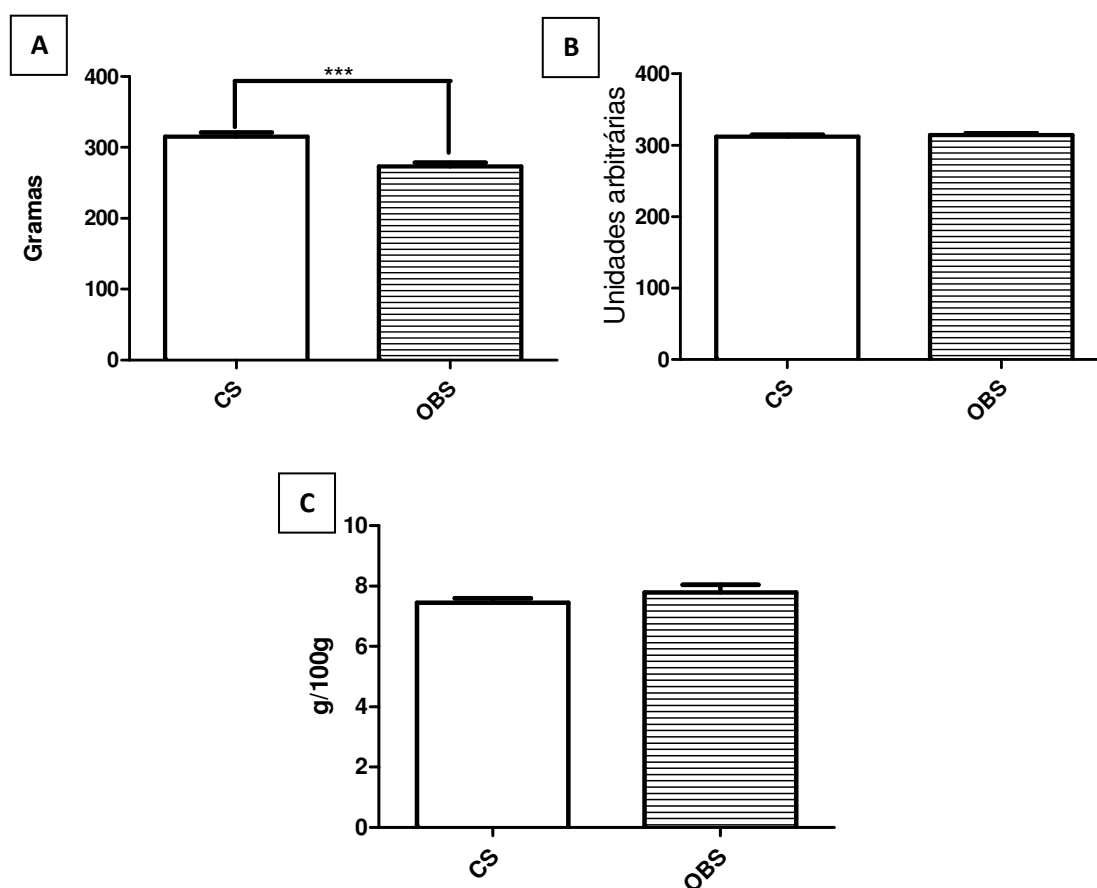


Figura 15: Características do modelo aos 90 dias. (A): Massa corporal. (B): Índice Lee. (C): Consumo de ração. Dados expressos como média \pm EPM de cinco experimentos. CS: Controle sedentário, CEX: Controle Exercício, OBS: Obeso sedentário, OBEX: Obeso Exercício. * \neq de CS. *** $p < 0,001$.

Aos noventa dias, a glicemia dos animais obesos (Figura 16 A) não foi diferente daquela observada para os animais controle. Foi verificada menor taxa de decaimento da glicose (KITT) durante teste de tolerância a insulina (Figura 16 B e C) nos animais do grupo OB quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$).

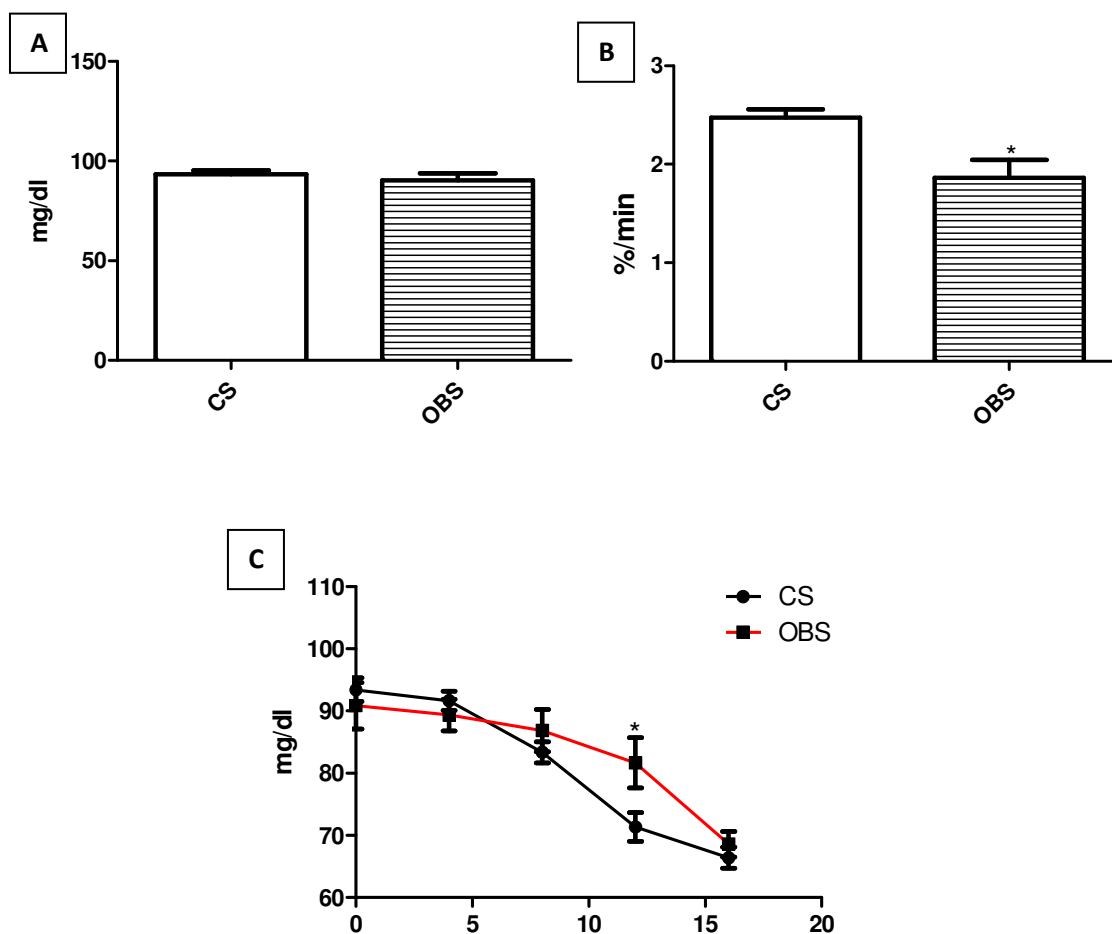


Figura 16: Características do modelo aos 90 dias. (A): Glicemia de jejum. (B): Taxa de decaimento da glicose (KITT) durante ITT. (C): Decaimento da glicose durante teste de tolerância à insulina (ITT). Dados expressos como média \pm EPM, de cinco experimentos. CS: Controle sedentário, CEX: Controle Exercício, OBS: Obeso sedentário, OBEX: Obeso Exercício. * \neq de CS. * $p < 0,05$.

5.2. Características do modelo aos 150 dias pós-nascimento e efeitos do exercício

5.2.1. Massa corporal

Durante o período de intervenção experimental (90 aos 150 dias) a massa corporal dos animais do grupo OBS (Figura 17) manteve-se abaixo daquela observada para os animais do grupo CS ($p < 0,01$). A massa corporal dos animais do grupo CEX e OBEX não foi diferente, quando comparada à do grupo CS e OBS respectivamente ($p < 0,05$). A massa corporal do grupo OBEX foi significativamente inferior quando comparada àquela do grupo CS ($p < 0,01$).

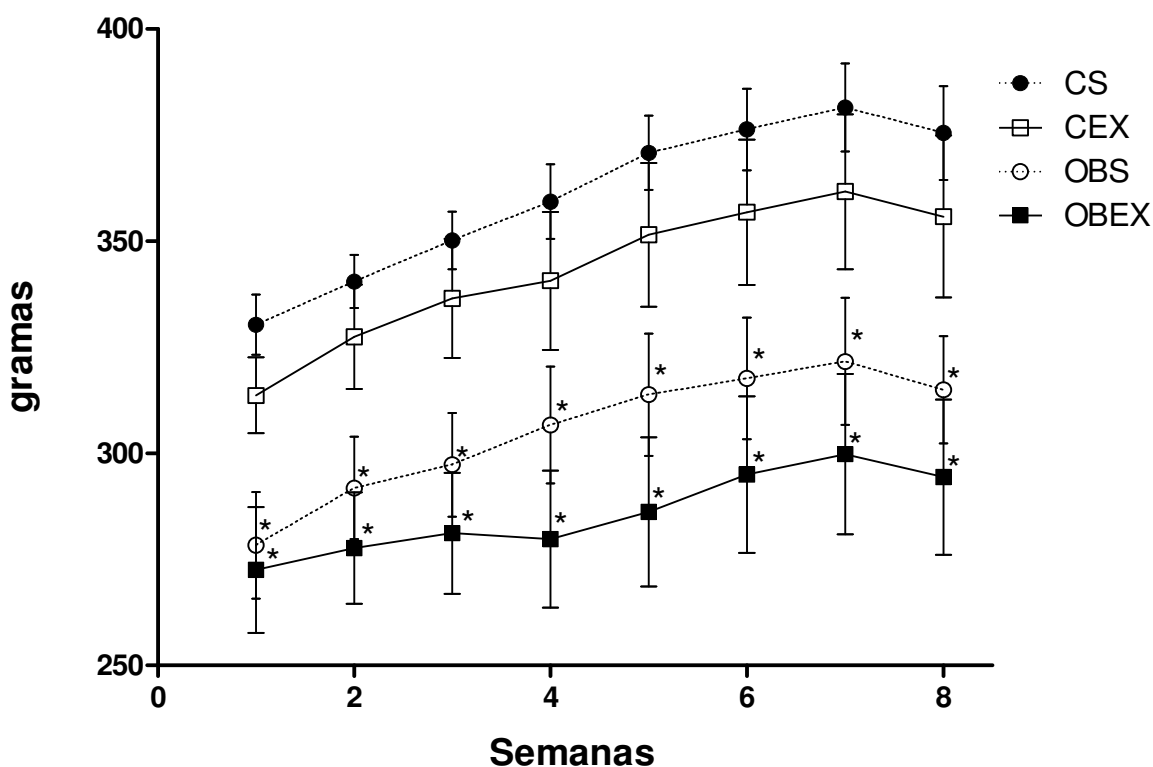


Figura 17: Massa corporal dos animais a partir de 90 dias e ao longo de 8 semanas. Dados expressos como média \pm EPM de cinco experimentos. -S: Controle sedentário, CEX: Controle Exercício, OBS: Obeso sedentário, OBEX: Obeso Exercício. \neq de C-S. $*p < 0,01$

5.2.2. Consumo de ração e índice Lee

O consumo de ração (Figura 18 A) foi similar entre os diferentes grupos experimentais quando comparados entre si ($p>0,05$).

A análise do índice Lee (Figura 18 B) revelou aumento significativo no grupo OBS quando comparado a CS ($p<0,001$). No grupo OBEX este índice foi significativamente inferior aquele observado em OBS ($p<0,001$). Não houve diferença no consumo de ração entre os grupos OBEX e CS ($p>0,05$).

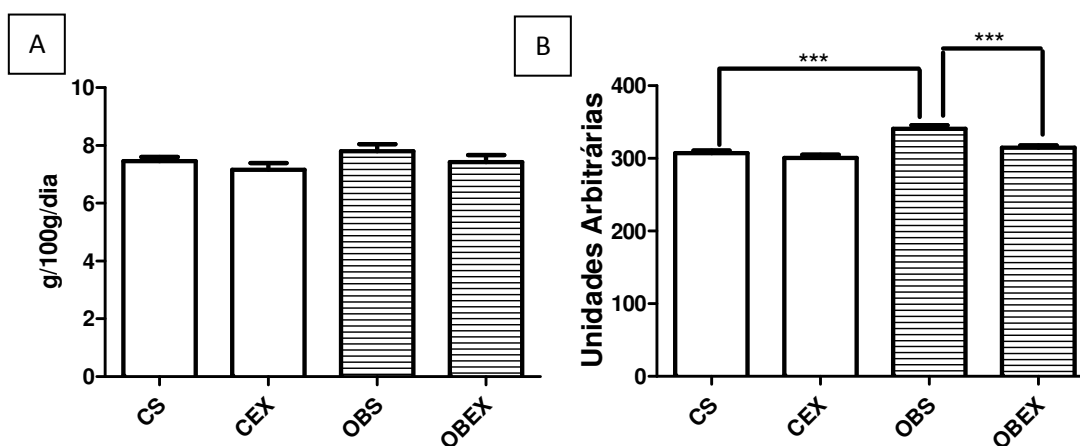


Figura 18: (A) Consumo diário médio de ração por 100 gramas de peso corporal. (B) Índice Lee dos animais aos 150 dias. Dados expressos como média \pm EPM de cinco experimentos. CS: Controle sedentário, CEX: Controle Exercício, OBS: Obeso sedentário, OBEX: Obeso Exercício. * \neq de CS. *** $p<0,001$

5.2.3. Massa adiposa e tamanho celular de adipócitos

O grupo OBS apresentou massa adiposa epididimal (Figura 19 A) significativamente maior quando comparada à do grupo CS ($p < 0,001$). Nos grupos CEX e OBEX a massa adiposa epididimal foi menor quando comparada à do CS e OBS, respectivamente ($p < 0,05$). O grupo OBEX apresentou massa adiposa epididimal significativamente superior quando comparada à do grupo CS ($p < 0,001$).

O grupo OBS apresentou massa adiposa retroperitoneal (Figura 19 B) significativamente maior quando comparada à do grupo CS ($p < 0,001$). Nos grupos CEX e OBEX a massa adiposa retroperitoneal foi menor quando comparadas à do CS e OBS, respectivamente ($p < 0,001$). O grupo OBEX apresentou massa adiposa retroperitoneal significativamente superior quando comparada à do CS ($p < 0,001$).

O tamanho médio dos adipócitos do tecido adiposo epididimal (Figura 19 C) dos animais do grupo OBS foi significativamente maior que àquele observado nos animais do grupo CS ($p < 0,05$). No grupo CEX e no grupo OBEX o tamanho médio dos adipócitos foi menor que àquele observado em seus controles CS e OBEX, respectivamente ($p < 0,05$). O tamanho médio dos adipócitos do grupo OBEX não foi diferente àquele do grupo CS ($p < 0,05$).

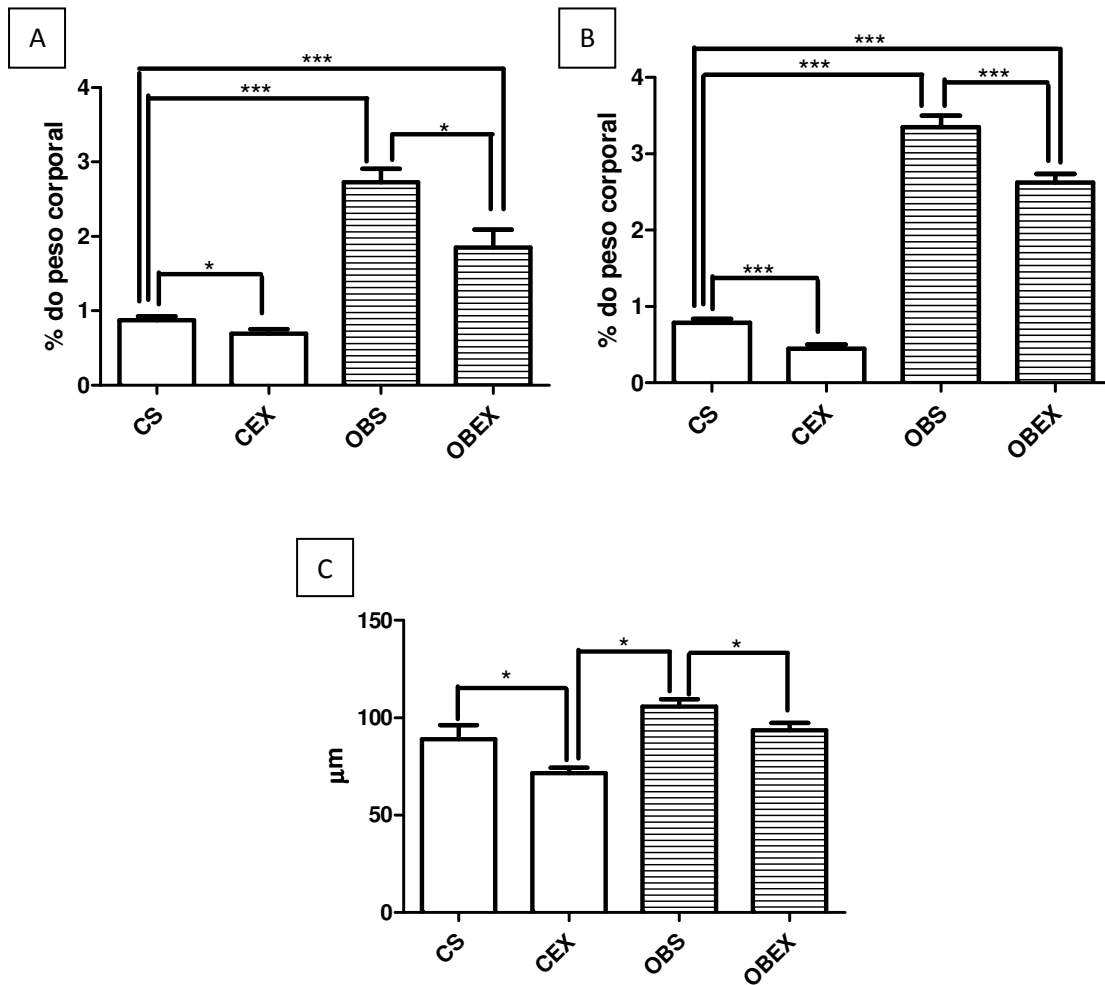


Figura 19: Peso do tecido adiposo e tamanho médio dos adipócitos. (A) Peso do tecido adiposo epididimal. (B) Peso do tecido adiposo retro peritoneal. (C) Tamanho médio dos adipócitos do tecido adiposo epididimal. Dados expressos como média \pm EPM de cinco experimentos. CS: Controle sedentário, CEX: Controle exercício, OBS: Obeso sedentário, OBEX: Obeso exercício. * \neq de CS. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

5.2.4. Tolerância à insulina e insulinemia

O grupo OBS apresentou menor taxa de decaimento da glicose (Figura 20 A) quando comparada à do CS ($p < 0,05$). Tanto no grupo CEX como no grupo OBEX, a sensibilidade à insulina foi maior quando comparada à de seus controles CS e OBS, respectivamente ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Não houve diferença na sensibilidade à insulina quando comparada à dos grupos OBEX e CS ($p > 0,05$).

A insulinemia (Figura 20B) foi significativamente maior no grupo OBS quando comparado à do CS ($p < 0,05$). Não houve diferença na insulinemia nos grupos CEX e OBEX quando comparadas à de seus controles CS e OBS, respectivamente ($p > 0,05$). Não houve diferença na insulinemia na comparação do grupo OBEX com CS ($p > 0,05$).

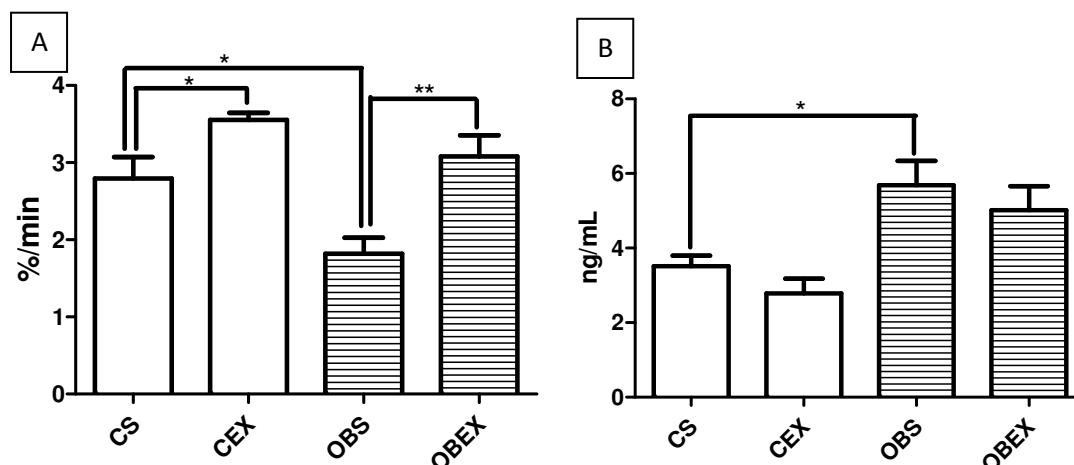


Figura 20: A. Teste de tolerância à insulina, expresso pela taxa de decaimento da glicose, após administração endovenosa de insulina (KITT). B. Insulinemia plasmática. Dados apresentados como média \pm EPM de cinco experimentos para KITT e três experimentos para insulinemia. CS: Controle sedentário, CEX: Controle exercício, OBS: Obeso sedentário, OBEX: Obeso exercício. * \neq de CS, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

5.2.5. Perfil bioquímico plasmático e tecidual

Os dados referentes as análises do perfil bioquímico plasmático e tecidual estão apresentados na tabela 01.

A glicemia de jejum não foi diferente na comparação entre os grupos experimentais ($p>0,05$).

Os animais do grupo OBS apresentaram colesterolemia significativamente superior que àquela observada no grupo CS ($p<0,01$). Nos grupos CEX e OBEX a colesterolemia foi significativamente menor que àquela observada em seus respectivos controles CS e OBS ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente). Não houve diferença na colesterolemia na comparação dos grupos OBEX e CS ($p>0,05$).

A concentração de HDL não foi diferente entre os grupos CS e OBS ($p<0,05$). Nos grupos CEX e OBEX, o HDL foi significativamente maior que àquela observado em seus controles CS e OBS, respectivamente ($p<0,05$). A concentração de HDL foi significativamente maior no grupo OBEX quando comparada à do grupo CS ($p<0,05$).

A triacilglicerolemia foi significativamente maior no grupo OBS quando comparada à do CS ($p<0,001$), e significativamente inferior no grupo OBEX quando comparada à do OBS ($p<0,01$). Não foi observado diferença na triacilglicerolemia dos animais do grupo CEX quando comparada à do CS ($p>0,05$). A triacilglicerolemia no grupo OBEX não foi diferente quando comparada à do grupo CS ($p>0,05$).

