

**GLEISSON ALISSON PEREIRA DE BRITO**

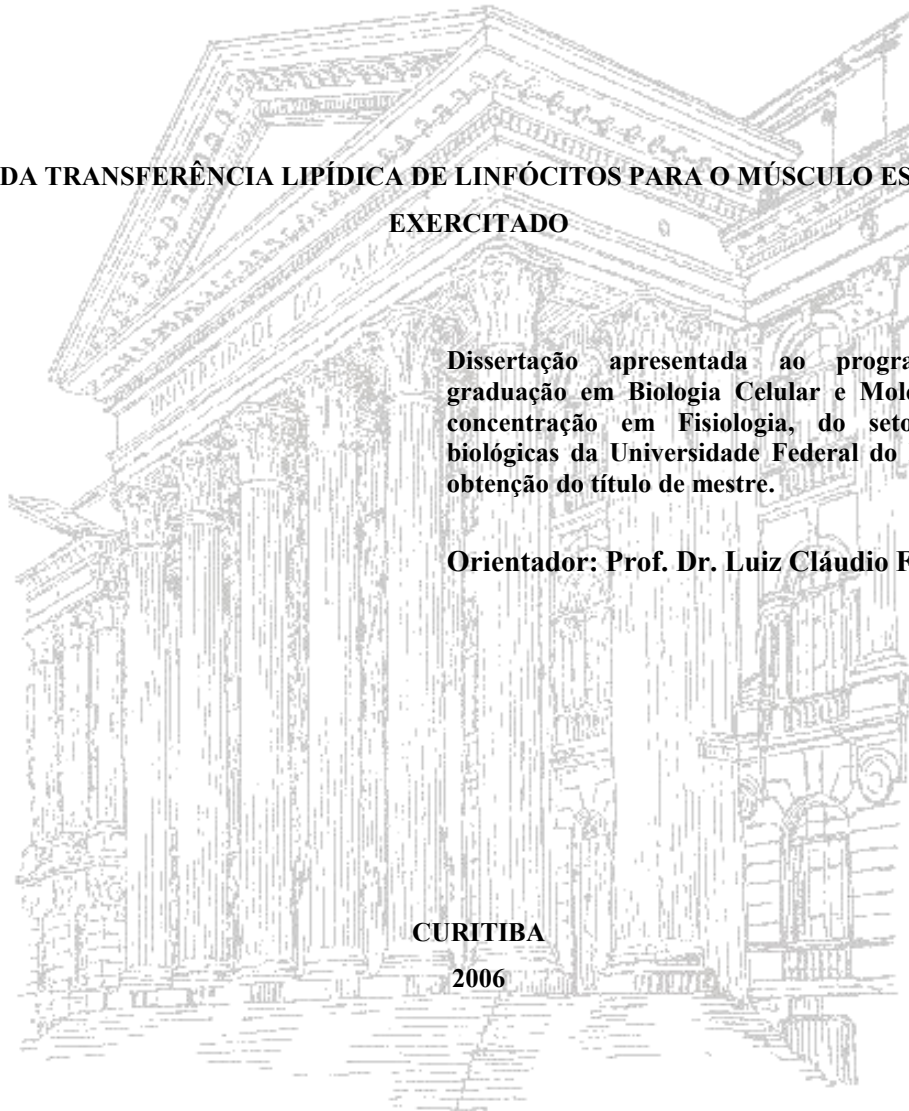
**ESTUDO DA TRANSFERÊNCIA LIPÍDICA DE LINFÓCITOS PARA O MÚSCULO ESQUELÉTICO  
EXERCITADO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia, do setor de ciências biológicas da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do título de mestre.

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes**

**CURITIBA**

**2006**



Aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

Aos meus pais, Alexandre e Maria Helena, pelo amor, dedicação e apoio incondicional. Vocês são pilar, alicerce da minha vida, e se alcancei alguma coisa, qualquer que seja, foi porque subi em seus ombros. E se eu posso seguir daqui, é porque o meu fôlego foi preservado enquanto vocês exauriam o seu por mim. Muito Obrigado!

AMO MUITO VOCÊS!!!!

Ao meu irmão, Rafael, pelo amor fraternal, e pelas horas de discussão político-social. Salve a liberdade. Salve a falta dela também...rsrs...

A Lílian. Por relevar todos os sábados em que o computador me roubou. Pelo amor. Pelo carinho. Pela presença. Pela amizade. (Pelas impressões... rsrs). Te Amo!

Ao professor Dr. Luiz Cláudio Fernandes. Pela orientação incondicional, (apesar da cabaçisse...rsrs). Por ensinar, ensinar...e...ensinar. Pelo profissionalismo e acessibilidade. Pelo exemplo. Pelas discussões político-sócio-educacionais, (de centro-esquerda é claro...). Por assar a carne nos churrascos. Pela amizade! Valeu Mesmo!

Ao professor MsC Everson Araújo Nunes. Pela recepção no laboratório. Pelo apoio até 23:50, sábado, chovendo, frio (ao menos tinha bolo de chocolate)...e o pé. Pelo exemplo. Por todas as FORÇAS, em todas as situações e momentos. Pelas discussões físico-químico-biológicas. Pela amizade! Valeu Mesmo!

A professora MsC Cláudia Nogata. Pela paciência no ensinamento das técnicas, e na introdução a linha de pesquisa, (que doidera...rsrs). Pelo auxílio no tratamento dos dados. Pela disponibilidade. Pela amizade! Valeu Mesmo!

A aquelas pessoas que, muito mais que colegas de laboratório, sábado após sábado, experimento após experimento, se tornaram meus AMIGOS: Loly, Vanessa, Sérgio, Fabíola, Carine, Carina, Luciele, Sandrinho, Diogo, Cris, Ricardo, Paulo, Alessandra. Meus estagiários sofredores: Fernanda Chemim, Flávia Freitas e o China.

VALEU MEEEEEEESMOOOO!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

Aos professores Vitor, Paulinho e Wellington, pelas MÃOS em todas as horas, pelas mudanças malucas de horários e pela amizade. A vocês e aos professores Jaque e Rodrigo...por me ajudarem a entender as gorduras...A toda galera de professores da GB!...Pela amizade!

VALEU MEEEEESMOOOO!!!!

## *SUMÁRIO*

### LISTA DE ABREVIATURAS

### LISTA DE FIGURAS

### RESUMO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
Metabolismo de ácidos graxos durante exercícios aeróbios .....	2
Adaptações celulares no músculo esquelético decorrentes de treinamento aeróbio .....	5
Linfócitos .....	10
Interações entre metabolismo de ácidos graxos e glicose no músculo esquelético .....	17
Justificativa .....	19
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 Animais .....	23
3.2 Treinamento físico.....	23
3.3 Ácidos Graxos .....	24
3.4 Obtenção e contagem dos linfócitos .....	26
3.5 Cultura dos linfócitos com AG rádiomarcados.....	26
3.6 Co-incubação de linfócitos com o músculo esquelético.....	28
3.8 Extração lipídica .....	29
3.9 Cromatografia em camada delgada (TLC).....	29
3.10 Oxidação dos ácidos graxos .....	31
3.12 Efeito do ácido palmítico sobre o metabolismo de glicose em músculo sóleo incubado de rato.....	32
3.13 Análise estatística .....	33
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
Perfil de incorporação de AG pelos linfócitos.....	34
Distribuição dos ácidos graxos nas diferentes frações lipídicas do músculo esquelético.....	46
Descarboxilação do ácido palmítico pelo musculo esquelético.....	60
Conteúdo de glicogênio intramuscular .....	61
Efeito do ácido palmítico sobre a responsividade a insulina em músculo sóleo incubado.....	62
Efeito do ácido palmítico sobre a síntese de [ <sup>14</sup> C] glicogênio a partir da captação estimulada por insulina da [U - <sup>14</sup> C]-D-glicose em músculo sóleo incubado de rato.....	68
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – ácido araquidônico  
Acetil-CoA – acetil coenzima  
AE – atividade específica  
AG – ácido graxo  
AGCL – ácido graxo de cadeia longa  
AGL – ácido graxo livre  
AL – ácido linoléico  
ANOVA – *one-way analysis of variance*  
AO – ácido oléico  
AP – ácido palmítico  
ATP – adenosina trifosfato  
BSA – albumina bovina sérica  
CC – corpos cetônicos  
CHO - carbohidrato  
COL – colesterol  
CPT – complexo carnitina palmitoil transferase  
DPM – desintegração por minuto  
ECOL – éster de colesterol  
FABP – proteína ligante de ácidos graxos  
FABP<sub>pm</sub> – proteína ligadora de ácido graxo da membrana plasmática  
FAT/CD36 – proteína translocadora de ácidos graxos  
FATP – proteína transportadora de ácido graxo  
FL – fosfolípídeo  
G-6-P – glicose 6 fosfato  
GLUT 4 – transportador de glicose 4  
HDL – lipoproteína de alta densidade  
HK – hexoquinase  
IRS – substrato para o receptor da insulina

IRS-1 – substrato para receptor de insulina-1  
LPL – enzima lípase lipoprotéica  
ME – músculo esquelético  
PBS – tampão fosfato salina  
PDH – enzima piruvato desidrogenase  
PFK – fosfofrutoquinase  
PGE – prostaglandina  
PI-3K – fosfatidil inositol 3 quinase  
PI-3quinase – fosfatidil-inositol 3-quinase  
PKB – proteína kinase B  
PUFA – ácidos graxos poliinsaturados  
Rd – taxa de desaparecimento de ácidos graxos do plasma  
RI – resistência periférica à insulina  
TAG – triacilglicerol  
TCA – ácido tricloroacético  
TLC – *Thin Layer Chromatography* - cromatografia em camada delgada  
TCL - triacilglicerol de cadeia longa  
TCM - triacilglicerol de cadeia média  
TGIM – triacilglicerol intra muscular  
VEGF – fator de crescimento endotelial  
VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01: PRINCIPAIS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO TRANSPORTE DE AG PARA O INTERIOR DA CÉLULA MUSCULAR ESQUELÉTICA. A PROTEÍNA LIGANTE DE AG DA MEMBRANA PLASMÁTICA (FABP<sub>PM</sub>, DO INGLÊS FATTY ACID BINDING PROTEIN), A TRANSLOCASE DE AG (FAT/CD36, DO INGLÊS FAT ACID TRANSLOCASE), E A PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE AG (FATP, DO INGLÊS FATTY ACID TRANSPORT PROTEIN). DE SPRIET (2002). ..... 8
- FIGURA 02: ESQUEMA DA ATIVIDADE DA ENZIMA CARNITINA PALMITOIL TRANSFERASE (CPT) NO PROCESSO DE PASSAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS ATRAVÉS DUPLA MEMBRANA MITOCONDRIAL. FFA, FAT FREE ÁCIDOS (ÁCIDOS GRAXOS LIVRES, DE SPRIET (2002). ..... 9
- FIGURA 04: RESUMO DOS EXPERIMENTOS COM TRANSFERÊNCIA LIPÍDICA ENTRE CÉLULAS. AG, ÁCIDO GRAXO; AGL, ÁCIDO GRAXO LIVRE, FL, FOSFOLÍPIDEOS, FC, FOSFATIDILCOLINA. .... 16
- FIGURA 06: SISTEMA DE NATAÇÃO UTILIZADO NO TREINAMENTO FÍSICO DOS ANIMAIS. .... 24
- FIGURA 08: RADIOATIVIDADE PRESENTE NO SOBRENADANTE APÓS LAVAGEM DOS LINFÓCITOS. AA – ÁCIDO ARAQUIDÔNICO. AP – ÁCIDO PALMÍTICO. RAD. T. – RADIOATIVIDADE TOTAL. RAD LAV –RADIOATIVIDADE APÓS LAVAGEM. RAD LINF. – RADIOATIVIDADE PRESENTE NO INTERIOR DOS LINFÓCITOS ..... 27
- FIGURA 09: PROCESSO DE ISOLAMENTO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO SÓLEO. .... 28
- FIGURA 10: REPRESENTAÇÃO DA PLACA CROMATOGRÁFICA DE SÍLICA-GEL COM AS MARCAÇÕES DO LOCAL DE APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS. .... 30
- FIGURA 11: DESENHO ESQUEMÁTICO DO “ENLENMEYER DE DESCARBOXILAÇÃO” UTILIZADO PARA MENSURAÇÃO DA OXIDAÇÃO DE AG PELO ME. .... 31
- FIGURA 12: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [U-<sup>14</sup>C]-PALMÍTICO (0,1μCi/mL) PELOS LINFÓCITOS OBTIDOS DE RATOS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA) E SOMENTE TREINADOS (TR) APÓS 6H DE INCUBAÇÃO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/10<sup>7</sup>CÉLS E REPRESENTAM MÉDIA ± EPM DE 3 EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,01 vs. C. #P<0,01 vs. TA. .... 35
- FIGURA 13 – EXPORTAÇÃO (%) PARA O MEIO DE INCUBAÇÃO DO ÁCIDO [U-<sup>14</sup>C]-PALMÍTICO INCORPORADO PELOS LINFÓCITOS DE RATOS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA) E SOMENTE TREINADOS (TR), APÓS 3H DE CO-INCUBAÇÃO COM ME.. OS RESULTADOS ESTÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± EPM, DE 3 EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA \*P<0,05 vs. C. #P<0,01 vs. TA. .... 35
- FIGURA 14 – INCORPORAÇÃO (%) DO ÁCIDO [U-<sup>14</sup>C]-PALMÍTICO PELOS ME DE RATOS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA) E SOMENTE TREINADOS (TR) APÓS 3H DE CO-INCUBAÇÃO COM OS LINFÓCITOS RADIOMARCADOS. OS RESULTADOS ESTÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± EPM DE 3 EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,01 vs. C. #P<0,01 vs. TA. .... 36
- FIGURA 15- INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-OLÉICO (0,1μCi/mL) PELOS LINFÓCITOS OBTIDOS DE RATOS CONTROLE (C) E TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA), APÓS 6H DE INCUBAÇÃO. OS RESULTADOS, EXPRESSOS EM PMOL/10<sup>7</sup>CÉLS, REPRESENTAM MÉDIA ± EPM, DE 3 EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,05 vs. C. .... 38
- FIGURA 16 – EXPORTAÇÃO PARA O MEIO DE INCUBAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-OLÉICO INCORPORADO PELOS LINFÓCITOS DE RATOS CONTROLE (C) E TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA) APÓS 3H DE CO-INCUBAÇÃO COM ME. OS RESULTADOS ESTÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± EPM, DE 3 EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA \*P<0,05 vs. C. .... 38

- FIGURA 17 – INCORPORAÇÃO (%) DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-OLÉICO, PELOS ME DE RATOS CONTROLE (C) E TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA), APÓS 3H DE CO-INCUBAÇÃO COM OS LINFÓCITOS RADIOMARCADOS. OS RESULTADOS ESTÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± EPM, DE 3 EXPERIMENTOS EM TRIPPLICATA. \*P<0,05 vs. C. .... 39
- FIGURA 18 - INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-LINOLÉICO (0,1μCi/mL) PELOS LINFÓCITOS OBTIDOS DE RATOS CONTROLE (C) E TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA), APÓS 6H DE INCUBAÇÃO. OS RESULTADOS, EXPRESSOS EM PMOL/10<sup>7</sup>CÉLS, REPRESENTAM MÉDIA ± EPM, DE 3 EXPERIMENTOS EM TRIPPLICATA. \*P<0,05 vs. C. .... 41
- FIGURA 19 – EXPORTAÇÃO (%) PARA O MEIO DE INCUBAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-LINOLÉICO PELOS LINFÓCITOS DE RATOS CONTROLE (C) E TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA), APÓS 3H DE CO-INCUBAÇÃO COM ME. OS RESULTADOS ESTÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± EPM, DE 3 EXPERIMENTOS EM TRIPPLICATA \*P<0,05 vs. A C. .... 41
- FIGURA 20 – INCORPORAÇÃO (%) DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-LINOLÉICO, PELOS ME DE RATOS CONTROLE (C) E TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA), APÓS 3H DE CO-INCUBAÇÃO COM OS LINFÓCITOS RADIOMARCADOS. OS RESULTADOS ESTÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± EPM, DE 3 EXPERIMENTOS EM TRIPPLICATA. \*P<0,05 vs. C. .... 42
- FIGURA 21 – INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-ARAQUIDÔNICO (0,1μCi/mL) PELOS LINFÓCITOS OBTIDOS DE RATOS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA) E SOMENTE TREINADOS (TR), APÓS 6H DE INCUBAÇÃO. OS RESULTADOS, EXPRESSOS EM PMOL/10<sup>7</sup>CÉLS, REPRESENTAM MÉDIA ± EPM, DE 3 EXPERIMENTOS EM TRIPPLICATA. \*P<0,05 vs. C. #P<0,05 vs. TA. .... 44
- FIGURA 22 – EXPORTAÇÃO (%) PARA O MEIO DE INCUBAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-ARAQUIDÔNICO INCORPORADO PELOS LINFÓCITOS DE RATOS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA) E SOMENTE TREINADOS (TR), APÓS 3H DE CO-INCUBAÇÃO COM ME. OS RESULTADOS ESTÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± EPM, DE 3 EXPERIMENTOS EM TRIPPLICATA. \*P<0,05 E \*\*P<0,01 vs. C. .... 44
- FIGURA 23 – INCORPORAÇÃO (%) DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-ARAQUIDÔNICO, PELOS ME DE RATOS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA) E SOMENTE TREINADOS (TR), APÓS 6H DE CO-INCUBAÇÃO COM OS LINFÓCITOS RADIOMARCADOS. OS RESULTADOS ESTÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± EPM, DE 3 EXPERIMENTOS EM TRIPPLICATA. \*P<0,05 vs. C. .... 45
- FIGURA 24: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [U-<sup>14</sup>C]-PALMÍTICO NA FRAÇÃO DE FOSFOLÍPIDES DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA), E APENAS TREINADOS (TR). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPPLICATA. \*P<0,05 E \*\*P<0,01 vs. C. #P<0,05 vs. TA. .... 48
- FIGURA 26: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [U-<sup>14</sup>C]-PALMÍTICO NA FRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (AGL) DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA), E APENAS TREINADOS (TR). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPPLICATA. \*P<0,01 vs. C. .... 49
- FIGURA 27: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [U-<sup>14</sup>C]-PALMÍTICO NA FRAÇÃO DE TRIACILGLICEROIS (TAG) DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA), E APENAS TREINADOS (TR). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPPLICATA. \*P<0,01 E \*\*P<0,001 vs. C. #P<0,001 vs. TA. .... 49

- FIGURA 28: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [U-<sup>14</sup>C]-PALMÍTICO NA FRAÇÃO DE COLESTEROL DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA), E APENAS TREINADOS (TR). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,001 vs. C. #P<0,01 vs. TA..... 50
- FIGURA 29: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [U-<sup>14</sup>C]-PALMÍTICO NA FRAÇÃO DE ÉSTER DE COLESTEROL (ECOL) DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA), E APENAS TREINADOS (TR). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,01 vs. C. 50
- FIGURA 30: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-OLÉICO NA FRAÇÃO DE FOSFOLÍPIDES DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C) E TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,01 vs. C..... 51
- FIGURA 31: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-OLÉICO NA FRAÇÃO DE LÍPÍDEOS POLARES DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C) E TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,01 vs. C..... 51
- FIGURA 32: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-OLÉICO NA FRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (AGL) DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C) E TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,05 vs. C..... 52
- FIGURA 34: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-OLÉICO NA FRAÇÃO DE COLESTEROL DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C) E TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,001 vs. C..... 53
- FIGURA 35: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-OLÉICO NA FRAÇÃO DE ÉSTER DE COLESTEROL (ECOL) DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C) E TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,01 vs. C..... 53
- FIGURA 36: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-LINOLÉICO NA FRAÇÃO DE FOSFOLÍPIDES DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C) E TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,001 vs. C..... 54
- FIGURA 38: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-LINOLÉICO NA FRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (AGL) DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C) E TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,01 vs. C..... 55
- FIGURA 39: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-LINOLÉICO NA FRAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS (TAG) DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C) E TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,05 vs. C. .... 55
- FIGURA 40: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-LINOLÉICO NA FRAÇÃO DE COLESTEROL DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C) E TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,05 vs. C..... 56

- FIGURA 42: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-ARAQUIDÔNICO NA FRAÇÃO DE FOSFOLÍPIDES DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA), E APENAS TREINADOS (TR). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,01 E \*\*P<0,001 vs. C. .... 57
- FIGURA 44: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-ARAQUIDÔNICO NA FRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (AGL) DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA), E APENAS TREINADOS (TR). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,001 vs. C. #P<0,05 vs. TA..... 58
- FIGURA 46: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-ARAQUIDÔNICO NA FRAÇÃO DE COLESTEROL DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA), E APENAS TREINADOS (TR). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,01 E \*\*P<0,001 vs. C.#P<0,001 vs. TA. .... 59
- FIGURA 47: INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO [1-<sup>14</sup>C]-ARAQUIDÔNICO NA FRAÇÃO DE ÉSTER DE COLESTEROL DO ME CO-INCUBADO COM LINFÓCITOS RADIOMARCADOS OBTIDOS DE ANIMAIS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA), E APENAS TREINADOS (TR). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS EM PMOL/G DE TECIDO E REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DE DOIS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. \*P<0,01 E \*\*P<0,001 vs. C.#P<0,05 vs. TA. .... 59
- FIGURA 48 : DESCARBOXILAÇÃO DO ÁCIDO PALMÍTICO PELOS ME OBTIDOS DE ANIMAS DOS GRUPOS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA), E APENAS TREINADOS (TR), DURANTE PERÍODO DE 1H. OS RESULTADOS, EXPRESSOS EM PMOL/G, REPRESENTAM MÉDIA ± EPM DE TRÊS EXPERIMENTOS EM QUADRUPPLICATA. \*P<0,05 E \*\*P<0,001 vs. C.#P<0,01 vs. TA. .... 60
- FIGURA 49: CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO NO MÚSCULO SÓLEO OBTIDO DE AMIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE (C), TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA) E SOMENTE TREINADOS (TR), PREVIAMENTE AOS EXPERIMENTOS DE CO-INCUBAÇÃO. OS DADOS, EXPRESSOS EM μMOL/G DE TECIDO, REPRESENTAM MÉDIA, ± EPM DE TRÊS EXPERIMENTOS EM QUADRUPPLICATA. \*P<0,01 vs. C.#P<0,001 vs. TA. .... 61
- FIGURA 50: EFEITO DO AP SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO PELOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE RATOS CONTROLE INCUBADOS POR 1H EM TAMPÃO BICARBONATO DE KREBS RINGER CONTENDO 5,6 mM DE GLICOSE, 0,1 μCi/mL DE [U-<sup>14</sup>C]-D-GLICOSE, A 37 °C E 95% DE O<sub>2</sub>, NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DE 10MU/ML DE INSULINA (I) E/OU 50 (P50) OU 100 (P100) mM DE PALMITATO. OS DADOS REPRESENTAM MÉDIA ± EPM DE TRÊS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. .... 63
- FIGURA 51: EFEITO DO AP SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO PELOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS OBTIDOS DE ANIMAIS TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA) INCUBADOS POR 1H EM TAMPÃO BICARBONATO DE KREBS RINGER CONTENDO 5,6 mM DE GLICOSE, 0,1 μCi/mL DE [U-<sup>14</sup>C]-D-GLICOSE, A 37 °C E 95% DE O<sub>2</sub>, NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DE 10MU/ML DE INSULINA (I) E/OU 50 (P50) OU 100 (P100) mM DE PALMITATO. OS DADOS REPRESENTAM MÉDIA ± EPM DE TRÊS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. .... 65
- FIGURA 52: EFEITO DO AP SOBRE A P´RODUÇÃO DE LACTATO PELOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE ANIMAIS TREINADOS POR SEIS SEMANAS (TR) INCUBADOS POR 1H EM TAMPÃO BICARBONATO DE KREBS RINGER CONTENDO 5,6 mM DE GLICOSE, 0,1 μCi/mL DE [U-<sup>14</sup>C]-D-GLICOSE, A 37 °C E 95% DE O<sub>2</sub>, NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DE 10MU/ML DE INSULINA (I) E/OU 50 (P50) OU 100 (P100) mM DE PALMITATO. OS DADOS REPRESENTAM MÉDIA ± EPM DE TRÊS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. .... 67

FIGURA 53: EFEITO DO AP SOBRE A SÍNTESE DE [ $^{14}\text{C}$ ]-GLICOGÊNIO A PARTIR DE [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]-D-GLICOSE PELO MÚSCULO ESQUELÉTICO ESTIMULADO POR INSULINA DE RATOS CONTROLE (C). OS MÚSCULOS FORAM INCUBADOS POR 1H EM TAMPÃO BICARBONATO DE KREBS RINGER CONTENDO 5,6 mM DE GLICOSE, 0,1  $\mu\text{Ci/mL}$  DE [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]-D-GLICOSE, A 37 °C E 95% DE  $\text{O}_2$ , NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DE 10M $\text{U/mL}$  DE INSULINA (I) E/OU 50 (P50) OU 100 (P100) mM DE PALMITATO. OS DADOS REPRESENTAM MÉDIA  $\pm$  EPM DE TRÊS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. .... 69