Tabela 01: Análises bioquímicas plasmáticas e teciduais. Valores plasmáticos, dosados após 12 horas de jejum, da concentração plasmática de glicose, colesterol total, fração HDL colesterol, triacilgliceróis e valores e teciduais de triacilgliceróis no musculo esquelético e tecido hepático. Dados apresentados como média \pm EPM de cinco experimentos. HDL: Lipoproteína de alta densidade, TAG: Triacilgliceróis, CS: Controle sedentário, CEX: Controle exercício, OBS: Obeso sedentário, OBEX: Obeso exercício. * \neq de CS, # \neq de OBS. *ou# $p < 0,05$, **ou## $p < 0,01$, ***ou### $p < 0,001$

	CS	CEX	OBS	OBEX
Glicemia (mg/dl)	88,48 \pm 2,143	85,94 \pm 2,139	87,93 \pm 2,739	88,84 \pm 1,664
Colesterolemia (mg/dl)	68,12 \pm 2,770	54,45* \pm 6,573	80,34** \pm 2,550	66,16## \pm 2,058
HDL (mg/dl)	20,22 \pm 0,620	24,38* \pm 1,515	21,77 \pm 0,989	28,15*# \pm 1,507
Triacilglicerolemia (mg/dl)	56,73 \pm 8,342	58,47 \pm 10,29	97,28*** \pm 6,076	61,41## \pm 10,71
TAG muscular (mg/g)	1,426 \pm 0,057	1,383 \pm 0,064	2,004** \pm 0,091	1,477## \pm 0,125
TAG hepático (mg/g)	3,297 \pm 0,119	3,053 \pm 0,228	4,972* \pm 0,755	4,996* \pm 0,394

No músculo esquelético dos animais obesos (OBS), o conteúdo de triacilgliceróis foi significativamente maior quando comparado à do grupo CS ($p < 0,01$) e também quando comparado ao dos animais do grupo OBEX ($p < 0,01$). Neste parâmetro, não foi verificada diferença entre os grupos CEX e CS ($p > 0,05$). Não houve diferença no conteúdo de triacilgliceróis no musculo esquelético do grupo OBEX quando comparado à do CS ($p > 0,05$).

O conteúdo de triacilgliceróis hepáticos foi significativamente maior no grupo OBS quando comparado à do CS ($p < 0,05$), e não foi diferente quando comparado à do OBEX ($p > 0,05$). Não houve diferença no conteúdo de triacilgliceróis no grupo CEX quando comparado à do CS ($p > 0,05$). O conteúdo de triacilgliceróis do grupo OBEX foi significativamente superior quando comparado ao do grupo CS ($p < 0,05$).

5.2.6. Metabolismo de ácidos graxos pelo tecido muscular esquelético e tecido adiposo em incubação

Não houve diferença na descarboxilação de [U-¹⁴C]-ácido palmítico (Figura 21 A) pelo músculo esquelético de animais do grupo OBS quando comparados à do CS ($p > 0,05$). Este parâmetro foi significativamente maior no grupo CEX quando comparado ao do CS ($p < 0,01$), bem como no grupo OBEX quando comparado ao do OBS ($p < 0,001$) ou ao do CS ($p < 0,01$). A descarboxilação do ácido palmítico foi significativamente maior no músculo esquelético do grupo OBEX quando comparada à do CS ($p < 0,01$).

A descarboxilação de [U-¹⁴C]-ácido palmítico (Figura 21 B) pelo tecido adiposo dos animais do grupo OBS foi significativamente menor quando comparada à do grupo CS ($p < 0,05$). Este parâmetro foi significativamente maior no grupo CEX quando comparado ao do CS ($p < 0,001$), bem como no grupo OBEX quando comparado ao do OBS ($p < 0,001$) ou a CS ($p < 0,001$). A descarboxilação do ácido palmítico foi significativamente maior no tecido adiposo do grupo OBEX quando comparada à do CS ($p < 0,001$).

Não houve diferença na incorporação de [U-¹⁴C]-ácido palmítico em lipídeos (Figura 21 C) no tecido adiposo entre os grupos experimentais ($p > 0,05$).

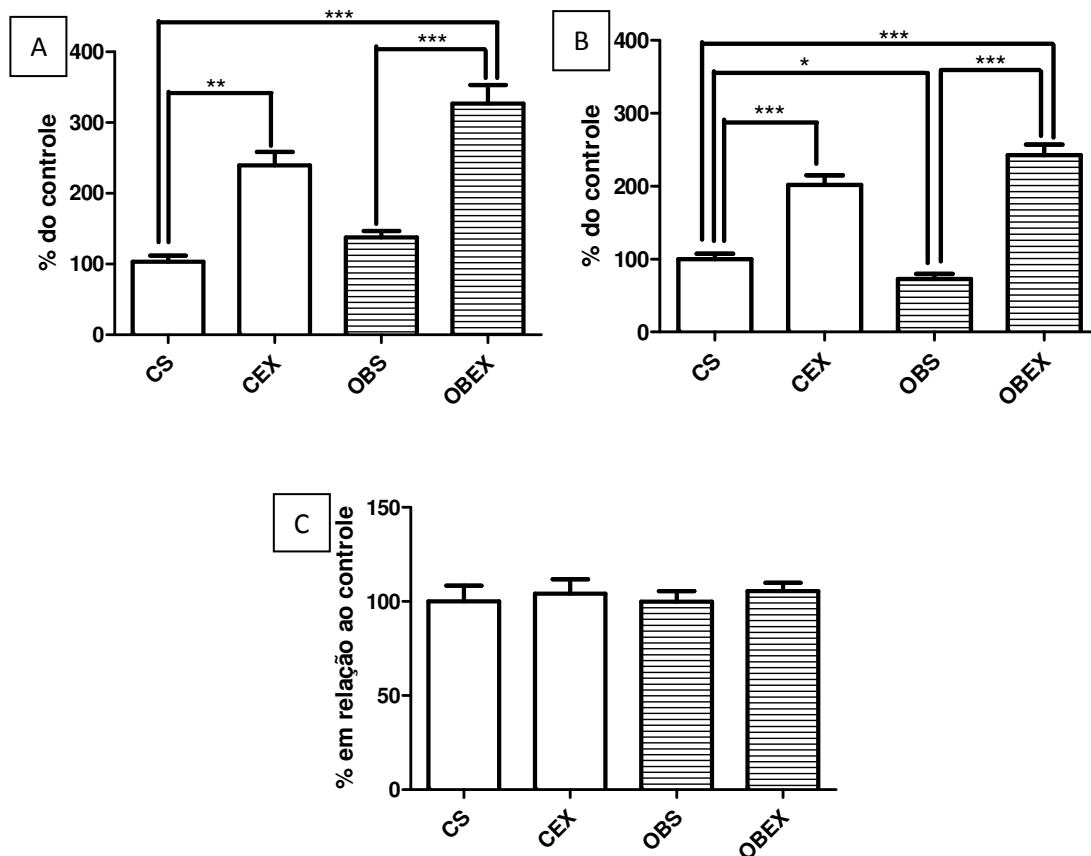


Figura 21: (A). Descarboxilação de U-[^{14}C] ácido palmítico pelo músculo esquelético. (B). Descarboxilação de U-[^{14}C] ácido palmítico pelo tecido adiposo epididimal. (C). Incorporação de U-[^{14}C] ácido palmítico em lipídeos (lipogênese) pelo tecido adiposo epididimal. Dados apresentados como média \pm EPM de três experimentos em quadruplicata. CS: Controle sedentário, CEX: Controle exercício, OBS: Obeso sedentário, OBEX: Obeso exercício. * \neq de CS * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.2.7. Metabolismo de glicose estimulado por insulina pelo tecido muscular esquelético em incubação

A produção de lactato estimulada por insulina (Figura 22 A) pelo músculo esquelético foi maior que a produção basal nos grupos CS, CEX e OBEX ($p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente). Não houve aumento significativo na produção de lactato estimulada por insulina no grupo OBS quando comparada a produção basal ($p > 0,05$). A produção de lactato estimulada por insulina foi maior no grupo OBEX comparado ao grupo CS ($p < 0,01$).

A descarboxilação de [U- 14 C]-glicose estimulada por insulina (Figura 22 B) no músculo esquelético foi maior que a descarboxilação basal nos grupos CS, CEX e OBEX, ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Não houve aumento significativo na descarboxilação de [U- 14 C]-glicose estimulada por insulina no grupo OBS ($p > 0,05$). A descarboxilação de [U- 14 C]-glicose estimulada por insulina pelo músculo esquelético foi maior no grupo OBS quando comparada à do grupo CS ($p < 0,05$). Não houve diferença na descarboxilação de glicose estimulada por insulina no grupo OBEX quando comparada à do CS ($p > 0,05$).

A síntese de [14 C]-glicogênio estimulada por insulina (Figura 22 C) pelo músculo esquelético foi maior que a síntese basal em todos os grupos experimentais ($p < 0,05$). A síntese basal e a síntese estimulada por insulina foram maiores no grupo OBS, quando comparadas às do CS ($p < 0,05$). Não houve diferença na síntese de glicogênio estimulada por insulina no grupo OBEX quando comparada à do CS ($p > 0,05$).

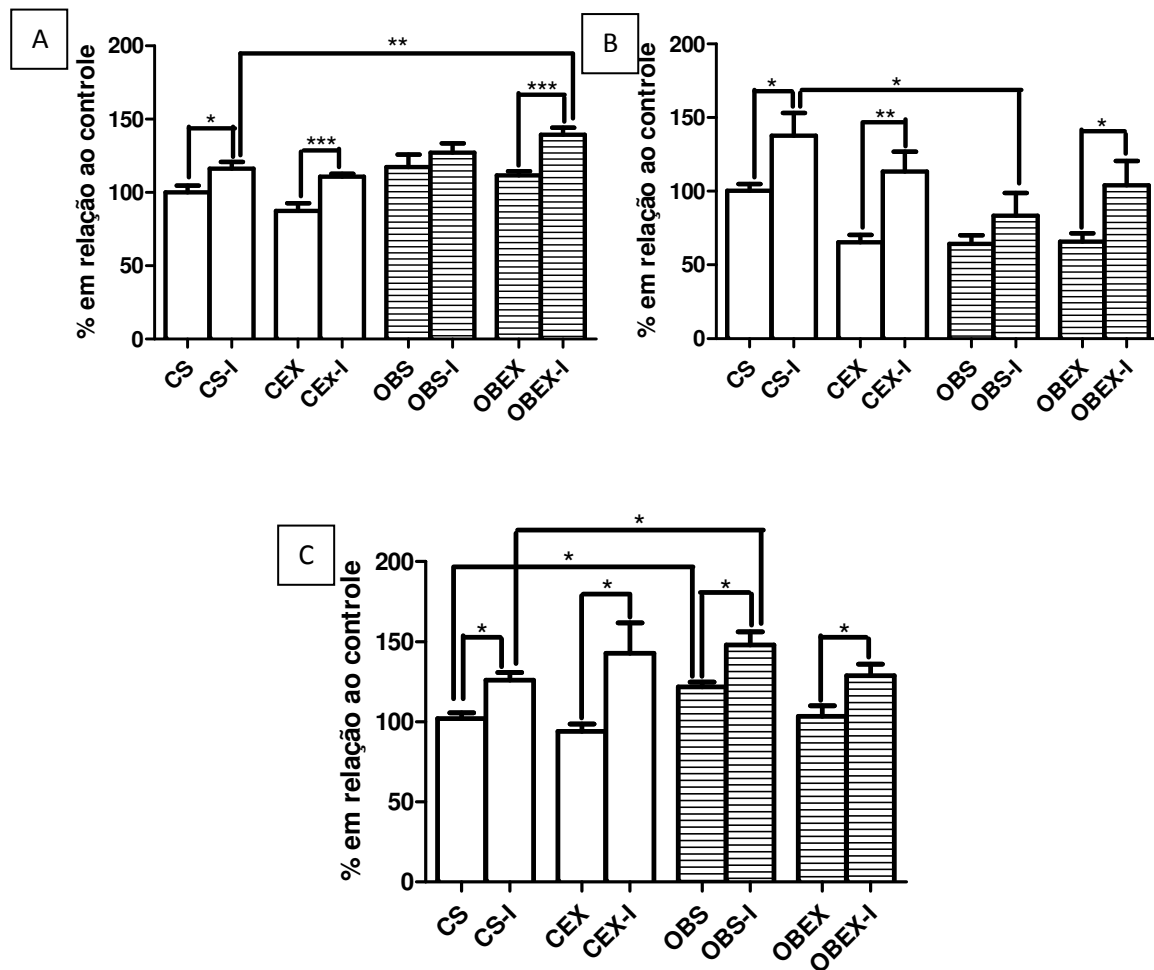


Figura 22: (A) Produção de lactato estimulado por insulina pelo músculo esquelético e (B) Descarboxilação de [U-¹⁴C]-glicose estimulado por insulina pelo músculo esquelético. (C) Síntese de [¹⁴C]-glicogênio estimulado por insulina pelo músculo esquelético. Dados expressos como média ± EPM de quatro experimentos em quadruplicata. CS: Controle sedentário, CEX: Controle exercício, OBS: Obeso sedentário, OBEX: Obeso exercício. ME: Músculo esquelético, I: insulina ≠ de CS. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

5.2.8. Metabolismo de glicose estimulado por insulina pelo tecido adiposo em incubação

A produção de lactato estimulado por insulina (Figura 23 A) pelo tecido adiposo foi maior que a produção basal nos grupos CS e CEX ($p < 0,01$). A produção de lactato estimulada por insulina não foi diferente da produção basal nos grupos OBS e OBEX ($p > 0,05$). A produção de lactato estimulada por insulina foi maior no grupo CS quando comparada à do grupo OBS ($p < 0,001$), bem como quando comparada à do OBEX ($p < 0,001$). A produção de lactato estimulada por insulina foi maior no grupo CEX quando comparada à do CS ($p < 0,01$).

A descarboxilação de [U- 14 C]-glicose estimulada por insulina (Figura 23 B) pelo tecido adiposo foi maior que a descarboxilação basal nos grupos CS, CEX e OBEX ($p < 0,05$). Não houve aumento na descarboxilação de [U- 14 C]-glicose estimulada por insulina no grupo OBS quando comparado a descarboxilação basal ($p > 0,05$). A descarboxilação basal e a descarboxilação estimulada por insulina de [U- 14 C]-glicose foram menores no grupo OBS quando comparada à do CS ($p < 0,05$ e $p < 0,001$). A descarboxilação de [U- 14 C]-glicose estimulada por insulina foi maior no grupo OBEX quando comparada à do OBS ($p < 0,05$). A descarboxilação de [U- 14 C]-glicose estimulada por insulina foi menor no grupo OBEX quando comparada à do CS ($p < 0,001$).

A síntese de [14 C]-glicogênio estimulada por insulina pelo tecido adiposo (Figura 23 C) foi maior que a síntese basal nos grupos CS e CEX ($p < 0,05$). Não houve diferença na síntese de [14 C]-glicogênio estimulada por insulina pelo tecido adiposo dos grupos OBS e OBEX quando comparada a síntese basal ($p > 0,05$). A síntese de [14 C]-glicogênio estimulada por insulina foi maior no grupo CEX quando comparada à do CS ($p < 0,01$).

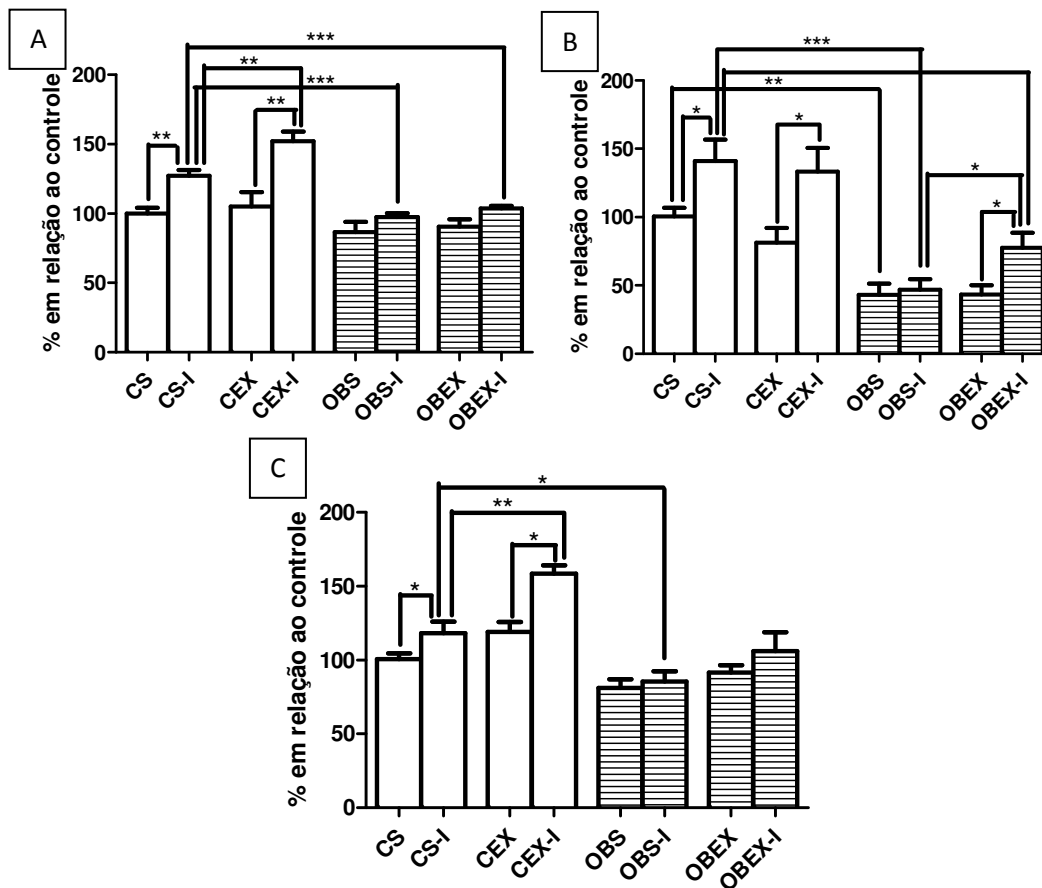


Figura 23: (A) Produção de lactato estimulado por insulina pelo tecido adiposo. (B) Descarboxilação de [U-¹⁴C]-glicose estimulado por insulina pelo tecido adiposo. (C) Síntese de [¹⁴C]-glicogênio estimulado pro insulina pelo tecido adiposo. Dados expressos como média ± EPM de quatro experimentos em quadruplicata. CS: Controle sedentário, CEX: Controle exercício, OBS: Obeso sedentário, OBEX: Obeso exercício. ME: Músculo esquelético, I: insulina ≠ de CS. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

5.2.9. Efeitos do ácido palmítico sobre o metabolismo de glicose estimulado por insulina no tecido muscular esquelético em incubação

O ácido palmítico, na concentração de 50 μ M, reduziu a produção de lactato estimulada por insulina pelo músculo esquelético (Figura 24A) nos grupos CS e OBS quando comparada à presença de apenas insulina ($p < 0,05$). Não houve efeito do ácido palmítico sobre esta variável, nesta concentração, nos grupos CEX e OBEX ($p > 0,05$). O ácido palmítico, na concentração de 100 μ M, reduziu a produção de lactato estimulada por insulina pelo músculo esquelético em todos os grupos experimentais, quando comparada à de seus respectivos controles na presença de apenas insulina ($p < 0,05$).

O ácido palmítico nas concentrações de 50 e 100 μ M, não afetou a descarboxilação de glicose estimulada por insulina pelo músculo esquelético (Figura 24 B) nos grupos CS e CEX, quando comparada à de seus respectivos controles na presença de apenas insulina ($p > 0,05$). O ácido palmítico, nas concentrações de 50 e 100 μ M, reduziu a descarboxilação de [U- 14 C]-glicose estimulada por insulina pelo músculo esquelético nos grupos OBS e OBEX, quando comparada à de seus respectivos controles na presença de apenas insulina ($p < 0,05$).

O ácido palmítico, na concentração de 50 μ M, aumentou a síntese de [14 C]-glicogênio estimulada por insulina pelo músculo esquelético (Figura 24 C) no grupo CEX quando comparada à presença de apenas insulina ($p < 0,05$). Não houve efeito do ácido palmítico sobre esta variável, nesta concentração, nos demais grupos experimentais ($p > 0,05$). O ácido palmítico, na concentração de 100 μ M, aumentou a síntese de [14 C]-glicogênio estimulada por insulina pelo músculo esquelético dos grupos CS e CEX quando comparada à presença de apenas insulina ($p < 0,01$). Não houve efeito do ácido palmítico sobre esta variável, na concentração de 50 ou 100 μ M, nos grupos OBS e OBEX, quando comparada à presença de apenas insulina ($p > 0,05$).

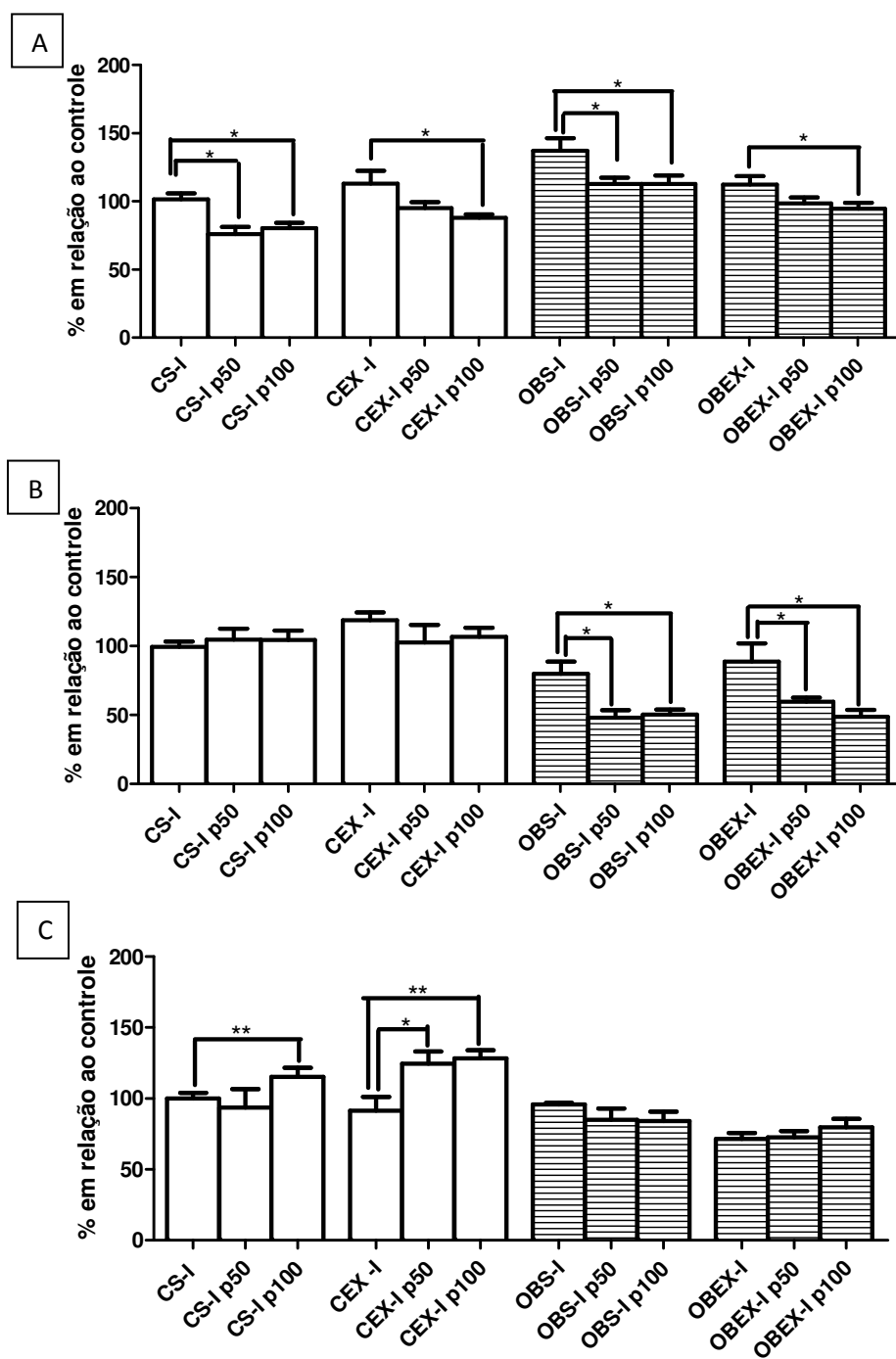


Figura 24: Efeito da exposição do músculo esquelético ao ácido palmítico sobre: (A) a produção de lactato (B) a descarboxilação de [U-¹⁴C]-glicose e (C) a síntese de [¹⁴C]-glicogênio. Dados expressos como média ± EPM de três experimentos em quadruplicata I: Insulina; p50: ácido palmítico na concentração de 50 uM. p100: ácido palmítico na concentração de 100uM; CS: Controle sedentário; CEX: Controle exercício; OBS: Obeso sedentário; OBEX: Obeso exercício; *≠ de CS. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

5.2.10. Efeitos do ácido palmítico sobre o metabolismo de glicose estimulado por insulina no tecido adiposo branco em incubação

O ácido palmítico, nas concentrações de 50 ou 100 μ M, não afetou a produção de lactato estimulada por insulina pelo tecido adiposo (Figura 25 A) em nenhum dos grupos experimentais quando comparada à de seus respectivos controles na presença de apenas insulina ($p > 0,05$).