FIGURA 54: EFEITO DO AP SOBRE A SÍNTESE DE [ $^{14}\text{C}$ ]-GLICOGÊNIO A PARTIR DE [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]-D-GLICOSE PELO MÚSCULO ESQUELÉTICO ESTIMULADO POR INSULINA DE ANIMAIS TREINADOS E AGUDAMENTE EXERCITADOS (TA). OS MÚSCULOS FORAM INCUBADOS POR 1H EM TAMPÃO BICARBONATO DE KREBS RINGER CONTENDO 5,6 mM DE GLICOSE, 0,1  $\mu\text{Ci/mL}$  DE [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]-D-GLICOSE, A 37 °C E 95% DE  $\text{O}_2$ , NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DE 10M $\text{U/mL}$  DE INSULINA (I) E/OU 50 (P50) OU 100 (P100) mM DE PALMITATO. OS DADOS REPRESENTAM MÉDIA  $\pm$  EPM DE TRÊS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. .... 71

FIGURA 55: EFEITO DO AP SOBRE A SÍNTESE DE [ $^{14}\text{C}$ ]-GLICOGÊNIO A PARTIR DE [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]-D-GLICOSE PELO MÚSCULO ESQUELÉTICO ESTIMULADO POR INSULINA DE ANIMAIS TREINADOS POR SEIS SEMANAS (TR). OS MÚSCULOS FORAM INCUBADOS POR 1H EM TAMPÃO BICARBONATO DE KREBS RINGER CONTENDO 5,6 mM DE GLICOSE, 0,1  $\mu\text{Ci/mL}$  DE [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]-D-GLICOSE, A 37 °C E 95% DE  $\text{O}_2$ , NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DE 10M $\text{U/mL}$  DE INSULINA (I) E/OU 50 (P50) OU 100 (P100) mM DE PALMITATO. OS DADOS REPRESENTAM MÉDIA  $\pm$  EPM DE TRÊS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. .... 73

FIGURA 56: RESUMO DOS RESULTADOS DE TRANSFERÊNCIA LIPÍDICA ENTRE LINFÓCITOS E ME. (A): NO GRUPO CONTROLE (C), PARTE SIGNIFICATIVA DOS AG TRANSFERIDOS INCORPOROU-SE NAS DIVERSAS FRAÇÕES LIPÍDICAS DO ME, E UMA MENOR FRAÇÃO FOI OXIDADA E LIBERADA NA FORMA DE [ $^{14}\text{CO}_2$ ]. (B): NO GRUPO TREINADO (TR), MENOR PORÇÃO DOS AG TRANSFERIDOS FOI ENCONTRADA NAS FRAÇÕES LIPÍDICAS ANALISADAS, PORÉM A CAPACIDADE OXIDATIVA DESTES TECIDOS MOSTROU-SE 2 VEZES SUPERIOR ÀQUELA DO GRUPO C. (C): NO GRUPO TREINADO E AGUDAMENTE EXERCITADO (TA), EM COMPARAÇÃO AO C, PROPORÇÕES SIMILARES DE AG FORAM ENCONTRADAS NAS FRAÇÕES LIPÍDICAS ANALISADAS, PORÉM, A CAPACIDADE OXIDATIVA DESTES TECIDOS MOSTROU-SE 5 VEZES SUPERIOR ÀQUELA ENCONTRADA NO C E 3 VEZES A DO TR. .... 91

## RESUMO

As principais fontes de ácidos graxos (AG) para a musculatura esquelética (ME) são os AG provenientes do tecido adiposo, dos triacilgliceróis (TAG) presentes nos quilomícrons (QM) e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e dos TAG presentes no próprio tecido muscular (TAG-IM triacilglicerol intramuscular). Recentemente, nosso grupo postulou os linfócitos (Ly) como fonte adicional de AG para o tecido muscular esquelético. O significado fisiológico deste fenômeno ainda não é conhecido com relação à atividade física, porém, tem-se aventado a possível função destes AG provenientes dos linfócitos como fornecedores de energia, moduladores da resposta à insulina e também da transdução de sinais biológicos.

Uma vez que o exercício físico leva a adaptações orgânicas que otimizam a capacidade de captação e oxidação de substratos pelo ME, investigamos o fenômeno de transferência lipídica entre Ly e ME de animais controle (C), de animais submetidos a treinamento físico de natação, 4 vezes por semana, durante uma hora, com sobrecarga de até 6% do peso corporal (TR) e de animais submetidos a treinamento físico e a sessão aguda de exercício com as mesmas características (TA). O cultivo de Ly na presença dos AG radiomarcados [ $^{14}\text{C}$ ]-Ácido Palmítico (AP), Ácido Oléico (AO), Ácido Linoléico (AL) e Ácido Araquidônico (AA) revelou perfil de incorporação dependente do tamanho da cadeia carbônica da molécula, número de insaturações e da atividade física. No grupo C a incorporação destes lípides deu-se na seguinte amplitude: AA>AL>AO=AP, no grupo TR, AA>AP, e no grupo TA, AA>AL>AO>AP. A transferência de AG dos Ly para o ME no co-cultivo foi, no grupo C, da seguinte ordem: AP=AO>AA>AL, no TR, AP>AA e no TA, AP>AO>AL>AA. No ME estes AG se incorporaram principalmente na fração de fosfolipídios em todos os grupos experimentais. Para os AG AA e AL o treinamento físico seguido de sessão aguda de exercício amplificou este fenômeno. Além de incorporadas, as moléculas de AG transferidas ao ME pelos LY podem ganhar as vias oxidativas levando a formação de [ $^{14}\text{CO}_2$ ]. No grupo TA, a oxidação do AP pelo ME incubado foi 5 vezes maior que aquela do grupo C, e 3 vezes superior a do TR. No grupo TR, este

fenômeno foi 2 vezes maior que àquele do grupo C. Visto que os ME incorporam ativamente as moléculas de AG provenientes dos Ly, passamos a investigar qual seria o possível papel destes AG sobre a modulação do metabolismo de glicose no ME. A síntese de lactado estimulada por insulina em ME incubado de animais controle (C), foi significativamente reduzida, para valores basais, na presença do ácido palmítico (AP) nas concentrações de 50 e 100 $\mu$ M. Este fenômeno teve comportamento similar para o ME dos animais TA e TR, porém com amplitude significativamente menor. A presença do ácido palmítico não afetou a produção de glicogênio pelo ME, com exceção de uma amplificação desta quando da concentração de 50 $\mu$ M no grupo C, evidenciando que a captação de glicose não se tornou comprometida.

Concluimos que os Ly são uma fonte adicional de AG para o ME, e que o treinamento físico seguido de exercício agudo leva a adaptações metabólicas que favorecem a amplificação deste fenômeno. Os AG transferidos dos Ly para o ME podem ter função energética (capacidade oxidativa 5 vezes maior no grupo TA e 2 vezes maior no grupo TR), e/ou modulatória do metabolismo de glicose (redução na síntese de lactato em todos os grupos experimentais).

## ABSTRACT

Triacylglycerols (TAG) from the adipose tissue are the main source of fatty acids (FA) to the skeletal muscle (SM). TAG from chylomicrons, very low density lipoprotein (VLDL) and TAG within skeletal muscle are too important source of FA to this cell. We have shown that FA can be transferred from lymphocytes (Ly) to SM, and we postulate that this might change signal transduction, insulin response and/or represent extra fuel to SM.

Seen that physical exercise could improve muscle capacity to mobilize and oxidize FA, the goal of this study was to investigate the profile of lipid transferred from leukocytes to SM from control rats (C), physically trained during 6 weeks, with overload of 6% of body weight, four days per week, during 1 hour per day (TR) and physically trained during 6 weeks and acutely exercised with the same type of exercise (TA). Lymphocytes were cultivated in the presence of radiolabeled FA [ $^{14}\text{C}$ ]-Palmitic Acid (PA), Oleic Acid (OA), Linoleic Acid (LA) e Arachidonic Acid (AA). In the control group, the incorporation of this FA by the Ly occurred in the largeness of  $\text{AA} > \text{LA} > \text{OA} = \text{PA}$ , in the TR group,  $\text{AA} > \text{PA}$ , and in the TA group,  $\text{AA} > \text{LA} > \text{OA} > \text{PA}$ . This FA would be incorporated in different fractions of the SM, being phospholipids the main fraction in all experimental groups. Other possible fate to the FA incorporated by the SM is the oxidative way, producing [ $^{14}\text{C}$ ] $\text{CO}_2$ . In the TA group, the oxidation of the PA was 5 times higher than that of C group, and 3 times higher than that of TR group. In the TR group, this oxidative capacity was 2 times higher than the C group. Some possible interactions of this FA with the SM metabolism were investigated. The lactate synthesis stimulated by insulin in incubated SM was dramatically reduced in the presence of PA (50 or 100 $\mu\text{M}$ ). This phenomenon was similar to the TR and TA group, however significantly of small amplitude. The presence of the PA didn't affect the glycogen synthesis in incubated SM, what shown that glucose uptake wasn't compromised.

We conclude that Ly are an additional source of FA to the SM, and that physical training followed by acute exercise can promote metabolic adaptations that

could amplify this phenomenon. The FA transferred from Ly to the SM can have energetic function (oxidative capacity 5 times higher in TA group, and 2 times higher in TR group), and/or a function in modulate glucose metabolism (reductions of lactate synthesis in all experimental groups).

## 1.INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos (AG) são moléculas com inúmeras funções no organismo. Entre elas estão as imunomodulatórias por agirem como mediadores intracelulares e intercelulares, podendo estimular ou inibir a proliferação de linfócitos, a produção de anticorpos e citocinas, a expressão de moléculas de adesão e a atividade de células citotóxicas (POMPÉIA *et al.*, 2000). Um ácido graxo extremamente importante para o sistema imunitário é o ácido araquidônico (AA), o qual gera potentes mediadores da inflamação ao ser convertido a eicosanóides, como prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas e tromboxanas (POMPÉIA *et al.*, 2002,).

Em adição, os AG desempenham funções importantes no metabolismo celular, como regulação de atividade enzimática no citoplasma (MALLAMPALLI, 1995), ativação de canais de potássio ( $K^+$ ) (ORDWAY *et al.*, 1989) e mesmo modulação da expressão gênica de proteínas no núcleo (GONZALES *et al.*, 1996). Estão também envolvidos na síntese de hormônios e de estruturas celulares como a membrana plasmática, e ainda podem ter ações sobre o processo secretório da insulina (GARCIA JÚNIOR, 2000; HABER *et al.*, 2001).

Na musculatura esquelética (ME), em adição as diversas funções citadas, os AG são importantes moduladores do metabolismo da glicose, e da responsividade a insulina (DRESNER *et al.*, 1999; RANDLE, 1998; RANDLE, 1994). São ainda fonte de combustível energético para a produção de adenosina trifosfato (ATP), em particular, durante exercícios aeróbios, onde passam a ser o principal substrato utilizado (ACHTEN *et al.*, 2003; SPRIET, 2002; HOROWITZ *et al.*, 2000; ACHTEN *et al.*, 2001; HAWLEY, 2001).

## **Metabolismo de ácidos graxos durante exercícios aeróbios**

### ***Cinética de ácidos graxos durante exercícios aeróbios***

As fontes de ácidos (AG) para utilização nos músculos esqueléticos são os triacilgliceróis (TAG) do tecido adiposo (os quais representam a principal reserva energética disponível no homem), o TAG dos quilomícrons e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) circulantes e o TAG do próprio tecido muscular (triacilglicerídeos intramusculares - TGIMs) (GARCIA JUNIOR *et al.*, 2002; RASMUSSEN *et al.*, 1999). A importância das diferentes fontes de AG para o músculo esquelético ainda é uma questão controversa, visto que enquanto alguns autores sugerem os ácidos graxos plasmáticos (provindos principalmente do tecido adiposo) como a principal fonte para este tecido (HOROWITZ, 2000) outros autores postulam que a importância maior é dos AG da própria reserva muscular na forma de TAG (BERGMAN, 1999). Evidências recentes da transferência de ácidos graxos de linfócitos para a musculatura esquelética sugerem estas células, os linfócitos, como outra possível fonte adicional de AG ao tecido muscular esquelético (CURI *et al.*, 2002 A; PARDAL, 2002; NOGATA, 2004).

Segundo SPRIET (2001), os principais pontos que regulam o metabolismo e a oxidação de ácidos graxos durante o exercício incluem: 1- lipólise do tecido adiposo e subsequente entrega de ácidos graxos livres ao músculo; 2 - movimento dos ácidos graxos livres através da membrana muscular; 3 - regulação da atividade da triglicerídeo lípase; e 4 - regulação do movimento de ácidos graxos livres através das membranas mitocôndrias – Carnitina Palmitoil Transferase (CPT).

Os tipos de exercício físico que se beneficiam de forma significativa do metabolismo dos AG são aqueles com duração superior a 30 minutos e que se prolongam por algumas horas, os quais podem apresentar aumento de 5 a 10 vezes na oxidação de AG acima dos níveis de repouso. Por exemplo, durante exercício prolongado com intensidade de 40% do  $\text{VO}_2$  máx, a oxidação lipídica aumenta de  $0,8\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$  (repouso) para  $4,2\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ , devido ao aumento da necessidade energética muscular e aumento na disponibilidade de AG (HOROWITZ, *et al.*, 2001),

permanecendo elevada ( $1,2 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) durante, pelo menos, uma hora do período de recuperação. Nesse momento o estoque de glicogênio está acentuadamente diminuído e a atividade metabólica continua aumentada, fazendo dos AG o principal substrato energético utilizado (GARCIA JÚNIOR *et al.*, 2002). Ainda, com relação a duração do exercício, conforme esta aumenta, observa-se que a contribuição dos TGIMs para a oxidação total de gordura declina e a contribuição dos AG do plasma aumenta (GUO *et al.*, 2000).

Além disso, esforços de longa duração e intensidade moderada levam a um efeito poupador do glicogênio, havendo maior utilização dos AG como substrato energético (HOROWITZ *et al.*, 2000). A hipótese que parece melhor explicar esse “desvio” do metabolismo dos carboidratos para os lipídios é o ciclo de Randle (Randle, 1963), o qual postula que com o aumento da disponibilidade de ácidos graxos, há maior oxidação deste, diminuindo, paralelamente, a degradação de glicogênio e a utilização da glicose.

Grande parte do aumento na disponibilidade deste substrato (AG), durante o exercício, é devido à elevação da lipólise do tecido adiposo (2 a 3x), a qual é mediada por uma acentuação na estimulação  $\beta$  adrenérgica. Em adição, a porcentagem de ácidos graxos liberados que são reesterificados decaem para a metade durante situações de exercício físico, presumivelmente por alterações no fluxo sanguíneo, visto que exercícios moderados dobram o fluxo sangüíneo ao tecido adiposo, e causam aumento de 10 vezes no fluxo sanguíneo ao músculo esquelético (CURI *et al.*, 2002 A). Isto facilita a entrega de ácidos graxos a partir do tecido adiposo aos músculos em atividade (GARCIA JÚNIOR *et al.*, 2002).

Diversos investigadores têm demonstrado que a taxa de desaparecimento de ácidos graxos (Rd), ou taxa de captação de ácidos graxos, é menor que sua oxidação durante as primeiras 1 às 2h de exercício, sugerindo que outra fonte de gordura, presumivelmente os TAG plasmáticos ou TGIMs, estão sendo oxidados em adição aos AG plasmáticos derivados do tecido adiposo (HOROWITZ *et al.*, 2000).

Por fim, a elevação do uso dos TAG durante o exercício representa uma integração cuidadosa de eventos neurais, hormonais, circulatórios, e musculares,

que aumentam o requerimento de energia, e facilitam entrega de AG oriundos dos estoques do tecido adiposo e dos TGIMs, para mitocôndria do músculo esquelético para oxidação (SPRIET, 2001).

### ***Metabolismo de ácidos graxos no indivíduo aerobiamente treinado***

Comparadas a pessoas destreinadas, que se exercitam numa mesma intensidade absoluta ou relativa, pessoas que foram submetidas a treinamento aeróbio apresentam melhor oxidação de gordura durante exercício (HOROWITZ *et al.*, 2000 ; SPRIET, 2001). TURCOTTE *et al.*, (1992) mostraram que a captação de ácidos graxos livres (AGL) do plasma é significativamente maior em homens treinados que em não treinados durante 3 horas de exercício. Esses achados indicam que o treinamento aeróbio eleva a oxidação de gorduras durante exercícios submáximos (HOROWITZ *et al.*, 2000 ; SPRIET, 2001; TURCOTTE *et al.*,1992).

Vários fatores contribuem para esta resposta adaptativa, tais como: aumento da densidade mitocôndrial dos ME, o que aumenta a capacidade de oxidação de gorduras; a proliferação de capilares no ME, o que proporciona maior entrega de AG ao músculo; alterações na estrutura dos fosfolipídios (FL) da membrana plasmática do ME (sarcolema), o que influencia na permeabilidade aos AG circulantes; um aumento das proteínas ligadoras de AG (fatty acid binding proteins) que regulam o transporte de AG no miócito, e ainda, uma melhora na capacidade do complexo carnitina palmitoil transferase (CPT), o que facilita o transporte de AG através da membrana mitocondrial (GARCIA JÚNIOR *et al.*, 2002; SRIET, 2001; HELGE, *et al.*, 1999; GALBO, *et al.*, 1996).

## **ADAPTAÇÕES CELULARES NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DECORRENTES DE TREINAMENTO AERÓBIO**

### ***Aumento da capilaridade periférica (angiogênese)***

A capilaridade músculo esquelética é um ponto determinante do desempenho no exercício (KRAUS, 2004), tendo em vista sua importante função de entrega de O<sub>2</sub> e substratos a este tecido (HAAS, 2002). Tem sido demonstrado ser o treinamento aeróbio capaz de aumentar o leito vascular através do aumento no número de pequenas arteríolas (angiogênese) e no diâmetro dos grandes vasos (WATERS, 2004; DESCHENES, 1999; WHITE, 1998). Esta angiogênese resultante do treinamento físico aeróbio parece estar relacionada à contração muscular, a qual cria um potente estímulo para o remodelamento estrutural vascular (PRIOR, 2004) elevando os níveis do mRNA para o fator de crescimento endotelial VEGF (do inglês – vascular endothelial growth factor) (LHOYD, 2003), e aumento da atividade mitótica das células endoteliais (DESCHENES, 1999). Desta forma, o aumento na capilaridade periférica resulta em um maior fluxo sanguíneo, conseqüentemente maior aporte de O<sub>2</sub> e substratos, elevando a capacidade do ME oxidar AG durante exercício físico.

### ***Fosfolipídios de membrana***

O processo de entrada dos AG na célula representa a etapa inicial de sua oxidação, e portanto, pode ser considerado como passo limitante deste.

Até recentemente acreditava-se que os AGL simplesmente difundiam-se através da bicamada lipídica da membrana muscular para dentro da célula muscular, pois sendo essas moléculas hidrofóbicas, não teriam problemas em atravessar a membrana plasmática, também hidrofóbica (GARCIA JÚNIOR, 2002).

Segundo PERES (2002), este processo de difusão possuiria três etapas:

- Adsorção a membrana – associação à face externa da membrana

- Movimento transmembrânico – transferência de AG de uma das faces da bicamada de FL da membrana para outra (flip-flop)
- Dessorção – desprendimento de membrana

A concentração de AG ou a taxa de entrega destes, controlariam sua captação pela célula muscular.

Os AG constituintes dos fosfolípidos das membranas celulares são componentes que influenciam suas propriedades físicas tais como permeabilidade, fluidez e o ancoramento de proteínas, e ainda correlacionam-se diretamente com o fenômeno de resistência a insulina (R.I.) (HELGE *et al.*, 1999). A concentração aumentada de AG saturados caracteristicamente levam a uma rigidez da membrana plasmática, enquanto que a presença aumentada de duplas ligações (aumento de AG insaturados) eleva concomitantemente a flexibilidade e fluidez (HELGE *et al.*, 1998). Aumento na proporção de AG insaturados também é associado à melhora da ação insulínica, enquanto aumento de AG saturados levam à RI (HELGE 1998).

O treinamento físico promove adaptações em várias etapas da utilização de AG, inclusive na membrana celular (sarcolema) dos ME, aumentando o limiar de saturação para a captação desses (GALBO *et al.*, 1996), e alterando a estrutura dos FL da membrana, mesmo sem modificação da dieta (HELGE *et al.*, 1999). O estímulo lipolítico do exercício mobiliza seletivamente AG insaturados dos depósitos de gordura do organismo (HELGE *et al.*, 1999), e o estímulo oxidativo tem preferência pelos AG saturados. Este efeito disponibiliza AG insaturados para serem incorporados pelas membranas celulares causando, cronicamente, elevação na concentração destes na membrana plasmática do ME, e reduzindo a concentração de AG saturados (THOMAS *et al.*, 1997). Anderson *et al.*, (1998) demonstraram que após 6 semanas de treinamento físico de baixa intensidade houve significante alterações nos AG dos FL, com aumento na concentração de monoinsaturados e redução na de saturados.

Alterações desta natureza influenciam nas propriedades físicas da membrana, como a própria permeabilidade aos AG circulantes e tais resultados podem contribuir para explicar o motivo pelo qual indivíduos treinados apresentam maior capacidade

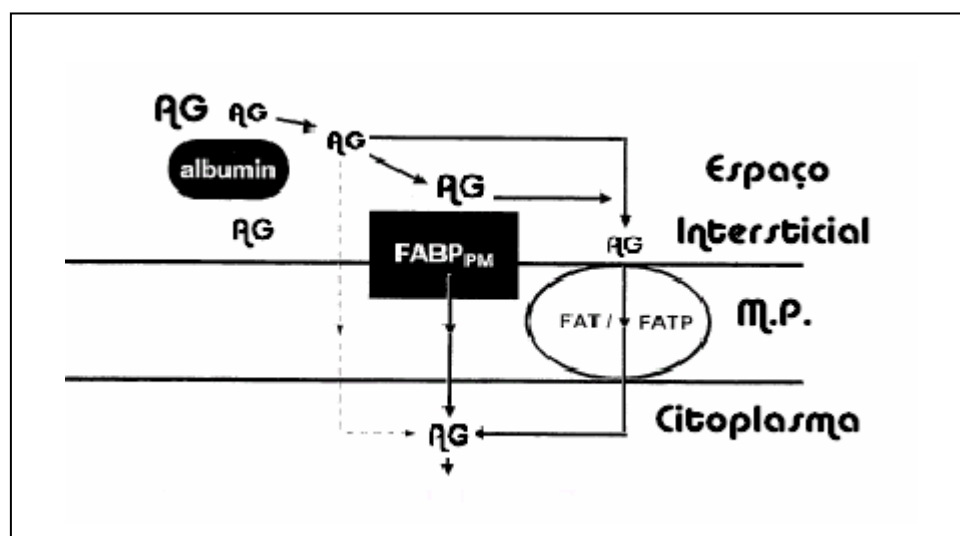
de utilização dos AG na oxidação muscular durante exercício (GARCIA JÚNIOR *et al.*, 2002), e como o exercício físico é eficiente em melhorar a sensibilidade a insulina do ME (HELGE *et al.*, 1998).

### ***Proteínas carreadoras de ácidos graxos***

Apesar de existir uma correlação positiva entre a concentração total de AG plasmáticos e o turnover total destes, evidências recentes vindas de ME de ratos perfundidos, e de humanos em exercício, revelaram que a captação de AGL é um processo saturável, sugerindo o envolvimento de mecanismo mediado por carreador (RASMUSSEN *et al.*, 1999).

Existe hoje grande volume de dados mostrando que a maior parte dos AG entram na célula muscular através de um mecanismo mediado por proteínas (SPRIET, 2001). Este transporte poderia ser realizado por proteínas carreadoras, ou através de facilitação do movimento da molécula de AG através da membrana por ligação inicial a proteínas de transporte (KIM, 2004). As proteínas carreadoras de AG foram identificadas pela primeira vez a 28 anos, e têm sido utilizadas nos estudos das interações de proteínas com lipídeos (PERES, 2002). SPRIET (2001), relatou que nos últimos dez anos foram identificadas e clonadas três proteínas transportadoras de AG em potencial: a proteína ligante de AG da membrana plasmática (FABP<sub>pm</sub>, do inglês fatty acid binding protein), a translocase de AG (FAT/CD36, do inglês fatty acid translocase), e a proteína transportadora de AG (FATP, do inglês fatty acid transport protein). Em adição, foi demonstrado que a estimulação elétrica crônica foi capaz de aumentar a expressão do mRNA de FAT/CD36, a proteína, vesículas de transporte de AG, e a oxidação de AG em músculos vermelho e branco de roedores. O treinamento aeróbico em humanos também tem sido mostrado ser capaz de aumentar o conteúdo muscular das FABP<sub>pm</sub> (KIENS *et al.*, 1997; TURCOTTE *et al.*, 1992; TURCOTTE *et al.*, 1997). No entanto, o mais surpreendente achado, é o fato de que a proteína FAT/CD36 parece ser

agudamente translocada de um pool intracelular para a membrana muscular durante a contração do músculo, de maneira similar ao que acontece ao transportador GLUT 4, sugerindo desta forma, um mecanismo para o aumento na captação de ácidos graxos durante o exercício (BONEN *et al.*, 2000). Portanto, o processo de captação dos AG pelas células musculares é etapa controladora da sua oxidação (GARCIA JÚNIOR, 2002).