O ácido palmítico, na concentração de 50 μ M não afetou a descarboxilação de [U- 14 C]-glicose estimulada por insulina pelo tecido adiposo (Figura 25 B) em nenhum dos grupos experimentais, quando comparada à de seus respectivos controles na presença de apenas insulina ($p < 0,05$). Na concentração de 100 μ M, o ácido palmítico reduziu a descarboxilação de [U- 14 C]-glicose estimulada por insulina pelo tecido adiposo em todos os grupos experimentais, quando comparada à de seus respectivos controles na presença de apenas insulina ($p < 0,05$).

O ácido palmítico, na concentração de 50 μ M, não promoveu alteração significativa na síntese de [14 C]-glicogênio estimulada por insulina (Figura 25 C), em nenhum dos grupos experimentais, quando comparada à de seus respectivos controles na presença de apenas insulina ($p > 0,05$). Na concentração de 100 μ M, o ácido palmítico causou aumento significativo na síntese de [14 C]-glicogênio em todos os grupos experimentais, quando comparada à de seus respectivos controles na presença de apenas insulina ($p < 0,05$).

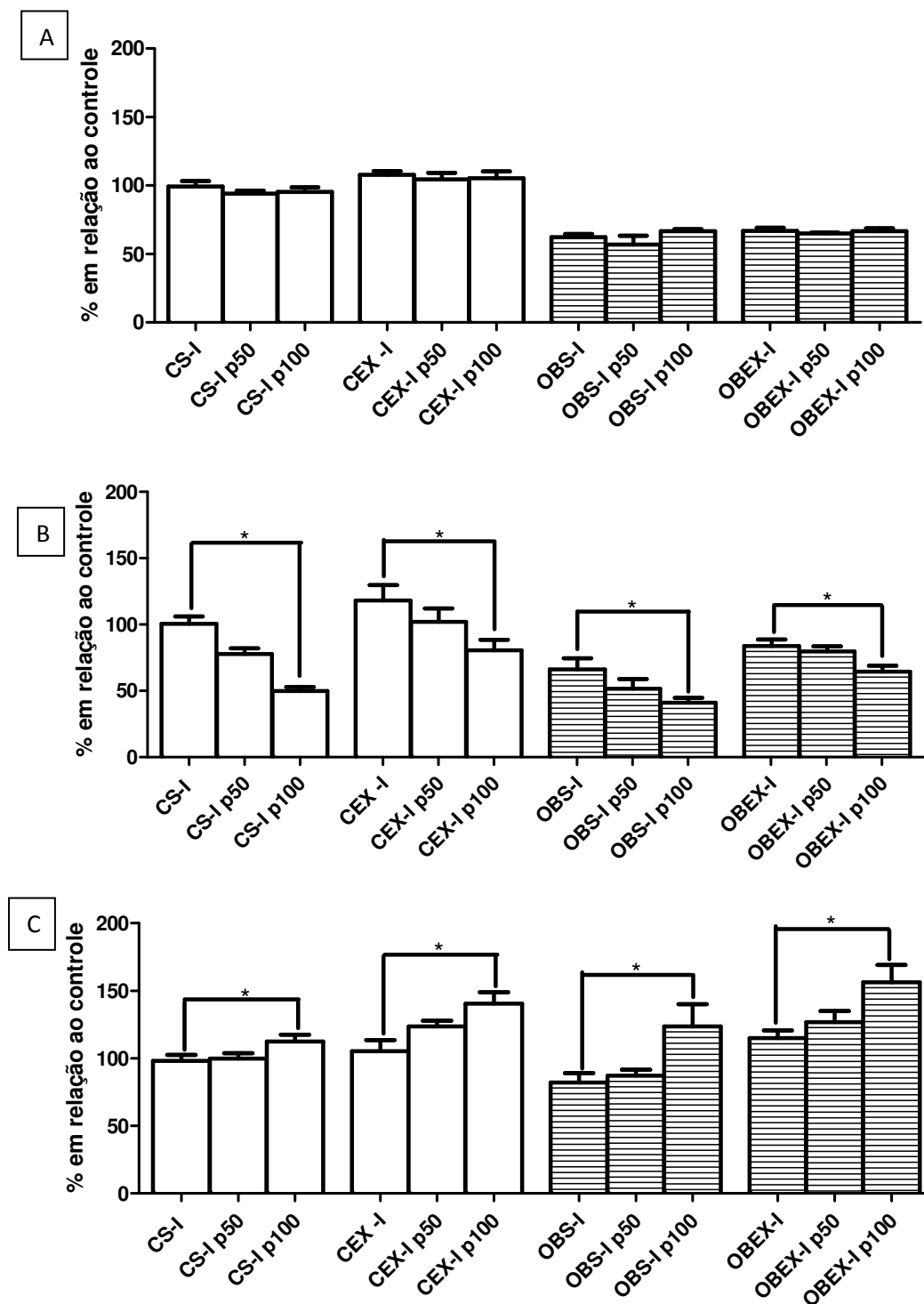


Figura 25: Efeito da exposição do TA ao ácido palmítico sobre a (A) produção de lactato (B) a descarboxilação de [U-¹⁴C]-glicose e (C) a síntese de [¹⁴C]-glicogênio. Dados expressos como média ± EPM de três experimentos I: Insulina; p50: ácido palmítico na concentração de 50 uM. p100: ácido palmítico na concentração de 100uM; CS: Controle sedentário; CEX: Controle exercício; OBS: Obeso sedentário; OBEX: Obeso exercício; *≠ de CS. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

5.2.11. Expressão de proteínas reguladoras de vias imunometabólicas no tecido adiposo branco

A expressão da AMP-K (proteína quinase dependente de AMP) (Figura 26) no tecido adiposo foi significativamente menor no grupo OBS quando comparada à do CS ($p < 0,01$). No grupo OBEX, a expressão desta proteína foi significativamente maior que àquela observada no grupo OBS ($p < 0,05$). Não houve diferença na expressão de AMP-k no grupo CEX quando comparada à do CS. A expressão de AMP-K foi significativamente menor no grupo OBEX quando comparada à do CS ($p < 0,01$).

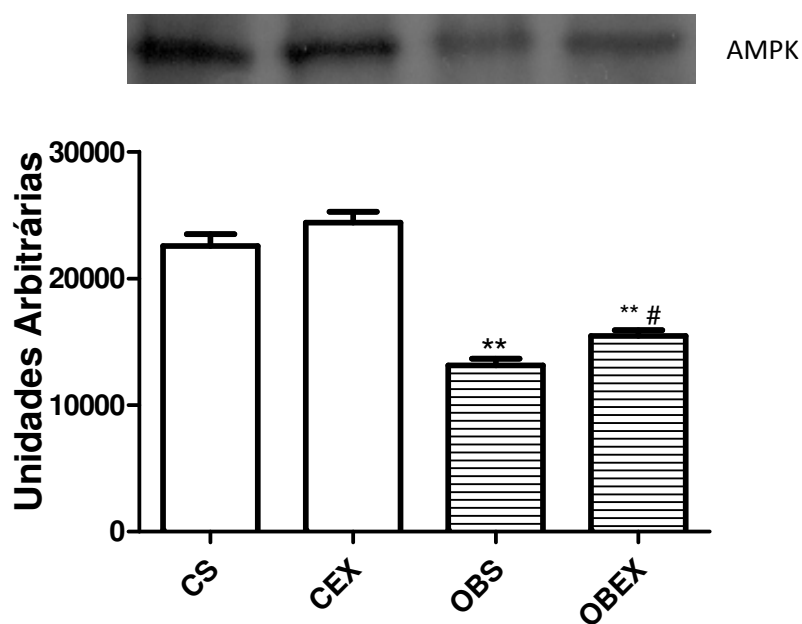


Figura 26: Expressão da enzima quinase dependente de AMP (AMP-K) no tecido adiposo. Dados expressos como média \pm EPM de três experimentos C-S: Controle sedentário, CEX: Controle exercício, OBS: Obeso sedentário, OBEX: Obeso exercício. * \neq de CS. # \neq de OBS * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A expressão do PGC-1 α (coativador 1 α dos receptores ativados por proliferadores de perossissomos – PPAR) no tecido adiposo (Figura 27) foi significativamente menor no grupo OBS quando comparada à do grupo CS ($p < 0,01$). No grupo CEX, a expressão de PGC-1 α foi significativamente maior que àquela observada no grupo CS ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa na expressão de PGC-1 α entre os grupos OBS e OBEX ($p > 0,01$). No grupo OBEX, a expressão de PGC-1 α foi significativamente menor quando comparada à do CS ($p < 0,05$).

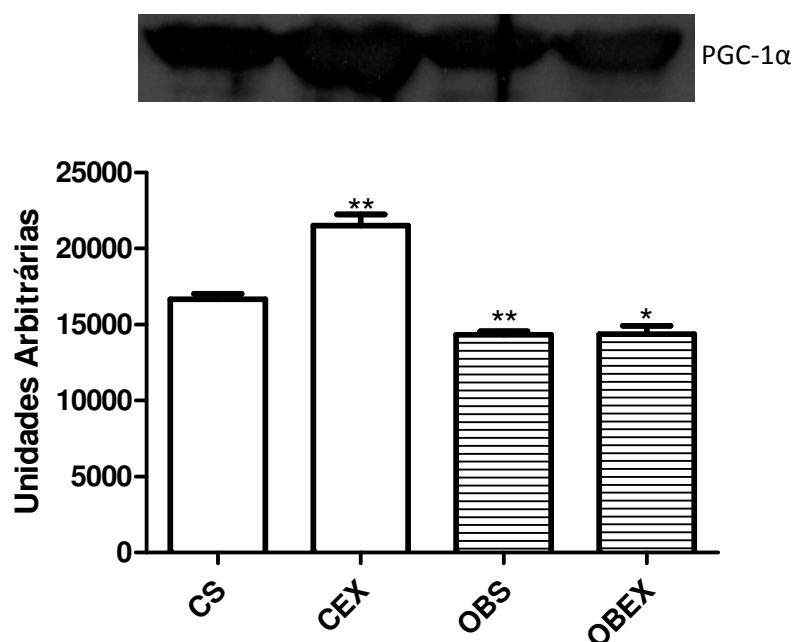


Figura 27: Expressão do cofator de transcrição PGC-1 α no tecido adiposo. Dados expressos como média \pm EPM de três experimentos. CS: Controle sedentário, CEX: Controle exercício, OB-S: Obeso sedentário, OBEX: Obeso exercício. * \neq de C-S. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.2.12. Infiltração de células imunitárias no tecido adiposo branco

A presença de células positivas para o marcador de macrófagos CD163 no tecido adiposo (Figura 28 A) foi significativamente maior no grupo OBS quando comparada à do CS ($p < 0,05$). No grupo OBEX este parâmetro foi significativamente menor quando comparada à do grupo OBS ($p < 0,05$). Não houve diferença na presença de macrófagos no grupo CS quando comparada à do CEX ou OBEX ($p > 0,05$).

A presença de células positivas para o marcador de linfócitos T CD8 (Figura 28 B) foi significativamente maior no grupo OBS quando comparada à do CS ($p < 0,01$). No grupo OBEX, este parâmetro foi significativamente menor quando comparada à do grupo OBS ($p < 0,01$). Não foi observado diferença na presença de linfócitos T CD8⁺ no grupo CS quando comparada à do CEX e a OBEX ($p > 0,05$).

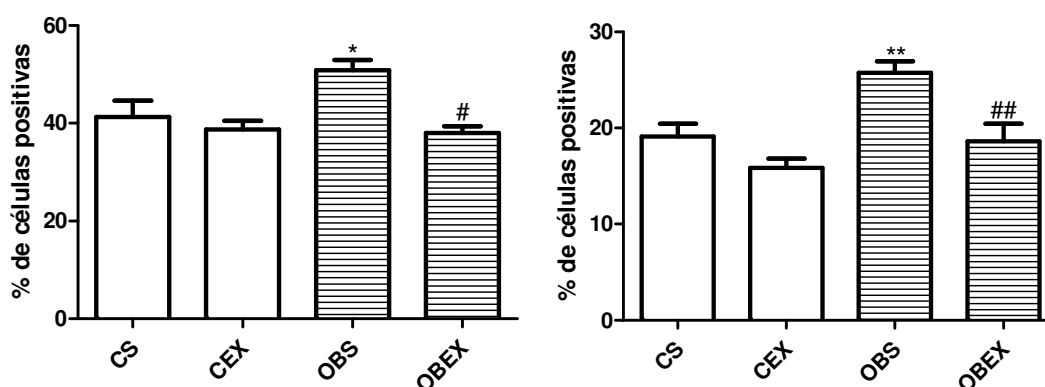


Figura 28: Infiltração de células imunitárias no tecido adiposo branco. A) População de macrófagos B) População de células CD8⁺, Dados expressos como média \pm EPM de quatro experimentos. TA-Epi: Tecido adiposo epididimal, CS: Controle sedentário, CEX: Controle exercício, OBS: Obeso sedentário, OBEX: Obeso exercício. * \neq CS, # \neq OBS. * ou # $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

6. DISCUSSÃO

Resistência à insulina é a base para a manifestação de diversas comorbidades da obesidade, e é condição essencial para o comprometimento da função orgânica denominada flexibilidade metabólica (GALGANI *et al.*, 2008). Flexibilidade metabólica é entendida como a capacidade do organismo modular a utilização de diferentes substratos energéticos em conformidade com sua disponibilidade, onde a insulina atua com papel chave (BICKEL, 2004). Em indivíduos resistentes à insulina, a inflexibilidade metabólica é caracterizada pela inabilidade em transitar da oxidação de lipídeos para à de glicose durante estímulo insulínico, e em manter a oxidação preferencial de lipídeos durante o jejum (KELLEY, 2005; GASTER, 2007). A flexibilidade metabólica é comumente avaliada por meio da infusão de insulina (clamp hiperinsulinêmico), ou teste de tolerância à insulina, com mensuração concomitante da taxa de desaparecimento de substratos do plasma, quociente respiratório ou calorimetria (MEEEX *et al.*, 2010). Tais metodologias são de grande relevância, uma vez que permitem estudar este parâmetro no contexto do organismo (GALGANI, 2008). Adicionalmente, abordagens reducionistas, como o estudo de tecidos isolados, podem fornecer informações que auxiliem no entendimento de como as peculiaridades de diferentes tecidos, bem como de diferentes ambientes fisiológicos, contribuem na regulação desta função orgânica (GASTER, 2007; UKROPCOVA *et al.*, 2005; GASTER *et al.*, 2004; HENRY *et al.*, 1995).

Neste trabalho investigamos a flexibilidade metabólica no modelo de obesidade induzida por glutamato monossódico (GMS). O tratamento com GMS provoca lesões em significativo número de neurônios do núcleo arqueado, comprometendo o funcionamento de áreas importantes envolvidas no controle metabólico (ANEXO 02) (OLNEY, 1969; SCHWARTZ e PORTE, 2005). Nossos dados evidenciam a instalação de quadro de resistência à insulina, decorridos apenas 90 dias da exposição dos animais ao GMS, conforme demonstrado pelo teste de tolerância à insulina (Figura 16 B e C).

A partir dos 90 dias de vida os animais foram submetidos a um protocolo de exercício com duração de oito semanas, conforme previamente descrito (BRITO *et al.*, 2010). Durante este período os animais obesos sedentários apresentaram massa corporal inferior (Figura 17), porém índice Lee superior (Figura 18 B) àquele observado nos animais controles, e mantiveram-se normofágicos (Figura 18 A). Estes dados estão em consonância com observações anteriores deste modelo (MACHO *et al.*, 2000; GRASSIOLLI *et al.*, 2007). Os animais obesos ainda apresentaram menor tamanho corporal, o que explica a elevação do índice Lee apesar da menor massa corpórea. De fato, animais expostos à ação do GMS apresentam crescimento comprometido em função de distúrbios neuroendócrinos consequentes de seu efeito hipotalâmico. Observam-se alterações de importantes hormônios reguladores do desenvolvimento, como o hormônio liberador de hormônio do crescimento (GHRH) e a testosterona (TAMURA *et al.*, 2002). O exercício, mesmo não modificando a massa corporal ou a ingestão alimentar, permitiu que o índice Lee se mantivesse significativamente inferior que àquele dos animais obesos sedentários (Figuras 17 e 18 A e B, respectivamente). Alguns autores postulam que o exercício não afeta a ingestão alimentar (IRANI *et al.*, 2005) e outros estudos, investigando os efeitos de diferentes protocolos de exercício sobre este modelo, obtiveram resultados semelhantes nestes parâmetros (ANDREAZZI *et al.*, 2008). Estes dados indicam que outros mecanismos mediaram os efeitos do exercício sobre o índice Lee dos animais obesos.

Certamente, o fator mais relevante para a caracterização da obesidade é a expansão do tecido adiposo (GOOSSENS, 2008). Este processo é mediado em maior extensão pela hipertrofia, e em menor pela hiperplasia de células adiposas (JO *et al.*, 2009; COUILLARD *et al.*, 2000). Neste trabalho, os animais tratados com GMS foram caracterizados por massa de tecido adiposo branco epididimal e retroperitoneal (Figura 19 A e B, respectivamente) significativamente superior àquela observada nos animais controles. A hipertrofia dos adipócitos teve contribuição significativa neste resultado (Figura 19 C). O aumento da massa adiposa é comumente consequência de desequilíbrio do balanço entre ingestão e gasto calórico (MILES 2009). Contudo, conforme citado anteriormente, os animais obesos deste estudo

apresentaram comportamento normofágico, sugerindo a existência de outros mecanismos subjacentes a hiperadiposidade. Neste sentido, a literatura estabelece determinadas alterações fisiológicas no modelo de obesidade induzido por GMS que, atuando concomitantemente, promovem um ambiente metabólico potencialmente lipogênico. Dentre estas se destacam modificações neuroendócrinas, como menor atividade simpática, redução na síntese e no estoque de catecolaminas na glândula suprarrenal (consequência de redução na expressão da enzima tirosina hidroxilase), redução da liberação de catecolaminas pelas células cromafins medulares, menor atividade da enzima lipase hormônio sensível (HSL) no adipócito (responsável pela degradação dos triacilgliceróis intracelulares), maior atividade da enzima lipase de lipoproteína (LPL) nos vasos que perfundem o tecido adiposo (responsável pela degradação dos triacilgliceróis presentes em lipoproteínas circulantes), e aumentada atividade de enzimas da via lipogênica (PARK *et al.* 2002; MARTINS *et al.*, 2004; DOLNIKOFF *et al.*, 2001). O conjunto destes dados compõe um quadro com potencial para o aumento da massa adiposa mesmo sem modificação na ingestão alimentar. Por outro lado, os animais tratados com GMS e submetidos ao exercício apresentaram massa adiposa significativamente menor que à dos sedentários, mas ainda superior àquela dos animais controles. Os efeitos agudos do exercício sobre a massa adiposa estão associados à ativação de vias lipolíticas, concomitantemente ao aumento da demanda energética no músculo esquelético (OSCAI e ESSER, 1996). Adicionalmente, os efeitos crônicos do exercício sobre este parâmetro são consequência de diversas adaptações, como por exemplo, elevação da capacidade oxidativa (ex. biogênese mitocondrial, enzimas oxidativas), e redução da atividade lipogênica (ex. enzimas lipogênicas) (SPRIET, 2002; HELGE *et al.*, 1999; GALBO *et al.*, 1996; FIEBIG *et al.*, 1998; GRIFFITHS *et al.*, 1996). Somados, estes efeitos reduzem a disponibilidade de ácidos graxos para armazenamento no tecido adiposo, constituindo mecanismos plausíveis para frear o aumento da massa adiposa, e consequentemente do índice Lee induzidos pelo GMS, conforme demonstrado por nossos resultados.

O estado de resistência à insulina observado 90 após exposição ao GMS foi confirmado aos 150 dias através de novo teste de tolerância à insulina

(Figura 20 A). Adicionalmente, os animais obesos foram caracterizados pela presença de hiperinsulinemia (Figura 20 B), confirmando dados de estudos prévios com este modelo (HIRATA *et al.*, 1997; GRASSIOLLI *et al.*, 2007, ANDREAZZI *et al.*, 2009). Na obesidade, a elevação da concentração plasmática de insulina é comumente o resultado de distúrbios em sua ação periférica, o que resulta em sobrecarga pancreática e desencadeia ação compensatória, com elevação na liberação deste hormônio (KAHN *et al.*, 2000). Esta ação compensatória pode permitir a normalização dos valores glicêmicos de jejum (TRIPATHY *et al.*, 2000), o que contribui para a explicação da normoglicemia encontrada nos animais obesos (Tabela 01). Contudo, neste modelo, é provável que outros fatores contribuam para a ocorrência da hiperinsulinemia. Por exemplo, o comprometimento da atividade simpática pode ter importância significativa, uma vez que o sistema nervoso simpático exerce ação inibitória sobre a secreção de insulina pelas células β pancreáticas (BALBO *et al.*, 2000, LUSTIG 2003, AHREN *et al.*, 2003). De fato, alguns autores observaram que a hiperinsulinemia de jejum pode ser parcialmente devida à redução do tônus simpático em indivíduos obesos (BALBO *et al.*, 2002). Estes achados podem ainda contribuir com o entendimento da observação de que o exercício não impediu a instalação da hiperinsulinemia nos animais expostos ao GMS. É possível que este resultado decorra da inabilidade do exercício reverter às modificações autonômicas causadas por tal exposição. Por exemplo, enquanto alguns trabalhos com este modelo demonstraram que o exercício de natação, iniciado no período de desmame, reestabelece a produção de catecolaminas pela medula adrenal (SCOMPARIN *et al.*, 2006), trabalhos que iniciaram a intervenção em períodos posteriores (21 ou 60 dias pós nascimento) não observaram melhora da função do eixo simpato-adrenal (SCOMPARSIN *et al.*, 2006). Neste estudo, os animais iniciaram o protocolo de exercício aos 90 dias, período necessário para o estabelecimento do quadro de resistência à insulina, e provavelmente associado a profundas modificações autonômicas (HIRATA *et al.*, 1997). Por outro lado, os resultados do teste de tolerância à insulina demonstram que o exercício evitou a instalação do quadro de resistência a este hormônio. Este efeito pode ser consequência indireta da redução da massa adiposa, uma vez

que este fator é significativamente associado a melhoras na função insulínica em obesos (SCHWARTZ E PORTE, 2005). Contudo, o exercício também atua diretamente sobre as vias de sinalização deste hormônio, promovendo melhora na sensibilidade periférica mesmo sem modificação na massa corporal (MILES *et al.*, 2009; GOODYEAR E KAHN, 1998, TORGAN *et al.*, 1993). Estes efeitos dependem de fatores como a duração e intensidade do exercício (TORGAN *et al.*, 1993, KRETSCHMER *et al.*, 2005).