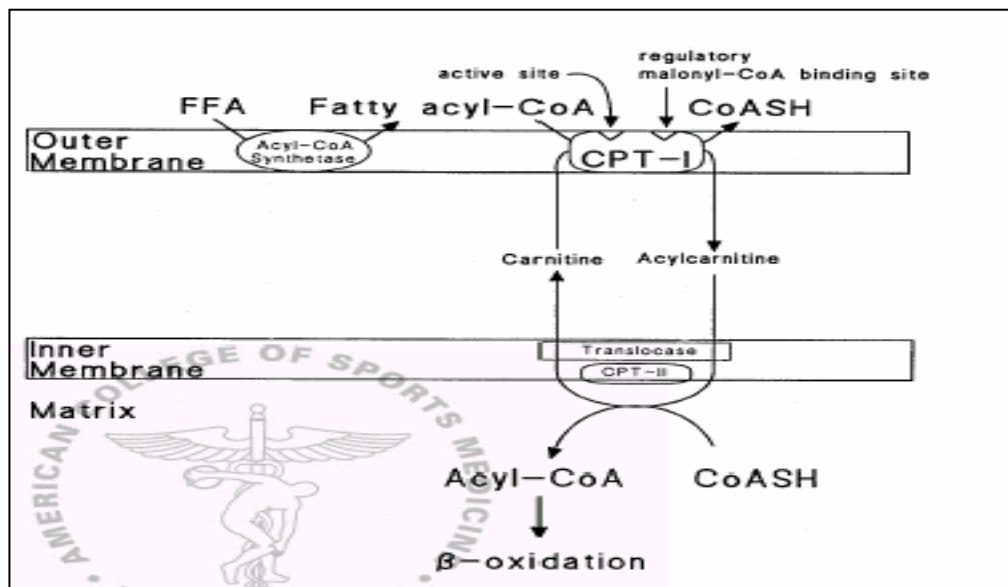


**FIGURA 01:** Principais proteínas envolvidas no transporte de AG para o interior da célula muscular esquelética. a proteína ligante de AG da membrana plasmática (FABP<sub>pm</sub>, do inglês fatty acid binding protein), a translocase de AG (FAT/CD36, do inglês fatty acid translocase), e a proteína transportadora de AG (FATP, do inglês fatty acid transport protein) De Spriet (2002).

### **Complexo carnitina palmitoil transferase (CPT)**

O complexo (CPT) consiste das 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, onde a essa molécula sofrerá então a  $\beta$  oxidação (SPRIET, 2001). A contribuição dos AG para o metabolismo muscular em exercícios prolongados com intensidade moderada, pode ser confirmada pelo fato de que a

concentração de acil-carnitina aumenta em cerca de três vezes durante o esforço e se mantém elevada até a exaustão (SAHLIN, 1990). Foi ainda demonstrado que a atividade da CPT eleva-se com o treinamento aeróbio (BOYADJIEV, 1996), aumentando, concomitantemente, a capacidade de oxidação de AG pelo ME de indivíduos treinados.



**FIGURA 02:** Esquema da atividade da enzima carnitina palmitoil transferase (CPT) no processo de passagem de ácidos graxos através dupla membrana mitocondrial. FFA, Fat free ácidos (ácidos graxos livres, De Spriet (2002).

### ***Densidade mitocondrial***

Assim como a capilaridade periférica, as proteínas transportadoras de AG, e o transporte de AG para a matriz da mitocôndria são modulados positivamente pelo treinamento aeróbio, a atividade mitocondrial sofre adaptações concomitantes para assegurar o aproveitamento eficiente dos substratos disponibilizados, suprimindo as demandas energéticas durante exercícios prolongados (OSCAI *et al.*, 1996). Neste tipo de exercício, o turnover energético pode se elevar em até 400 vezes os valores de repouso, enquanto o consumo de oxigênio pelo músculo pode aumentar mais que 100 vezes. Existem evidências convincentes de que a máxima capacidade oxidativa

mitocondrial ( $V_{m\acute{a}x}$ ) no musculo esqueletico humano,  maior que aquela requerida durante exercícios com grandes grupos musculares. Junto a este fato ocorre um aumento da densidade e da atividade mitocondrial durante o treinamento aeróbio, além de um aumento significativo do número destas organelas no ME, elevando a capacidade deste tecido oxidar AG (TONKONOGI *et al.*, 2002).

### **Linfócitos**

Os linfócitos são células circulantes pequenas (08  $\mu\text{m}$  a 12  $\mu\text{m}$ ) (ABBAS, 2000), com alta razão núcleo / citoplasma e tem origem nos tecidos linfóides primários (timo e medula óssea) podendo migrar para órgãos linfóides secundários (baço, linfonodos, placa de Peyer) (CURI *et al.*, 2002 A). De acordo com sua origem, os linfócitos são divididos em linfócitos T e B. O linfócito B atinge a maturidade na medula óssea e está relacionado com a imunidade humoral. Apresenta imunoglobulinas na superfície, quando ativado por antígeno específico, prolifera-se por mitose e se diferencia em plasmcito, secretando, assim, grande quantidade de anticorpos. Os linfócitos B ainda podem diferenciar-se em células de memória imunológica, as quais respondem mais rapidamente a uma próxima exposio a um mesmo antígeno (ABBAS *et al.*, 2000).

Os linfócitos T são os mais numerosos do sangue. Possuem diferenciao e maturo intratmica, não sintetizam quantidades detectáveis de imunoglobulinas, mas atuam como reguladores da resposta imunitária celular. Integra a populao de linfócitos T uma série de subtipos celulares com funoes específicas na resposta imunitária: células citotóxicas (Tc), auxiliares ou *helper* (Th) e supressoras (Ts) (ABBAS, *et al.*, 2002).

### **Metabolismo de Linfócitos**

Linfócitos maduros recirculam via sangue e linfa através dos tecidos linfóides num estado relativamente quiescente, até que sejam estimulados a se proliferarem por uma infecção bacteriana ou viral por exemplo (NEWSHOLME *et al.*, 1999). Nos anos 80 houve um grande avanço no entendimento do metabolismo das células do sistema imunitário, possibilitando o conhecimento dos substratos energéticos preferencialmente utilizados por estas células e suas vias de principais de metabolização.

Glicose e glutamina são utilizadas ativamente por linfócitos incubados, entretanto, esses substratos são apenas parcialmente metabolizados, sendo a glicose convertida a lactato, e a glutamina convertida a glutamato, aspartato e lactato (NEWSHOLME *et al.*, 2003 ; OTTON *et al.*, 2002 ; BACURAL *et al.*, 2000). Há assim, intensa atividade de glicólise e glutaminólise parciais, e a oxidação parcial destes substratos, com baixa produção de CO<sub>2</sub>, é indicativo de que essas substâncias não são utilizadas exclusivamente para a produção de ATP por estas células (PERES, 2000). O piruvato, derivado da metabolização de glicose e glutamina, não é oxidado pelas reações do ciclo de krebs, e além de gerar acetato, citrato e corpos cetônicos em linfócitos incubados, este metabólito é precursor importante para a síntese de lipídeos, via acetil coenzima A (acetil CoA) (CURI *et al.*, 2002 A). Os lipídeos sintetizados a partir do piruvato (AGL, FL e colesterol (COL)), são acumulados intracelularmente, porém, são também ativamente exportados para o meio (CURI, 2002 A), como demonstraram HOMEM DE BITTENCOURT *et al.*, (1993), onde linfócitos cultivados com piruvato por 24h sintetizaram ampla variedade de lipídeos (AG, FL, COL), os quais foram exportados para o meio de incubação.

### ***Destino do acetil CoA em linfócitos***

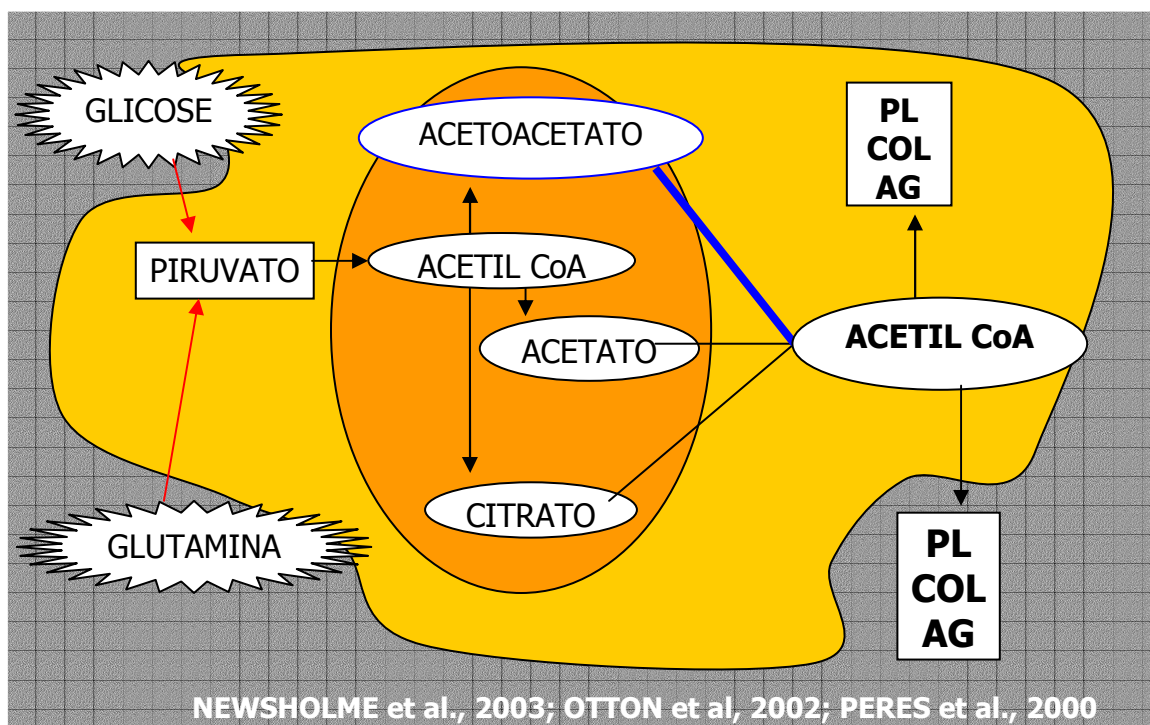
A descarboxilação do piruvato, promovida pela enzima piruvato desidrogenase (PDH), forma acetil-CoA que, devido ao tamanho da molécula, permanece na mitocôndria. Uma vez que em macrófagos e linfócitos o acetil CoA não se acumula

na mitocôndria e nem é descarboxilado em altas taxas, devem existir mecanismos de transporte para que haja transferência deste metabólito para o citoplasma (CURI, 2002 B). Com o objetivo de estudar esses sistemas de transporte, a atividade das enzimas acetil CoA hidrolase que forma acetato, (facilmente permeável à membrana mitocondrial), e da ATP citrato liase presente no citoplasma de linfócitos, foram determinadas (CURI *et al.*, 1989 A e B). Apesar da presença de atividade significativa das duas enzimas, na incubação com mitocôndrias isoladas (obtidas dos linfonodos mesentéricos), a conversão do piruvato em acetato e citrato foi baixa.

Sabe-se que no fígado dos mamíferos, quando há excesso de acetil-CoA, duas dessas moléculas condensam-se formando acetoacetato e 3-hidroxiacetato, os corpos cetônicos (CURI, 2002 B). Procurou-se então, como possibilidade adicional, verificar a síntese de corpos cetônicos no linfócito. Inicialmente, a atividade das enzimas relacionadas com a síntese dos corpos cetônicos foi determinada (CURI *et al.*, 1989 A e B) e em seguida investigou-se a formação destas espécies químicas a partir do piruvato em mitocôndrias incubadas. Os resultados obtidos são indicativos de que o acetoacetato (50% do total do piruvato consumido) representa, provavelmente, o principal metabólito para a transferência do acetil CoA da mitocôndria para o citoplasma (CURI *et al.*, 1999).

Uma vez no citoplasma, o acetil CoA pode ser utilizado para a formação de lipídios (TAG, FL e COL), constituindo etapa fundamental no processo de proliferação celular (constituição de componentes estruturais e duplicação de DNA). Este processo é disparado rapidamente e, portanto, para assegurar a eficiência no suprimento da demanda metabólica, é mais fácil desviar metabólitos de vias ativas que estimular uma via a partir de seu início. Trata-se da “regulação metabólica em ramo” proposta por Crabtree e Newsholme (1985) e que explica o alto fluxo de metabólitos mesmo em células quiescentes (não estimuladas), desde que apresentem potencialidade para proliferação rápida. Assim, é possível que o acetoacetato seja formado e acumulado na célula quiescente e quando o processo de divisão celular é então disparado (Marx, 1991; Clevenger *et al.*, 1991) ocorre desvio do acetoacetato para a produção de lipídios essenciais ao processo

proliferativo. Os principais lipídios incorporados em linfócitos e macrófagos cultivados por 24 h na presença de piruvato foram: FL, COL e AG, principalmente AA (HOMEN-DE-BITTENCOURT *et al.*, 1993). Quantidade considerável destes foi também ativamente exportada pelas células ao meio de cultura. O perfil observado no linfócito foi ligeiramente diferente daquele obtido no macrófago, que não apresenta a capacidade de proliferar-se, mas que possui um metabolismo mais ativo, pois necessita renovar sua membrana a cada 30 minutos aproximadamente (PERES, 2002). Os macrófagos sintetizam muito mais lipídios a partir de piruvato que os linfócitos e, por sua vez, a proporção de lipídios exportada por macrófagos é muito maior que a quantidade acumulada na célula (cerca de sete vezes). Essa capacidade de exportar lipídios é bem maior em macrófagos elicitados que nas células residentes (PERES, 1999).



**FIGURA 03:** Vias de metabolização da glutamina e glicose nos linfócitos até a geração e exportação dos lipídeos. Os lipídeos formados podem ser incorporados na fração celular ou serem exportados (HOMEM DE BITTENCOURT jr *et al.*, 1993; PERES *et al.*, 1997 e CURI e PERES, 2002).

### ***Transferência lipídica entre células***

A partir da observação de que linfócitos e macrófagos eram hábeis em sintetizar e exportar lipídeos, hipotetizou-se a possível função destas moléculas em mecanismos de sinalização e interação intercelulares. Estudos demonstraram que há incorporação de AG pelas células do sistema imunitário, e também por outros tecidos quando em co-cultivo (PERES, 19997 ; GARCIA JÚNIOR, 2000).

PERES (1997) demonstrou que macrófagos e linfócitos, quando co-incubados, são capazes de transferir lipídeos entre si. Utilizando moléculas de ácidos graxos rádio-marcados, mostrou ser este fenômeno modulado pelas características estruturais (insaturações e tamanho da cadeia carbônica) dos lipídeos utilizados. Em experimentos de incubação de MA- macrófago peritoneais com AG rádio-marcados, o perfil de incorporação dos lipídeos pelas células deu-se nas seguintes proporções: AA(poliinsaturado) >> AL(diinsaturado) = AP(saturado) > AO(monoinsaturado). A maior parte dos AG captados pelos macrófagos incorporou-se em fosfolipídio de membrana, mas também esterificaram-se em triacilglicerol e éster de colesterol, o que proporcionaria um influxo constante de AG do meio ao interior da célula.

Estes mesmos macrófagos, após incubados com os AG rádio-marcados, foram então co-incubados com linfócitos obtidos dos linfonodos mesentéricos. Foi possível, após o período de co-incubação, encontrar nos LY-linfócitos parte da radioatividade presente antes em MA, nas seguintes proporções: AA=AO>AL=AP. De modo semelhante aos MA, grande parte dos AG captados pelos LY incorporou-se em FL. A mensuração dos lipídeos presentes no meio após a co-incubação (AGL>FL>LP), mostrou uma compatibilidade com o perfil encontrado nos FL dos LY co-incubados, sugerindo a possibilidade dos FL serem transferidos entre células. Estes achados são importantes, tendo em vista o fato de que metabólitos dos AG podem modular a

função imunitária, e assim as interações entre as células são importantes para o desempenho da resposta imunitária.

NISHIYAMA-NARUKE E CURI (2000) mostraram que a fosfatidilcolina (FC) é ativamente transferida de macrófagos e linfócitos em co-cultivo, podendo intervir como mediador de moléculas e no controle proliferativo de linfócitos e macrófagos.

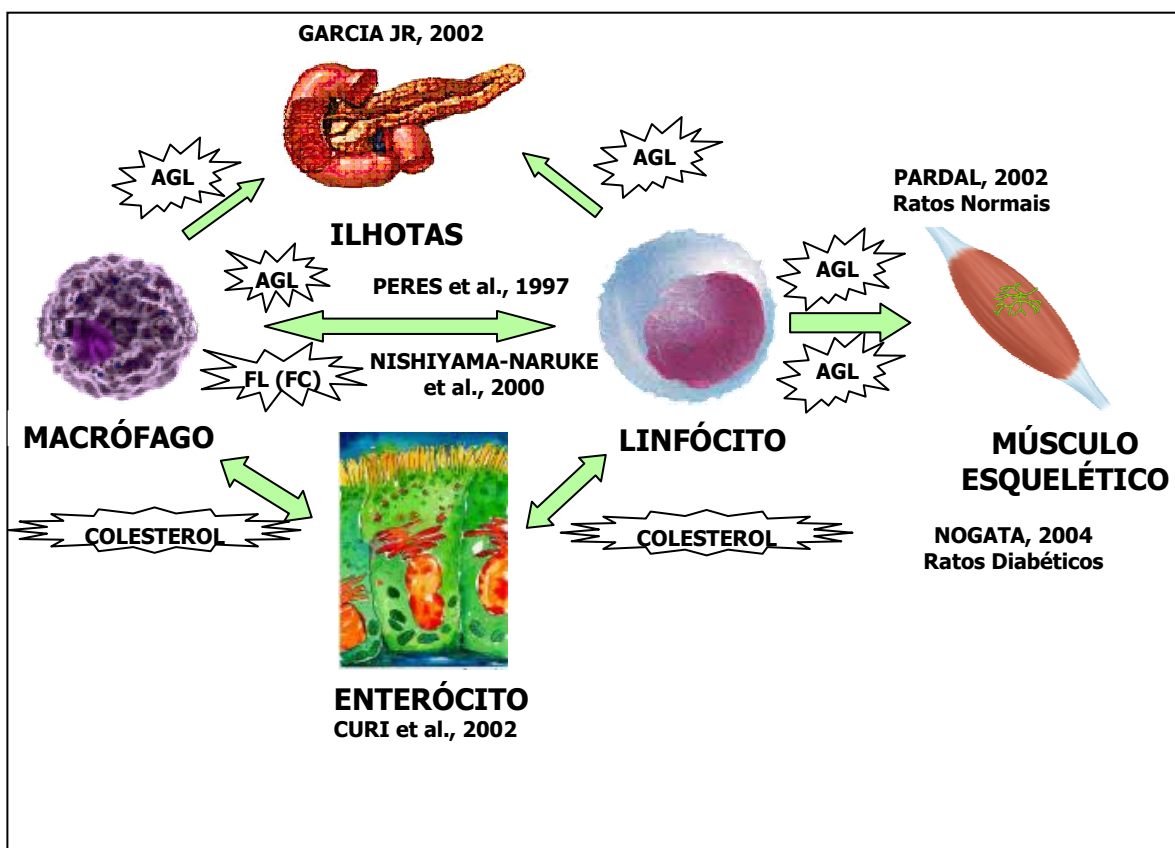
A transferência de lipídeos também ocorre de leucócitos para células não leucocitárias. Linfócitos e macrófagos transferem COL para enterócitos e recebem COL destas células (CURI *et al.*, 2002 A).

Uma vez demonstrada a habilidade de leucócitos sintetizarem e transferirem lípidos entre si, e sendo estas células circulantes, a possível interação das mesmas com outros tecidos corporais através da transferência de lípidos foi hipotetizada e passou a ser investigada. GARCIA JÚNIOR (2001), mostrou que macrófagos, após serem cultivados por 6 horas com AO, AL, AP e AA rádio-marcados, e então co-cultivados com ilhotas de Langerhans, durante período de 3 horas, são capazes de exportar estas moléculas ao meio de cultura, e que estas ilhotas eram hábeis em captar o AG exportado.

Em experimentos *in vivo* verificou-se que linfócitos pré-tratados com AA rádio-marcado transferem quantidades significativas de radioatividade para glândulas adrenais, fígado, baço e aorta, sendo que, desta forma, os lipídios (incluindo os AG) podem se constituir em moléculas de sinalização entre células, assim como atuam as citocinas e os autacóides (CURI *et al.*, 2002 A).

PARDAL (2002) realizou o primeiro trabalho de investigação da ocorrência de transferência lipídica entre linfócitos e musculatura esquelética. Ratos machos Wistar foram sacrificados e os linfócitos dos linfonodos mesentéricos foram retirados. Estes foram cultivados em meio Eagle durante 6 h na presença do ácido [<sup>14</sup>C]-palmítico. Após o cultivo, outros ratos foram sacrificados e o músculo sóleo retirado e incubado por 3 h em tampão Krebs-Ringer contendo 5,6 mM de glicose e albumina sérica bovina (BSA) a 1%, na presença dos linfócitos pré-tratados com o ácido [<sup>14</sup>C]-palmítico. Após a incubação, avaliou-se a quantidade de AG exportada dos linfócitos e incorporada no ME e a sua distribuição nas diferentes frações lipídicas, conforme

avaliado por cromatografia de camada delgada. A transferência de ácido [ $^{14}\text{C}$ ]-palmítico do linfócito para o músculo esquelético foi de 18%, sendo a maior parte deste incorporada em FL (70%) e TAG (9%).



**FIGURA 04:** Resumo dos experimentos com transferência lipídica entre células. AG, ácido graxo; AGL, ácido graxo livre, FL, fosfolípido, FC, fosfatidilcolina.

Estes resultados sugerem que os leucócitos constituem uma fonte adicional de AG para a musculatura esquelética e que esta transferência pode ser mais relevante em situações onde há aumento de contato entre estes dois tipos celulares, como no exercício físico, quando a demanda por AG neste tecido aumenta significativamente, o fluxo sanguíneo é substancialmente elevado e as concentrações de leucócitos também pode elevar-se (KLARLUND *et al.*, 2000) e em ações patológicas, onde

também há aumento do número de leucócitos. Assim, foi demonstrado que as células do sistema imunitário são importantes exportadores de AG e seus metabólitos, os quais podem ou não, serem utilizados por outras células e tecidos.

O mecanismo pelo do qual os AG são transportados através da membrana celular é controverso, devido a questão de ser este transporte mediado por proteínas, ou se simplesmente as moléculas atravessam a fase lipídica das membranas (KLENFIELD,2000). Alguns autores sugerem que os AG protonados (não ionizados, de natureza hidrofóbica) poderiam atravessar a membrana rapidamente, por simples difusão (KAMP *et al.*, 1992), ou mediada pela geração de um gradiente de concentração, promovido por uma proteína citoplasmática que se liga aos AG. Apesar da passagem de AG de uma célula a outra, reforçar a hipótese de que o fenômeno de transferência de AG através de membranas pode ocorrer por simples difusão, outros autores sugerem que a presença de uma proteína ligada à membrana (FABP, fatty acid binding protein), forma uma família de proteínas com expressão tecido-específica. Estas proteínas estão ligadas ao transporte de AG, facilitando o processo de fluxo transmembrana por um mecanismo que também parece ser tecido específico (RICHIERI *et al.*, 2000). As FABP também participam do transporte intracelular dos AG ligados a albumina extracelular, e dos AG que estão dentro das células (KAMP *et al.*, 1991).

### ***Interações entre metabolismo de ácidos graxos e glicose no músculo esquelético***

O ciclo da glicose – AG, postulado por Randle e colaboradores (1963), prove explicações para a interação entre substratos em diversas circunstâncias. Randle propôs este ciclo em estudos com coração e diafragma de rato, observando a princípio, que o aumento de AGL no plasma aumentava concomitantemente sua oxidação, e assim diminuía o metabolismo de carboidratos (CHO) e a captação de glicose por estes tecidos. Altas concentrações de AG ocorrem, por exemplo, em várias situações de resistência a insulina, tais como obesidade, diabetes tipo 2,

traumas severos e sepsia (RASMUSSEN *et al.*, 1999). Somando-se a isso, o ciclo da glicose – AG, também constitui um mecanismo potencial para regular a interação entre substratos durante o exercício (PARDAL, 2002 ; CURI *et al.*, 2002 A; NEWSHOLME, 1996; SPRIET *et al.*, 1996). Os pontos-chave desta hipótese podem ser encadeados da seguinte maneira: o aumento plasmático de AGL induz a beta oxidação ( $\beta$ -oxidação) de AG com aumento da produção de acetil-CoA, levando a inibição da piruvato PDH e oxidação do piruvato. Ao mesmo tempo, o aumento de citrato e ATP inibem a fosfofrutoquinase (PFK) e a glicólise, resultando em acúmulo da glicose-6-fosfato (G-6-P). Esta, por sua vez, leva a inibição da atividade da hexoquinase (HK), com redução da captação e fosforilação da glicose (RASMUSSEN, 1999 ; HABER, 2001; DRESNER *et al.*, 1999).

Além disso, os AG alteram a secreção de insulina pelas ilhotas de Langerhans (GARCIA JÚNIOR, 2000), e também são capazes de interferir em ações mediadas por este hormônio em vários tecidos, como o ME, fígado e adipócitos (CURI *et al.*, 2002 A).

Estudos recentes mostraram que os AG parecem inibir a captação de glicose estimulada pela insulina, ao invés de competir com esta na produção de ATP, pois verificou-se que os AG levam a redução na ativação de proteínas envolvidas na sinalização insulínica – Receptor da insulina, Substrato para o receptor da insulina (IRS), Fosfatidil inositol 3-quinase (PI-3K), e Proteína quinase B (PKB) – diminuindo assim, a captação, oxidação e armazenagem de glicose (CURI *et al.*, 2002 A; DRESNER *et al.*, 1999). Esta influência parece depender de vários fatores, como conteúdo de metabólitos gerados (acil-CoA, ceramida, diacilglicerol e triacilglicerol); composição fosfolipídica da membrana plasmática, tipo de AG predominante e tempo de exposição a esta molécula (HIRABARA, 2005). Por exemplo, os AG saturados (como o ácido palmítico) podem induzir resistência a insulina em vários tipos celulares, enquanto os AG poliinsaturados, especialmente aqueles da família  $\omega$ 3, têm sido implicados no aumento de sensibilidade à ação do hormônio (HIRABARA, 2005; RODEN, 2004).

Desta maneira, os linfócitos podem exercer importante interferência no metabolismo da glicose, através da transferência de AG ao ME. Isto seria relevante principalmente nas situações em que há elevação do fluxo sanguíneo, como ocorre durante o exercício físico (aumento de 10 a 40 vezes) (CURI, *et al.*, 2002 A), onde esta transferência pode se tornar significativa pelo aumento de contato entre estes dois tipos celulares. Nesta situação, as moléculas de AG, então em contato acentuado com o ME, poderiam modular o metabolismo da glicose.

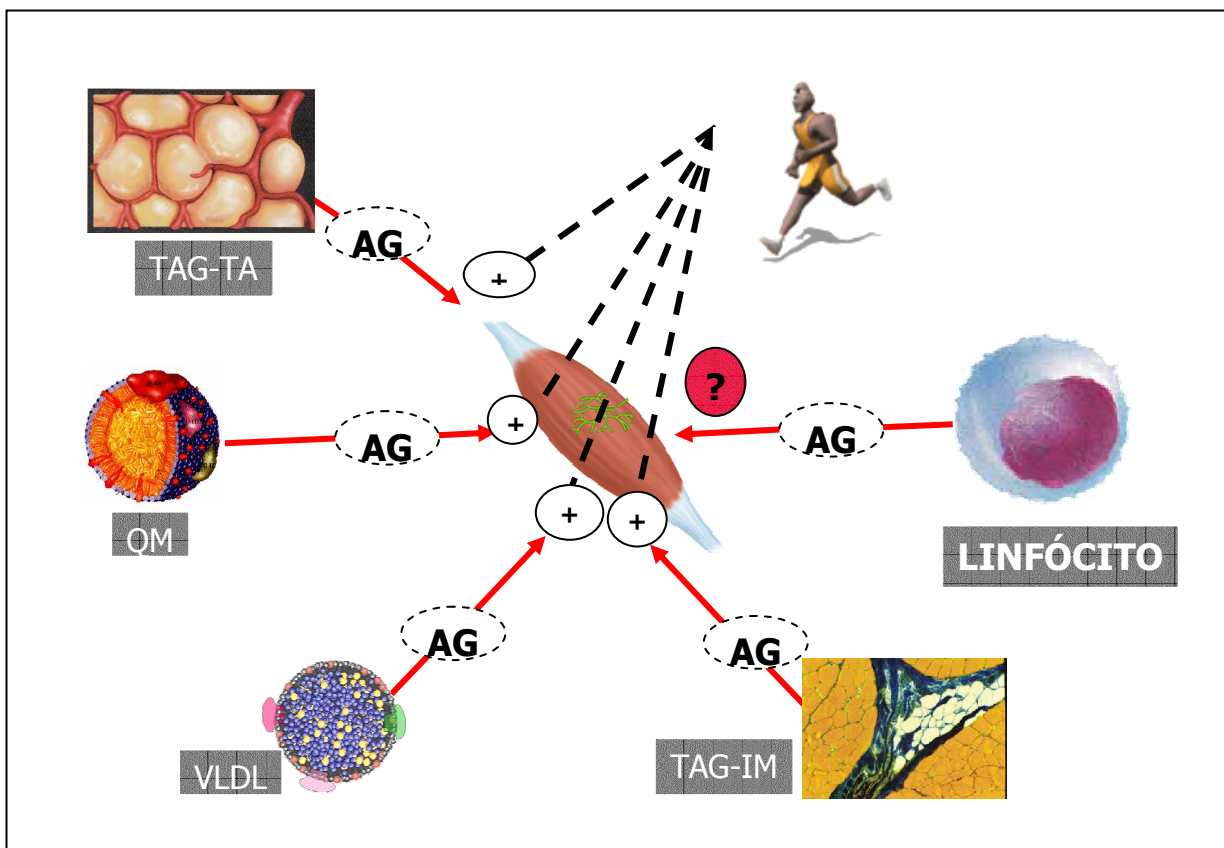
Adicionalmente, no indivíduo aerobiamente treinado, devido as alterações da capilaridade periférica (WATERS, 2004; DESCHENES, 1999; WHITE, 1998) a entrega de substratos ao ME é potencializada, e em adição, em função das alterações na membrana plasmática - FL e proteínas carreadoras de AG - (HELGE *et al.*, 1999; KIENS *et al.*, 1997; TURCOTTE *et al.*, 1997; TURCOTTE *et al.*, 1992), no complexo CPT (SAHLIN, 1990; BOYADJIEV, 1996) e na densidade mitocondrial (OSCAI, *et al.*, 1996; ONKONOGI *et al.*, 2002) a capacidade de captação e oxidação deste substrato esta otimizada.

### ***Justificativa***

Evidências obtidas sobre a capacidade de células do sistema imunitário transferirem AG para outras células leucocitárias (PERES, 1997) e também para células não leucocitárias como enterócitos (NISHIYAMA-NARUKE *et al.*, 2000), glândulas adrenais, fígado, baço e aorta (CURI *et al.*, 2002 A e B), ilhotas pancreáticas (GARCIA JÚNIOR, 2000) e mais recentemente ME (PARDAL, 2002), indicam que estas células podem constituir uma fonte adicional de AG para a musculatura esquelética. Este fenômeno seria relevante principalmente em situações onde há o aumento do contato entre estes dois tipos celulares. Isto ocorre, por exemplo, no exercício físico, onde há elevação de 10 a 40 vezes no fluxo sanguíneo, e em situações patológicas, quando há aumento do número de leucócitos.

Também é conhecido que o treinamento físico aeróbio acarreta adaptações na célula muscular esquelética, tais como alteração dos FL da membrana e aumento do número de proteínas carreadoras de AG (FABP), o que em última instância podem levar a um aumento no limiar de saturação para a captação de AG. Outras adaptações como aumento da vascularização periférica, melhora no complexo CPT, e aumento da densidade mitocondrial são importantes em otimizar a capacidade da célula muscular esquelética em oxidar AG. Não obstante, sabe-se que os AG são importantes agentes moduladores do metabolismo, podendo inibir a oxidação da glicose através do ciclo de Randle, ou por influência na responsividade a insulina no ME.

Assim, ao ser transferido, a partir dos linfócitos, para o ME, qual o destino metabólico destes AG? No ME submetido a treinamento aeróbio (TR) e no ME submetido treinamento aeróbio e agudamente exercitado (TR) existe alteração na transferência e no destino metabólico destas moléculas? Qual seria a interferência do AG sobre o metabolismo de glicose sobre o ME de animais Controle -C, Treinado Repouso -TR e Treinado agudo -TA?



**FIGURA 05:** Representação esquemática da função dos linfócitos como fonte adicional de energia ao ME, e a possível interferência do exercício físico sobre este fenômeno. TAG-TA, triacilglicerol do tecido adiposo; AG, ácidos graxos; QM, quilomícrons; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; TAGIM, triacilglicerol intramuscular.

## 2. OBJETIVOS

- Determinar a captação de AG ( $[U^{14}C]$ -AP,  $[1-^{14}C]$ -AO,  $[1-^{14}C]$ -AL,  $[1-^{14}C]$ -AA) por células linfocitárias de animais controle (C), treinados (TR) e treinados e agudamente exercitados (TA).
- Investigar a transferência de lipídeos de células do sistema imunitário para o tecido muscular esquelético de ratos C, TR e TA.
- Verificar a distribuição dos AG transferidos nas diferentes frações lipídicas do ME.
- Avaliar a capacidade oxidativa do ME nas diferentes situações experimentais C, TR e TA.
- Avaliar o efeito agudo do AP sobre alguns parâmetros do metabolismo de glicose (síntese de glicogênio e produção de lactato) induzidos por insulina no ME.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, provenientes do biotério central do setor de ciências biológicas da Universidade Federal do Paraná, com idade de 3 a 4 semanas e massa corporal entre 200 e 250g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (6 animais por gaiola), em sala com temperatura controlada de  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ , sob ciclo de iluminação de 12/12 horas, com livre acesso a água e ração contendo 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos (Nuvilab CRI, Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, PR). Os animais foram distribuídos em 3 grupos: 10 animais controles (C), 10 animais treinados e mantidos em repouso no dia dos experimentos (TR), 10 animais treinados e submetidos a exercício agudo no dia dos experimentos (TA).

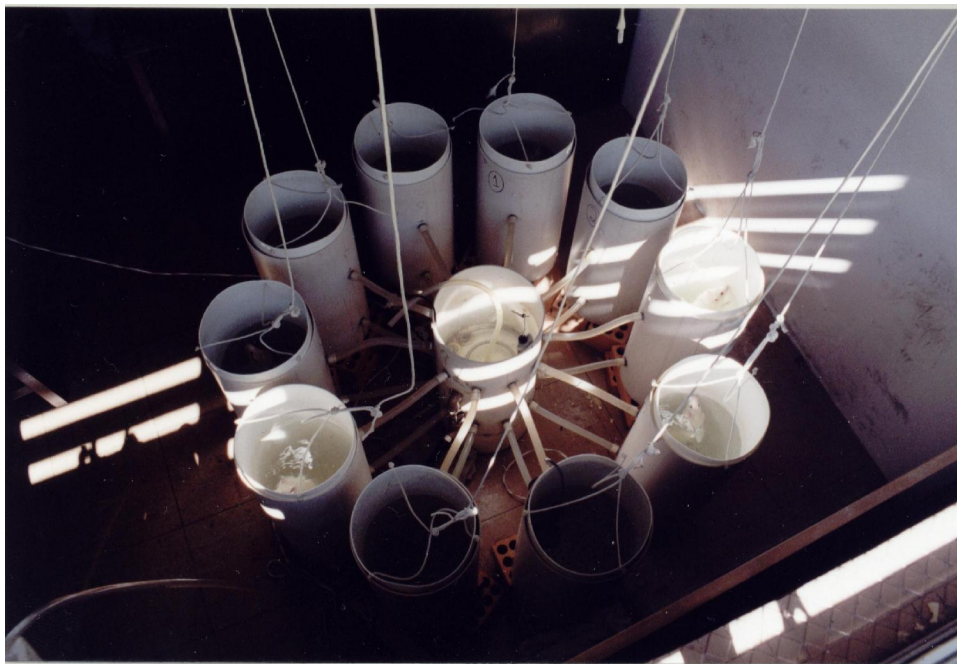
Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Todo o procedimento experimental foi aprovado pelo comitê de Ética de Experimentação Animal do SBC (Setor de Ciências Biológicas).

#### **3.2 Treinamento físico**

Após período de adaptação ao meio líquido (30 minutos de natação por dia, durante dois dias, sem uso de sobrecarga), os animais foram submetidos a um programa de treinamento físico, consistido de sessões de 1 hora de natação, quatro vezes por semana, com sobrecarga de até 6% do peso corporal (máximo peso considerado como carga aeróbia) (GOBATTO *et al.*, 2001 ; ROMBALDI, 1996). O período total de treinamento, necessário para produzir as adaptações requeridas foi de 6 semanas (GOBATO *et al.*, 2001).

Para a realização do treinamento utilizou-se um sistema de natação composto por 10 tubos de PVC, com 250 mm de diâmetro e 60 cm de altura, interligados através de uma central de bombeamento e aquecimento de água, comportando um

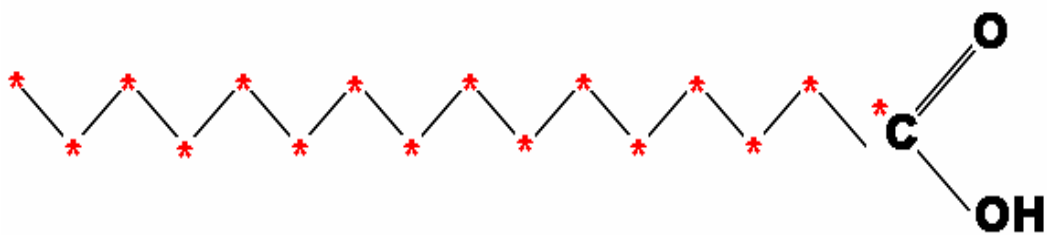
animal por tubo (FIG. 06). A temperatura da água foi mantida em 30°C - 32°C, por ser considerada termicamente neutra em relação a temperatura corporal do rato (ROGATTO *et al.*, 2001).



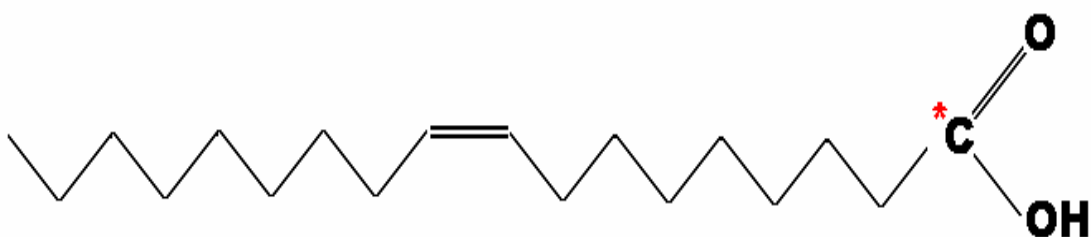
**FIGURA 06:** Sistema de natação utilizado no treinamento físico dos animais.

### **3.3 Ácidos Graxos**

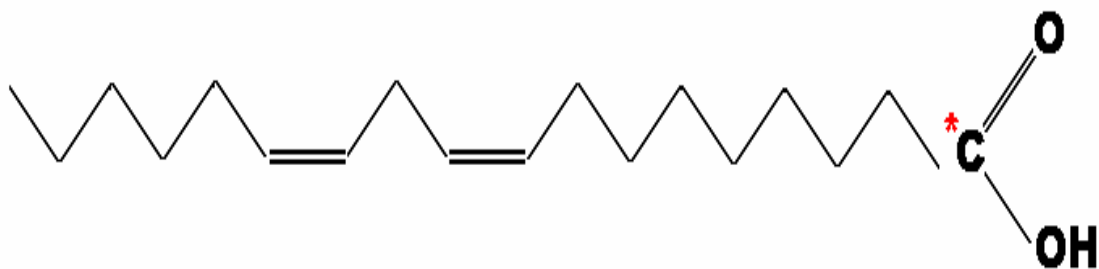
Os ácidos graxos foram obtidos da Amersham (Grã-Bretanha): [U-<sup>14</sup>C]–Ácido Palmítico (C16:0, atividade específica (AE) de 824 mCi/mmol; PM: 256,42); [1-<sup>14</sup>C]–Ácido Oleico (C18:1,  $\omega$ 9, AE = 60,0 mCi/mmol, PM: 282,45); [1-<sup>14</sup>C]–Ácido Linoléico (C18:2,  $\omega$ 6, AE = 58,0 mCi/mmol, PM: 280,44); [1-<sup>14</sup>C]–Ácido Araquidônico (C20:4,  $\omega$ 6, AE = 55,0 mCi/mmol, PM: 304,46).



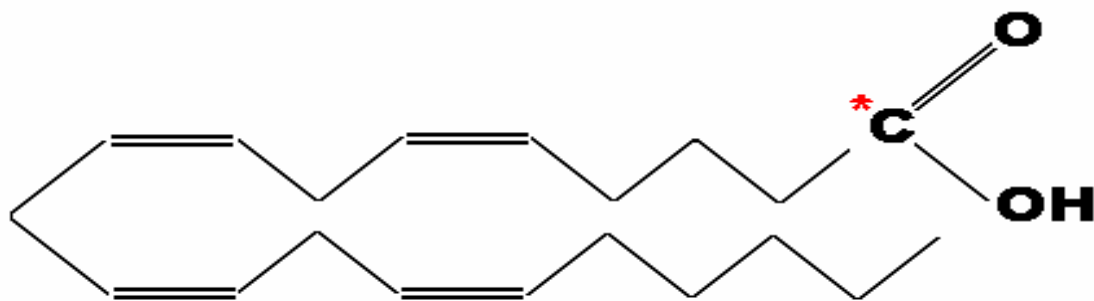
**[U-<sup>14</sup>C]-Ácido Palmítico (C16:0)**



**[1-<sup>14</sup>C]-Ácido Oléico (C18:1, ω9)**



**[1-<sup>14</sup>C]-Ácido Linoléico (C18:2, ω6)**



**[1-<sup>14</sup>C]-Ácido Araquidônico (C20:4, ω6)**

FIGURA 07: Estrutura química dos ácidos graxos radioativos utilizados neste estudo. \* Indica a posição da marcação com [<sup>14</sup>C]

### 3.4 Obtenção e contagem dos linfócitos

Os animais foram mortos por deslocamento cervical e os linfócitos foram obtidos dos linfonodos mesentéricos, por compressão deste órgão num cilindro mesentérico de malhas que permitiu obtenção dos linfócitos íntegros e livre de gordura

Os linfócitos foram mergulhados em solução salina (NaCl 0,9%) e submetidos à filtragem em papel filtro especial *Whatman* nº 105, (Grã-Bretanha) e em seguida centrifugados (1500rpm ou 453g, 4°C), durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em salina (20ml) e após uma segunda filtragem e centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 2 ml de meio de cultura (*Dulbelcco's Eagle Medium Gibco*) com BSA a 1% (sigma EUA). Em seguida as células foram contadas na câmara de Neubauer, através da exclusão por azul de *Trypan* (*Sigma-Aldrich*).

---

#### Componentes do meio de cultura (DEMEN)

---

Glicose

L-glutamina

110 mg/l piruvato de sódio

Bicarbonato de sódio

---

### 3.5 Cultura dos linfócitos com AG rádio-marcados

Após a contagem, os linfócitos (  $1 \times 10^8$  cels/ml ) foram acondicionados em garrafas plásticas (*Corning*) contendo 10 ML de meio meio *Eagle*, contendo BSA (1%) e 0,1  $\mu$ Ci/ml do AG rádio marcado. As células foram mantidas em banho sob agitação a 37°C, durante 6 horas, tempo a partir do qual a incorporação dos AG pelos linfócitos não mais se altera (PERES, 1997). Decorrido este período de

incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos (1.500 rpm a 4°C), e 100  $\mu$ l do sobrenadante foram coletados para a determinação da radioatividade total presente no meio de cultivo, em contador *beta Beckman-LS 6000 IC Liquid Scintillator* (Beckman Instruments, Fullerton, CA, EUA). O sedimento celular foi lavado com 20ml de solução salina e submetido a nova centrifugação, procedimento este que foi eficiente em eliminar a radioatividade externa proveniente do sobrenadante (FIG. 08). O sedimento celular foi ressuspensionado em 2 ml de meio *Krebs-Ringer* (contendo BSA a 1% e glicose 56 mM) e levado para contagem de células em câmara de *Neubauer*, através da exclusão por azul de trypan. Todos os componentes para a solução de *Krebs-Ringer* e a glicose foram obtidos da Reagen Quimbrás Indústria Brasileira S/A.

---

Composição do Tampão Krebs-Ringer (KR)

---

NaCl 0,9% + Hepes 100mM 150 ml

CaCl<sub>2</sub> 0,11 M 2.25 ml

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,11% 1.5 ml

MgSO<sub>4</sub> 3,82% 1.5 ml

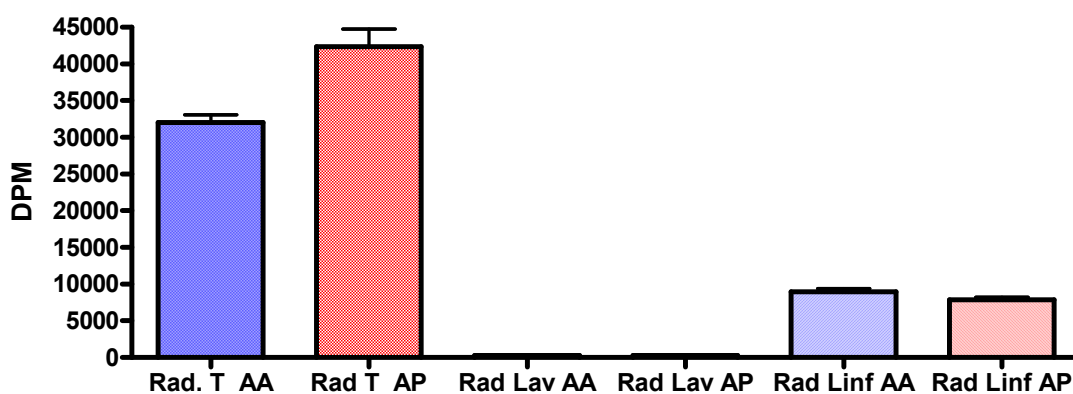
KCl 1,15% 6 ml

NaHCO<sub>3</sub> 31.5 ml

---

pH 7,4

---



FI

GURA 08: Radioatividade presente no sobrenadante após lavagem dos linfócitos. AA – ácido araquidônico. AP – ácido palmítico. Rad. T. – Radioatividade total. Rad Lav – Radioatividade após lavagem. Rad Linf. – Radioatividade presente no interior dos linfócitos

### 3.6 Co-incubação de linfócitos com o músculo esquelético

Após morte por deslocamento cervical, o músculo sóleo foi cuidadosamente e rapidamente isolado (FIG 09), divididos longitudinalmente ao meio, pesados (25-35 mg) e pré-incubados em enlenmeyers, contendo 3 ml de tampão de *Krebs-Ringer*, sob agitação constante com atmosfera de  $O_2/CO_2$  (95%/5%) por período de 30 minutos.

Após o período de pré incubação os músculos foram transferidos a outros erlenmeyers contendo 3 ml de meio *Krebs Ringer* e os linfócitos ( $1 \times 10^7$  céls/ml) incubados anteriormente na presença dos AG rádio-marcados. O músculo e os linfócitos foram co-incubados por período de 3 horas, sob as mesmas condições da pré-incubação. Decorrido o período de co-incubação (3h), os músculos foram coletados, lavados em solução salina para retirar o excesso externo de radioatividade, secos e acondicionados em flaconetes contendo 1 ml de líquido de cintilação, para a determinação da radioatividade incorporada em contador *beta Beckman-LS 6000 ic Liquid Scintillator*. Alguns músculos foram congelados em nitrogênio líquido, para posterior extração lipídica. O meio de incubação foi submetido a 5 minutos de centrifugação (1500 rpm ou 453 g, 4°C) para sedimentar os linfócitos, e em seguida, 200  $\mu$ L do sobrenadante foi coletado para determinação da radioatividade no meio, como descrito anteriormente.



**FIGURA 09:** Processo de isolamento do músculo esquelético sóleo.

### **3.8 Extração lipídica**

O método utilizado é uma adaptação da metodologia descrita por Folch *et al.* (1957). O princípio desta metodologia está na diferença de solubilidade dos lipídeos nos solventes utilizados (água e metanol na fase aquosa, e clorofórmio na fase orgânica). Os lipídios são mais solúveis em clorofórmio por possuírem maior coeficiente de partição em solventes orgânicos.