A melhora na sensibilidade à insulina representa ainda importante mecanismo para o entendimento dos efeitos do exercício sobre os lipídeos plasmáticos (TABELA 01). De fato, a insulina é importante reguladora dos lipídeos circulantes, e alterações nas concentrações de lipoproteínas plasmáticas (dislipoproteinemias) na obesidade e no diabetes são, em grande medida, decorrentes da resistência a este hormônio (MOORADIAN, 2009). Dislipoproteinemias estão associadas com a ativação de vias inflamatórias (STEINBERG, 2002) e com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (ROCHE e GIBNEY, 2000), o que demonstra a importância do seu controle na obesidade. O papel da insulina nesta regulação ocorre através de seus efeitos sobre a atividade de vias lipolíticas. Por exemplo, a enzima lipase hormônio sensível (HSL), essencial à degradação dos estoques de triacilgliceróis nos adipócitos, e a enzima lipase de lipoproteína (LPL), fundamental para a degradação de lipoproteínas plasmáticas, são moduladas por este hormônio (GROOP *et al.*, 1989). Enquanto a sinalização insulínica inibe a HSL, este hormônio tem efeito estimulador sobre a ação da LPL. Deste modo, a resistência à insulina eleva a atividade lipolítica no tecido adiposo e reduz a degradação de lipoproteínas plasmáticas (POULIOT *et al.*, 1992). De fato, estes fatores comprometem a manutenção da normalidade dos valores de AGL (ácidos graxos livres), VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade), IDL (lipoproteínas de densidade intermediária), LDL (lipoproteínas de baixa densidade) e HDL (lipoproteínas de alta densidade) (CHAN, 2002). Nossos dados corroboram estas informações demonstrando que os animais obesos resistentes à insulina apresentam valores significativamente elevados de colesterolemia e triacilglicerolemia, enquanto os obesos submetidos ao exercício mantiveram estes parâmetros dentro da normalidade. O exercício tem

importante papel no controle dos lipídeos plasmáticos, tipicamente reduzindo as concentrações de triacilgliceróis e colesterol, bem como elevando às de HDL (KRAUS *et al.*, 2002). Estes efeitos são parcialmente devidos às ações do exercício sobre a sensibilidade à insulina. Assim, a melhora na sensibilidade à insulina promovida pelo exercício representa importante mediador da normalização lipídica, bem como da elevação do HDL, observado nos animais obesos exercitados.

A sensibilidade à insulina, determinante na manutenção da flexibilidade metabólica, está comprometida na obesidade em função de uma plethora de fatores. Muitas vezes é difícil determinar quais destes atuam como causa, e quais são consequência dos distúrbios na função insulínica nestes indivíduos. Neste sentido, no tecido adiposo e no músculo esquelético quatro fatores são intrinsecamente correlacionados à flexibilidade metabólica:

1) Conteúdo de triacilgliceróis (TAG) e hipertrofia de tecido adiposo em órgãos periféricos (gordura ectópica) como fígado e músculo esquelético (HOPPELER e BOESCH., 2001; BAYS *et al.*, 2004).

2) Capacidade oxidativa de ácidos graxos e metabolismo de glicose estimulado por insulina no tecido adiposo e músculo esquelético (SUTHERLAND *et al.*, 2009; KIENS, 2006).

3) Regulação mediada por ácidos graxos do metabolismo de glicose estimulado por insulina no tecido adiposo e músculo esquelético (HIRABARA *et al.*, 2007; EPPS-FUNG *et al.*, 1997).

4) Quadro inflamatório localizado, mediado pela infiltração de células imunitárias no tecido adiposo (OUCHI *et al.*, 2011; CLEMENT e LANGIN, 2007).

Neste trabalho, os animais obesos apresentaram maior conteúdo de TAG intramuscular e intra-hepático quando comparados ao dos animais controles (TABELA 01) bem como significativo conteúdo de tecido adiposo ectópico associado ao músculo esquelético (ANEXO 03). O acúmulo de triacilgliceróis (TAG) e a hipertrofia do tecido adiposo em tecidos periféricos é

comumente observado na obesidade (MILES *et al.*, 2006), e parece ter início quando os adipócitos subcutâneos atingem seu limite de expansibilidade (BAYS, *et al.*, 2004). Como consequência, há aumento de ácidos graxos circulantes e um fluxo excessivo dos mesmos para outros tecidos corpóreos (BAYS *et al.*, 2004; SHIMABUKURO, 1998). Este fenômeno desencadeia efeito lipotóxico, mediado por metabólitos como diacilglicerol e ceramidas, o qual contribui com a resistência à insulina no músculo esquelético e no fígado (GALGANI *et al.*, 2008; ECKARDT *et al.*, 2011). Alguns trabalhos sugerem que o conteúdo intramuscular e hepático de TAG pode ser superior à adiposidade visceral como preditor de distúrbios na ação insulínica (GOODPASTER, 1997). Adicionalmente, a reversão deste quadro através de intervenções que reduzam a massa corporal, como o exercício, está significativamente correlacionada à melhora na sensibilidade à insulina (BAYS *et al.*, 2004). Neste sentido, apesar de nossos dados demonstrarem que o exercício não impediu o acúmulo hepático de TAG nos animais tratados com GMS, esta intervenção manteve o conteúdo intramuscular deste lipídeo em concentrações similares à de animais controle. Este efeito do exercício pode ser consequência da preservação da função de estocagem de lipídeos nos adipócitos, evitando que estes chegassem a atingir seus limites de expansibilidade. Isto reduziria os AGL circulantes e o fluxo destes substratos aos tecidos periféricos, contribuindo para menor acúmulo de TAG intramusculares. No entanto, este mecanismo não explicaria o resultado observado no tecido hepático. É possível que neste tecido a atividade lipogênica não tenha respondido de modo suficiente ao exercício. Contudo, este parâmetro não foi investigado neste trabalho. Adicionalmente, demanda energética aumentada no músculo esquelético, e maior capacidade oxidativa contribuiriam com a redução dos estoques intracelulares de TAG. É importante destacar que os mecanismos subjacentes aos efeitos dos TAG na resistência à insulina não estão completamente estabelecidos, e esta questão tem sido motivo de controvérsia na literatura. Por exemplo, foi observado que atletas de endurance possuem maior conteúdo intramuscular de TAG quando comparado ao de indivíduos sedentários, e o mesmo foi verificado para mulheres quando comparadas a homens (HOPPELER *et al.*, 2001; GOODPASTER *et al.*, 2001). Contudo, tais atletas

apresentam maior sensibilidade à insulina que sedentários, e mulheres costumam apresentar maior sensibilidade à insulina que homens com níveis similares de condicionamento físico (KIENS, 2006). É possível que, em obesos, a combinação de outros fatores associados ao metabolismo tecidual, como a capacidade oxidativa, modulem os efeitos dos TAG e seus metabólitos no desenvolvimento da resistência à insulina (HIRABARA *et al.*, 2007).

A capacidade oxidativa de ácidos graxos está diretamente associada à inflexibilidade metabólica na obesidade (RODEN, 2005; STORLIEN *et al.*, 2004; KELLEY., 2005; KELLEY *et al.*, 2002). Alguns trabalhos demonstram que a sensibilidade à insulina *in vivo* é relacionada com a capacidade de o músculo esquelético oxidar ácidos graxos *in vitro* (UKROPCOVA *et al.*, 2005). No entanto, neste trabalho o estudo do fluxo de ácidos graxos pela via oxidativa do músculo esquelético (FIGURA 21 A) demonstrou que a obesidade não comprometeu este parâmetro. Ainda assim, considerando que estes animais apresentam importante redução de sua massa muscular em consequência de distúrbios neuroendócrinos (TAMURA *et al.*, 2002), é provável que, no contexto do organismo, a capacidade de oxidação de ácidos graxos seja comprometida. Por outro lado, o tecido adiposo de animais obesos apresentou comprometimento da capacidade oxidativa de ácidos graxos (Figura 21 B). Este resultado poderia ser consequência de maior preferência tecidual para armazenamento deste substrato, em detrimento da oxidação. No entanto, a incorporação destes ácidos graxos ocorreu em quantidade similar à do controle (Figura 21 C). Analisados em conjunto, menor fluxo pela via oxidativa, sem modificação na incorporação, sugere menor captação dos ácidos graxos por este tecido. Esta interpretação corrobora a hipótese de que a expansibilidade dos adipócitos limita a captação de ácidos graxos, o que no contexto do organismo aumenta o fluxo deste substrato a tecidos periféricos. A capacidade oxidativa de ácidos graxos do músculo esquelético e do tecido adiposo foi significativamente maior nos animais exercitados. Neste sentido, sabe-se que o exercício modula o funcionamento de diversos passos limitantes para a oxidação deste substrato (TONKONOGLI e SAHLIN., 2002). Por exemplo, a passagem do nutriente pela membrana plasmática através de proteínas transportadoras (STEWART, 2000; CLARKE *et al.*, 2004), sua metabolização

por enzimas citoplasmáticas e mitocondriais (SPRIET, 2001) e a biogênese mitocondrial (BAAR, 2004). Estes efeitos são mediados pela modulação de diversas vias de sinalização e da regulação da expressão gênica (WACKERHAGE, 2006).

Adicionalmente, para o estudo do metabolismo de glicose estimulado por insulina, verificamos o fluxo de [U-¹⁴C]-glicose por diferentes vias metabólicas. Foram avaliados a síntese de lactato, a descarboxilação de glicose e produção de glicogênio pelo músculo esquelético e tecido adiposo (Figuras 22 e 23, respectivamente). O músculo esquelético dos animais obesos sedentários foi caracterizado por menor sensibilidade à insulina, uma vez que a produção de lactato e a descarboxilação de glicose não foram estimuladas na presença do hormônio. É possível que estes achados sejam consequência de menor captação de glicose estimulada pela insulina neste tecido. De fato, animais portadores de obesidade induzida por GMS apresentam menor conteúdo do transportador de glicose GLUT-4, o que compromete a habilidade deste hormônio em elevar a captação do substrato (PAPA *et al*, 1997). Contudo, a observação de que a síntese de glicogênio foi estimulada na presença de insulina, em amplitude significativamente superior àquela observada no grupo controle, não permite atribuir estes resultados exclusivamente à captação de glicose. O conjunto dos dados sugere a existência de desvio no fluxo do substrato, preferencialmente para a via glicogênica. Nos animais obesos exercitados, o fluxo da glicose pelas três vias foi adequadamente estimulado pela presença da insulina. Este resultado contribui para o entendimento da melhor sensibilidade ao hormônio, verificada no contexto corporal. De fato, foi demonstrado que o exercício melhora a ação insulínica modulando diversas etapas das vias de sinalização ativadas por este hormônio. Por exemplo, HEVENER, (2000) mostrou que o exercício de corrida moderado causa, em três semanas, aumento da fosforilação em tirosina do receptor de insulina e aumento da expressão de IRS-1 em animais resistentes à insulina. Adicionalmente, a sensibilidade à insulina também se mostrou comprometida no tecido adiposo de animais portadores de obesidade induzida por GMS. Neste tecido, o fluxo da glicose pelas diferentes vias estudadas não foi estimulada na presença do hormônio, sugerindo comprometimento na

capacidade da insulina em elevar a captação deste substrato. Esta interpretação é corroborada por estudos que demonstraram redução na captação de glicose estimulada por insulina (MACHO *et al.*, 2000), e redução no conteúdo do transportador de glicose GLUT-4 (MACHADO *et al.*, 1993) em adipócitos de ratos portadores de obesidade induzida por GMS. Em contrapartida, alguns estudos encontraram aumento na captação de glicose estimulada por insulina em adipócitos deste mesmo modelo (MARMO *et al.*, 1994). No entanto, esta aparente contradição pode ser decorrente da duração da obesidade no momento de realização das análises. Enquanto estes autores realizaram seus experimentos decorridos 90 dias da exposição ao GMS, nossas investigações sobre este parâmetro foram realizadas aos 150 dias. Por outro lado, houve aumento na descarboxilação de glicose estimulada pela insulina no tecido adiposo dos animais exercitados. Este dado indica que o exercício promove melhora na sensibilidade ao hormônio neste tecido. Contudo, este efeito foi observado em apenas uma das vias investigadas, sugerindo prevenção parcial dos distúrbios causados pelo tratamento com GMS.

Em adição a capacidade de metabolização de ácidos graxos e glicose, outro fator importante para a modulação da flexibilidade metabólica na obesidade é a interação entre estes substratos. Para estudar este fenômeno, investigamos os efeitos da exposição aguda (1h) do músculo esquelético e tecido adiposo ao ácido palmítico, sobre o metabolismo de glicose estimulado por insulina (Figuras 24 e 25, respectivamente). Em ambos os tecidos o ácido palmítico interferiu significativamente com a metabolização da glicose. No músculo esquelético o AG reduziu a síntese de lactato estimulada por insulina, o que poderia ser consequência de redução na captação de glicose. Contudo, o AG não afetou a descarboxilação da glicose e elevou a síntese de glicogênio estimulada por insulina. Em conjunto, estes resultados sugerem que o AG modifica o fluxo do substrato pelas diferentes vias metabólicas investigadas. Esta interpretação é corroborada por estudos onde as mesmas concentrações do ácido palmítico reduziram a síntese de lactato pelo músculo esquelético, sem reduzir a captação de glicose estimulada pela insulina, induzindo concomitante aumento na síntese de glicogênio (HIRABARA *et al.*, 2003). A

combinação destes dados sugere que o ciclo de Randle é um plausível mecanismo subjacente aos efeitos dos AG. Segundo esta hipótese, a metabolização de ácidos graxos pela célula compromete a ação de importantes enzimas da via glicolítica (RANDLE *et al.*, 1963) gerando intermediários que podem ser desviados para outras vias metabólicas. Por outro lado, no músculo esquelético dos animais obesos a síntese de lactato e a descarboxilação de glicose foram reduzidas, e não foi observado aumento na síntese de glicogênio. Apesar de não utilizarmos uma metodologia específica para avaliação da captação de glicose, é plausível supor que no músculo esquelético destes animais a redução na captação de glicose estimulada por insulina contribui de maneira mais significativa, como mediadora dos efeitos do ácido palmítico. De fato, os ácidos graxos são capazes de comprometer a captação da glicose através de modulação da sinalização insulínica, e existem evidências de que ativem a resistência à insulina em humanos e animais (LIU *et al.*, 2002). Estes efeitos são mediados por produtos derivados de sua metabolização como os diacilgliceróis e ceramidas (ECKARDT *et al.*, 2011), mas também por ação direta através da ativação de receptores de membrana (KIENS, 2006). Por exemplo, demonstrou-se que ácidos graxos saturados agem como ligantes para diversos receptores da família Toll-Like (TLR) (LEE *et al.*, 2003). Mais especificamente, o ácido palmítico pode ativar os receptores TLR 2 e 4, encontrados em tecidos como o músculo esquelético e o tecido adiposo, de modo tempo dependente (SENN, 2005). Tais receptores estimulam vias de sinalização relacionadas a processos inflamatórios, e diversos mediadores destas vias são enzimas com atividade serina/treonina kinase, capazes de interferir na sinalização insulínica (SONG *et al.*, 2006; SENN, 2005). Adicionalmente, no músculo esquelético dos animais exercitados apenas as concentrações mais elevadas do AG comprometeram a síntese de lactato, e o exercício não proporcionou proteção quanto aos demais efeitos estudados. De modo interessante, o tecido adiposo, mesmo sendo um ambiente continuamente exposto a elevadas concentrações de lipídios e seus metabólitos, também é sensível aos efeitos dos AG sobre o metabolismo de glicose estimulado por insulina (EVANS *et al.*, 2002; SONG *et al.*, 2006). Nossos dados confirmam esta hipótese e demonstram que apenas as

concentrações mais elevadas de AG apresentaram efeitos significativos neste tecido. Foi observado que, tanto para os animais obesos como para os controles, houve redução da descarboxilação de glicose e elevação na produção de glicogênio. De modo similar ao discutido anteriormente, estes dados sugerem que o ciclo de Randle é um mecanismo plausível para a explicação dos efeitos do AG. Neste tecido, o exercício não mostrou efeito preventivo sobre as ações deste metabólito. Contudo, é importante notar que os efeitos dos ácidos graxos sobre o metabolismo são dependentes de fatores como o tipo de AG, concentração, e o tempo de exposição à molécula (HIRABARA *et al.*, 2007; RODEN, 2004). Assim, apesar de ácidos graxos saturados e de cadeia longa serem significativamente associados à resistência à insulina (SENN, 2005), neste trabalho foram utilizadas concentrações fisiológicas do ácido palmítico, e abordado apenas suas ações agudas. No entanto, no contexto do organismo obeso as concentrações elevadas de AG circulantes são caracteristicamente um fenômeno crônico. Deste modo, os efeitos do exercício sobre as concentrações deste metabólito podem ser mais relevantes que seus prováveis efeitos gerando imunidade dos tecidos as variações de sua concentração.

Não obstante, as alterações metabólicas observadas na obesidade estão também associadas a diversas modificações no perfil de expressão gênica, expressão proteica e na atividade de inúmeras vias de sinalização (CLEMENT e LANGING, 2007). Muitas destas vias são comuns a diferentes tecidos, e muitas vezes diferentes vias convergem a determinados moduladores em um mesmo tecido. Uma vez que nossos dados demonstram papel relevante de distúrbios metabólicos no tecido adiposo no modelo estudado, investigamos neste tecido a via AMPK/PGC-1 α (proteína cinase ativada por amp /coativador 1 α dos receptores ativados por proliferadores de perossissomos – PPAR.) (Figuras 26 e 27, respectivamente). Esta via foi escolhida por sua atuação tanto na regulação do metabolismo como de processos inflamatórios envolvidos na obesidade, além de ser modulada pelo exercício em diferentes tecidos como fígado, músculo e tecido adiposo (BULER *et al.*, 2012; RUDERMAN *et al.*, 2003; HANDSCHIN e SPIEFELMAN., 2008; HAMMARSTEDT *et al.*, 2003). De fato, esta é uma das vias de integração entre

inflamação e metabolismo (discutido adiante), uma área que tem sido denominada imunometabolismo (MATHIS, 2011; OUCHI *et al.*, 2011). Nossos dados demonstram que a via da AMPK/PGC-1 α foi comprometida no tecido adiposo dos animais obesos. Ambas apresentaram expressão significativamente inferior àquela observada no tecido adiposo dos animais controles. Esta parece ser uma observação comum em indivíduos obesos (HANDSCHIN e SPIEGELMAN, 2008). A via AMPK/PGC1 α é conhecida como um sensor do estado energético celular, regulando processos como a oxidação de AG, a biogênese mitocondrial e a síntese de lipídeos (HARDIE e CARLING, 1997). Adicionalmente, a AMPK possui também efeitos antiinflamatórios bem conhecidos, como por exemplo, a inibição da via de sinalização do NF- κ B (YANG *et al.*, 2010; KATERELOS *et al.*, 2010), e a mediação do mecanismo de ação da adiponectina, uma adipocina caracteristicamente antiinflamatória (AGUILAR-SALINAS *et al.*, 2008; WEISS *et al.*, 2005). Foi demonstrado ainda que intervenções que promovam ativação da AMPK, como o exercício físico, promovem também redução na atividade de vias inflamatórias associadas à resistência à insulina, bem como reduzem a resposta de vias inflamatórias ativadas por ácidos graxos livres (RUDERMAN *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2010). O exercício regula esta via de diversas maneiras, como por exemplo, modulando o estado energético da célula, as concentrações de catecolaminas circulantes e de moléculas como a interleucina-6 (abordada adiante) (KELLY *et al.*, 2004; JAGER *et al.*, 2007). Em consonância, nossos dados demonstram que a redução na expressão da AMPK nos animais obesos exercitados foi menos severa que àquela observada nos animais obesos sedentários. No entanto, permaneceu ainda abaixo dos valores dos animais controles. Em adição, a função primordial do PGC-1 α é a regulação transcricional de vias metabólicas, e está associado a distúrbios na expressão de importantes mediadores da via de sinalização insulínica. Entretanto, este co-fator também modula a expressão de vias inflamatórias, e foi demonstrado que o exercício estimula sua atividade em diferentes tecidos (SUTHERLAND *et al.*, 2009; BULER *et al.*, 2012; HANDSCHIN e SPIELGELMAN, 2008). Neste trabalho, o exercício elevou de maneira significativa a expressão de PGC-1 α no tecido adiposo de animais controles. Contudo, não evitou a redução na expressão

desta proteína causada pelo tratamento com GMS. De modo interessante, foi demonstrado que o bloqueio β adrenérgico impede os estímulos do exercício sobre a expressão de PGC-1 α no tecido adiposo (SUTHERLAND *et al.*, 2009), sugerindo que o sistema nervoso autônomo medeia este processo. Deste modo, é possível que a inabilidade do exercício em reverter as profundas modificações autonômicas causadas pelo GMS, comprometa também seus efeitos sobre a modulação adequada da via do PGC-1 α . É importante observar que os mecanismos moleculares através dos quais o exercício regula a via AMPK/PGC-1 α , bem como a interação entre as mesmas, precisa ainda ser explorado em maiores detalhes.