O conteúdo lipídico do ME (após 3h de co-incubação) foi extraído adicionando-se a cada amostra 0,5ml de metanol, 1 ml de clorofórmio e 0,5 ml de salina tamponada com sais de fosfato (PBS: NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Em seguida estas amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (8000 rpm ou 697 g, 4°C) por 1 minuto, para que a fase hidrometanólica (superior) fosse separada da fase orgânica, e submetida a nova re-extração (com 0,4 ml de PBS, 0,5 ml de cloroformio e 0,5 ml de metanol). As fases orgânicas, resultantes das duas extrações, foram misturadas e reextraídas com 1ml de solvente Folch (clorofórmio/metanol/água, 3:47:48, em volume). Cada amostra foi agitada e centrifugada novamente, a fase superior (hidrometanólica) desprezada e a fase orgânica, contendo o extrato lipídico, foi seca em *speed vac* (*Refrigerated Condensation Trap – SC 110-Savant*) para posterior separação lipídica por cromatografia de camada delgada (*Thin Layer Chromatography - TLC*)

### **3.9 Cromatografia em camada delgada (TLC)**

Método de separação de mistura baseado na diferença de afinidade dos vários componentes de uma amostra (no caso os lipídios) e entre a mistura de solventes utilizada (fase móvel) com relação a uma substância suporte (fase estacionária), neste caso a sílica-gel aderida à placa de vidro.

As placas utilizadas para a cromatografia foram obtidas da *Sigma Aldrich* (sílica-gel 60H com espessura de 250µm). Antes da aplicação das amostras, as placas foram ativadas por 30 minutos em estufa a 120°C, para retirar o máximo

possível da camada de água da superfície da sílica. As placas foram demarcadas após ativação.

As amostras secas foram lavadas com 2 volumes de 100  $\mu\text{L}$  e 50  $\mu\text{L}$ , respectivamente, da mistura clorofórmio/metanol (2:1, em volume) com 0,05% de hidroxibutiltolueno (BHT, antioxidante solúvel em solventes orgânicos). Esses volumes foram aplicados a placa cromatográfica com auxílio de uma seringa (*Hamilton Company, Inc., Whittier, CA, EUA*). Em seguida, a placa foi colocada numa cuba cromatográfica contendo o sistema de solventes (fase móvel), que consiste em hexano/éter dietílico/ácido acético glacial (10:30:1), e papel filtro ao redor da parede para saturação. Para a separação dos lipídios totais, as amostras foram cromatografadas a temperatura ambiente, contra padrão *sigma* (178-1) contendo: colesterol (COL), AG livres (AGL), trioleína (um triacilglicerol TAG) e um éster de colesterol (ECOL). Após a corrida cromatográfica de 12 cm, a placa foi retirada da cuba e deixada à temperatura ambiente para secagem, e em seguida revelada iodo.

As bandas de origem foram raspadas e acondicionadas em flaconetes plásticos (*Wheaton omni-vials-255402*), para medição de radioatividade. Nos flaconetes, foram adicionados 2 ml de líquido de cintilação (*Ecolume®, INC., CA 92626, EUA*). Em seguida, foram agitados e submetidos a decantação durante a noite para posterior contagem em cintilador. Para a contagem dos brancos, foi utilizada a sílica presente nas bordas superiores da placa onde não foi aplicada amostra.

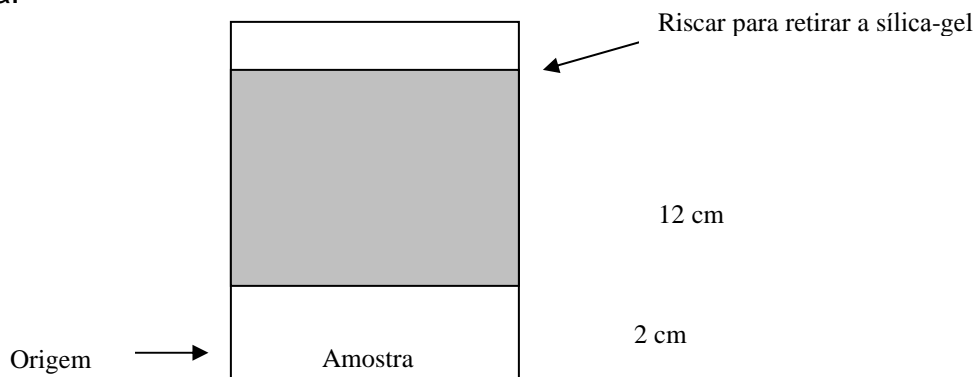


FIGURA 10: Representação da placa cromatográfica de sílica-gel com as marcações do local de aplicação das amostras.

### 3.10 Oxidação dos ácidos graxos

Em um outro experimento, o músculo sóleo de ratos controle e exercitados (TA e TR) foram incubados como descrito anteriormente. Em cada erlenmeyer de descarboxilação (FIG. 11), o músculo foi adicionado à solução tampão Krebs-Ringer, contendo 1,5% de albumina complexada com o AG não marcado (0,9 mm). Este meio foi anteriormente deixado em banho Maria a 37°C, sob agitação, para complexação do AG com a albumina por 24 horas. Após este período o AP marcado (0,1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) foi adicionado ao meio. O músculo foi incubado neste ambiente durante período de 1 hora. No segundo compartimento do erlenmeyer foi adicionado uma mistura de feniletilamina/metanol (1:1 em volume) para captação de [ $^{14}\text{CO}_2$ ] produzido pela metabolização do AG.

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. Para obtenção do branco as amostras foram injetadas com 200  $\mu\text{l}$  DE TCA no início da incubação, e mantidas em gelo.

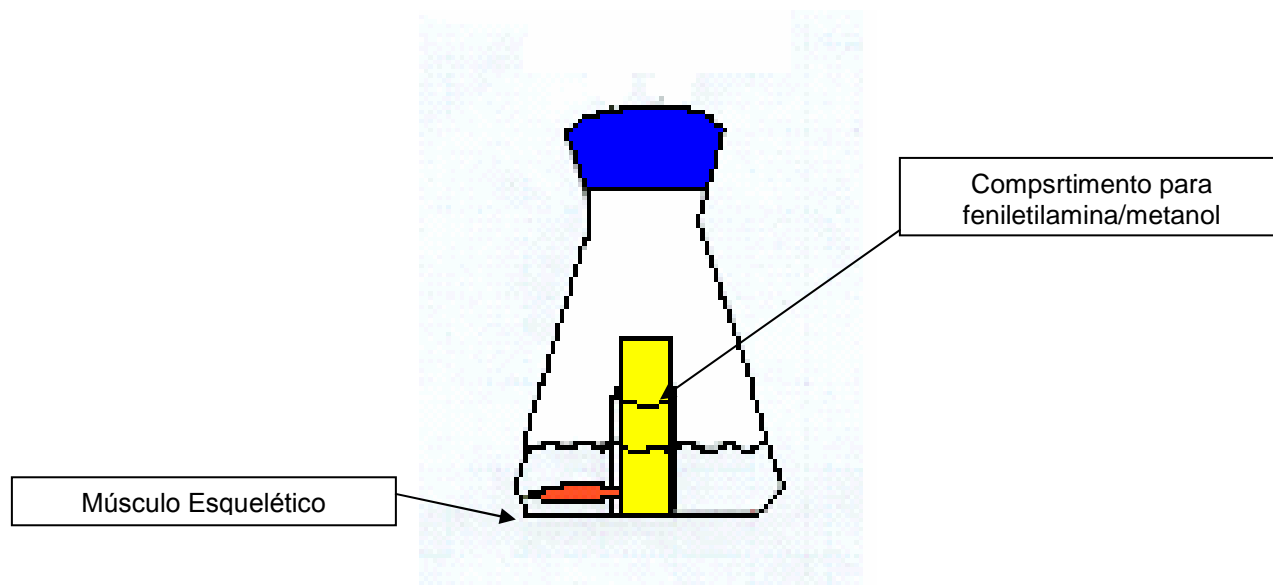


FIGURA 11: Desenho esquemático do “erlenmeyer de descarboxilação” utilizado para mensuração da oxidação de AG pelo ME.

### 3.11 Determinação do conteúdo de glicogênio muscular

O conteúdo de glicogênio foi determinado segundo LEIGHTON *et al.* (1989) adaptado. Do músculo sóleo aproximadamente 90 mg foram retirados e colocados em tubos de ensaio contendo 500 µl de KOH 1M e deixados em banho a 70 °C por 30 minutos, para a digestão do tecido. Após o banho, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e pipetados 100 µl em tubos para microcentrífuga contendo 17,5 µl de ácido acético glacial e 500 µl de tampão acetato contendo amiloglicosidase 0,1%, e submetidas ao banho-maria (37 °C) por 3 horas. Ao final deste período centrifugou-se as amostras por 5 minutos a 15000 g, e 100 µl de cada amostra foi colocada em novos tubos de ensaio contendo 1 ml do tampão Trietanolamina (TEA). Após 40 minutos as amostras foram lidas no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 340 nm. Composição do tampão acetato e TEA.

### 3.12 Efeito do ácido palmítico sobre o metabolismo de glicose em músculo sóleo incubado de rato.

O músculo sóleo obtido de animais dos grupos C, TR e TA foi pré-incubado da maneira descrita anteriormente. Após período de pré-incubação (30'), os músculos foram transferidos a outros enlenmeyers contendo 3ml do tampão *Krebs Ringer* e 0,1µCi/ml de [U-<sup>14</sup>C]-D-glicose (Basal) ou tampão *Krebs Ringer* e 0,1µCi/ml de [U-<sup>14</sup>C]-D-glicose mais 10mU de insulina (I) para avaliação da síntese de lactato e da produção de glicogênio pelo músculo esquelético. Em outros enlenmeyers foram ainda adicionados 50 (I + p50) ou 100 (I + p100) µM de palmitato para análise de sua interferência sobre os parâmetros avaliados. Para adição do ácido palmítico, este foi diluído em etanol (solução de 20mM). A quantidade de etanol presente em cada enlenmeyer foi de 0,5%, concentração esta que não interfere no metabolismo de glicose com relação aos parâmetros analisados (HIRABARA, 2005).

A síntese de lactato e a produção de glicogênio foram então mensuradas segundo os métodos descritos por ESPINAL (1983) e ENGLE JONES (1978), respectivamente.

### 3.13 Análise estatística

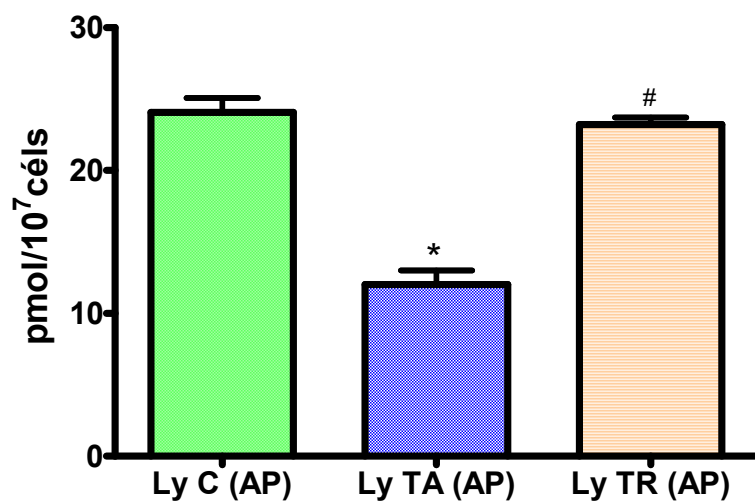
Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA, *One Way Analysis of Variance*) com pós teste de comparação múltipla de Tuckey, ou a teste t de Student para um nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

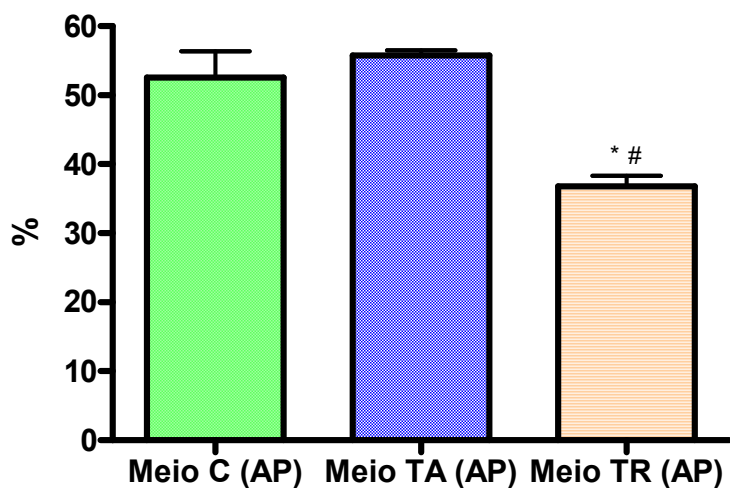
### *Perfil de incorporação de AG pelos linfócitos*

Linfócitos obtidos de ratos controle (C) incubados na presença de 0,1  $\mu\text{Ci/ml}$  do ácido graxo saturado palmitato (16:0), incorporaram  $24,07 \pm 1,0$  pmol/ $10^7$  céls (FIG. 12). Os linfócitos dos animais que foram submetidos a treinamento físico de 6 semanas (TR) apresentaram similar incorporação de palmitato  $23,20 \pm 1,0$  pmol/ $10^7$  céls. Contudo, as células linfocitárias de animais treinados e submetidos a exercício agudo (TA) incorporaram 50% menos palmitato ( $12,0 \pm 0,5$  pmol/ $10^7$  céls) quando comparados aos grupos C e TR ( $p < 0,01$ ). Estes linfócitos ao serem co-incubados com o músculo esquelético, proveniente de seus respectivos grupos, exportaram o palmitato incorporado para o meio de incubação na quantia de  $52,6 \pm 3,8\%$  no grupo C,  $55,75 \pm 0,79\%$  no grupo TA e  $36,75 \pm 1,59\%$  no grupo TR (FIG. 13). A quantidade de palmitato incorporado no ME do grupo C e TA foi de  $3,8 \pm 0,3\%$  e no TR de  $2,27 \pm 0,036\%$ , significativamente menor quando comparado à do C e TA ( $p < 0,01$ ) (FIG. 14).

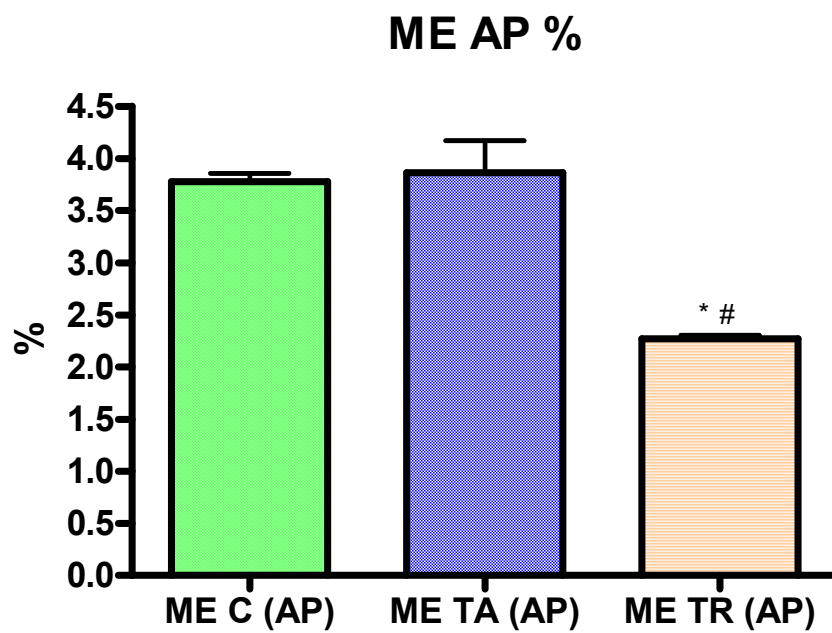
Ácido Palmítico



**FIGURA 12:** Incorporação do ácido [U-<sup>14</sup>C]-palmítico (0,1 $\mu$ Ci/mL) pelos linfócitos obtidos de ratos controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA) e somente treinados (TR) após 6h de incubação. Os resultados estão expressos em pmol/10<sup>7</sup> céls e representam média  $\pm$  epm de 3 experimentos em triplicata. \*P<0,01 vs. C. #P<0,01 vs. TA.

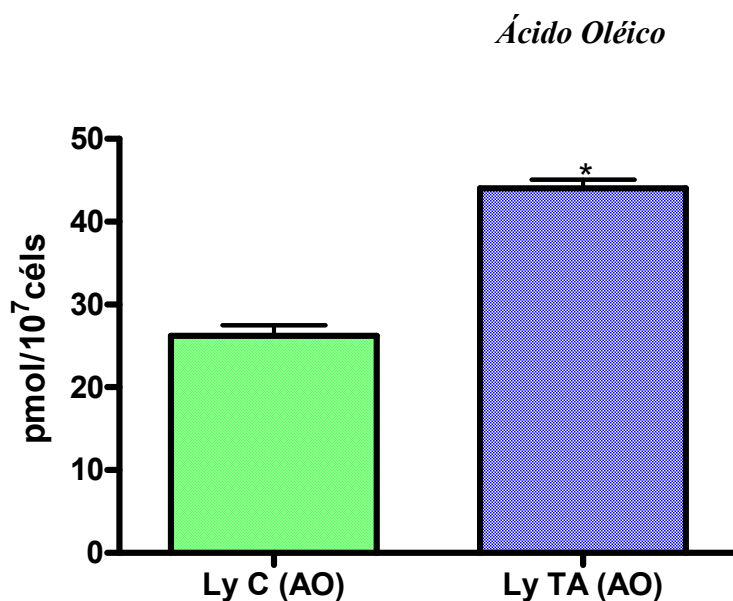


**FIGURA 13 –** Exportação (%) para o meio de incubação do ácido [U-<sup>14</sup>C]-palmítico incorporado pelos linfócitos de ratos controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA) e somente treinados (TR), após 3h de co-incubação com ME.. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  epm, de 3 experimentos em triplicata \*P<0,05 vs. C. #P<0,01 vs. TA.

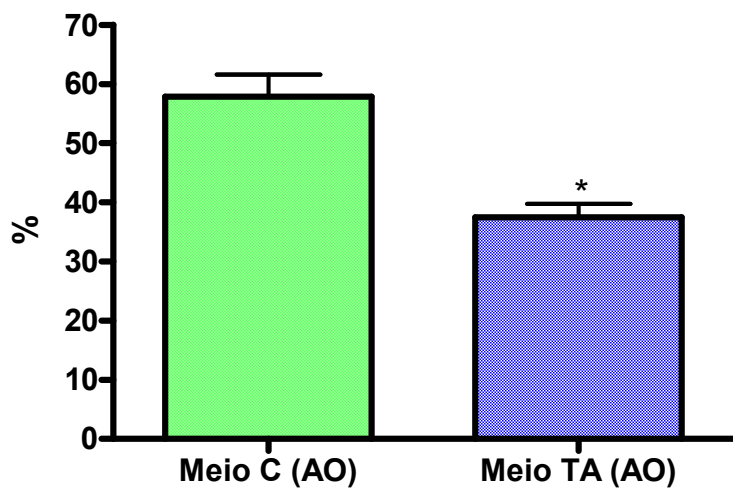


**FIGURA 14** – Incorporação (%) do ácido [U-<sup>14</sup>C]-palmitico pelos ME de ratos controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA) e somente treinados (TR) após 3h de co-incubação com os linfócitos rádio-marcados. Os resultados estão apresentados como média ± epm de 3 experimentos em triplicata. \*P<0,01 vs. C. #P<0,01 vs. TA.

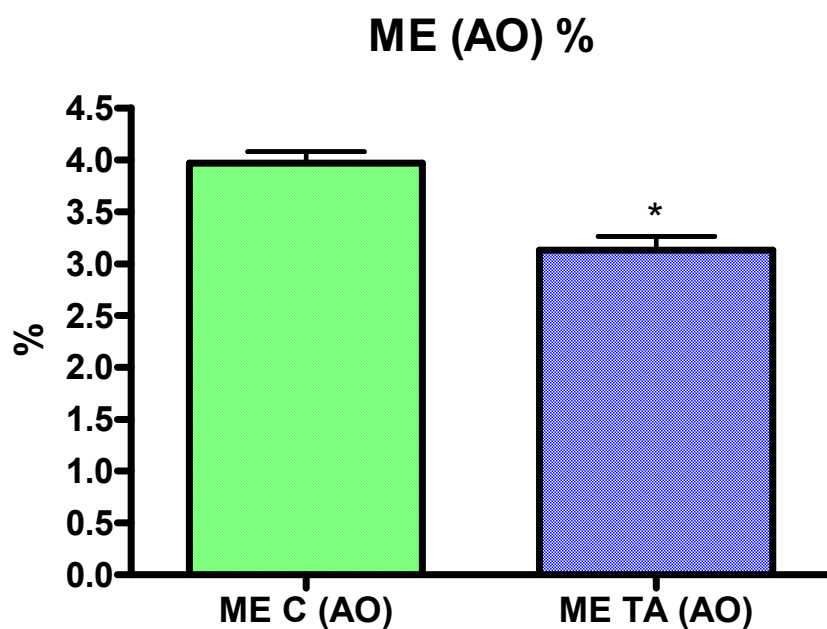
O perfil de incorporação do oleato, ácido graxo com dezoito carbonos e uma insaturação (18:1) membro da família  $\omega$ -9, pelos linfócitos de ratos controle (C) foi de  $26,23 \pm 1,2$  pmol/ $10^7$  céls (FIG. 15) e de  $44,03 \pm 1,0$  pmol/ $10^7$  céls pelos linfócitos do grupo treinado e submetido a exercício agudo (TA) ( $p < 0,05$ ). Estes linfócitos quando co-incubados com o músculo esquelético de seus respectivos grupos exportaram para o meio de incubação  $57,85 \pm 3,7\%$  e  $37,5 \pm 2,25\%$  do oleato incorporado para os grupos C e TA, respectivamente (FIG. 16). No músculo esquelético encontramos  $3,97 \pm 0,11\%$  de oleato para o grupo C e  $3,13 \pm 0,13\%$  para o grupo TA, que foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) (FIG. 17).



**FIGURA 15-** Incorporação do ácido [1-<sup>14</sup>C]-oléico (0,1 $\mu$ Ci/mL) pelos linfócitos obtidos de ratos controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA), após 6h de incubação. Os resultados, expressos em pmol/10<sup>7</sup>céls, representam média  $\pm$  epm, de 3 experimentos em triplicata. \*P<0,05 vs. C.



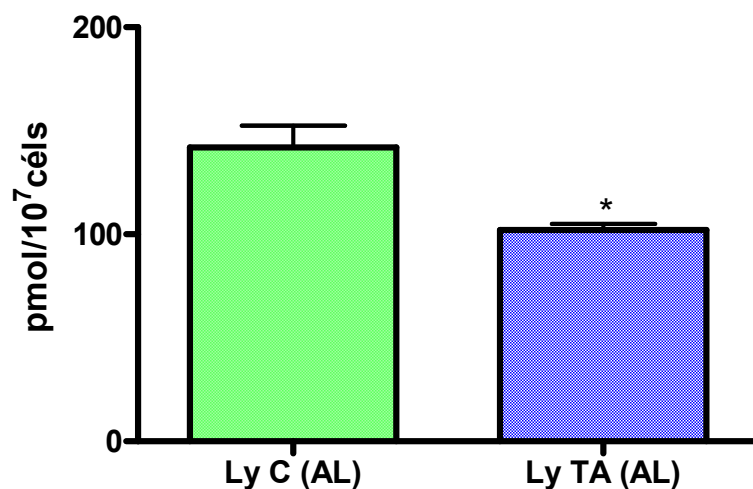
**FIGURA 16** – Exportação para o meio de incubação do ácido [1-<sup>14</sup>C]-oléico incorporado pelos linfócitos de ratos controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA) após 3h de co-incubação com ME. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  epm, de 3 experimentos em triplicata \*P<0,05 vs. C.



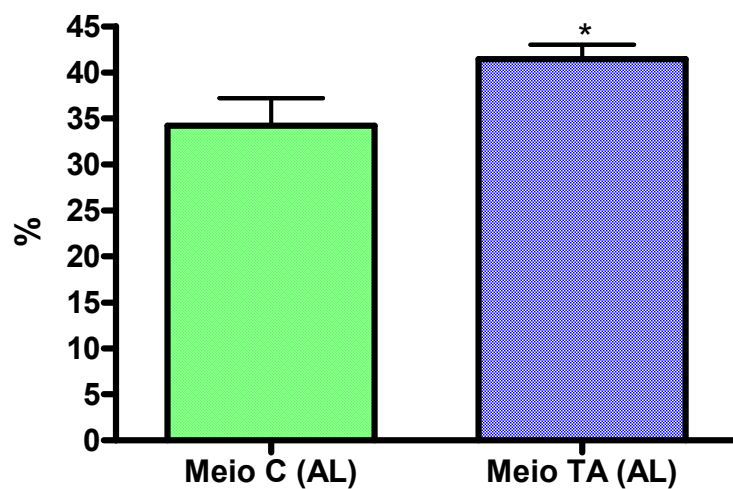
**FIGURA 17** – Incorporação (%) do ácido [1-<sup>14</sup>C]-oléico, pelos ME de ratos controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA), após 3h de co-incubação com os linfócitos rádio-marcados. Os resultados estão apresentados como média ± epm, de 3 experimentos em triplicata. \*P<0,05 vs. C.