A ação comprometida de vias antiinflamatórias é normalmente acompanhada de maior atividade em vias próinflamatórias no tecido adiposo. A soma destas alterações potencializa síntese e secreção de moléculas caracteristicamente próinflamatórias por este tecido, como por exemplo, o TNF α (fator de necrose tumoral alfa), MCP-1 (proteína quimioatrativa para monócitos) e o PAI-1 (inibidor do ativador do plasminogênio) (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993; FEINSTEIN *et al.*, 1993; GAUTHIER e RUDERMAN, 2010). Muitas destas moléculas comportam-se como quimiocinas (citocinas quimioatrativas) e, atuando em conjunto com hipóxia tecidual e ao estresse metabólico, podem ser responsáveis pela infiltração de células imunitárias no tecido adiposo. De fato, aumento na presença de células como macrófagos e linfócitos neste tecido é fenômeno observado tanto em humanos como em roedores obesos (OUCHI *et al.*, 2011; CLEMENT e LANGING, 2007; WEISBERG *et al.*, 2003). Neste trabalho, a infiltração de células imunitárias no tecido adiposo foi estudada pela técnica de citometria de fluxo (Figura 28 A e B). Nossos dados corroboram a presença de quadro inflamatório nos animais obesos, uma vez que revelaram maior conteúdo de macrófagos no tecido adiposo destes. Estas células comumente representam a maior proporção daquelas infiltradas no tecido adiposo, e estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento de resistência à insulina neste tecido (WEISBERG *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2003). Este dado é corroborado por estudos onde a inibição da infiltração de macrófagos no tecido adiposo de ratos preveniu o desenvolvimento de resistência à insulina, mesmo quando submetidos à dieta de alto teor lipídico

que desencadeou hiperadiposidade, esteatose hepática e elevado conteúdo intramuscular de triacilgliceróis. (GLASS, 2009). Adicionalmente, outras células imunitárias parecem atuar de modo coadjuvante no processo. Por exemplo, Nishimura *et al.* (2009) observaram elevada presença de linfócitos T CD8⁺ no tecido adiposo de animais obesos, e demonstraram que estas células secretam fatores humorais envolvidos na migração e ativação de macrófagos. Estes achados sugerem que células T CD8⁺ são importantes para a propagação da resposta inflamatória no tecido adiposo. Este mesmo estudo demonstrou que a depleção de células T CD8⁺ com anticorpos anti-CD8 foi capaz de reduzir a infiltração de macrófagos no tecido, o que levanta o questionamento sobre quais células do sistema imunitário dariam início a este processo. Nossos dados demonstraram maior conteúdo de células TCD8⁺ no tecido adiposo dos animais obesos, o que somado a observação sobre macrófagos, e sobre a via AMPK/PGC-1 α , compõem um quadro importante para a associação entre inflamação, metabolismo do tecido adiposo e flexibilidade metabólica neste modelo. De modo interessante, os animais obesos submetidos ao exercício apresentaram infiltração significativamente inferior de macrófagos e células TCD8⁺ no tecido adiposo, com valores similares àqueles observados nos controles. De fato, o exercício é reconhecido como intervenção com significativa ação anti-inflamatória, capaz de modular a infiltração de células imunitárias no tecido adiposo, e de promover ambiente fisiológico anti-inflamatório em cada sessão (PETERSEN e PEDERSEN., 2005; MATHUR e PEDERSEN., 2008). Os mecanismos subjacentes às ações anti-inflamatórias do exercício na obesidade podem ocorrer como consequência da redução da massa de tecido adiposo, principalmente no que condiz a redução no tamanho dos adipócitos (CINTI *et al.*, 2005), o que é corroborado pelos encontrados neste estudo. Contudo, os efeitos antiinflamatórios do exercício são observados mesmo quando a massa adiposa não é modificada (KAWANISHI *et al.*, 2010; ROSS e BRADSHAW., 2009). Neste sentido, demonstrou-se que o exercício pode modular a expressão de quimiocinas, bem como a expressão de moléculas de adesão no endotélio, reduzindo a migração celular para o tecido adiposo (GLEESON *et al.*, 2011; BISHOP *et al.*, 2009; KAWANISHI *et al.*, 2010). Adicionalmente, foi demonstrado que as ações do exercício sobre a

inflamação são, em grande medida, mediadas pela produção de fatores com função anti-inflamatória pelo músculo esquelético. Muitos destes fatores são citocinas, as quais convencionou-se a denominação de miocinas (PEDERSEN e EDWARD, 2009; PEDERSEN *et al.*, 2007; FEBBRAIO, 2007). Por exemplo, o músculo esquelético, quando estimulado pela contração, sintetiza e secreta na circulação moléculas como a interleucina 18 (IL-18), a IL-15 e a IL-6 (GLEESON *et al.*, 2011). Destas, a IL-6 tem ganhado notoriedade no que diz respeito aos mecanismos antiinflamatórios do exercício (PEDERSEN *et al.*, 2007). Malgrado ausência de consenso sobre as ações anti-inflamatórias desta molécula (KRISTIANSEN e POULSEN, 2005), diversos trabalhos demonstraram sua capacidade em bloquear vias pró inflamatórias. Por exemplo, demonstrou-se que a IL-6 estimula a síntese do receptor solúvel de TNF (TNFr), o qual neutraliza a ação do TNF circulante, estimula a síntese do antagonista para o receptor de IL-1 β (IL-1ra), o qual bloqueia os receptores celulares para IL-1 β , e estimula a síntese de interleucina 10 (IL10), a qual inibe a síntese TNF e IL-1 (STEENBERG *et al.*, 2003; STARKIE *et al.*, 2003; GLEESON *et al.*, 2011). Adicionalmente, durante o exercício as concentrações plasmáticas de IL-6 podem atingir valores 100 vezes superiores àquelas observadas no repouso (FISCHER, 2006; MECKEL, 2009). Não obstante, outras modificações induzidas pelo exercício também modulam a atividade inflamatória. Por exemplo, elevações nas concentrações plasmáticas de adrenalina, cortisol, hormônio do crescimento e proteínas de choque térmico exercem efeitos imunomodulatórios (CUPPS e FAUCI., 1982; BERGMANN., 1999; GLEESON *et al.*, 2011) e podem ter contribuído com os efeitos antiinflamatórios do exercício observados neste trabalho.

Os dados aqui apresentados demonstram que o tratamento com glutamato monossódico (GMS) compromete a flexibilidade metabólica. A importância de entendermos como diferentes tecidos contribuem com este quadro é reforçada pelas observações de que o músculo esquelético e o tecido adiposo manifestam disfunções metabólicas bastante peculiares na obesidade. O protocolo de exercício preveniu a evolução de diversos distúrbios causados pelo GMS, sendo eficiente na manutenção da flexibilidade metabólica. O conjunto destas informações demonstra a importância do exercício na

manutenção de funções do metabolismo, mesmo quando estão presentes extensas modificações neuroendócrinas. O completo entendimento dos mecanismos moleculares que medeiam a inflexibilidade metabólica na obesidade, bem como o papel de diferentes protocolos de exercício sobre estes parâmetros permanecem em aberto para serem elucidados.

7. CONCLUSÕES

O tratamento pós natal com glutamato monossódico predispõe a instalação de hiperadiposidade, acompanhado de comprometimento da flexibilidade metabólica em músculo esquelético e tecido adiposo. Animais tratados com GMS e submetidos a exercício são imunes a diversos distúrbios observados neste modelo.

O fluxo de ácidos graxos pela via oxidativa foi comprometido no tecido adiposo, mas não no músculo esquelético dos animais obesos. Os dados sugerem que a captação de ácidos graxos esta reduzida no tecido adiposo destes animais. O exercício eleva o fluxo dos ácidos graxos pela via oxidativa no músculo esquelético e no tecido adiposo de animais obesos e saudáveis.

O músculo esquelético de animais obesos apresenta alteração do metabolismo de glicose estimulado por insulina. Os resultados sugerem comprometimento do fluxo deste substrato pela via oxidativa. O exercício impede a instauração desta alteração.

O tecido adiposo de animais obesos apresenta comprometimento do metabolismo de glicose estimulado por insulina. Os resultados sugerem comprometimento na captação deste substrato. O exercício previne parcialmente a manifestação desta alteração.

O ácido palmítico compromete o metabolismo de glicose estimulado por insulina no músculo esquelético dos animais controles e obesos. Os dados sugerem que no músculo esquelético dos animais controles, os efeitos agudos do ácido palmítico estão relacionados ao ciclo de randle. No músculo esquelético dos animais obesos, os dados sugerem que estes efeitos estão relacionados ao comprometimento na captação da glicose.

O ácido palmítico compromete o metabolismo de glicose estimulado por insulina no tecido adiposo dos animais controles e obesos. Os dados sugerem que neste tecido os efeitos do ácido palmítico estão relacionados ao ciclo de Randle.

O exercício não evita os efeitos do ácido palmítico sobre o metabolismo de glicose estimulado por insulina no músculo esquelético ou tecido adiposo de animais obesos ou controles.

A expressão de AMPK e de PGC1 α é significativamente reduzida no tecido adiposo dos animais obesos. O exercício previne parcialmente a redução de AMPK e não afeta a de PGC1 α neste modelo.

O tecido adiposo dos animais obesos foi caracterizado por um estado inflamatório, com significativa infiltração de macrófagos e linfócitos TCD8⁺. O exercício previne o aumento na infiltração destas células.

Deste modo, nossos resultados demonstram que o exercício aeróbio crônico previne o comprometimento da flexibilidade metabólica no TA e no ME, melhorando a capacidade oxidativa de ácidos graxos e a sensibilidade à insulina, bem como restringido a progressão da adiposidade e modulando vias imunometabólicas.

8. REFERÊNCIAS

ABERNETHY, P.J.; THAYER, R.; TAYLOR, A.W. Acute and chronic responses of skeletal muscle to endurance and sprint exercise. A review. **Sports Med**, v.10, p.365–389.1990.

ACSM (American College of Sports Medicine) Position Stand. Appropriate intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. **Med Sci Sports Exerc**, v.33, p. 2145–2156, 2001.

ADA (American Diabetes Association) Position Statement. Physical activity/exercise and diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 26: S73–S77, 2003.

AFIFI, M.M.; ABBAS, A.M. Monosodium glutamate versus diet induced obesity in pregnant rats and their offspring **Acta Physiologica Hungarica**, v.98 (2), p. 177–188. 2011.

AGUILAR-SALINAS, C.A.; GARCIA, E.G.; ROBLES, L.; RIANO, D.; RUIZ-GOMEZ, D.G.; GARCIA-ULLOA, A.C.; High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.93, p.4075–4079. 2008.

AHREN, B.; WIERUP, N.; SUNDLER, F. Neuropeptides and the regulation of islet function. **Diabetes**, v.55, p.S98–S107. 2006.

AJUWON, K.M.; SPURLOCK, M.E. Palmitate Activates the NF- κ B Transcription Factor and Induces IL-6 and TNF α Expression in 3T3-L1 **Adipocytes J. Nutr.** V.135, p.1841–1846. 2005

ALESSI, D.R.; DOWNES, C.P. The role of PI 3-kinase in insulin action. **Biochim Biophys Acta**, v. 1436, n. 1-2, p. 151-164. 1998.

ALVAREZ-GUARDIA, D.; PALOMER, X.; COLL, T.; DAVIDSON, M.M.; CHAN, T.O.; FELDMAN, A.M.; LAGUNA, J.C.; VAZQUEZ-CARRERA, M. The p65 subunit of NF- κ B binds to PGC-1 α , linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. **Cardiovasc Res**, v.87 p.449–458. 2010.

ANDERSSON, A.; SJODIN, A.; OLSSON, R.; VESSBY, B. Effects of physical exercise on phospholipid fatty acid composition in skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** 274: p.432–438. 1998

ANDREAZZI, A.E.; SCOMPARIN, D.X.; MESQUITA, F.P.; BALBO, S.L.; GRAVENA, C.; OLIVEIRA, J.C. RINALDI, W.; GARCIA, R.M.G. Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. **Journal of Endocrinology**, v.201, p.351–359. 2009.

ARAKI E, LIPES MA, PATTI ME. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v. 372, p. 186-90. 1994

ARNER P. Impact of exercise on adipose tissue metabolism in humans. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.19, p.18–21, 1995.

ASANO, T.; KANDA, A.; KATAGIRI, H.; NAWANO, M.; OGIHARA, T.; INUKAI, K.; ANAI, M.; FUKUSHUMA, Y.; YAZAKI, Y.; HOOSHMAND-RAD, R.; HELDIN, C. H.; OKA, Y.; FUNAKI, M. P. P110beta is up regulated during differentiation of 3T3-L1 cells and contributes to the highly insulin-responsive glucose transport activity. **J Biol Chem**, v.275, n.23, p. 17671-17676. 2000.

BAAR K, Involvement of PPAR γ co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR α in the adaptive response to endurance exercise, **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p.269–273, 2004.

BACKER JM, MYERS MG Jr, SHOELSON SE. Phosphatidylinositol 3-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **EMBO J**, v.11, p.3469-79, 1992.

BAI, A.; MA, A.G.; YONG, M.; WEISS, C.R.; MA, Y.; GUAN, Q.; BERNSTEIN, C.N.; PENG, Z. AMPK agonist downregulates innate and adaptive immune responses in TNBS-induced murine acute and relapsing colitis. **Biochem Pharmacol**, v.80 p.1708–1717. 2010.

BALBO, S.L.; BONFLEUR, M.L.; CARNEIRO, E.M.; AMARAL, M.E.; FILIPUTTI, E.; MATHIAS, P.C. Parasympathetic activity changes insulin response to glucose and neurotransmitters. **Diabetes and Metabolism**, v.28, p.3S13–3S17. 2002.

BALBO, S.L.; MATHIAS, P.C.; BONFLEUR, M.L.; ALVES, H.F.; SIROTI, F.J.; MONTEIRO, O.G.; RIBEIRO, F.B.; SOUZA, A.C. Vagotomy reduces obesity in MSG-treated rats. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v.108, p.291–296. 2000.

BARON, V.; VAN OBBERGHEN, E.; mechanism of Insulin Action. **C R Seances Soc Biol Fil**, v. 189, n. 1, p. 25-41. 1995.

BAUMANN CA, RIBON V, KANZAKI M. CAP defines a second signaling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. **Nature**, v.407, p.202-7, 2000

BAYS, H.; MANDARINO, L.; DEFRONZO, R.A. Role of the Adipocyte, Free Fatty Acids, and Ectopic Fat in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus: Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Agonists Provide a Rational Therapeutic Approach. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** v89(2), p463–478. 2004

BERGEN HT, MIZUNO TM, TAYLOR J, and MOBBS CV. Hyperphagia and weight gain after gold-thioglucose: relation to hypothalamic neuropeptide Y and proopiomelanocorticotropin. **Endocrinology** v.139 p.4483–4488. 1998.

BERGMANN, M. Attenuation of catecholamine-induced immunosuppression in whole blood from patients with sepsis. **Shock** v.12, p.421–427. 1999.

BERNARDIS, L. L.; B. D. PATTERSON. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**, v.40, n.4, Apr, p.527-8. 1968.

BICKEL, P. E. Metabolic fuel selection:the importance of being flexible. **The Journal of Clinical Investigation**, v.114, p.1547-1549. 2004.

BISHOP, N. C., WALKER, G. J., GLEESON, M., WALLACE, F. A., HEWITT, C. R. A. Human T lymphocyte migration towards the supernatants of human rhinovirus infected airway epithelial cells: influence of exercise and carbohydrate intake. **Exerc. Immunol. Rev.** v.15, p.42–59. 2009.

BODEN, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and
Boden, G., Chen, X.; Ruiz, J.; White, J.; Rossetti, L.. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. **J. Clin. Invest**, v.93 p.2438–2446. 1994.

BODEN, G.; LEBED, B.; SCHATZ, M.; HOMKO, C.; LEMIEUX, S. Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. **Diabetes**, v.50, p.1612–1617. 2001.

BONEN, A.; LUIKEN, J.J.; ARUMUGAM, Y.; GLATZ, J.F.; TANDON, N.N. Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. **J Biol Chem** v275, p.14501–14508, 2000.

BOSANSKÁ, L.; MICHALSKY D.; LACINOVA Z.; DOSTALOVA I.; BARTLOVA M.; HALUZIKOVA D.; MATOULEK M.; KASALICKY M.; HALUZIK M. The influence of obesity and different fat depots on adipose tissue gene expression and protein levels of cell adhesion molecules. **Physiol. Res.**, v.59, p.79–88 2010.

BOYADJIEV, N. Increase of aerobic capacity by submaximal training and high fat diets. **Folia med (Plovdiv)**, v38, n1, p. 49 – 59, 1996.

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, May 7, p.248-54. 1976.

BRITO, G.A.P.; NUNES, E.A.; NOGATA, C.; YAMAZAKY , R.K.; NALIWAIKO, K.; CURI, R.; FERNANDES, L.C. Lymphocytes transfer [14C]-labeled fatty acids to skeletal muscle in culture; modulation by exercise. **Cell Biochem Funct**, v.28 p.278–282. 2010.

BRONWYN A.E.; POYNTEN, A.; LOWY, A.J.; FURLER, S.M. Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle, **Am J Physiol Endocrinol Metab** v.279 p.E554–E560. 2000.

BROZINICK, J.T.; ETGEN, G.J.; YASPELKIS, B.B; IVY, J.L. Glucose uptake and GLUT-4 protein distribution in skeletal muscle of obese Zucker rat. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, v.267, R236-R243, 1994.

BRUCE DG, CHISHOLM DJ, STORLIEN LH & KRAEGEN EW. Physiological importance of deficiency in early prandial insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes. **Diabetes**. v.37, p.736–744. 1988.

BULER, M.; AATSINKI, S.; SKOUMAL, R.; KOMKA, Z.; TÓTH, M. Energy-sensing Factors Coactivator Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Coactivator 1- α (PGC-1 α) and AMP-activated Protein Kinase Control Expression of Inflammatory Mediators in Liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v.287, p.1847-1860. 2012.

BUNYAN, B.Y. J.; MURRELL, E. A.; SHAH P. The induction of obesity in rodents by means of monosodium glutamate. **Br. J. Nutr.** v.35, p.25-39. 1976.

BURSTEIN, R.; ZISSHOLTZ, A.; ZICK-BACHAR Y, EPSTEIN Y, SHAPIRO Y, and KARNIELI E. Glucose uptake by adipocytes of obese rats: effect of one bout of acute exercise. **Can J Physiol Pharmacol**, v.70, p. 1473-1476, 1992.

CACICEDO, J.M.; YAGIHASHI, N.; KEANEY, J.F.; RUDERMAN, N.B. AMPK inhibits fatty acid-induced increases in NF- κ B transactivation in cultured human umbilical vein endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.324 p.1204–1209. 2004.

CAI, D.; DHE-PAGANON, S.; MELENDEZ, P.A; LEE, J; SHOELSON, S.E. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. **J Biol Chem**, v. 278, n. 28, p 25323-25330. 2003.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **Physiol Rev**, 84, p.277–359. 2004
Carvalho JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Bases moleculares e fisiológicas da resistência à insulina, **Hipertensão**, V.5, N.1, 2002.

CHARDIN, O.; CAMONIS, J. H.; GALE, N. W.; VAN AELST, L.; SCHLESSINGER, J.; WIGLER, M. H.; BAR-SAGI, D. Human Sas 1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. **Science**, v. 260, n. 5112, p. 1338-1343. 1993.

CHIANG SH, BAUMANN CA, KANZAKI M. Insulin stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. **Nature**, v.410, p.944-8, 2001.

CHIBALIN, A.V.; YU, M.; RYDER, J.W.; SONG, X.M.; GALUSKA, D.; KROOK, A.; WALLBERG-HENRIKSSON, H.; ZIERATH, J.R. Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin receptor substrates 1 and 2. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.97, p. 38-43, 2000.

CHOO, H.J.; KIM, J.H.; KWON, O.B.; LEE, C.S.; MUN, J.Y.; HAN, S.S.; YOON, Y.S.; YOON, G.; CHOI, K.M.; KO, Y.G. Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. **Diabetologia**, v.49, p.784–791. 2006.

CHRISTY, C.Y.; HUNT, D.; HANCOCK, J.; GARCIA-MACEDO, R.; MANDARINO, L.J.; IVY, J.L. Exercise training improves muscle insulin resistance not insulin receptor signaling in obese Zucker rats. **J Appl Physiol**, v.92, p.736–744, 2002.

CINTI, S.; MITCHELL, G.; BARBATELLI, G.; MURANO, I.; CERESI, E.; FALIOIA, E.; WANG, S.; FORTIER, Melanie.; Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **J. Lipid Res.**, v.46, p.2347–2355. 2005.

CLARK, S. F.; MOLERO, J.C.; JAMES, D.E. Release of insulin receptor substrate proteins from an intracellular complex coincides with the development of insulin resistance. **J Biol Chem**, v. 275, n. 6, p. 3819-3826. 2000.

CLARKE, D.C.; MISKOVIC, D.; HAN, X.X.; CALLES-ESCANDON, J.; GLATZ J.F.; LUIKEN, J.J.; HEIKKILA, J.J.; BONEN, A. Overexpression of membrane-associated fatty acid binding protein (FABPpm) in vivo increases fatty acid sarcolemmal transport and metabolism. **PhysiolGen**, v17: p.31–37, 2004.

CLEMENT, K.; LANGIN, D. Regulation of inflammation-related genes in human adipose tissue. **J. Intern. Med.** v.262, p.422–430. 2007.

Corcoran, M.P.; Lamon-Fava, S.; Fielding, R. A Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. **Am J Clin Nutr**, v.85, p.662–77. 2007.

COUILLARD, C.; MAURIEÁGE, P.; IMBEAULT, P.; PRUD'HOMME, D.; NADEAU, A. Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. **International Journal of Obesity**, v.24, p.782-788. 2000.

Craig, B.W. Hammons GT, Garthwaite SM, Jarett L, and Holloszy JO. Adaptation of fat cells to exercise: response of glucose uptake and oxidation to insulin. **J Appl Physiol** v.51, p.1500–1506, 1981.

Craig, B.W. Thompson K, and Holloszy JO. Effects of stopping training on size and response to insulin of fat cells in female rats. **J Appl Physiol**, v.54, p. 571–575, 1983.

CROSS, D. A.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMINGS, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by ptein kinase B. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 785-789. 1995.

CUPPS, T.R.; FAUCI, A.S. Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. **Immunol. Rev.**, v.65, p.133–155. 1982.

CZECH MP, CORVERA S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **J Biol Chem**, v.274, p.1865-8, 1999

DAWSON R, PELLEYMOUNTER MA, MILLARD WJ, LIU S, EPPLER B. Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. **Am J Physiol Endocrinol Metab** v.273 p.E202–E206. 1997.

DAWSON R, PELLEYMOUNTER MA, MILLARD WJ, LIU S, EPPLER B. Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. **Am J Physiol Endocrinol Metab** v.273 p.E202–E206. 1997.

PAPA, C.P.; A. M. VARGAS; J. L. DA SILVA; M. T. NUNES; U. F. MACHADO. GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. **Life Sci**, v.71, n.16, Sep 6, p.1917-28. 2002.

DELA, F.; PLOUG, T.; HANDBERG, A.; PETERSEN, L.N.; LARSEN, J.J.; MIKENES, K.J.; GALBO, H. Physical training increases muscle GLUT4 protein and mRNA in patients with NIDDM. **Diabetes**, v.43, p. 862-865, 1994.

DESCHENES, M.R.; OGILVIE, R.W. Exercise stimulates neovascularization in occluded muscle without affecting bFGF content. **Med Sci Sports Exercise**, v31, n.11, p. 1599 – 604, 1999.

DING, X.; LICHTI, K.; KIM, I.; GONZALEZ, F.J.; STAUDINGER, J.L. Regulation of constitutive androstane receptor and its target genes by fasting, cAMP, hepatocyte nuclear factor α , and the coactivator peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α . **J Biol Chem**, v.281, p.26540–26551. 2006.

DOLNIKOFF, M. S.; C. E. KATER; M. EGAMI; I. S. DE ANDRADE; M. R. MARMO. Neonatal treatment with monosodium glutamate increases plasma corticosterone in the rat. **Neuroendocrinology**, v.48, n.6, Dec, p.645-9. 1988.

DOLNIKOFF, M.; A. MARTIN-HIDALGO; U. F. MACHADO; F. B. LIMA; E. HERRERA. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.25, n.3, Mar, p.426-33. 2001.

DONG, L. Q.; ZHANG, R. B.; LANGLAIS, P.; HE, H.; ZHU, L.; LIU, F. Primary structure, tissue distribution, and expression of mouse phosphoinositide-dependent protein kinase-1, a protein kinase that phosphorylates and activates protein kinase C ζ . **J Biol Chem**, v. 274, n. 12, p. 8117-8122. 1999.

DRESNER, A., LAURENT, D., MARCUCCI, M., GRIFFIN, M. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. **J. Clin. Invest**, v3, n2, p.253-259, 1999

ECKARDT, K.; TAUBE, A.; ECKEL, J. Obesity-associated insulin resistance in skeletal muscle: Role of lipid accumulation and physical inactivity. **Rev Endocr Metab Disord**, v.12, p.163-172. 2011

EGAN, S.E.; GIDDINGS, B. W.; BROOKS, M.W.; BUDAY, L.; SIZELAND, A.M.; WEINBERG, R.A. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. **Nature**, v. 363, n. 6424, p. 45-51. 1993.

ENGEL, P. C.; J. B. JONES. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD⁺ in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. **Anal Biochem**, v.88, n.2, Aug 1, p.475-84. 1978.

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

ESPINAL, J.; R. A. CHALLISS; E. A. NEWSHOLME. Effect of adenosine deaminase and an adenosine analogue on insulin sensitivity in soleus muscle of the rat. **FEBS Lett**, v.158, n.1, Jul 11, p.103-6. 1983.

EVANS, J.L.; GOLDFINE, I.D.; MADDUX, B.A.; GRODSKY, G.M. **Endocr. Rev.** v.23, p.599–622. .2002.

EZAKI, O.; HIGUCHI, M.; NAKATSUKA, H.; KAWANAKA, K.; ITAKURA, H. Exercise training increases glucose transporter content in skeletal muscles more efficiently from aged obese rats than young lean rats. **Diabetes**, v.41, p. 920–926, 1992.

FANTIN VR, WANG Q, LIENHARD GE, KELLER SR. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.278, E127-E133. 2000.

FEBBRAIO, M. A. Exercise and inflammation. **J. Appl. Physiol.** v.103, p.376–377. 2007.

FEBBRAIO, M.; HAJJAR, D.P.; SILVERSTEIN, R.L.; CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. **J Clin Invest**, v.108 p.785–791. 2001.

FEINSTEIN, R., KANETY, H., PAPA, M. Z., LUNENFELD, B., KARASIK, A. Tumor necrosis factor- α suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. **J. Biol. Chem.** v.268, p.26055–26058. 1993.

FEUERER M.; HERRERO, L.; CIPOLLETTA, D.; NAAZ, A.; WONG, J.; NAYER A.; LEE, J.; GOLDFINE, A.B.; BENOIST, C.; SHOELSON, S.; MATHIS, D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. **Nature Medicine**, v.15, p.930 – 939. 2009.

FIEBIG, R.; GRIFFITHS, M.A.; GORE, M.T.; BAKER, D.H.; OSCAI, L.; NEY, DM, JI, L.L. Exercise training down-regulated hepatic lipogenic enzymes in meal-fed rats: fructose versus complex carbohydrate diets. **J Nutr**, v.128 p.810–817. 1998. FINGERLE-ROWSON, G.; ANGSTWURM, M.; ANDREESSEN, R.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Selective depletion of CD14+CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy. **Clin. Exp. Immunol.**, v.112, p.501–506. 1998.

FISCHER, C. P. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? **Exerc. Immunol. Rev.** v.12, p.6–33. 2006.

FOLLI F, SAAD MJ, BACKER JM, KAHN CR. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. **J Biol Chem**, v.267, p.22171-7, 1992.

FREITAS MATHIAS, P. C.; S. GRASSIOLLI; D. N. ROCHA; D. X. SCOMPARIN; C. GRAVENA. Transplantation of pancreatic islets from hypothalamic obese rats corrects hyperglycemia of diabetic rats. **Transplant Proc**, v.39, n.1, Jan-Feb, p.193-5. 2007.

FRIED, S. K.; BUNKIN, D. A.; GREENBERG, A. S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.83, p.847–850, 1998.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation **Arthritis Research & Therapy**, v.8, p.1-6. 2006.

GALBO, H., STALLKNECHT B., Regulation of fat metabolism in exercise. In: Maughan, R.J., Shirreffs, S.M. **Biochemistry of exercise IX**. Human Kinetics publishers: Champaign, p.63-71, 1996.

GALGANI, J.E.; MORO C.; RAVUSSIN E. Metabolic flexibility and insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.295, p1009–1017, 2008.

GALICA, S.; OAKHILLA, J.S.; STEINBERG, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.316, p.129–139. 2010.

GASTER, M. Metabolic flexibility is conserved in diabetic myotubes **Journal of Lipid Research**, v.48, p207-217. 2007.

GASTER, M.; RUSTAN, A.; AAS, V.; BECK-NIELSEN, H. Reduced lipid oxidation in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects may be of genetic origin: evidence from cultured myotubes. **Diabetes**. v.53 p.542–548. 2004.

GAUTHIER, M.; RUDERMAN, N.B. Adipose tissue inflammation and insulin resistance: all obese humans are not created equal. **Biochem. J.** v.430, p.e1–e4. 2010.

GAUTHIER, M.S.; O'BRIEN, E.L.; BIGORNIA, S.; MOTT, M.; CACICEDO, J.M.; XU, X.J.; GOKCE, N.; APOVIAN, C.; RUDERMAN, N. Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans. **Biochem Biophys Res Commun**. v.404 p.382–387. 2011.

GAVRILOVA, O.; MARCUS-SAMUELS, B.; GRAHAM, D.; KIM, J.K.; SHULMAN, G.I.; CASTLE, A.L.; VINSON, C.; ECKHAUS, M.; REITMAN, M.L. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipotrophic mice. **J Clin Invest**, v.105, p.271–278. 2000.

GHANIM, H.; ALJADA, A.; HOFMEYER, D.; SYED, T.; MOHANTY, P.; DANDONA, P. Circulating Mononuclear Cells in the Obese Are in a Proinflammatory State. **Circulation**, v.110, p.1564 –1571. 2004.

GLEESON, M.; MCFARLIN, B. K.; Flynn, M. G. Exercise and Toll-like receptors. **Exerc. Immunol. Rev.** v.12, p.34–53. 2006.

GLEESON, M.; BISHOP, N.C.; STENSEL, D.J.; LINDLEY, M.R.; MASTANA S.S.; NIMMO, M.A. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease, *Nature*, v.11, p. 607-616. 2011

GOBATTO CA, MELLO MA, SOUZA CT, RIBEIRO IA. The monosodium glutamate (MSG) obese rat as a model for the study of exercise in obesity. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. v.111(1-4). p89-101. 2002.

GOODPASTER, B.H.; HE, J.; WATKINS, S.; KELLEY, D.E. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, p.5755–5761, 2001.

GOODPASTER, B.H.; THAETE, F.L.; SIMONEAU, J.A.; KELLEY, D.E. Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. **Diabetes**, v.46, p.1579–1585. 1997.

GOODYEAR, L.J.; KAHN, B.B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. **Annual Review of Medicine**, v.49, p.235–261. 1998.

GOOSSENS, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. **Physiol Behav**, v.94, n.2, May 23, p.206-18. 2008.

GRASSIOLLI, S.; C. GRAVENA; P. C. DE FREITAS MATHIAS. Muscarinic M2 receptor is active on pancreatic islets from hypothalamic obese rat. **Eur J Pharmacol**, v.556, n.1-3, Feb 5, p.223-8. 2007.

GRIFFITHS, M.A.; FIEBIG, R.; GORE, M.T.; BAKER, D.H.; ESSER, K.; OSCAL, L.; JI, L.L. Exercise down-regulates hepatic lipogenic enzymes in food-deprived and refeed rats. **J Nutr**, v.126 p.1959–1971. 1996.

GROOP, L.C.; BONADONNA, R.C.; DEL PRATO, S.; RATHEISER, K.; ZYCK, K.; DEFRONZO, R.A. Effect of insulin on oxidative and non-oxidative pathways of glucose and FFA metabolism in NIDDM. Evidence for multiple sites of insulin resistance. **J Clin Invest**, v.84 p.205–213. 1989.

HAAS, T.L. Molecular control of capillarity growth in skeletal muscle. **Can J Appl Physiol**, v27, n.5, p. 491 – 515, 2002.

HAMMARSTEDT, P.A.; JANSSON, C.; WESSLAU, X.; SMITH U. Reduced expression of PGC-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, p. 578–582, 2003.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B.M. The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. *Nature*, v454, p.463-469 .2008.

HARDIE, D.; CARLING, D. The AMP-activated protein kinase—fuel gauge of the mammalian cell? **Eur. J. Biochem**. V.246, p.259–273. 1997.

HARDIE, D.G. AMP activated protein kinase: a key system mediating metabolic responses to exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.36, n.1, p.1249-1254, 2004.

HE, K.; ZHAO, L.; DAVIGLUS, M.L.; DYER, A.R.; HORN, L.V.; GARSIDE, D. Association of Monosodium Glutamate Intake With Overweight in Chinese Adults: The INTERMAP Study. **Obesity**. v.16, n.8, p.1875-1880. 2008.

HELGE, J. W.; AYRE, K.J.; HULBERT, A. J.; KIENS, B.; STORLIEN, L. H. Regular Exercise Modulates Muscle Membrane Phospholipid Profile in Rats. **J. Nutri**, V129, p. 1636–1642, 1999.

HENRY, R.R.; ABRAMS, L.; NIKOULINA, S.; CIARALDI, T.P.. Insulin action and glucose metabolism in nondiabetic control and NIDDM subjects. Comparison using human skeletal muscle cell cultures. **Diabetes**. v.44 p.936–946. 1995

HERMANUSSEN M, GARCÍA AP, SUNDER M. Obesity, voracity, and short stature: the impact of glutamate on the regulation of appetite. **Eur J Clin Nutr** v.60 p.25–31. 2006.

HERMANUSSEN M, TRESGUERRES JA. Does high glutamate intake cause obesity? **J Pediatr Endocrinol Metab** v.16 p.965–968. 2003. (A)

HERMANUSSEN M, TRESGUERRES JA. Does the thrifty phenotype result from chronic glutamate intoxication? A hypothesis. **J Perinat Med**, v.31 p.489–495. 2003. (B)

HEVENER, A.L.; REICHART, D.; OLEFSKY, J. Exercise and thiazolidinedione therapy normalize insulin action in the obese Zucker fatty rat. **Diabetes**, v. 49, p. 2154-2159, 2000.

HIRABARA, S.M.; SILVEIRA, L.R.; ABDULKADER, F.; CARVALHO, C.R.O.; PROCOPIO, J.; CURTI, R. Time-Dependent Effects of Fatty Acids on Skeletal Muscle Metabolism. *Journal of Cellular Physiology*, v.210, p.7–15. 2007.

HIRABARA, S.M.; CARVALHO, C.R.O.; MENDONÇA, J.R.; HABERA, E. P.; FERNANDES, L.C.; CURIA, R. Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolization. **FEBS Letters**, v.541, p.109-14. 2003.

HIRATA, A.E.; F. ALVAREZ-ROJAS; J. B. CARVALHEIRA; C. R. CARVALHO; M. S. DOLNIKOFF; M. J. ABDALLA SAAD. Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. **Life Sci**, v.73, n.11, p.1369-81. 2003.

HIRATA, A.E.; I. S. ANDRADE; P. VASKEVICIUS; M. S. DOLNIKOFF. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. **Braz J Med Biol Res**, v.30, n.5, p.671-4. 1997.

HOLLOSZY, J.O.; COYLE, E.F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. **Journal of Applied Physiology**, v. 56, p.831-838, 1984.

HOLZWARTH-MCBRIDE, M. A.; J. R. SLADEK, JR.; K. M. KNIGGE. Monosodium glutamate induced lesions of the arcuate nucleus. II. Fluorescence histochemistry of catecholamines. **Anat Rec**, v.186, n.2, , p.197-205. 1976.

HONG, E.G. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. **Diabetes**, v.58, p.2525–2535. 2009.

HOPPELER, H.; BOESCH, C. Postexercise fat intake repletes intramyocellular lipids but no faster in trained than in sedentary subjects. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.281 p.R760–R769. 2001.

HOROWITZ, J.F., KLEIN, S., Lipid metabolism during endurance exercise. **Am. J. Clin. Nutr.** v.72, p.558-63, 2000.

HOTAMISLIGIL, G., SHARGILL, N., SPIEGELMAN, B. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science** v.259, p.87–91. 1993.

HOTAMISLIGIL, G.S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. **Cell**. v.140 p.900–917. 2010.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v.444, p.860-867. 2006.

HOUWARD, J.A.; EGAN, P.C.; NEUFER, P.D.; FRIEDMAN, J.E.; WHEELER, W.S.; ISRAEL, R.G.; DOHM, G.L. Elevated skeletal muscle glucose transporter levels in exercise-trained middle-aged men. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 261, p. E437-E443, 1991.

HOUWARD, J.A.; SHAW, C.D.; HICKEY, M.S.; TANNER, C.J. Effect of short-term exercise training on insulin-stimulated PI 3-kinase activity in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 277, p. E1055-E1060, 1999.

HUGHES, V.A.; FIATARONE, M.A.; FIELDING, R.A.; KAHN, B.B.; FERRARA, C.M.; SHEPHERD, P.; FISHER, E.C.; WOLFE, R.R.; ELAHI, D.; EVANS, W.J. Exercise increases muscle GLUT4 levels and insulin action in subjects with impaired glucose tolerance. **Am J Physiol Endocrinol Metab** , v.264, p. E855-E862, 1993.

HUMMASTI, S.; HOTAMISLIGIL, G.S. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. **Circ Res**, v.107, p.579–591. 2010.

IRANI, B.G.; XIANG, Z.; MOORE, M.C.; MANDEL, R.J.; HASKELL-LUEVANO, C. Voluntary exercise delays monogenetic obesity and overcomes reproductive dysfunction of the melanocortin-4 receptor knockout mouse. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.326, p.638–644. 2005.

JAGER, S.; HANDSCHIN, C.; ST-PIERRE, J.; SPIEGELMAN, B.M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . **Proc Natl Acad Sci**, v.104, p.12017–12022. 2007.

JESSEN, N.; POLD, R.; BUHL, E.S.; JENSEN, L.S.; SCHMITZ, O.; LUND, S. Effects of AICAR and exercise on insulin-stimulated glucose uptake, signaling, and GLUT-4 content in rat muscles. **J Appl Physiol**, v.94, p. 1373–1379, 2003.

JO, J.; GAVRILOVA, O.; PACK, S.; JOU, W.; MULLEN, S.; SUMNER, A.E. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. **Computational Biology**, v.5, p.1-10. 2009.

JOVE, M.; PLANAVILA, A.; LAGUNA, J. C.; VAZQUEZ-CARRERA, M. **Endocrinology**, v.146, p.3087–3095. 2005.

KAHN, B. B.; J. S. FLIER. Obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**, v.106, n.4, p.473-81. 2000.

KATERELOS, M.; MUDGE, S.J.; STAPLETON, D.; AUWARDT, R.B.; FRASER, S.A.; CHEN, C.G.; KEMP, B.E.; POWER, D.A. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside and AMP-activated protein kinase inhibit signalling through NF- κ B. **Immunol. Cell Biol** . v.88(7), p.754-60. 2010.

KAWANISHI, N.; YANO, H.; YOKOGAWA, Y.; SUZUKI, K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. **Exerc Immunol Rev**, v.16 p.105-18. 2010

KELLEY, D.; MOKAN, M.; SIMONEAU, J.A.; MANDARINO, L.J. Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. **J. Clin. Invest.** v.92, p.93–98. 1993.

KELLEY, D.E. Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything. **J.Clin. Invest.** v.115, p.1699–1702. 2005.

KELLEY, D.E.; HE, J.; MENSHIKOVA, E.V.; RITOV, V.B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes**, v51, p.2944–2950. 2002.

KELLY, M.; KELLER, C.; AVILUCEA, P.R.; KELLER, P.; LUO, Z.; XIANG, X.; GIRALT, M.; HIDALGO, J.; SAHA, A.K.; PEDERSEN, B.K.; RUDERMAN, N.B. AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. **Biochem Biophys Res Commun** v.320, p.449–454. 2004.

KERKERIAN, L.; PELLETIER, G. Effects of monosodium L-glutamate administration on neuropeptide Y-containing neurons in the rat hypothalamus. **Brain Res** v.369, p.388–390. 1986.

KHAN, T.; MUISE, Eric S.; IYENGAR, P.; WANG, Z.V.; CHANDALIA, M.; ABATE, N.; ZHANG, B.B.; BONALDO, P.; CHUA, S.; SCHERER, P.E. Metabolic

Dysregulation and Adipose Tissue Fibrosis: Role of Collagen VI **Molecular and Cellular Biology**, p.1575–1591. 2009.

KIENS, B. Skeletal Muscle Lipid Metabolism in Exercise and Insulin Resistance **Physiol Rev**, v.86 p.205–243. 2006.

KIENS, B.; KRISTIANSEN, S.; JENSEN, P.; RICHTER, A.; TURCOTTE L.P. Membrane associated fatty acid binding protein (FABP_{pm}) in human skeletal muscle is increased by endurance training. **Biochem Biophys Res Commun**, v231, p.463 – 65, 1997.

KIM, H.J.; PARK, K.G.; YOO, E.K.; KIM, Y.H.; KIM, Y.N.; KIM, H.S.; KIM, H.T.; PARK, J.Y.; LEE, K.U.; JANG, W.G.; KIM, J.G.; KIM, B.W.; LEE, I.K. Effects of PGC-1 α on TNF- α -induced MCP-1 and VCAM-1 expression and NF- κ B activation in human aortic smooth muscle and endothelial cells. **Antioxid Redox Signal**, v.9 p.301–307. 2007.

KIM, Y.; INOUE, T.; NAKAJIMA, R.; NAKAE, K.; TAMURA, T.; TOKUYAMA, K.; SUZUKI, M. Effects of endurance training on gene expression of insulin signal transduction pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, v.210, p. 766-773, 1995.

KIM, Y.B.; INOUE, T.; NAKAJIMA, R.; SHIRAI-MORISHITA, Y.; TOKUYAMA, K.; SUZUKI, M. Effect of long-term exercise on gene expression of insulin signaling pathway intermediates in skeletal muscle. **Biochem Biophys Res Commun**, v.254, p. 720-727, 1999.

KIM, Y.B.; HICKNER, R.C.; CORTRIGHT, R.L.; DOHM, G.L, HOUMARD, J.A. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v279, p.1039–44. 2000.

KIRWAN, J.P.; DEL AGUILA, L.F.; HERNANDEZ, J.M.; WILLIAMSON, D.L.; O'GORMAN, D.J.; LEWIS, R.; KRISHNAN, R.K. Regular exercise enhances insulin activation of IRS-1-associated PI3-kinase in human skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v.88, p.797-803, 2000.

KOTANI, K.; OGAWA, W.; MATSUMOTO, M.; KITAMURA, T.; SAKAUE, H.; HINO, Y.; MIYAKE, K.; SANO, W.; AKIMOTO, K.; OHNO, S.; KASUGA, M. Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. **Mol Cell Biol**, v.18, n. 12, p 6971-6982. 1998.

KRAEGER, E.W.; CLARK, P.W.; JENKINS, A.B.; DALEY, E.A; CHISHOLM, D.J.; STORLIEN, L.H. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. **Diabetes**, v. 40, p.1397–1403, 1991.

KRAUS, R.M.; STALLINGS, H.W.; YEAGER, R.C.; GAVIN, T.P. Circulating plasma VEGF response to exercise in sedentary and endurance-trained men. **J Appl Physiol**, v96, n.4, p. 1445 – 50, 2004.

KRAUS, W. E.; HOUMARD, J.A.; DUSCHA, B.D.; KNETZGER, K.J.; WHARTON, M.B.; MCCARTNEY, J.S. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. **N. Engl. J. Med.** v.347, p.1483–1492. 2002.

KRETSCHMER, B.D.; SCHELLING, P.; BEIER, N.; LIEBSCHER, C.; TREUTEL, S.; KRUGER, N.; SCHOLZ, H.P.; HAUS, A. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. **Life Sciences**, v.76, p.1553–1573. 2005.

KRISTIANSEN, O. P.; MANDRUP-POULSEN, T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? **Diabetes**, v.54, p.S114–S124. 2005.

LAGE, R.; DIEGUEZ, C.; VIDAL-PUIG, A.; Lopez, M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med*, v.14 p.539–549. 2008.

LEE, J.Y.; PLAKIDAS, A.; LEE, W. H.; HEIKKINEN, A.; CHANMUGAM, P.; BRAY, G.; HWANG, D. H. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. **J. Lipid Res**, v.44, p.479–486. 2003.

LEE, W.J.; KIM, M.; PARK, H.; KIM, H.S., JEON, M.J.; OH, K.S., KOH, E.H. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR α and PGC-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.349, , p.519-524. 2006.

LEIGHTON, B.; COOPER, G.J.S. Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro. **Nature**, v. 335, p.632-635, 1989.

LIANG, H.; WARD, W.F. PGC-1: a key regulator of energy metabolism. **AdvPhysioEduc**, v.30, p.145–151, 2006.

LIETZKE SE, BOSE S, CRONIN T. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. **Mol Cell**, v.6, p. 385-94. 2000.

Lin J, Wu H, Tarr PT, et al, Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibers. **Nature** v.418, n.6899, p. 797-801, 2002.

LIN, J.; WU, H.; TARR, P.T.; ZHANG, C.Y.; WU, Z.; BOSS, O.; MICHAEL, L.F.; PUIGSERVER, P.; ISOTANI, E.; OLSON, E.N.; LOWELL, B.B.; BASSEL-DUBY, R.; SPIEGELMAN, B.M. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, v.418, p.797–801. 2002.

LIU SC, WANG Q, LIENHARD GE, KELLER SR. Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. **J Biol Chem**. v.274, p.18093-9. 1999,

LIU, R.H.; MIZUTA, M.; KUROSE, T.; MATSUKURA, S. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.** v. 26, p.318–326. 2002.

LLOYD, P.G.; PRIOR, B.M.; YANG, H.T.; TERJUNG, R.L. Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. **Am J Physiol**, v284, n.5, p. 1668 – 78, 2003.

LUMENG, C.N.; MAILLARD, I.; SALTIEL, A. R. T-ing up inflammation in fat. v.15 n.8 p.846-847. 2009.

LUSTIG, R.H. Autonomic dysfunction of the beta-cell and the pathogenesis of obesity. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v4, p.23–32. 2003.

MACHADO, U.F.; SHIMIZU, Y.; SAITO, M. Decreased glucose transporter (GLUT 4) content in insulin-sensitive tissues of obese aurothioglucose- and monosodium glutamate-treated mice. **Hormone and Metabolic Research**, v.25 p.462–465. 1993.

MACHO, L.; M. FICKOVA; JEZOVA; S. ZORAD. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. **Physiol Res**, v.49, p.S79-85. 2000.

MARMO, M.R.; DOLNIKOFF, M.S; KETTELHUT, I.C; MATSUSHITA, D.M.; HELL, N.S.; LIMA, F.B. Neonatal monosodium glutamate treatment increases epididymal adipose tissue sensitivity to insulin in three-month old rats. **Braz J Med Biol Res**. v.27(5), p.1249-53. 1994

MARTIN, W.H. Effects of acute and chronic exercise on fat metabolism. **Exercise Sport Sci Rev**, v.24 p.203–231. 1996.

MARTINS, A. C.; K. L. SOUZA; M. T. SHIO; P. C. MATHIAS; P. I. LELKES; R. M. GARCIA. Adrenal medullary function and expression of catecholamine-synthesizing enzymes in mice with hypothalamic obesity. **Life Sci**, v.74, n.26, May 14, p.3211-22. 2004.

MATHIS, D. Immunometabolism: an emerging Frontier. *Nature reviews immunology*, v.11 p.81-83. 2011.

MATHUR, M.; PEDERSEN, B.K. Exercise as a mean to control low-grade inflammation. **Mediators Inflamm.**, p.1-6. 2008.

MECKEL, Y. The effect of a brief sprint interval exercise on growth factors and inflammatory mediators. **J. Strength Cond. Res**. v.23, p.225–230. 2009.

MEEH, R.C.R.; SCHRAUWEN-HINDERLING, V.B.; MOONEN-KORNIPS E.; SCHAART, G.;1 MENSINK, M.; PHIELIX, E.; VAN DE WEIJER, T. Restoration of Muscle Mitochondrial Function and Metabolic Flexibility in Type 2 Diabetes by Exercise Training Is Paralleled by Increased Myocellular Fat Storage and Improved Insulin Sensitivity. **Diabetes**, v. p.1-17. 2009.

MEISTER, B.; CECCATELLI, S.; HOKFELT, T. Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions **Exp Brain Res** v.76 p.343-368. 1989.

MILES, J.L.; HUBER, K.; THOMPSON, N.M.; DAVISON, M.; BREIER, B.H. Moderate Daily Exercise Activates Metabolic Flexibility to Prevent Prenatally Induced Obesity. **Endocrinology**, v.150(1), p.179–186. 2009.