O perfil de incorporação do ácido linoléico (FIG. 18) , ácido graxo também de 18 carbonos, contudo contendo duas insaturações, membro da família  $\omega$ -6, pelos linfócitos do grupo controle foi de  $142 \pm 10,49$  pmol/ $10^7$  céls e de  $102,1 \pm 2,9$  pmol/ $10^7$  céls no grupo treinado e submetido a exercício agudo ( $p < 0,05$ ). Estes linfócitos quando co-incubados com o músculo esquelético de seus respectivos grupos exportaram para o meio de incubação  $34,22 \pm 2,9\%$  e  $41,46 \pm 1,5\%$  do linoleato incorporado para os grupos C e TA, respectivamente (FIG. 19). No músculo esquelético encontramos  $1,44 \pm 0,2\%$  do linoleato exportado pelos linfócitos para o grupo controle e  $2,11 \pm 0,2\%$  para o grupo TA, que foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) (FIG. 20).

### Ácido Linoléico



**FIGURA 18** - Incorporação do ácido [1-<sup>14</sup>C]-linoléico (0,1 $\mu$ Ci/mL) pelos linfócitos obtidos de ratos controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA), após 6h de incubação. Os resultados, expressos em pmol/10<sup>7</sup> céls, representam média  $\pm$  epm, de 3 experimentos em triplicata. \*P<0,05 vs. C.



**FIGURA 19** - Exportação (%) para o meio de incubação do ácido [1-<sup>14</sup>C]-linoléico pelos linfócitos de ratos controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA), após 3h de co-incubação com ME. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  epm, de 3 experimentos em triplicata \*P<0,05 vs. a C.

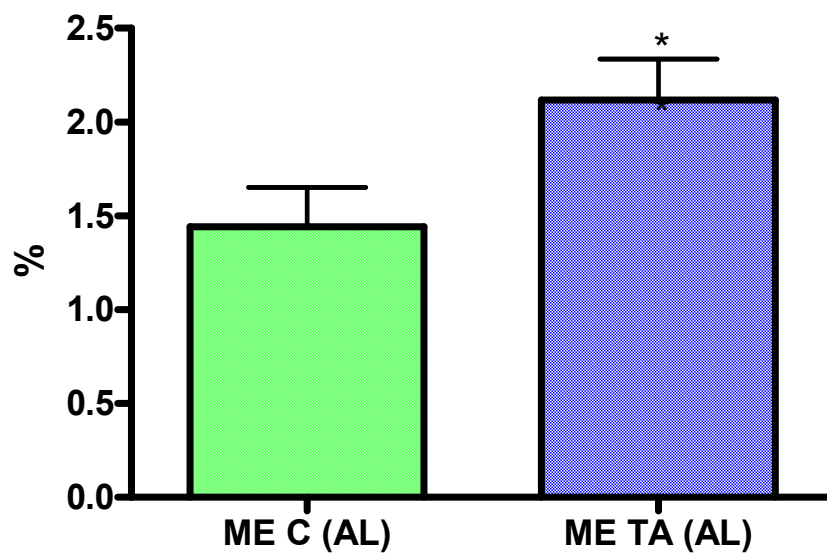
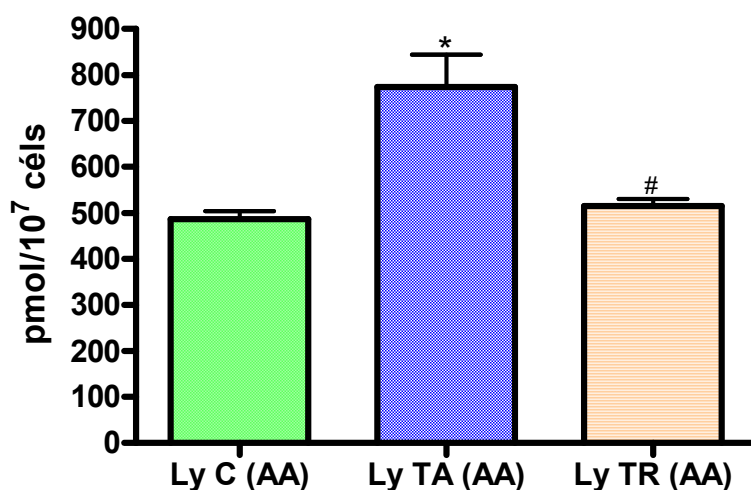


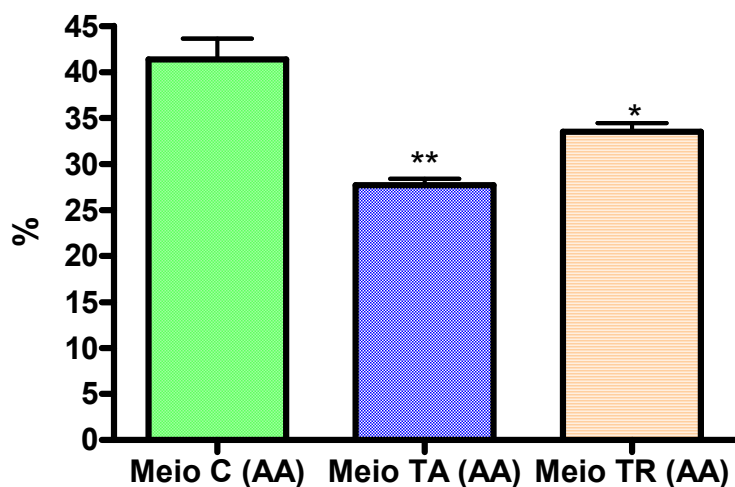
FIGURA 20 – Incorporação (%) do ácido [1-<sup>14</sup>C]-linoléico, pelos ME de ratos controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA), após 3h de co-incubação com os linfócitos radiomarcados. Os resultados estão apresentados como média ± epm, de 3 experimentos em triplicata. \*P<0,05 vs. C.

O perfil de incorporação do ácido araquidônico, um ácido graxo de 20 carbonos, quatro insaturações e também membro da família  $\omega$ -6, pelos linfócitos dos ratos controles (C) foi de  $486,7 \pm 16,7$  pmol/107célis (FIG. 21) e de  $773,8 \pm 70,5$  pmol/107célis pelos linfócitos de ratos treinados e submetidos a exercício agudo (TA), e de  $515,2 \pm 15,1$  pmol/107célis no grupo apenas submetido a treinamento (TR). Assim, a incorporação de araquidonato foi significativamente maior nos linfócitos do grupo TA quando comparada a dos grupos C e TR ( $P < 0,05$ ). Estes linfócitos quando incubados com o músculo esqueléticos de seus respectivos grupos, exportaram  $41,37 \pm 2,2\%$  e  $27,70 \pm 0,7\%$  para o meio de incubação nos os grupos C e TA, respectivamente, a qual foi significativamente menor no TA quando comparado à do C ( $p < 0,05$ ) (FIG. 22). No grupo TR esta foi de  $33,52 \pm 0,9\%$ , sendo também significativamente menor quando comparada à do (C) ( $p < 0,05$ ), mas superior à do TA ( $p < 0,05$ ). No músculo esquelético encontramos  $2,7 \pm 0,2\%$  do ácido araquidônico no grupo C e  $1,8 \pm 0,3\%$  no TA que, entretanto, não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, no grupo TR esta incorporação foi de  $1,25 \pm 0,05\%$ . significativamente menor que a observada no C ( $p < 0,05$ ), mas não diferente da encontrados TA ( $P > 0,05$ ) (FIG. 23).

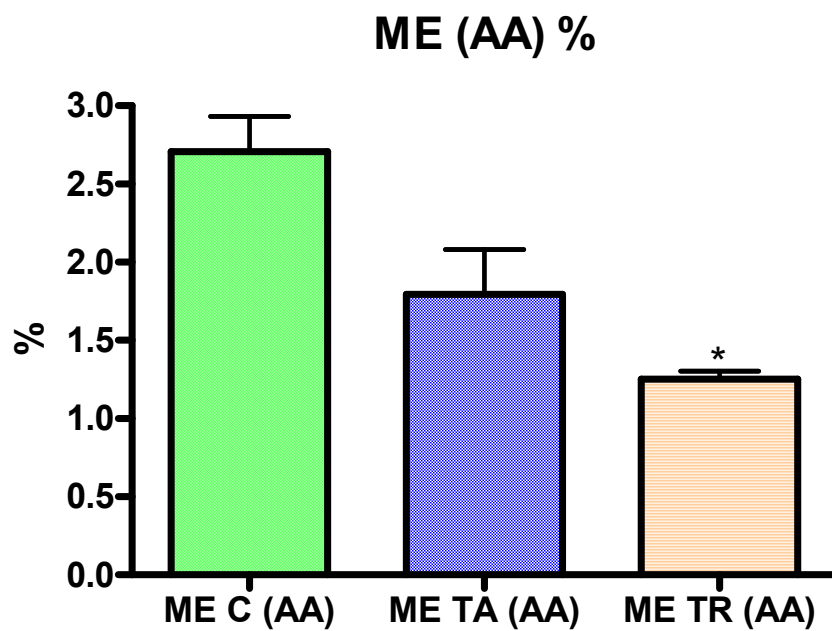
## Ácido Araquidônico



**FIGURA 21** – Incorporação do ácido [1-<sup>14</sup>C]-araquidônico (0,1μCi/mL) pelos linfócitos obtidos de ratos controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA) e somente treinados (TR), após 6h de incubação. Os resultados, expressos em pmol/10<sup>7</sup> céls, representam média ± epm, de 3 experimentos em triplicata. \*P<0,05 vs. C. #P<0,05 vs. TA.



**FIGURA 22** – Exportação (%) para o meio de incubação do ácido [1-<sup>14</sup>C]-araquidônico incorporado pelos linfócitos de ratos controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA) e somente treinados (TR), após 3h de co-incubação com ME. Os resultados estão apresentados como média ± epm, de 3 experimentos em triplicata. \*P<0,05 e \*\*P<0,01 vs. C.



**FIGURA 23** – Incorporação (%) do ácido [1-<sup>14</sup>C]-araquidônico, pelos ME de ratos controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA) e somente treinados (TR), após 6h de co-incubação com os linfócitos radiomarcados. Os resultados estão apresentados como média ± epm, de 3 experimentos em triplicata. \*P<0,05 vs. C.

***Distribuição dos ácidos graxos nas diferentes frações lipídicas do músculo esquelético.***

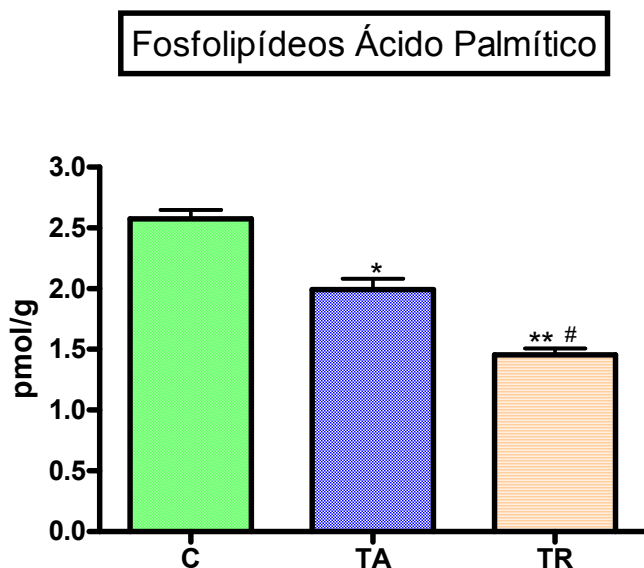
Os músculos sóleos co-incubados com os linfócitos rádio-marcados apresentaram perfil distinto de distribuição dos lipídios em suas membranas conforme o ácido graxo utilizado e também a atividade física. O palmitato, ácido graxo saturado de 16 carbonos distribuiu-se em diferentes frações, onde, nos animais agudamente exercitados houve redução significativa de fosfolipídeos, triacilgliceróis (TAG) e éster de colesterol quando comparados ao do C. Nos animais submetidos apenas a treinamento, houve redução também de fosfolipídeos, TAG e éster de colesterol e ainda de ácidos graxos livres (AGL) e colesterol (COL), quando comparados ao do C (FIGS. 24 a 29).

Quanto ao oleato (ácido graxo de 18 carbonos, e uma insaturação), a distribuição do mesmo nas frações lipídicas do músculo esquelético co-incubado foi significativamente menor no grupo submetido a exercício agudo (TA) nas frações de fosfolipídeos e lipídeos polares, sem alterações em TAG, foi elevado em AGL, éster de colesterol e colesterol quando comparado ao do controle (FIGS. 30 a 35).

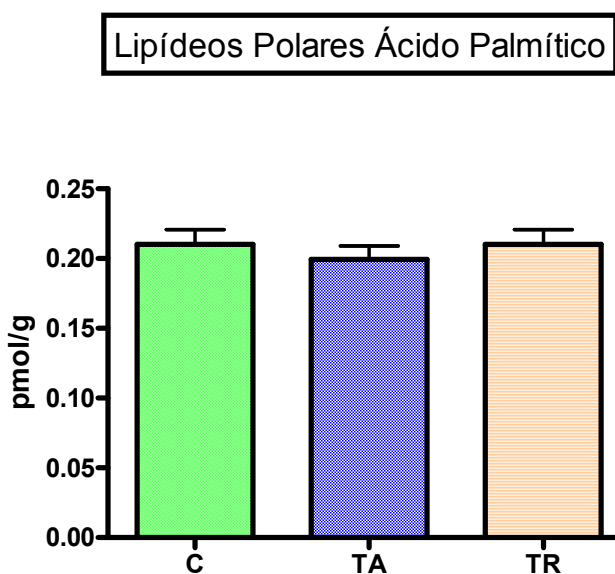
Para o linoleato (ácido graxo de 18 carbonos e duas insaturações), a distribuição em todas as frações lipídicas foram significativamente maiores quando comparadas àquelas encontradas para o grupo controle (FIGS. 36 a 41).

Finalmente, para o ácido graxo de 20 carbonos e quatro insaturações, o araquidonato, sua incorporação no músculo esquelético dos animais treinados e submetidos a exercício agudo (TA) foi na fração de fosfolipídeos ( $p < 0,05$  vs C) e menor nas frações de lipídeos polares, AGL, TAG, COL e éster de colesterol. Nos

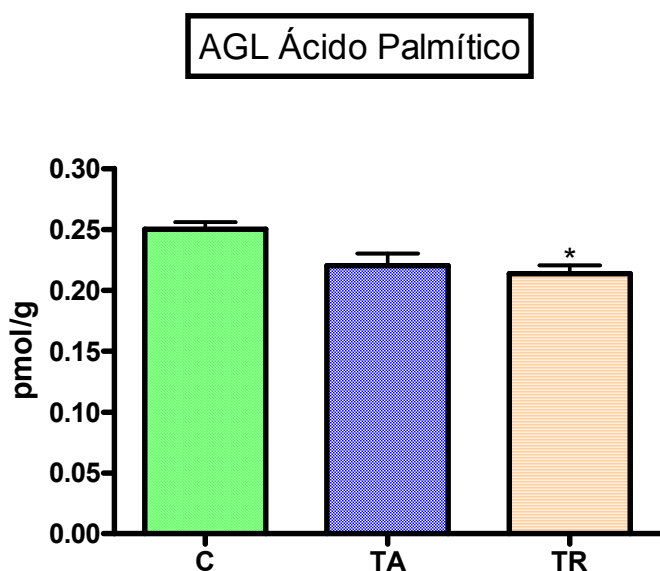
animais submetidos a treinamento (TR), houve aumento na fração de fosfolipídeos ( $p < 0,01$  vs C), e redução na de lipídeos polares, TAG, COL e éster de colesterol quando comparada a dos grupos C e TA. Os AGL foram significativamente menores quando comparados ao do C ( $p < 0,05$ ), porém significativamente maiores quando comparados ao do TA (FIGS. 42 a 47).



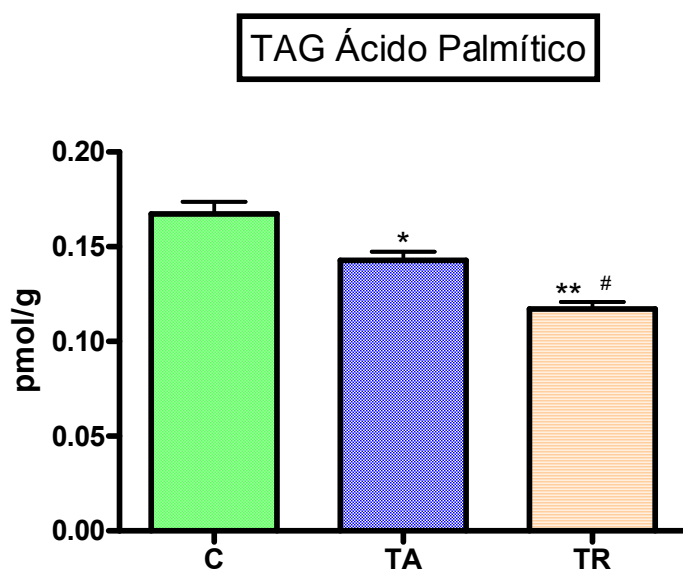
**FIGURA 24:** Incorporação do ácido [U-<sup>14</sup>C]-palmítico na fração de fosfolípidos do ME co-incubado com linfócitos radiomarcados obtidos de animais controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA), e apenas treinados (TR). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média ± epm de dois experimentos em triplicata. \*P<0,05 e \*\*P<0,01 vs. C. #P<0,05 vs. TA.



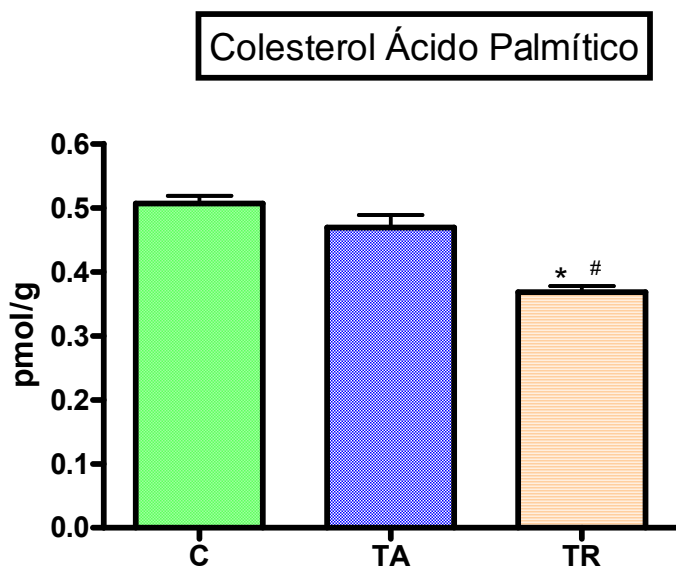
**FIGURA 25:** Incorporação do ácido [U-<sup>14</sup>C]-palmítico na fração de lipídeos polares do ME co-incubado com linfócitos radiomarcados obtidos de animais controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA), e apenas treinados (TR). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média ± epm de dois experimentos em triplicata.



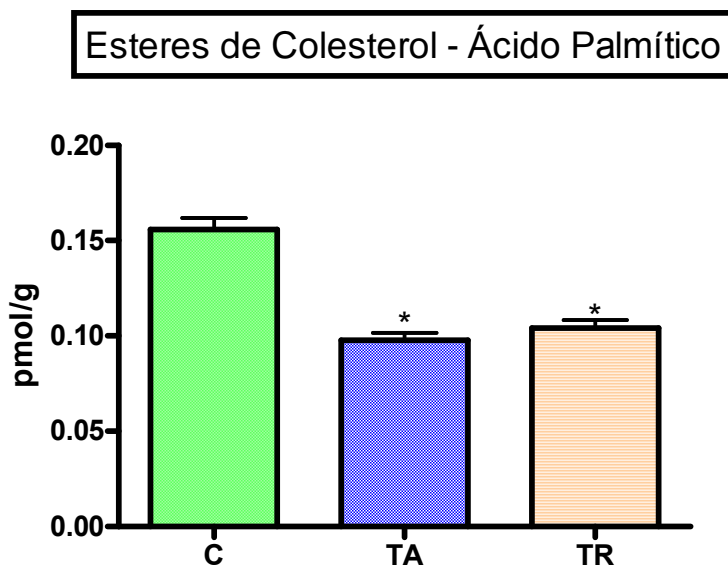
**FIGURA 26:** Incorporação do ácido [U-<sup>14</sup>C]-palmítico na fração de ácidos graxos livres (AGL) do ME co-incubado com linfócitos radiomarcados obtidos de animais controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA), e apenas treinados (TR). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média  $\pm$  epm de dois experimentos em triplicata.\*P<0,01 vs. C.



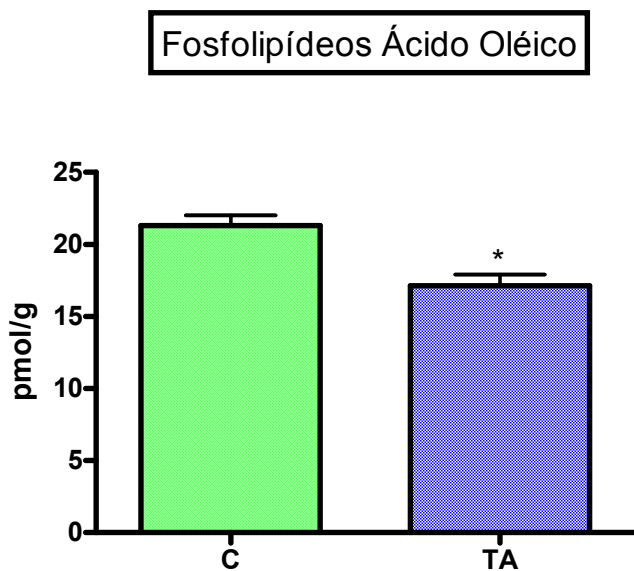
**FIGURA 27:** Incorporação do ácido [U-<sup>14</sup>C]-palmítico na fração de triacilgliceróis (TAG) do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcados obtidos de animais controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA), e apenas treinados (TR). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média  $\pm$  epm de dois experimentos em triplicata.\*P<0,01 e \*\*P<0,001 vs. C. #P<0,001 vs. TA.



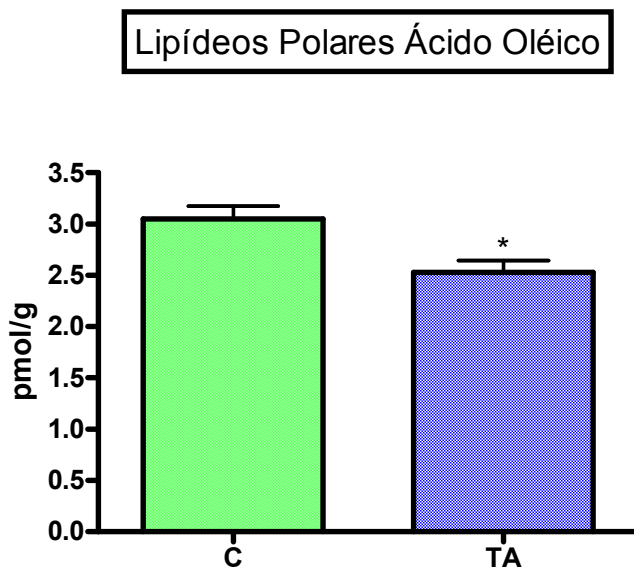
**FIGURA 28:** Incorporação do ácido [U-<sup>14</sup>C]-palmítico na fração de Colesterol do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA), e apenas treinados (TR). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média ± epm de dois experimentos em triplicata.\*P<0,001 vs. C. #P<0,01 vs. TA.



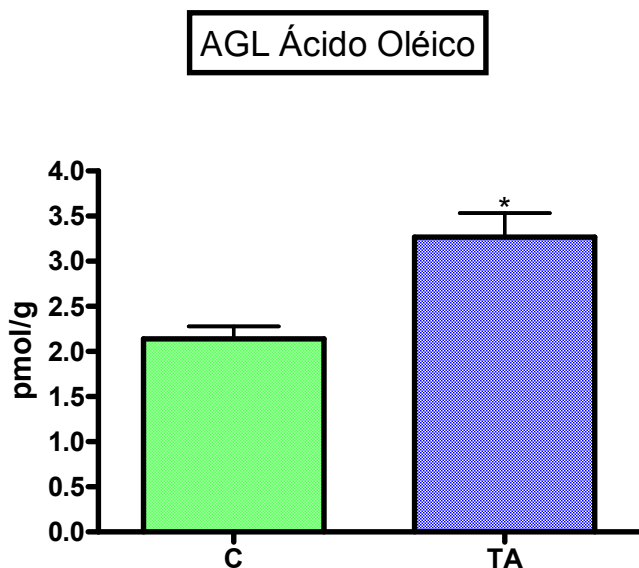
**FIGURA 29:** Incorporação do ácido [U-<sup>14</sup>C]-palmítico na fração de éster de colesterol (Ecol) do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA), e apenas treinados (TR). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média ± epm de dois experimentos em triplicata.\*P<0,01 vs. C.