MIURA, S.; KAWANAKA, K.; KAI, Y.; TAMURA, M.; GOTO, M.; SHIUCHI, T.; MINOKOSHI, Y.; EZAKI, O. An increase in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) mRNA in response to exercise is mediated by β -adrenergic receptor activation. **Endocrinology**, v.148, p.3441–3448. 2007.

Monno A *et al.* Extracellular glutamate levels in the hypothalamus and hippocampus of rats after acute or chronic oral intake of monosodium glutamate. **Neurosci Lett** 1995;193:45–48.

MOORADIAN, A. D. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, v.5, n.3, p.150-9. 2009.

MORARI, J.; TORSONI, A.S.; ANHE, G.F.; ROMAN, E.A.; CINTRA, D.E.; WARD, L.S.; BORDIN, S.; VELLOSO, L.A. The role of proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α in the fatty-acid-dependent transcriptional control of interleukin-10 in hepatic cells of rodents. **Metab Clin Exp**, v.59, p.215–223. 2010.

MORRISA M.J.; TORTELLIA, C.F., FILIPPISB, A.; PROIETTOB, J. Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. **Regulatory Peptides** v.75, p. 441–447. 1998.

MUSI, N.; FUJII,N.; HIRSHMAN, M.; EKBERG, I.; FRÖBERG, Sven.; LJUNGQVIS, Olle.; Anders Thorell² and Laurie J. Goodyear¹ AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Activated in Muscle of Subjects With Type 2 Diabetes During Exercise. *Diabetes*, v.50 ,no.5, p.921-927. 2001.

MYERBURG, M.M.; KING, J.D.; OYSTER, N.M.; FITCH, A.C.; MAGILI, A.; BATY, C.J.; WATKINS, S.C.; KOLLS, J.K.; PILEWSKI, J.M.; HALLOWS, K.R. AMPK agonists ameliorate sodium and fluid transport and inflammation in cystic fibrosis airway epithelial cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.42 p.676–684. 2010.

NATH, N.; GIRI, S.; PRASAD, R.; SALEM, M.L.; SINGH, A.K.; SINGH, I.; 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside: a novel immunomodulator with therapeutic efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol** v.175 p.566–574. 2005.

NISHIMURA, S.; I. MANABE; M. NAGASAKI; K. ETO; H. YAMASHITA; M. OHSUGI; M. OTSU; K. HARA; K. UEKI; S. SUGIURA; K. YOSHIMURA; T. KADOWAKI; R. NAGAI. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nat Med**, v.15, n.8, Aug, p.914-20. 2009.

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

- OLEFSKY, J.M.; GLASS, C.K. Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance **Annu. Rev. Physiol**, v.72 p.219–46. 2010.
- OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v.164 p.719–721. 1969.
- OLUBA, O.M.; ONYENEKE, E.C.; IDONIJE, B.O.; EIDANGBE, G.O. Effect of Soy Protein on Monosodium Glutamate (MSG)-induced Obesity in Rats. **Asian J Pharm Biol Res** p8-14. 2011.
- OSCAI, L.B., ESSER, K. Regulation of muscle triglyceride metabolism in exercise. In: Maughan, R.J., Shirreffs, S.M. **Biochemistry of exercise IX**. Human Kinetics publishers: Champaign, p.105 - 115, 1996.
- OUCHI, N.; PARKER, J.L.; LUGUS, J.J.; WALSK, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Rev. Immunol.* v.11, p.85–97. 2011.
- OUMARD, J.A.; SHINEBARGER, M.H.; DOLAN, P.L.; LEGGETT-FRAZIER, N.; BRUNER, R.K.; MCCAMMON, M.R.; ISRAEL, R.G.; DOHM, G.L. Exercise training increases GLUT-4 protein concentration in previously sedentary middle-aged men. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 264, p. E896-E901, 1993.
- PALOMER, X.; ALVAREZ-GUARDIA, D.; RODRIGUEZ-CALVO, R.; COLL, T.; LAGUNA, J.C.; DAVIDSON, M.M.; CHAN, T.O.; FELDMAN, A.M.; VAZQUEZ-CARRERA, M. TNF- α reduces PGC-1 α expression through NF- κ B and p38MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. **Cardiovasc Res**, v.81 p.703–712. 2009.
- PAPA, P.C.; SERAPHIM, P.M.; MACHADO, U.F. Loss of weight restores GLUT 4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated obese mice. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v.21, p.1065–1070. 1997.
- PARISI, M.A.; CLAYTON, D.A. Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. **Science**, v.252, p.965-969,1991.
- PARK, S.Y.; DAN, J.; KIM J.Y.. Attenuated Sympathetic Activity and Its Relation to Obesity in MSG Injected and Sympathectomized Rats. **Korean J Physiol Pharmacol**, v.11, p.155 - 161. 2007.
- PATTI ME, KAHN CR. The insulin receptor – a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 9, p.89-109, 1998.
- PEDERSEN, B. K., AKERSTROM, T. C., NIELSEN, A. R., FISCHER, C. P. Role of myokines in exercise and metabolism. **J. Appl. Physiol.** v.103, p.1093–1098. 2007.
- PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M.A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiol. Rev.** v.88, p.1379–1406. 2008.

PEDERSEN, B.K.; EDWARD, F.A. Distinguished Lecture: Muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines. **J. Appl. Physiol**, V.107, p.1006–1014. 2009.

PEDERSEN, B.K.; FEBBRAIO, M.A.; ROBERT A. Interleukin-6 does/does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. **J Appl Physiol**, v.102 p.814-816, 2007.

PELUSO, G.; PETILLO, O.; MARGARUCCI, S.; Decreased mitochondrial carnitine translocase in skeletal muscles impairs utilization of fatty acids in insulin-resistant patients. **Front Biosci**, v.7, p.109 –16. 2002

PENKOWA, M.; KELLER, CHARLOTTE.; KELLER, P.; JAUFFRED, S.; PEDERSEN, B.K.; Immunohistochemical detection of interleukin-6 in human skeletal muscle fibers following exercise **The FASEB Journal**, v.17 p.2166-2168. 2003.

PERES, S.B.; MORAES, S.M.F.; COSTA, C.E.M.; BRITO, L.C.; TAKADA, J.; ANDREOTTI, S.; MACHADO, M.A.; ALONSO-VALE, M.I.C.; SILVA, C.N.B.; LIMA, F.B. Endurance exercise training increases insulin responsiveness in isolated adipocytes through IRS/PI3-kinase/AKT pathway. **J Appl Physiol**, v.98, p. 1037-1043. 2005.

PERSEGHIN, G.; BONFANTI, R.; MAGNI, S.; LATTUADA, G.; DE COBELLI, F.; CANU, T.; ESPOSITO, A.; SCIFO, P.; NTALI, G.; COSTANTINO, F.; BOSIO, L.; RAGOGNA, F.; DEL MASCHIO, A.; CHIUMELLO, G.; LUZI, L. Insulin resistance and whole body energy homeostasis in obese adolescents with fatty liver disease. **American Journal Physiol**, v.291, p.697-703. 2006 .

PERSEGHIN, G.; PETERSEN, K.; SHULMAN, G.I. **Int. J. Obes. Relat.**

PERSEGHIN, G.; PRICE, T.B.; PETERSEN, K.F.; RODEN, M.; CLINE, C.W.; GEROW, K.; ROTHMAN, D.L.; SHULMAN, G.I. Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. **N Engl J Med**, v.335, p. 1357-1362, 1996.

PESSIN JE, SALTIEL AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest**, 106: 165-9, 2000.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J. Appl. Physiol.** 98, 1154–1162 (2005).

POULIOT, M.C.; DESPRES, J.P.; NADEAU, A.; MOORJANI, S.; PRUD'HOMME, D.; LUPIEN, P.J.; TREMBLAY, A.; BOUCHARD, C. Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. **Diabetes**. v.4, p.826-34. 1992.

PUIGSERVER, P.; WU, Z.; PARK, C.W.; GRAVES, R.; WRIGHT, M.; SPIEGELMAN, B.M. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**, v.92, p.829–839. 1998.

- RANDLE, P.J., Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: The glucose fatty acid cycle after 35 years. **Diabetes Metab. Rev.** v.14, p.263-83, 1998.
- RANDLE, P.J.; GARLAND, P.B.; HALES, C.N.; NEWSHOLME, E.A. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity, and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet** v.1, p.785–789, 1963.
- RANDLE, P.J.; PRIESTMAN, D.A.; MISTRY, S.; HALSALL, A. Mechanisms modifying glucose oxidation in diabetes mellitus. **Diabetologia.** v.37(S2):S155-S61, 1994.
- RASMUSSEN, B.B.; WOLFE, R.R.; Regulation of fat acids oxidation in skeletal muscle. **Annu Rev Nutr**, v.19, p.463-84. 1999.
- RIBON V, PRINTEN JA, HOFFMAN NG, KAY BK, SALTIEL AR. A novel, multifunctional c-CBL binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. **Mol Cell Biol**, v.18, p.872-9, 1998.
- RIBON V, SALTIEL AR. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-CBL in 3T3-L1 adipocytes. **Biochem J.** V.324,(Pt3), p.839-45, 1997.
- ROBERTS, C.K.; WON, D.; PRUTHI, S.; KURTOVIC, S.; SINDHU, R.K.; VAZIRI, N.D.; R. BARNARD, J. Effect of a short-term diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation, MMP-9, and monocyte chemotactic activity in men with metabolic syndrome factors. **J Appl Physiol**, v.100, p.1657–1665. 2006.
- ROCHE, H. M.; M. J. GIBNEY. Effect of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on fasting and postprandial triacylglycerol metabolism. **Am J Clin Nutr**, v.71, n.1 Suppl, Jan, p.232S-7S. 2000.
- RODEN, M. How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. **News Physiol Sci.** v.19. p.92-96. 2004.
- RODEN, M.; Muscle triglycerides and mitochondrial function: possible mechanisms for the development of type 2 diabetes. **Int J Obes** v.29, p.S111–S115. 2005
- ROGERS, M.A.; YAMAMOTO, C.; KING, D.S.; HAGBERG, J.M.; EHSANI, A.A.; HOLLOSZY, J.O. Improvements in glucose tolerance after 1 week of exercise in patients with mild NIDDM. **Diabetes Care** v.11, p 613-618, 1988.
- ROJAS FA, CARVALHO CR, PAEZ-ESPINOSA V, SAAD MJ. Regulation os cardiac Jak-2 in animal models of insulin resistance. **IUBMB Life**, V.49, p.501-9, 2000.
- ROMANYUKHA, A.A.; RUDNEV, S.G.; SIDOROV, I.A. Energy cost of infection burden: an approach to understanding the dynamics of host-pathogen interactions. **J.Theor. Biol**, v.241, p.1-13. 2006.

ROSS, R.; BRADSHAW, A.J. The future of obesity reduction: beyond weight loss. **Nature Rev. Endocrinol.** v.5, p.319–325. 2009.

RUDERMAN, N.B.; PARK, H.; KAUSHIK, V.K.; DEAN, D. AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise **Acta Physiol Scand**, v.178, p.435–442. 2003.

RUDERMAN, N.B.; XU, X.J.; NELSON, L.; CACICEDO, J.M.; SAHA, A. K.; LAN, F.; IDO, Y. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*, v.298, p.751–E760. 2010.

RYYSY, L.; HAKKINEN, A.M.; GOTO, T.; VEKAVAARA, S.; WESTERBACKA, J.; HALAVAARA, J.; YKI-JARVINEN, H. Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. **Diabetes**, v.49, p.749–758. 2000.

SAAD MJ, ARAKI E, MIRALPEIX M, ROTHENBERG PL, WHITE MF, KAHN CR. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. **J Clin Investm**, v.90, p.1839-49, 1992.

SAAD MJ, FOLLI F, KEHN JA, KAHN CR. Modulation of insulin receptor, insulin substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. **J Clin Invest.** V.92, p.2065-72, 1993.

SALMINEN, A.; HYTTINEN, J.M.T.; KAARNIRANTA, K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. **J Mol Med**, v.89, p.667–676. 2011.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, **Nature**, v 414, p.799-806. 2001.

SASAKI, Y.; SHIMADA, T.; IIZUKA, S.; SUZUKI, W. Effects of bezafibrate in nonalcoholic steatohepatitis model mice with monosodium glutamate-induced metabolic syndrome. **European Journal of Pharmacology**, v.662, p.1–8. 2011.

Scarpulla, R. C. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. V.29, p.109-119, 1997.

SCARPULLA, R.C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*, v.88, p.611–638. 2008.

SCHWARTZ, M.W.; PORTE, D. Diabetes, obesity, and the brain. **Science**, v.307, p.375–379. 2005.

SCOMPARIN, D.X.; GRASSIOLLI, S.; MARCAL, A.C.; GRAVENA, C.; ANDREAZZI, A.E.; MATHIAS, P.C. Swim training applied at early age is critical to adrenal medulla catecholamine content and to attenuate monosodium L-glutamate-obesity onset in mice. **Life Sciences**, v.79, p.2151–2156. 2006.

SEKI, E.; BRENNER, D.A. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. **Hepatology**, v.48, p.322-35. 2008.

SENN, J.J. Toll-like Receptor-2 Is Essential for the Development of Palmitate-induced Insulin Resistance in Myotubes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p.26865–26875. 2006.

SERAPHIM, P. M.; M. T. NUNES; U. F. MACHADO. GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. **Braz J Med Biol Res**, v.34, n.10, Oct, p.1353-62. 2001.

SHEPHERD PR, NAVE BT, SIDDLE K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen syntase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. **Biochem J**. V.305, p.25-8, 1995.

SHEPHERD, P.; KAHN, B. Glucose transporters and insulin action. **The New England Journal of Medicine**, p248-257, 1999

SHIMABUKURO, M.; ZHOU, Y.T.; LEVI, M.; UNGER, R.H. Fatty acid induced _ cell apoptosis. **Proc Natl Acad Sci**, v.95, p.2498–2502. 1998.

SHORT, K.R.; VITTONI, J.L.; BIGELOW, M.L. Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. **Diabetes**, v.52, n.8, p. 1888-1896, 2003.

SHULDINER A.R.; McLENITHAN J.C. Genes and pathophysiology of type 2 diabetes: more than just the Randle cycle all over again. **The Journal of Clinical Investigation**, v.114, p. 1414. 2004.

SOMWAR, R.; KIM, D. Y.; SWEENEY, G.; HUANG, C; NIU, W.; LADOR, C.; RAMLAL, T.; KLIP, A. GLUT4 translocation precedes the stimulation os glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activations of GLUT4 via p38 mitogen activated protein kinase. **Biochen J**, v. 359, n. Pt 3, p. 639-649. 2001.

SONG M.J.; KIM, K.H.; YOON, J.M.; KIM, J.B. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.346, p.739–745. 2006.

SPRIET, L.L. et al., Regulatory mechanisms in the interaction between carbohydrate and lipid oxidation during exercise. **Acta Physiol Scand**.178:443 – 52, 2003.

SPRIET, L.L., Regulation of muscle fat oxidation during exercise in humans. **Med Sci Sports Exercise**,1477-84, 2002.

STALLKNECHT, B.; VINTEN, J.; PLOUG, T.; GALBO, H. Increased activities of mitochondrial enzymes in white adipose tissue in trained rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v.261 p.410–414. 1991.

STANDAERT, M. L.; GALLOWAY, L.; KARNAM, P.; BANDYOPADHYAY, G.; MOSCAT, J.; FARESE, R.V. Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. **J Biol Chem**, v. 272, n.48, p. 30075-30082, 1997.

STARKIE, R.; OSTROWSKI, S.R.; JAUFFRED, S.; FEBBRAIO, M.; PEDERSEN, B.K. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. **FASEB J**, v.17, p.884–886. 2003.

STEENSBERG, A.; FISCHER, C.P.; KELLER, C.; MOLLER, K.; PEDERSEN, B.K. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* v.285, p.E433–E437. 2003.

STEINBERG, D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. **Nat Med**, v.8, n.11, p.1211-7. 2002.

STEINBERG, G.R.; KEMP, B.E. AMPK in health and disease. **Physiol Rev**, v.89, p.1025–1078. 2009

STEINBERG, G.R.; MICHELL, B.J.; VAN DENDEREN, B.J.W.; WATT, M.J.; CAREY, A.L.; FAM, B.C.; ANDRIKOPOULOS, S.; PROIETTO, J.; GORGUN, C.Z.; CARLING, D.; HOTAMISLIGIL, G.S.; FEBBRAIO, M.A.; KAY, T.W.; KEMP, B.E. Tumor necrosis factor α -induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab*, v.4, p.465–474. 2006.

STEWART, J.M. The cytoplasmic fatty-acid-binding proteins: thirty years and counting. **Cell. Mol. Life. Sci.** v.57. p.1346-1359, 2000.

STORLIEN, L.; OAKES, N.D.; KELLEY, D.E. Adipose tissue–liver–muscle interactions leading to insulin resistance. **Proceedings of the Nutrition Society.** v. 63, p.363–368. 2004.

SUN, X.J.; CRIMMINS, D.L.; MYERS, M.G., Jr.; MIRALPEIX, M.; WHITE, M.F. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. **Mol Cell Biol**, v.13, n. 12, p. 7418-7428.1993.

SUTHERLAND, L.N.; BOMHOF, M.R.; CAPOZZI, L.C.; BASARABA, S.A.U. WRIGHT, D.C. Exercise and adrenaline increase PGC-1 α mRNA expression in rat adipose tissue, **The Journal of Physiology**, v.587, p.1607-1617. 2009

TAMURA, H.; KAMEGAI, J.; SHIMIZU, T.; ISHII, S.; SUGIHARA, H.; OIKAWA, S. Ghrelin stimulates GH but not food intake in arcuate nucleus ablated rats. **Endocrinology**, v.143, n.9, Sep, p.3268-75. 2002.

THIRONE AC, CARVALHEIRA JB, HIRATA AE, VELLOSO LA, SAAD MJ. Regulation of CBL-associated protein/CBL pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance. **Endocrinology**, v,145, p.281-93. 2004.

THONG, F. S.; DUGANI, C. B.; KLIP, A. Turning Signals On and Off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway. **Physiology (Bethesda)**, v. 20, n. 4, p. 271-284, 2005.

THYFAULT, J.P.; KRAUS, R.M.; HICKNER, R.C.; HOWELI, A.W.; WOLFE, R.R.; DOHM, G.L. Impaired plasma fatty acid oxidation in extremely obese women. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.287 p.1076–81. 2004

TIMMERMAN, K.L.; FLYNN, M.G., COEN, P.M.; MARKOFSKI, M.M.; PENCE, B.D. Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? **Leukoc. Biol.** V.84, p.1271–1278. 2008.

TIRABY, C.; TAVERNIER, G.; LEFORT, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D.; LANGIN, D. Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* v.278, p33370–33376. 2003.

TOKUYAMA, K.; HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis, torpor, and obesity of glutamate-treated mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab** v.251, p.E407–E415. 1986.

TOMIE FURUYA, D.; R. BINSACK; M. E. ONISHI; P. MONTEIRO SERAPHIM; U. FABRES MACHADO. Low ethanol consumption induces enhancement of insulin sensitivity in liver of normal rats. **Life Sci**, v.77, n.15, Aug 26, p.1813-24. 2005.

TONKONOGLI, M.; SAHLIN, K. Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle. **Exerc. Sports. Sci. Rew.** v.30. n3. p.129-137, 2002.

TORGAN, C.E.; BROZINICK, J.T.; BANKS, E.A.; CORTEZ, M.Y.; WILCOX, R.E.; IVY, J.L. Exercise training and clenbuterol reduce insulin resistance of obese Zucker rats. **American Journal of Physiology**, v.264, p.E373–E379. 1993.

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

TRIPATHY, D.; CARLSSON, M.; ALMGREN, P.; ISOMAA, B.; TASKINEN, M-R.; TUOMI, T.; GROOP, L.C. Insulin secretion and insulin sensitivity in relation to glucose tolerance. Lessons from the Botnia Study. **Diabetes**, v.49 p.975–980. 2000

TURCOTTE LP, SWENBERGER JR, TUCKER MZ, and YEE AJ. Training-induced elevation in FABP(PM) is associated with increased palmitate use in contracting muscle. **J Appl Physiol** v87: p.285–293,1999.

TURCOTTE, L.P., RICHTER, E.A., KIENS, B. Increased plasma FFA uptake and oxidation during prolonged exercise in trained vs. untrained humans. **Am J Physiol**, v262, p. E791 – 99, 1992.

UKROPCOVA, B., MCNEIL, M.; SEREDA, O.; JONGE, L.; XIE, H.; BRAY, G.A. SMITH, S.R. Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor. **J. Clin. Invest.**, v.115 p.1934–1941. 2005.

VALERIO, A.; CARDILE, A.; COZZI, V.; BRAGALE, R.; TEDESCO, L.; PISCONTI, A.; PALOMBA, L.; CANTONI, O.; CLEMENTI, E.; MONCADA, S.; CARRUBA, M.O.; NISOLI, E. TNF- α downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. **J Clin Invest**, v.116, p.2791–2798. 2006.

VAN AMELSVOORT, J.M.; VAN DER BEEK, A.; STAM, J.J. Effect of the type of dietary fatty acid on the insulin receptor function in rat epididymal fat cells. **Ann Nutr Metab**, v.30, p.273–280, 1986.

VAN TITS, L.J.H.; Stienstra R.; VAN LENTC, P.L.; NETEAB, M.G.; JOOSTENB, L.A.B.; STALENHOE, A.F.H. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: A crucial role for Krüppel-like factor 2. **Atherosclerosis**, v.214, p.345–349. 2011.

VELLOSO LA, CARVALHO CR, ROJAS FA, FOLLI F, SAAD MJ. Insulin signaling in heart involves insulin receptor substrates-1 and 2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway. **Cardiovasc Res**. v.40, p.96-102, 1998

WACKERHAGE, H. Adaptation to endurance training. In **genetics and molecular biology of muscle adaptation**, Elsevier, 2006.

WACKERHAGE, H.; WOODS, N.M. Exercise-induced signal transduction and gene expression in skeletal muscle. **J. Sport Science medicine**, v.1, p.103-114, 2002.

WANG, J.; SONG, H.; YANG, Y.; VIEIRA, V.J.; NIU, Y, M.A. Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. **Scand. J. Med. Sci. Sports** v.16, p. 2011.

WATERS, R.E.; ROTEVATN, S.; LI, P.; ANNEX, B.H.; YAN, Z., Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle. **Am J Physiol**, v14, 2004.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L.; FERRANTE, A.W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J. Clin. Invest.** v.112, p.1796–1808. 2003.

WEISS, R., TAKSALI, S. E., DUFOUR, S., YECKEL, C. W., PAPADEMETRIS, X., CLINE, G., TAMBORLANE, W. V., DZIURA, J., SHULMAN, G. I., CAPRIO, S. The 'obese insulin-sensitive' adolescent: importance of adiponectin and lipid partitioning. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.90, p.3731–3737. 2005.

WHITE, F.F.; BLOOR, C.M.; McKIRNAN, M.D.; CARROL S.M. Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart. **J Appl Physiol**, v85(3), p. 1160 – 8, 1998.

WILSON-FRITCH, L.; NICOLORO, S.; CHOUINARD, M.; LAZAR, MA.; CHUI, P.C.; LESZYK, J.; STRAUBHAAR, J.; CZECH, M.P.; CORVERA, S. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. **J Clin Invest** v.114, p.1281–1289. 2004.

WINER, S.; CHAN, Y.; PALTSER, G.; TRUONG, D.; TSUI, H.; BAHRAM, J.I.; DORFMAN, R.; WANG, Y.; ZIELENSKI, J.; MASTRONARDI, F.; MAEZAWA, Y.; DRUCKER, D. J.; ENGLEMAN, E.; WINER, D.; DOSCH, H.M.. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. **Nat Med**, v.15, n.8, p.921-9. 2009.

WISNEWSKY, J.; TORDJMAN, J., POITOU, C.; DARAKHSHAN, F.; HUGOL, D.; BASDEVANT A.; GUERRE-MILLO, A.A.; CLÉMENT, K. Human Adipose Tissue Macrophages: M1 and M2 Cell Surface Markers in Subcutaneous and Omental Depots and after Weight Loss. **J Clin Endocrinol Metab**, v.94(11) p.4619–4623. 2009.

WOLFE, R.R. Metabolic interactions between glucose and fatty acids in human. **Am J Clin Nutr**, v.67, p519–S526. 1998.

WU, H.; KANATOUS, S.B.; THURMOND, F.A. Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. **Science** v.296,(5566),p. 349-352, 2002.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J. Chronic inflammation in fat 70 plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, v.112, n.12, p.1821-30. 2003.

YAMAZAKI, R.K.; BRITO, G.A.P.; COELHO, I.; PEQUITTO, D.C.T.; YAMAGUCHI, A.A.; BORGHETTI, G.; SCHIESSEL, D.L.; KRYCZYK, M.; MACHADO, J.; ROCHA, R.E.R. FERNANDES, L.C. Low fish oil intake improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistant MSG-obese rats. **Lipids in Health and Disease**, p.1-7. 2011.

YANG, Z.; KAHN, B.B.; SHI, H.; XUE, B.; Macrophage $\alpha 1$ AMP activated protein kinase ($\alpha 1$ AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1. **J Biol Chem**, v.285 p.19051–19059. 2010.

YANO, Y.; SUMIDA, Y.; BENZING, C. F.; ROBINSON, F. W.; KONO, T. Primary sites of action of staurosporine and H-7 in the cascade of insulin action to glucose to glucose transport in rat adipocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1176, n.3, p. 327-332. 1993.

YEH, S.H.; CHUANG, H.; LIN, L.W.; HSIAO, C.Y.; ENG, H.L. Regular tai chi chuan exercise enhances functional mobility and CD4CD25 regulatory T cells. **Br. J. Sports Med.** v.40, p.239–243. 2006.

YOSHIDA, T.; YOSHIOKA, K.; HIRAOKA, N. Effect of nicotine on norepinephrine turnover and thermogenesis in brown adipose tissue and metabolic rate in MSG obese mice. **The Japanese journal of physiology** v. 36, p.123-130. 1990.

YOSHIOKA, K.; YOSHIDA, T.; KONDO, M. Reduced brown adipose tissue thermogenesis and metabolic rate in pre-obese mice treated with monosodium-L-glutamate. **Endocrinologia Japonica** v.38, p.75-79. 1991

ZECCHIN G.H., CARVALHEIRA, J.B.C., SAAD, M.J.A. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. **Rev. Soc. Cardiol. SP.** v14. p574-589, 2004

ZEYDA, M.; STULNIG, T. M. Adipose tissue macrophages. **Immunology Letters**, v.112, p.61–67. 2007.

ZHAO, X.; ZMIJEWSKI, J.W.; LORNE, E.; LIU, G.; PARK, Y.J.; TSURUTA, Y.; ABRAHAM, E. Activation of AMPK attenuates neutrophil proinflammatory activity and decreases the severity of acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.295 p.497–504. 2008.

ZHOU, R.; TARDIVEL, A.; THORENS, B.; CHOI, I.; TSCHOPP, J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. **Nat Immunol**, v.11 p.136–140. 2010.

ZOPPINI, G.; TARGHER, G.; ZAMBONI, C.; VENTURI, C.; CACCIATORI, V.; MOGHETTI, P.; MUGGIO M. Effects of moderate-intensity exercise training on plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in older patients with type 2 diabetes. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis**, v.16, p.543–549. 2006.

ANEXO 01

Sinalização insulínica

A insulina é um hormônio pleiotrópico extensivamente estudado, e encontram-se bem estabelecidas várias etapas fundamentais de seu mecanismo de ação. Este hormônio é secretado pelas células β pancreáticas em resposta a alimentação, sendo fundamental na estimulação da captação de glicose em tecidos periféricos, bem como na inibição da produção hepática de glicose e da liberação de ácidos graxos livres do tecido adiposo (SALTIEL e KAHN, 2001). De fato, indivíduos portadores de resistência à insulina são caracterizados por pronunciada elevação das concentrações plasmáticas de glicose após refeição, e comprometida capacidade de reduzir os níveis de AGL circulantes (BRUCE *et al.*, 1998).

Para desempenhar suas funções, a insulina deve se ligar a seu receptor presente na membrana da célula alvo, sendo altamente regulados e específicos os eventos posteriores a esta ligação (JONES *et al.*, 1994). O receptor de insulina é proteína heterotetramérica com atividade tirosina quinase (Figura 29), composta por duas subunidades alfa e duas subunidades beta (SALTIEL e KAHN, 2001). A subunidade alfa atua como enzima alostérica, que inibe a atividade tirosina quinase da subunidade beta (ZECCHIN, 2004). Ao se ligar à subunidade alfa, a insulina promove a retirada deste efeito inibitório, e a subunidade beta adquire atividade tirosina quinase, levando a autofosforilação do receptor em múltiplos resíduos tirosina (PATTI e KAHN, 1998). O receptor de insulina ativado levará a fosforilação em resíduos tirosina de diversos substratos protéicos intracelulares, dos quais ao menos 10 já foram identificados. Quatro destes pertencem à família dos substratos para o receptor de insulina (IRS) (PESSIN, 2000), e outros incluem Shc, Gab-1, p60^{dok}, Cbl, JAK2 e APS (PESSIN e SALTIEL, 2000; CARVALHEIRA *et al.*, 2002; ROJAS *et al.*, 2000; VELLOSO *et al.*, 1998;). O IRS-1, expresso na maioria dos tecidos (SUN *et al.*, 1991; CLARK *et al.*, 2000), é o substrato predominante para o receptor de insulina, e sua fosforilação em tirosina cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src

(SH2). A importância das proteínas IRS é observada em estudos com animais knockout. Por exemplo, camundongos knockout para IRS-1, apresentam resistência à insulina e retardo do crescimento, mas não são hiperglicêmicos (ARAKI *et al.*, 1994). Camundongos knockout para IRS-2 apresentam hiperglicemia acentuada decorrente de diversas anormalidades na ação da insulina em tecidos periféricos, e falência da atividade secretória das células beta, com redução significativa do número destas células. Por outro lado, camundongos knockout para IRS-3, expresso em tecido adiposo, e IRS-4, expresso no rim, tem crescimento e metabolismo da glicose praticamente normais (LIU *et al.*, 1999; FANTIN *et al.*, 2000). Recentemente duas novas formas de IRS foram descritas (IRS-5 no rim e IRS-6 no músculo), porém suas funções não foram ainda determinadas (CAI *et al.*, 2003).

A sequência desta via de sinalização envolve a ativação da PI3-quinase pelo IRS-1. A PI3-quinase é importante na regulação da mitogênese, na diferenciação celular e no transporte de glicose estimulado por insulina (FOLLI *et al.*, 1992; SAAD *et al.*, 1992; SAAD *et al.*, 1993; SHEPHERD *et al.*, 1995; CZECH e CORVERA 1999). Esta proteína possui uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85), que possui dois domínios homólogos a Src2 (SH2) (BACKER *et al.*, 1992; ASANO *et al.*, 2000). Uma vez ativada, a enzima catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na porção 3 do anel de inositol, produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato, e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (LIETZKE *et al.*, 2000). Este último produto permite a propagação de sinais mediados pela enzima, ligando-se a domínios PH (pleckstrin homology) de diversas moléculas sinalizadoras, alterando sua atividade e localização subcelulares (LIETZKE *et al.*, 2000). Como por exemplo, a quinase dependente de fosfoinosítídeos 1 (PDK-1), a qual esta envolvida na fosforilação e ativação da proteína quinase B (PKB), também conhecida como AKT ou Rac (ALESSI e DOWNES, 1998), e de formas atípicas das proteínas quinases C λ e ξ (PKC C λ e ξ) (KOTANI *et al.*, 1998; DONG *et al.*, 1999). A AKT regula várias respostas fisiológicas da insulina, como a translocação de GLUT4 a membrana plasmática, síntese protéica via p70S6 quinase (p70^{S6K}), síntese de glicogênio e outros efeitos metabólicos. Esta enzima também fosforila e inativa a glicogênio sintase

quinase-3 (GSK-3), enzima responsável pela fosforilação e inativação da glicogênio sintase, levando a aumento da glicogênese (CROSS *et al.*, 1995). As PKC λ e ξ estão envolvidas na translocação do GLUT4 a membrana plasmática e aumento no transporte de glicose estimulado pela insulina (STANDAERT *et al.*, 1997; KOTANI *et al.*, 1998), e ainda potencializam a fosforilação da GSK-3 pela AKT e fosforilação em serina da IRS-1 (ORIENTE *et al.*, 2001).

Além da ativação da PI3-quinase, outros sinais podem ser necessários para que a insulina estimule o transporte de glicose (PESSIN *et al.*, 2000). Uma segunda via envolve a fosforilação do proto-oncogene c-Cbl (RIBON e SALTIEL, 1997) e é aparentemente independente da ativação da PI3-quinase. Na maioria dos tecidos sensíveis à insulina, Cbl está associado com a proteína adaptadora CAP (Cbl-associated protein) (RIBON *et al.*, 1998). Após a fosforilação, o complexo Cbl-CAP migra para a membrana celular e interage com a proteína adaptadora CrkII, que também está associada constitutivamente a proteína C3G (BAUMANN *et al.*, 2000; CHIANG *et al.*, 2001). A C3G é proteína trocadora de nucleotídeos que catalisa a troca de GDP por GTP da proteína TC10, ativando-a, e desencadeando um segundo sinal para a translocação da proteína GLUT4 a membrana plasmática, em paralelo a ativação da via PI3-quinase (CHIANG *et al.*, 2001). Foi demonstrado que a insulina estimula, agudamente, a fosforilação em tirosina de Cbl e sua associação com a CAP no tecido adiposo de animais normais, e que esta via pode participar no controle da adiposidade em modelos animais resistentes à insulina (THIRONE *et al.*, 2004).

Outra via de sinalização ativada pela insulina é a cascata da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP quinase). Esta se inicia com a associação da Grb-2 ao Shc e, em menor grau, ao IRS-1, levando a formação do complexo Grb/Son of Sevenless (Sos) na membrana plasmática e ativação da proteína c-Ras, a qual ativa Raf, que é o primeiro elemento da cascata MAP quinase (EGAN *et al.*, 1993, CHARDIN *et al.*, 1993, BARON e VAN OBBERGHEN, 1995). Esta via parece estar envolvida nos processos de diferenciação e proliferação celulares mediados pela insulina, bem como síntese de glicogênio

e translocação de GLUT-4 a membrana plasmática. Aparentemente, esta via não é suficiente, ou mesmo necessária, para a translocação de GLUT-4 a membrana plasmática (NYSTRON e QUOM, 1999), apesar de estudos recentes apontarem que a MAP quinase p38 esta envolvida no aumento do transporte de glicose mediado pela insulina (SOMWAR et al., 2001; THONG *et al.*, 2005). O aumento na síntese de glicogênio deve-se a ativação da fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1) através da p90 ribossomal S6 quinase (p90^{rsk}). A PP-1 é responsável pela desfosforilação e ativação da glicogênio sintase, resultando em aumento da glicogênese (YANO *et al.*, 1993).

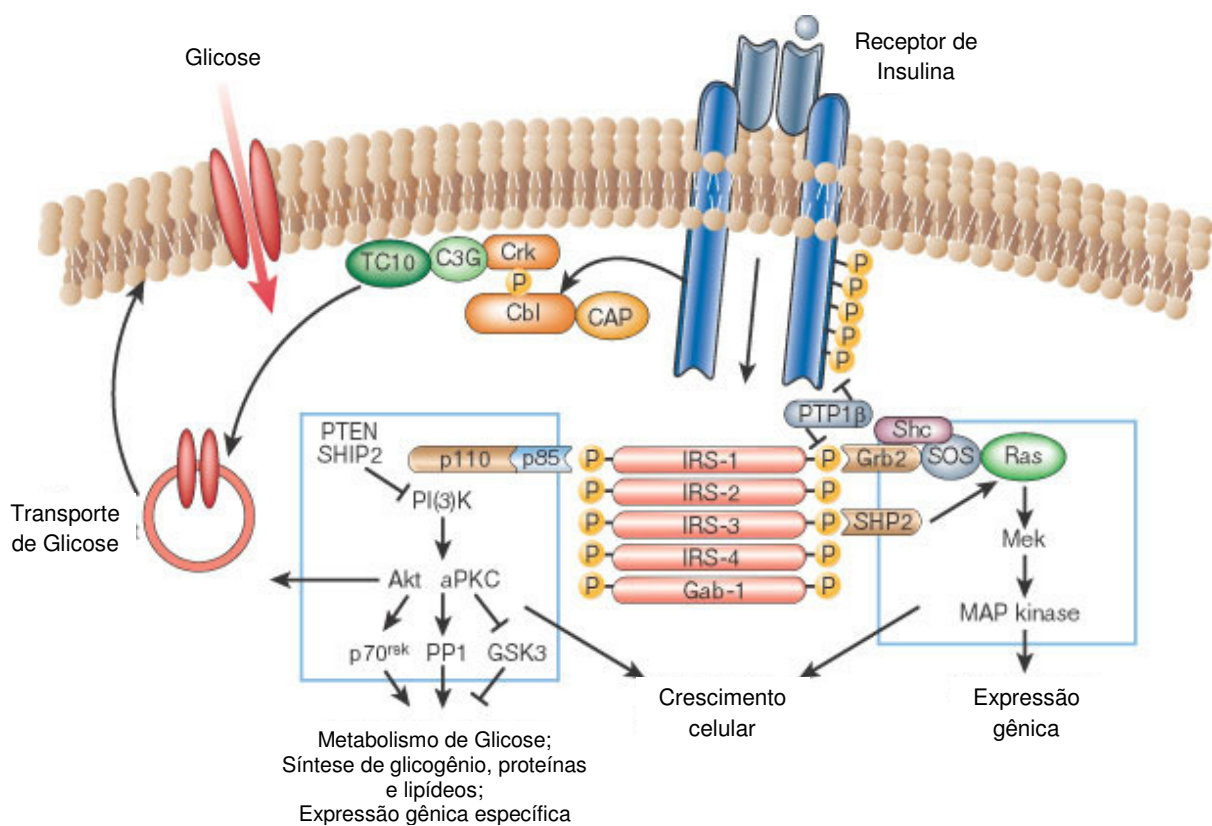


Figura 29: Vias de sinalização da insulina. O receptor de insulina é uma proteína com atividade tirosina quinase, capaz de autofosforilação, que catalisa a fosforilação de proteínas celulares como os membros da família IRS, Shc e Cbl. Uma vez fosforiladas em resíduos tirosina, estas proteínas interagem com moléculas sinalizadoras através de seus domínios SH2, resultando em uma diversidade de vias de sinalização. Estas incluem a ativação da PI(3)K e de quinases dependentes de PtdIns(3,4,5), da RAS, da cascata da MAP quinase, Cbl/CAP e da ativação de TC10. Estas vias agem em conjunto para coordenar o tráfego de vesículas, a síntese protéica, ativação e inativação de enzimas e expressão gênica, resultando na regulação do metabolismo de glicose, lipídios e proteínas. Adaptado de SALTIEL e KAHN, 2001.

ANEXO 02

O modelo de obesidade induzido por glutamato monossódico.

O glutamato monossódico (GMS), sal de sódio de ácido glutâmico, é um componente comum da dieta humana, e tem sido associado ao sobrepeso e obesidade por comprometer a regulação da fome (HERMANUSSE *et al.*, 2006). Foi sugerido que a ingestão crônica de GMS pode intoxicar neurônios do núcleo arqueado e causar distúrbios na cascata de sinalização hipotalâmica da leptina, causando resistência a este hormônio (HERMANUSSEN e TRESGUERRES, 2003 A, HERMANUSSEN e TRESGUERRES, 2003 B). Foi ainda demonstrado que, independentemente do nível de atividade física e do consumo calórico, a presença de GMS na dieta está positivamente associada a sobrepeso e obesidade em humanos (HE *et al.*, 2008).

De modo interessante, em ratos e camundongos, o tratamento pós-natal com glutamato monossódico (GMS), administrado por meio de injeção subcutânea, promove aumento superior a 100% no conteúdo lipídico da carcaça, e estabelece um modelo animal frequentemente utilizado para o estudo da obesidade (YAMAZAKI *et al.*, 2011; SASAKI *et al.*, 2011; OLUBA *et al.*, 2011; AFIFI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2010; ANDREAZZI *et al.*, 2009; SCOMPARIN *et al.*, 2006; MORRISA *et al.*, 1998; DAWSON *et al.*, 1997; ; HOLZWARTH-MCBRIDE *et al.*, 1976; BUNYAN *et al.*, 1976; TOKUYAMA e HIMMS-HAGEN, 1974). Nestes animais, o GMS destrói significativa parcela dos neurônios do núcleo arqueado e eminência mediana no hipotálamo, com importante redução nas concentrações de neuropeptídeo Y (NPY) e proopiomelanocortina (POMC) (BERGEN *et al.*, 1998; MEISTER *et al.*, 1989; KERKERIAN e PELLETIER, 1986). Desencadeia também redução na responsividade hipotalâmica a moléculas circulantes com ação anorexígena, como por exemplo, a leptina (DAWSON *et al.*, 1997).

No entanto, desde a primeira descrição deste modelo feita por Olney (OLNEY, 1969), ficou estabelecido que o mesmo não é caracterizado por hiperfagia. Este dado sugere que outros distúrbios metabólicos medeiam o desenvolvimento da adiposidade nestes animais. De fato, diversas alterações neuroendócrinas decorrentes da lesão hipotalâmica destacam-se como

mecanismos potenciais. Por exemplo, ocorre redução do hormônio liberador de hormônio do crescimento (GHRH) e da testosterona (TAMURA *et al.*, 2002), menor atividade simpática, redução na síntese e no estoque de catecolaminas na glândula suprarrenal, redução da liberação de catecolaminas pelas células cromafins medulares, menor atividade da enzima lipase hormônio sensível (HSL) no adipócito, maior atividade da enzima lipase de lipoproteínas (LPL) nos vasos que perfundem o tecido adiposo, aumentada atividade de enzimas da via lipogênica, redução da termogênese mediada pelo tecido adiposo marrom, e menor taxa de metabolismo basal (PARK *et al.* 2002; MARTINS *et al.*, 2004; DOLNIKOFF *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 1991; YOSHIDA *et al.*, 1990; MOSS *et al.*, 1985). O conjunto destas modificações estabelece um ambiente fisiológico potencialmente lipogênico, promovendo aumento da massa adiposa mesmo sem modificação na ingestão alimentar. O modelo de obesidade induzida por GMS é acompanhado ainda do desenvolvimento de resistência à insulina e hiperinsulinemia (HIRATA *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1999), com alterações na secreção deste hormônio (BALBO, *et al.*, 2002), e em importantes mediadores de sua via de sinalização. Por exemplo, HIRATA *et al.*, (2003) demonstrou elevação na expressão da proteína fosfatase PTP1B no fígado, músculo e tecido adiposo, e PAPA *et al.*, (2002) encontrou redução na expressão de GLUT-4 no músculo esquelético em ratos tratados com GMS.

Finalmente, a obesidade decorrente de hipo-função autonômica e redução na taxa de metabolismo basal tem semelhanças com o desenvolvimento de distúrbios metabólicos consequentes do sedentarismo crônico (SASAKI *et al.*, 2011). Deste modo, este é um modelo interessante para o estudo dos efeitos do exercício sobre a fisiopatologia da obesidade (GOBATTO *et al.*, 2002).

ANEXO 03

Imagens do animal portador de obesidade induzida por glutamato monossódico (GMS).



Imagem 01: Observação do modelo de obesidade induzido por GMS.



Imagem 02: Tecido adiposo subcutâneo no animal controle (esquerda da imagem), e no animal obeso (direita da imagem).

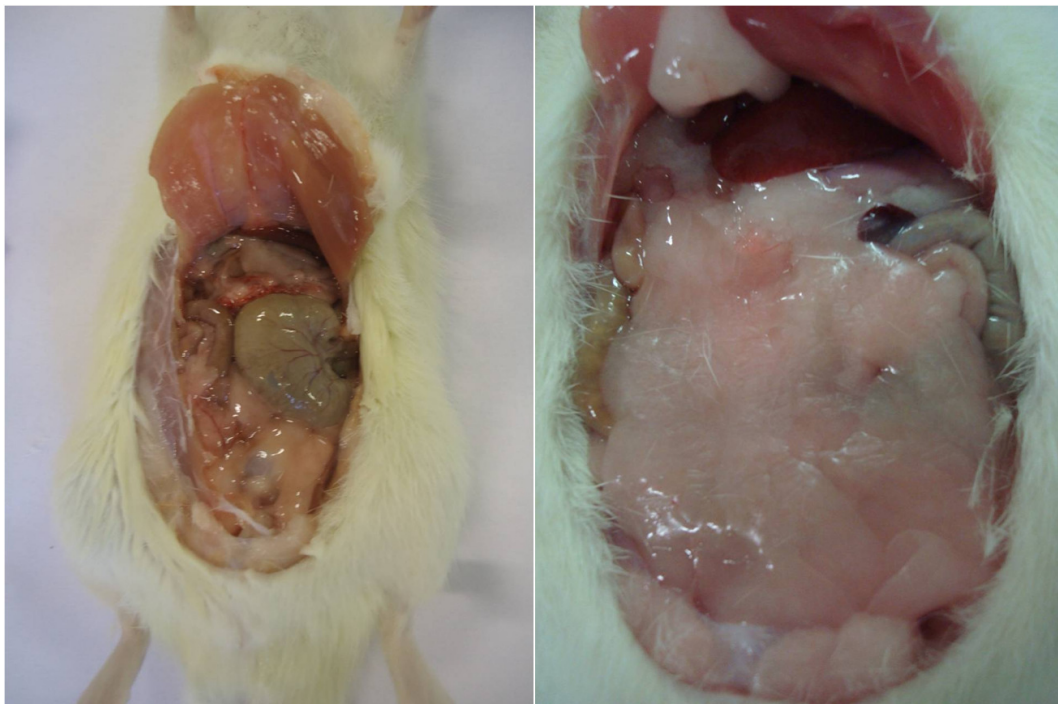


Imagem 03: Tecido adiposo omental no animal controle (esquerda da imagem) e no animal obeso (direita da imagem).



Imagem 04: Tecido adiposo ectópico na periferia do músculo esquelético no animal obeso.

ANEXO 04**Declaração do comitê de ética em experimentação animal**

Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 Setor de Ciências Biológicas
 Comitê de Ética em Experimentação Animal
 (CEEA)



Nº 331

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.034314/2008-01

APROVADO:

09/09/2008 – R.O. 08/2008

TÍTULO:

Efeitos do exercício crônico sobre a flexibilidade metabólica no músculo esquelético e tecido adiposo

AUTORES:

Luiz Claudio Fernandes, Gleisson Alisson Pereira de Brito,
 Danielle Cristina Tonello Pequeto, Ricardo Key Yamazaki,
 Everson Araújo Nunes

DEPARTAMENTO: Fisiologia

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue oval, belonging to Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi.

Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi
 Coordenadora do CEEA