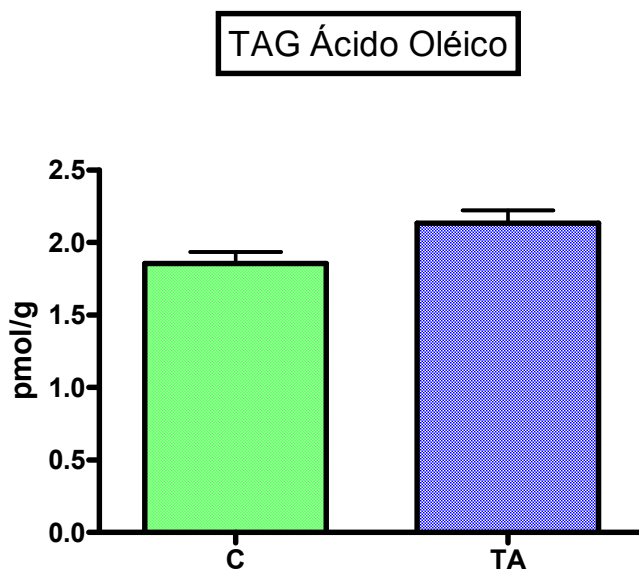
**FIGURA 30:** Incorporação do ácido  $[1-^{14}\text{C}]$ -oléico na fração de fosfolípidos do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média  $\pm$  epm de dois experimentos em triplicata. \* $P < 0,01$  vs. C.



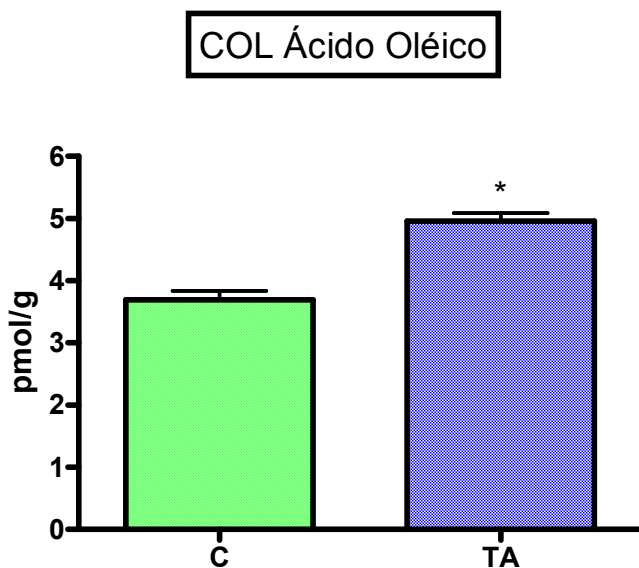
**FIGURA 31:** Incorporação do ácido  $[1-^{14}\text{C}]$ -oléico na fração de lipídeos polares do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média  $\pm$  epm de dois experimentos em triplicata. \* $P < 0,01$  vs. C.



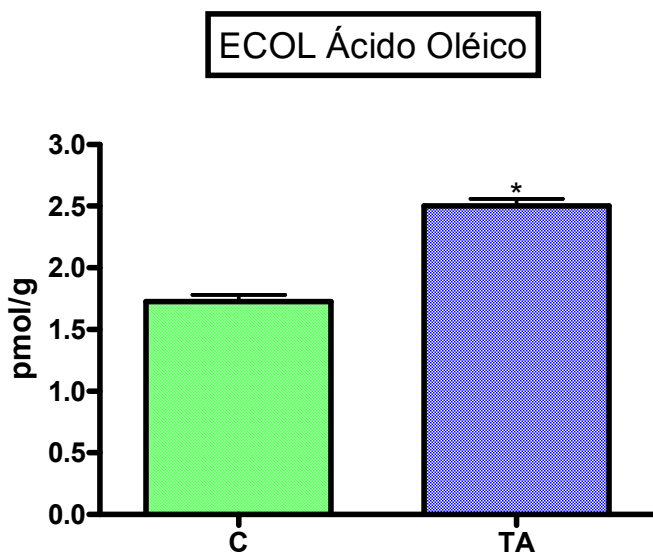
**FIGURA 32:** Incorporação do ácido  $[1-^{14}\text{C}]$ -oléico na fração de ácidos graxos livres (AGL) do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média  $\pm$  epm de dois experimentos em triplicata. \* $P < 0,05$  vs. C.



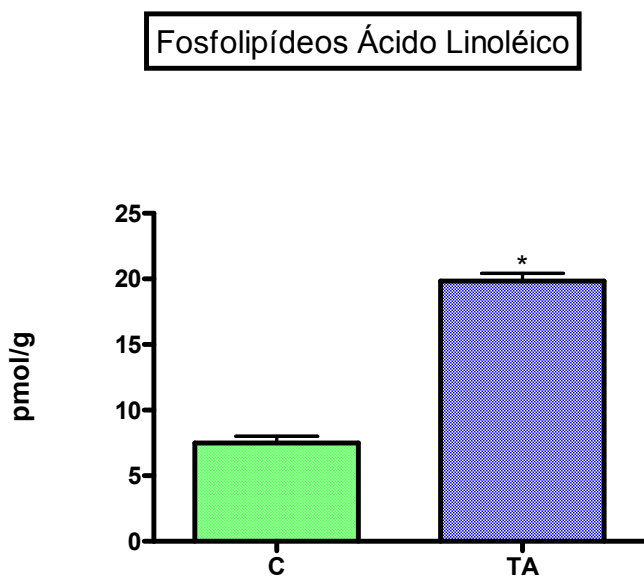
**FIGURA 33:** Incorporação do ácido  $[1-^{14}\text{C}]$ -Oléico na fração de triacilgliceróis do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam média  $\pm$  epm de dois experimentos em triplicata.



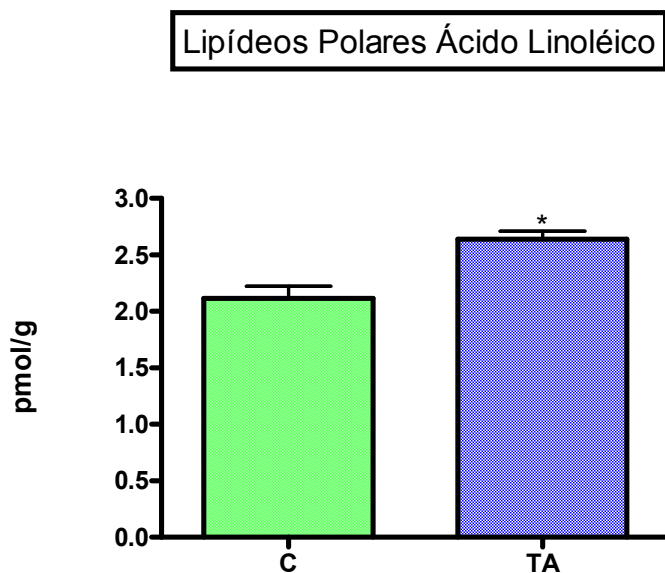
**FIGURA 34:** Incorporação do ácido  $[1-^{14}\text{C}]$ -oléico na fração de colesterol do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam média  $\pm$  epm de dois experimentos em triplicata. \* $P < 0,001$  vs. C.



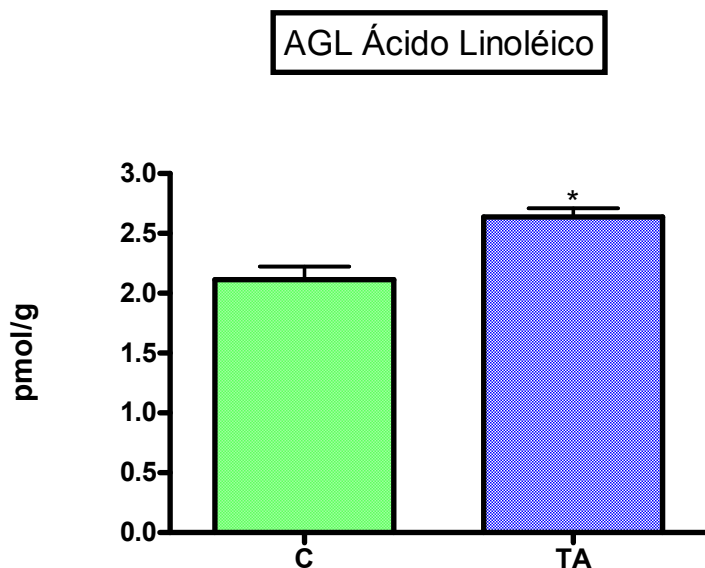
**FIGURA 35:** Incorporação do ácido  $[1-^{14}\text{C}]$ -oléico na fração de éster de colesterol (Ecol) do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média  $\pm$  epm de dois experimentos em triplicata. \* $P < 0,01$  vs. C.



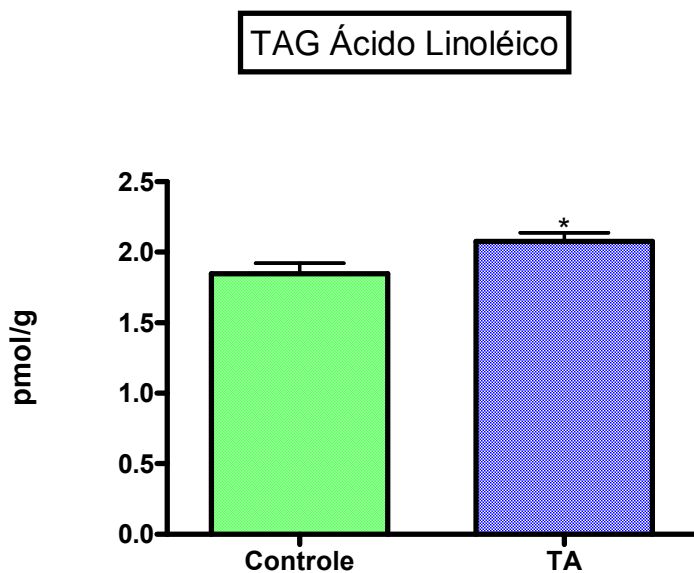
**FIGURA 36:** Incorporação do ácido  $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléico na fração de fosfolípidos do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média  $\pm$  epm de dois experimentos em triplicata.\* $P < 0,001$  vs. C.



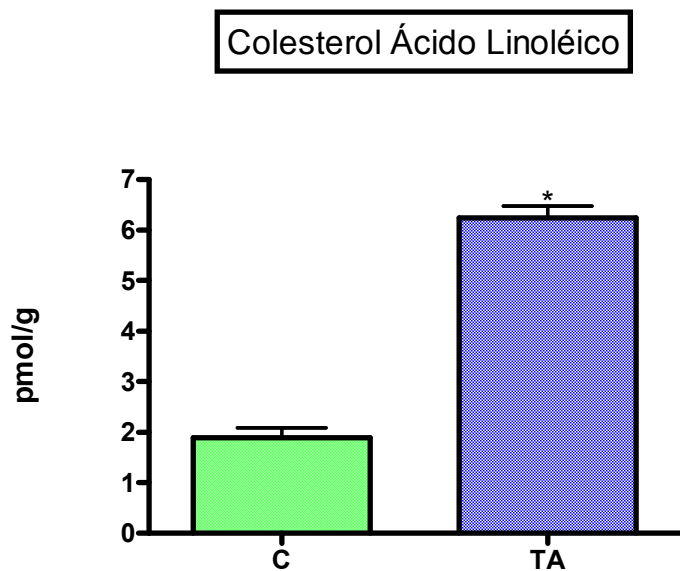
**FIGURA 37:** Incorporação do ácido  $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléico na fração de lipídeos polares do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média  $\pm$  epm de dois experimentos em triplicata.\* $P < 0,01$  vs. C.



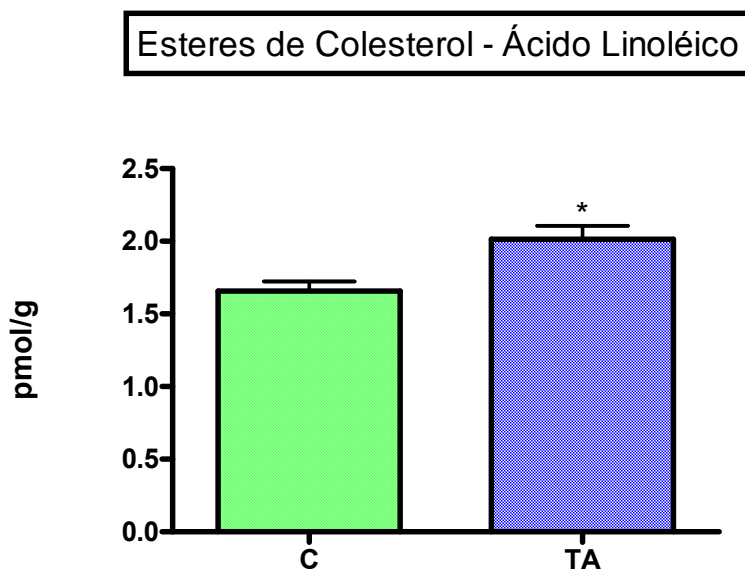
**FIGURA 38:** Incorporação do ácido  $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléico na fração de ácidos graxos livres (AGL) do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média  $\pm$  epm de dois experimentos em triplicata. \* $P < 0,01$  vs. C.



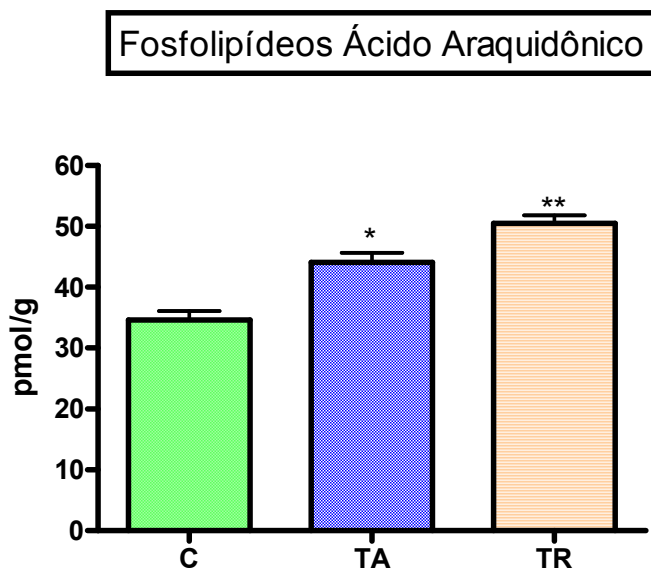
**FIGURA 39:** Incorporação do ácido  $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléico na fração de triacilgliceróis (TAG) do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média  $\pm$  epm de dois experimentos em triplicata. \* $P < 0,05$  vs. C.



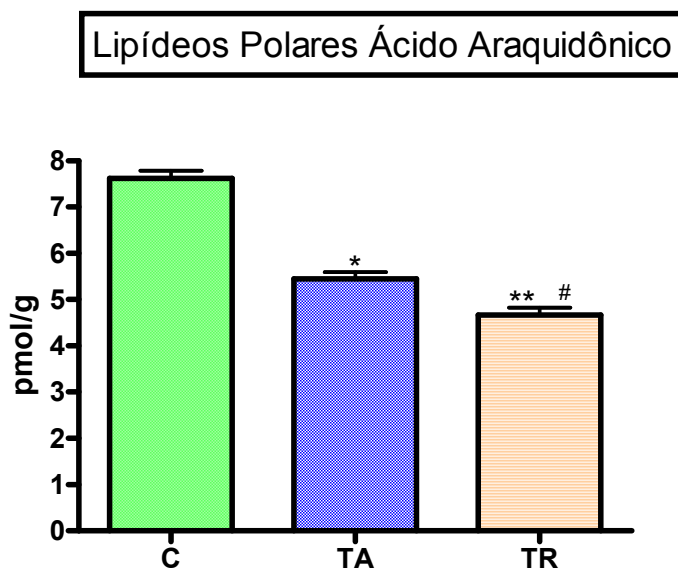
**FIGURA 40:** Incorporação do ácido  $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléico na fração de colesterol do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média  $\pm$  epm de dois experimentos em triplicata. \* $P < 0,05$  vs. C.



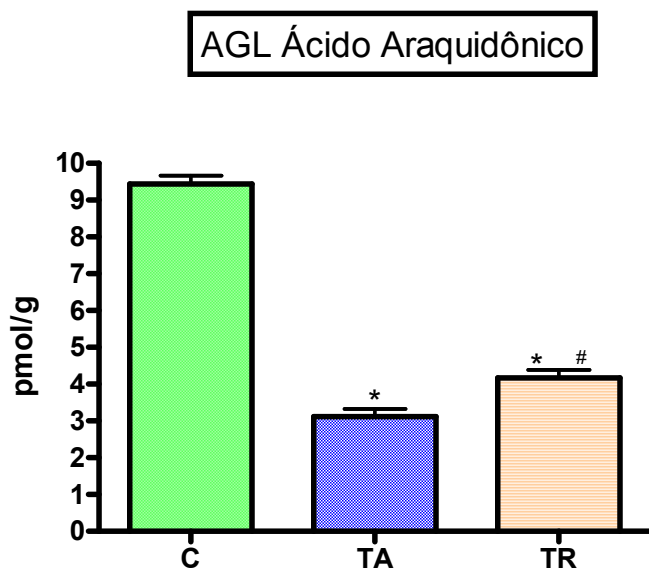
**FIGURA 41:** Incorporação do ácido  $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléico na fração de éster de colesterol (Ecol) do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C) e treinados e agudamente exercitados (TA). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média  $\pm$  epm de dois experimentos em triplicata. \* $P < 0,01$  vs. C.



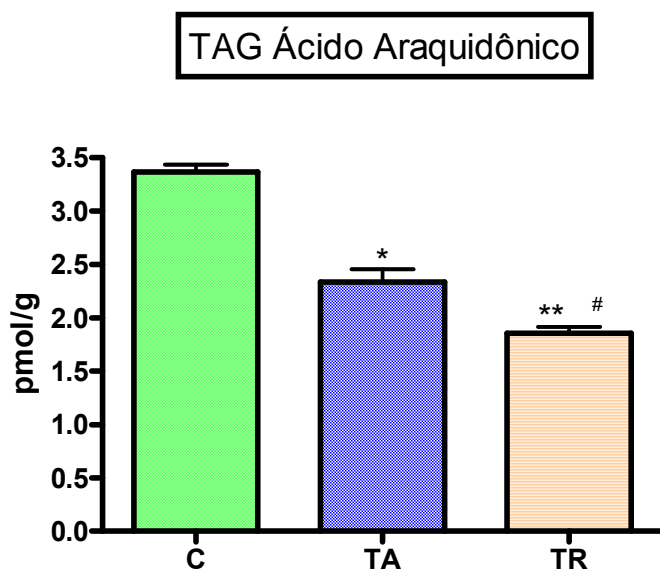
**FIGURA 42:** Incorporação do ácido [1-<sup>14</sup>C]-araquidônico na fração de fosfolípidos do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA), e apenas treinados (TR). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média ± epm de dois experimentos em triplicata. \*P<0,01 e \*\*P<0,001 vs. C.



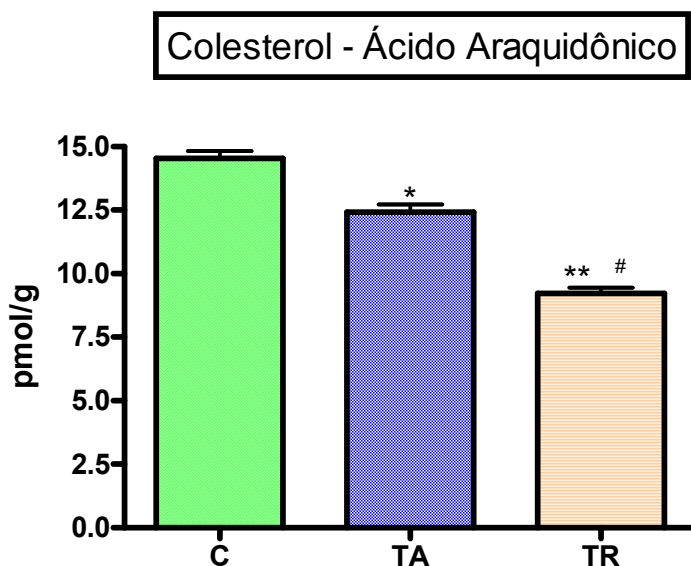
**FIGURA 43:** Incorporação do ácido [1-<sup>14</sup>C]-araquidônico na fração de lipídeos polares do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA), e apenas treinados (TR). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média ± epm de dois experimentos em triplicata. \*P<0,01 e \*\*P<0,001 vs. C. #P<0,05 vs. TA.



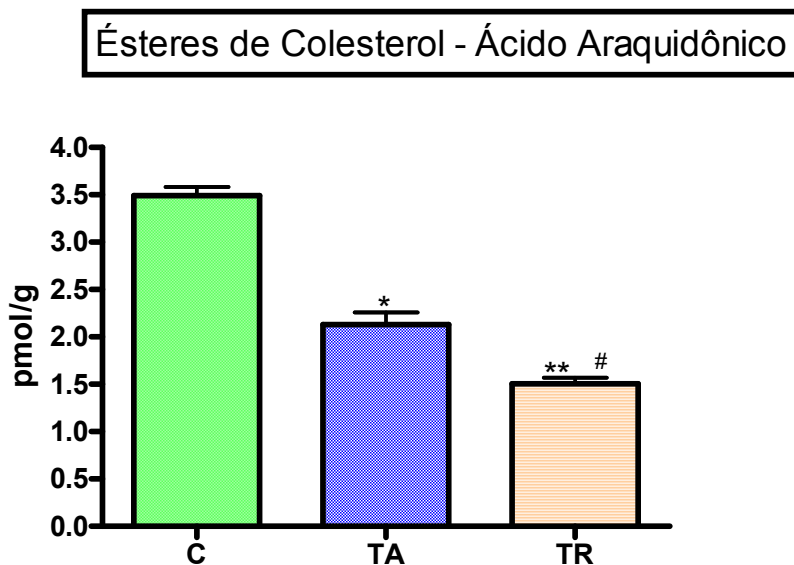
**FIGURA 44:** Incorporação do ácido [1-<sup>14</sup>C]-araquidônico na fração de ácidos graxos livres (AGL) do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA), e apenas treinados (TR). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média ± epm de dois experimentos em triplicata. \*P<0,001 vs. C. #P<0,05 vs. TA.



**FIGURA 45:** Incorporação do ácido [1-<sup>14</sup>C]-araquidônico na fração de triacilgliceróis (TAG) do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA), e apenas treinados (TR). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média ± epm de dois experimentos em triplicata. \*P<0,01 e \*\*P<0,001 vs. C.#P<0,05 vs. TA.



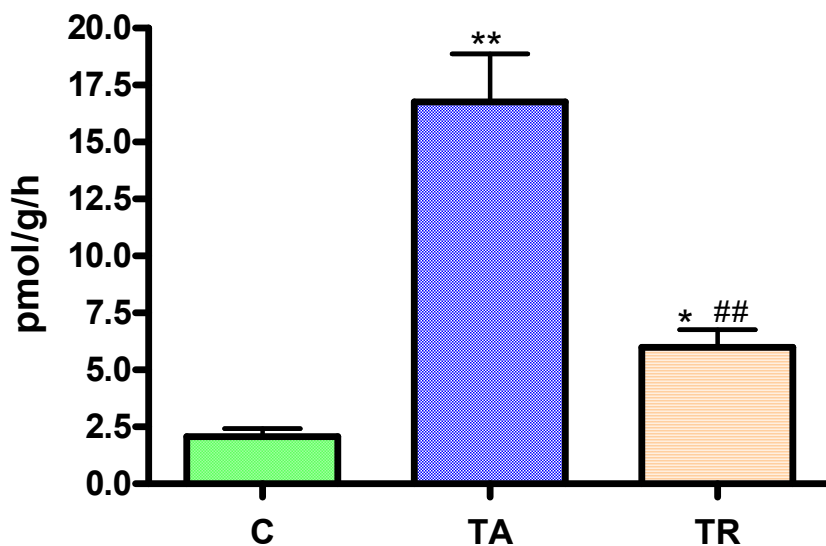
**FIGURA 46:** Incorporação do ácido [1-<sup>14</sup>C]-araquidônico na fração de colesterol do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA), e apenas treinados (TR). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média ± epm de dois experimentos em triplicata. \*P<0,01 e \*\*P<0,001 vs. C.#P<0,001 vs. TA.



**FIGURA 47:** Incorporação do ácido [1-<sup>14</sup>C]-araquidônico na fração de éster de colesterol do ME co-incubado com linfócitos rádio-marcado obtidos de animais controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA), e apenas treinados (TR). Os resultados estão expressos em pmol/g de tecido e representam a média ± epm de dois experimentos em triplicata. \*P<0,01 e \*\*P<0,001 vs. C.#P<0,05 vs. TA.

### **Descarboxilação do ácido palmítico pelo músculo esquelético.**

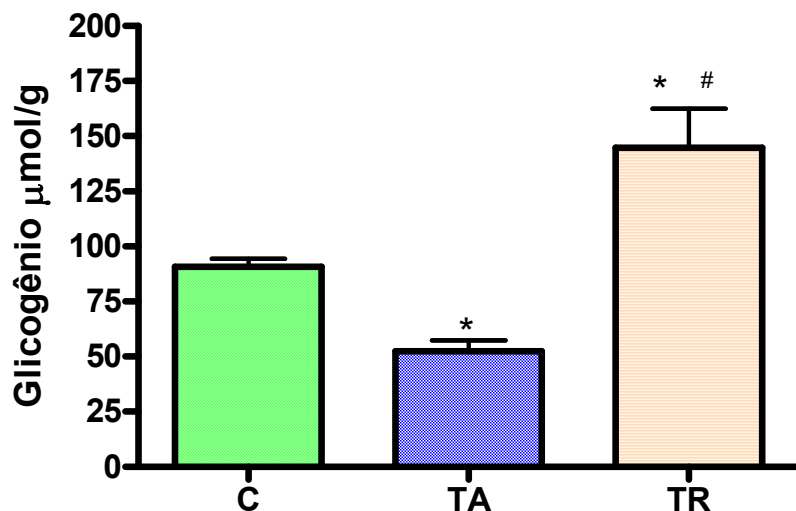
A capacidade de oxidação de AG pelo ME obtido dos animais dos grupos C, TA e TR foi investigada na presença de [U-<sup>14</sup>C]-AP durante o período de uma hora de incubação (FIG. 48). A descarboxilação do AP rádio-marcado aumentou significativamente após o período de treinamento físico (TR) quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). Após sessão aguda de exercício no grupo treinado (TR), a descarboxilação mostrou-se expressivamente acentuada, acima de 5 vezes daquela obtida para o grupo controle ( $p < 0,001$ ) e 3 vezes aquela obtida para o grupo TR ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 48** : Descarboxilação do ácido palmítico pelos ME obtidos de animais dos grupos controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA), e apenas treinados (TR), durante período de 1h. Os resultados, expressos em pmol/g, representam média  $\pm$  epm de três experimentos em quadruplicata. \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,001$  vs. C. # $P < 0,01$  vs. TA.

### **Conteúdo de glicogênio do ME intramuscular**

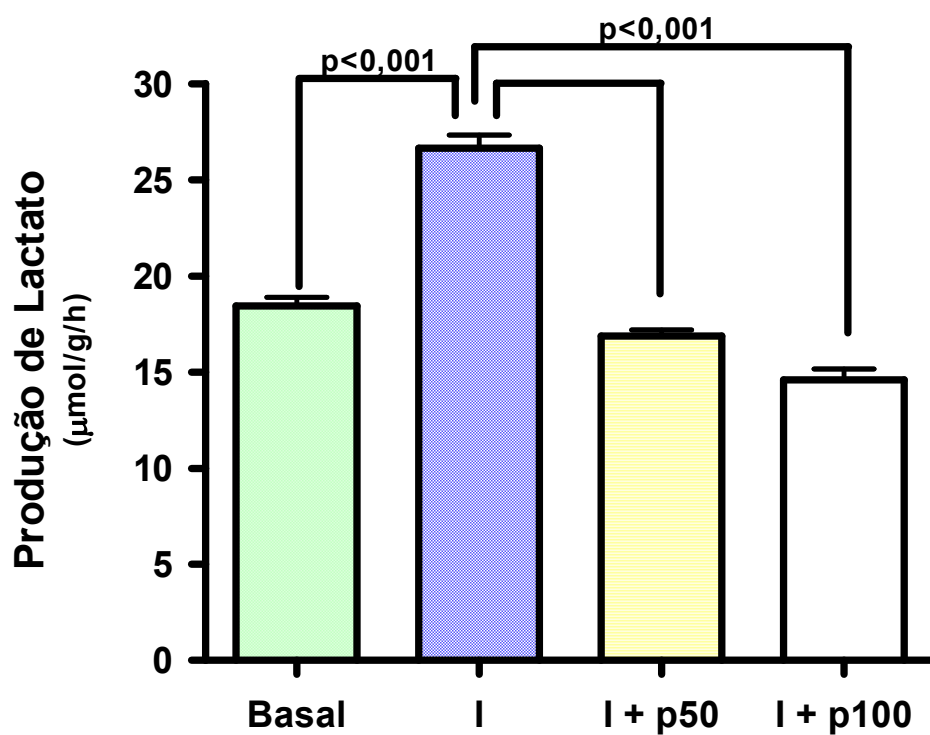
O treinamento físico de seis semanas (TR) foi capaz de aumentar o conteúdo de glicogênio no músculo sóleo (FIG. 49) quando comparado ao do grupo controle ( $p < 0,01$  vs. C). Por outro lado, a sessão aguda de exercício reduziu o conteúdo de glicogênio de maneira significativa ( $p < 0,01$  vs. C e  $p < 0,001$  vs. TA).



**FIGURA 49:** Conteúdo de glicogênio no músculo sóleo obtido de animais dos grupos controle (C), treinados e agudamente exercitados (TA) e somente treinados (TR), previamente aos experimentos de co-incubação. Os dados, expressos em μmol/g de tecido, representam média, ± epm de três experimentos em quadruplicata. \* $P < 0,01$  vs. C. # $P < 0,001$  vs. TA.

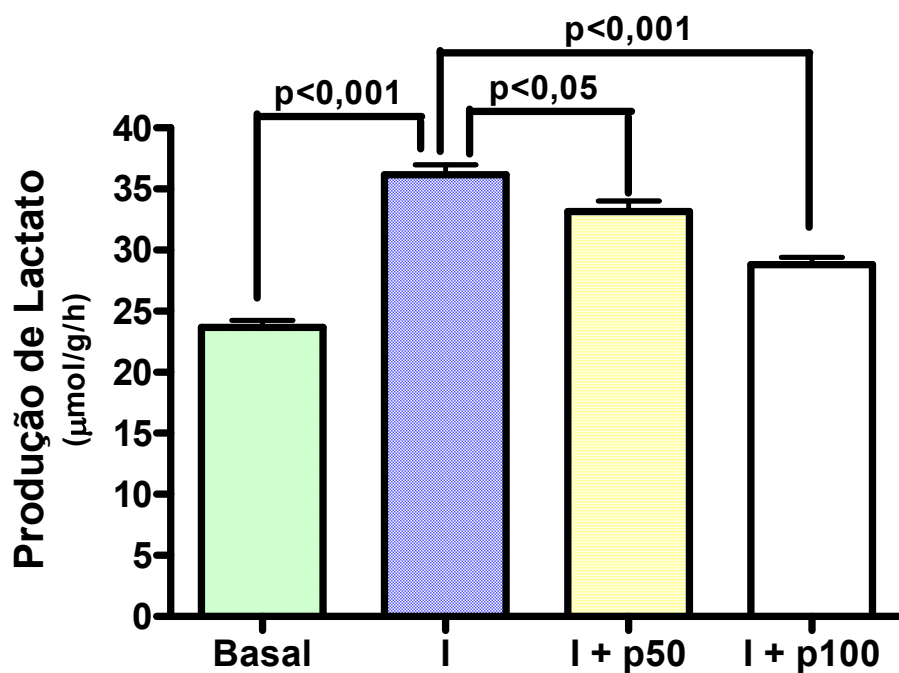
***Efeito do ácido palmítico sobre a responsividade a insulina em músculo sóleo incubado.***

No grupo controle, quando na ausência de insulina (basal), a produção de lactato foi de  $18,44 \pm 0,43$   $\mu\text{mol/ml}$  (FIG. 50). A adição de 10  $\mu\text{m/ml}$  de insulina (I) elevou a produção de lactato para  $26,65 \pm 0,67$   $\mu\text{mol/ml}$ , a qual foi significativamente maior que àquela observada na situação basal ( $p < 0,001$ ). No músculo estimulado pela insulina e na presença do ácido palmítico nas concentrações de 50 (I+p50) e 100 (I+p100)  $\mu\text{M}$ , a produção de lactato foi de  $16,89 \pm 0,31$  e  $14,59 \pm 0,57$   $\mu\text{mol/ml}$ , respectivamente, significativamente menores que àquela observada no grupo I ( $p < 0,001$ ).



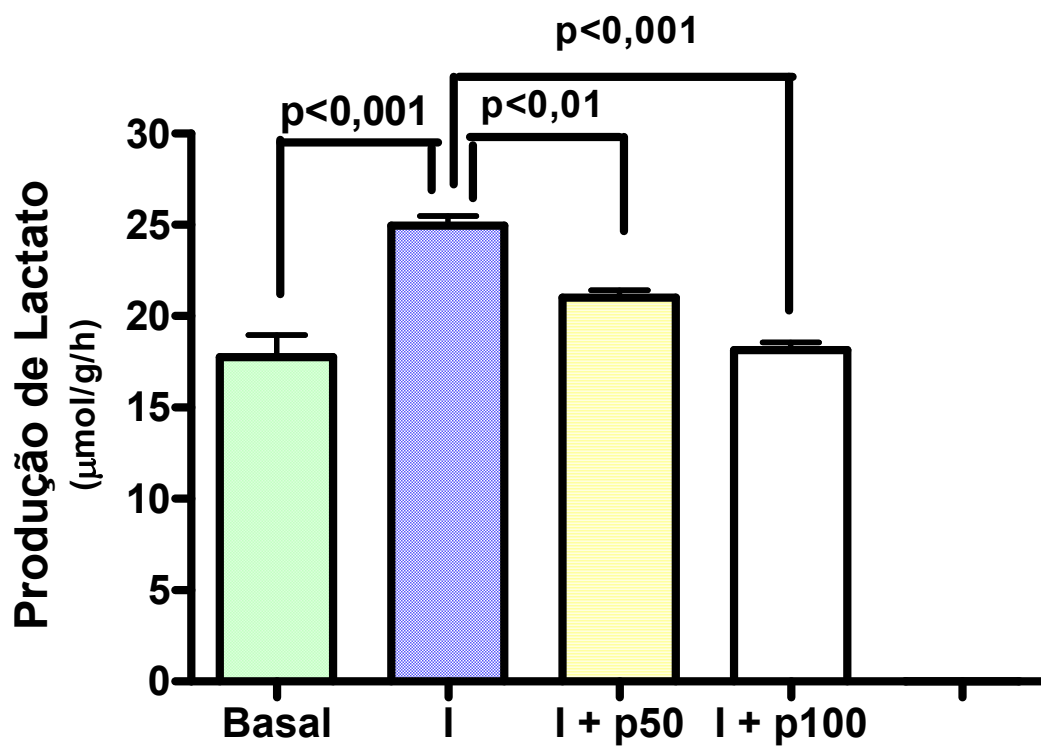
**FIGURA 50:** Efeito do AP sobre a produção de lactato pelos músculos esqueléticos de ratos controle incubados por 1h em tampão bicarbonato de Krebs Ringer contendo 5,6 mm de glicose, 0,1 µCi/ml de [U-<sup>14</sup>C]-D-glicose, a 37 °C e 95% de O<sub>2</sub>, na ausência ou presença de 10mU/ml de insulina (I) e/ou 50 (p50) ou 100 (p100) mM de palmitato. Os dados representam média ± epm de três experimentos em triplicata.

No músculo sóleo dos animais treinados e submetidos a exercício agudo (TA), a produção de lactato basal foi de  $23,69 \pm 0,56$   $\mu\text{mol/ml}$  (FIG. 51). O estímulo com insulina (I) incrementou a produção de lactato para  $36,19 \pm 0,79$   $\mu\text{mol/ml}$  ( $p < 0,001$ ). A adição de ácido palmítico na concentração de  $50$   $\mu\text{M}$  ao grupo estimulado com insulina (i+p50) induziu a uma produção de lactato de  $33,15 \pm 0,87$   $\mu\text{mol/ml}$ ., a qual foi menor que à observada no grupo I ( $p < 0,05$ ). Na concentração de  $100$   $\mu\text{M}$  de ácido palmítico (I+p100), a produção de lactato foi de  $28,81 \pm 0,60$   $\mu\text{mol/ml}$ , significativamente menor que à do grupo I ( $p < 0,001$ ), e a do grupo I+p50 ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 51:** Efeito do AP sobre a produção de lactato pelos músculos esqueléticos obtidos de animais treinados e agudamente exercitados (TA) incubados por 1h em tampão bicarbonato de Krebs Ringer contendo 5,6 mM de glicose, 0,1 µCi/ml de [U-<sup>14</sup>C]-D-glicose, a 37 °C e 95% de O<sub>2</sub>, na ausência ou presença de 10mU/mL de insulina (I) e/ou 50 (p50) ou 100 (p100) mM de palmitato. Os dados representam média ± epm de três experimentos em triplicata.

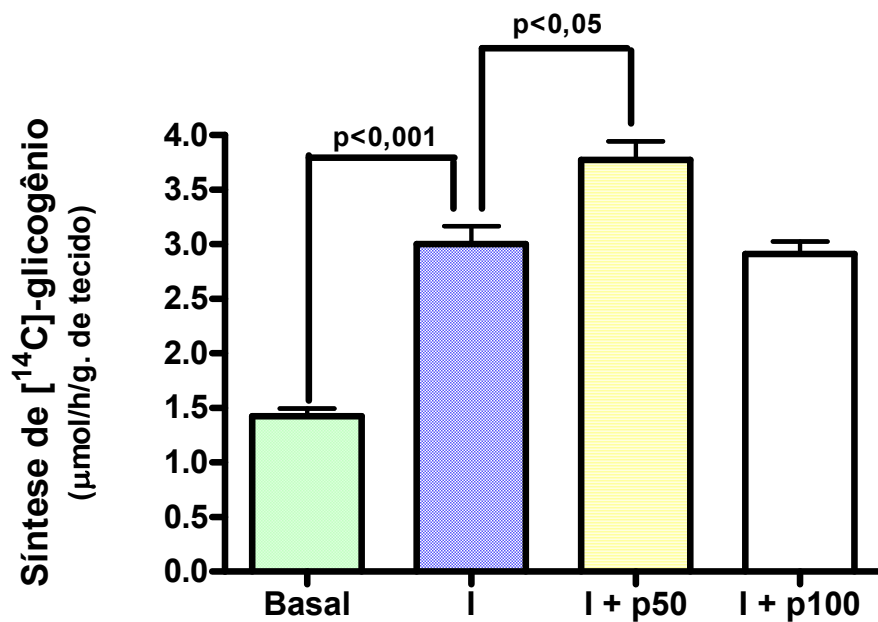
No músculo sóleo dos animais treinados (TR) a produção basal de lactato foi de  $17,77 \pm 1,18 \mu\text{mol/ml}$  (FIG. 52). A adição de insulina (I) incrementou a produção para  $24,96 \pm 0,52 \mu\text{mol/ml}$  ( $p < 0,001$ ). A adição de ácido palmítico na concentração de  $50 \mu\text{M}$  ao grupo estimulado com insulina (I+p50) induziu a uma produção de lactato de  $21,00 \pm 0,41 \mu\text{mol/ml}$ , a qual foi menor que àquela observada na presença de apenas insulina ( $p < 0,05$ ), porém ainda superior a observada para a situação basal ( $p < 0,05$ ). Na concentração de  $100 \mu\text{M}$  de ácido palmítico, a produção de lactato foi de  $18,13 \pm 0,42 \mu\text{mol/ml}$ , significativamente menor que à observada no grupo I ( $p < 0,001$ ), e a do grupo I+p50 ( $p < 0,05$ ), mas ainda superior aquela sem estímulo da insulina (basal) ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 52:** Efeito do AP sobre a produção de lactato pelos músculos esqueléticos de animais treinados por seis semanas (TR) incubados por 1h em tampão bicarbonato de Krebs Ringer contendo 5,6 mM de glicose, 0,1 µCi/ml de [U-<sup>14</sup>C]-D-glicose, a 37 °C e 95% de O<sub>2</sub>, na ausência ou presença de 10mU/mL de insulina (I) e/ou 50 (p50) ou 100 (p100) mM de palmitato. Os dados representam média ± epm de três experimentos em triplicata.

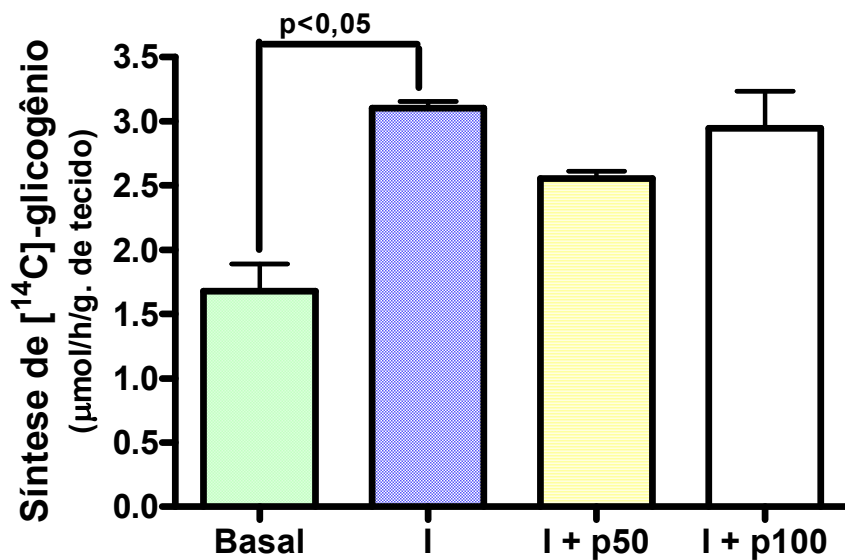
***Efeito do ácido palmítico sobre a síntese de [<sup>14</sup>C] glicogênio a partir da captação estimulada por insulina da [U -<sup>14</sup>C]-D-glicose em músculo sóleo incubado de rato.***

No grupo controle, a síntese basal de [<sup>14</sup>C]-glicogênio (mmol/h/g de tecido) a partir da [U -<sup>14</sup>C]-D-glicose foi de 1,427±0,07 (FIG. 53). A presença de insulina (I), elevou a síntese de [<sup>14</sup>C]-glicogênio para 3,003±0,16, a qual foi significativamente maior (P<0,001). A adição de palmitato na concentração de 50µM ao grupo estimulado por insulina (I+p50) elevou a síntese de [<sup>14</sup>C]-glicogênio para 3,77±0,17, a qual foi significativamente maior que a do grupo I (p<0,05). A adição de palmitato na concentração de 100µM (I+p100) promoveu a síntese de [<sup>14</sup>C]-glicogênio pelo músculo esquelético para 2,913±0,11, a qual foi similar a do grupo I, mas inferior a do grupo I+p50 (P>0,05).



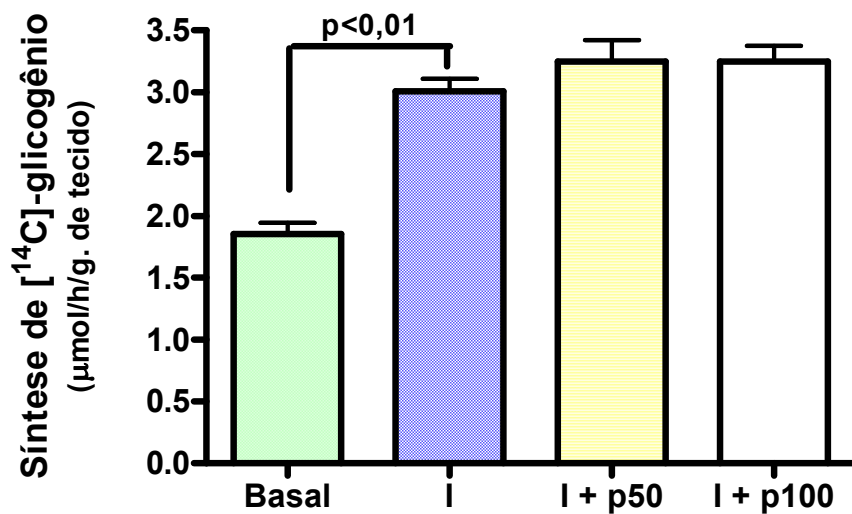
**FIGURA 53:** Efeito do AP sobre a síntese de [14C]-glicogênio a partir de [U-14C]-D-glicose pelo músculo esquelético estimulado por insulina de ratos controle (C). Os músculos foram incubados por 1h em tampão bicarbonato de Krebs Ringer contendo 5,6 mM de glicose, 0,1 µCi/ml de [U-14C]-D-glicose, a 37 °C e 95% de O<sub>2</sub>, na ausência ou presença de 10mU/mL de insulina (I) e/ou 50 (p50) ou 100 (p100) mM de palmitato. Os dados representam média ± epm de três experimentos em triplicata.

No grupo treinado e submetido a exercício agudo (TA), a síntese basal de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicogênio (mmol/h/g. de tecido) a partir da [U - $^{14}\text{C}$ ]-D-glicose foi de  $1,679 \pm 0,2$  (FIG. 54). A presença de insulina (I), induziu a uma produção de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicogênio de  $3,10 \pm 0,05$ , a qual foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ). Com a adição de palmitato na concentração de  $50 \mu\text{M}$  na presença de insulina (I+p50), a síntese de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicogênio foi de  $2,554 \pm 0,057$ , e quando da adição de palmitato na concentração de  $100 \mu\text{M}$  foi de  $2,94 \pm 0,28$ , não sendo diferentes daquelas observadas da do grupo I ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 54:** Efeito do AP sobre a síntese de [<sup>14</sup>C]-glicogênio a partir de [U-<sup>14</sup>C]-D-glicose pelo músculo esquelético estimulado por insulina de animais treinados e agudamente exercitados (TA). Os músculos foram incubados por 1h em tampão bicarbonato de Krebs Ringer contendo 5,6 mM de glicose, 0,1 µCi/ml de [U-<sup>14</sup>C]-D-glicose, a 37 °C e 95% de O<sub>2</sub>, na ausência ou presença de 10mU/mL de insulina (I) e/ou 50 (p50) ou 100 (p100) mM de palmitato. Os dados representam média ± epm de três experimentos em triplicata.

No grupo treinado (TR), a síntese basal de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicogênio (mmol/h/g. de tecido) a partir da [U - $^{14}\text{C}$ ]-D-glicose foi de  $1,85 \pm 0,09$  (FIG. 55). A adição de insulina (I), elevou a produção para  $3,008 \pm 0,1 \mu\text{mol/g/h}$ , a qual foi significativamente maior ( $P < 0,01$ ). A adição de palmitato na concentração de  $50 \mu\text{M}$  ao grupo estimulado com insulina (I+p50) levou a uma síntese de  $3,24 \pm 0,17 \mu\text{mol/g/h}$ , e a adição de palmitato na concentração de  $100 \mu\text{M}$  de  $3,248 \pm 0,128 \mu\text{mol/g/h}$ . Ambas não foram diferentes daquelas observadas no grupo I ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 55:** Efeito do AP sobre a síntese de [<sup>14</sup>C]-glicogênio a partir de [U-<sup>14</sup>C]-D-glicose pelo músculo esquelético estimulado por insulina de animais treinados por seis semanas (TR). Os músculos foram incubados por 1h em tampão bicarbonato de Krebs Ringer contendo 5,6 mM de glicose, 0,1 μCi/m de [U-<sup>14</sup>C]-D-glicose, a 37 °C e 95% de O<sub>2</sub>, na ausência ou presença de 10mU/mL de insulina (I) e/ou 50 (p50) ou 100 (p100) mM de palmitato. Os dados representam média ± epm de três experimentos em triplicata.

## 5.DISSCUSSÃO

O fenômeno de transferência lipídica entre linfócitos (Ly) e músculo esquelético (ME) já foi demonstrado, (PERES, 2002; e NOGATA, 2005), entretanto, o significado deste fenômeno em relação à atividade física ainda não é sabido. Tem-se aventado a possível função destes AG transferidos como fornecedores de energia, moduladores da resposta à insulina e também da transdução de sinais biológicos. Não há relato na literatura da investigação destes mesmos fenômenos em animais exercitados.

A constatação de perfil de incorporação diferenciado para cada AG estudado indica, reafirmando dados de outros estudos (PERES, 1997, NOGATA, 2004), que o número de insaturações e o tamanho da cadeia carbônica da molécula tem importância direta na modulação de sua incorporação pela célula. HAMILTON E CÍSTOLA (1986) demonstraram que o aumento da cadeia carbônica reduz a captação de AG por vesículas, enquanto o aumento no nº de duplas ligações eleva esta captação. No presente estudo, o AA (poliinsaturado) foi o AG mais incorporado pelos Ly de todos os grupos experimentais, corroborando dados já demonstrados em outros trabalhos de nosso grupo (PERES, 1997; GARCIA JR, 2000; PARDAL, 2002; NOGATA, 2004), seguido dos ácidos AL > AO > AP. A incorporação lipídica dos Ly do grupo TR não apresentou diferença estatística quando comparada ao grupo C (FIGS. 12 e 21). Porém, a análise dos LY do grupo TA verifica uma incorporação lipídica significativamente maior para os AG AA e AO (FIGS. 21 e 15) e uma

incorporação reduzida para AP e AL quando comparado ao C (FIGS. 12 e 18). A redução ou aumento na quantidade de lípidos encontrados nos Ly após o período de incubação na presença de cada AG estaria relacionado a dois fatores principais: 1) Taxa reduzida ou aumentada na captação destas moléculas; ou 2) Taxa reduzida ou aumentada na oxidação dos AG captados.

No trabalho de BACURAL *et al.*, 2000, o protocolo de treinamento físico reduziu a conversão de glicose a lactato (26%) e o fluxo através do ciclo de Krebs (14%) em Ly de ratos portadores de tumor de Walker 256, o que promoveria um aumento na quantidade de glicose disponível para ser metabolizada na via das pentoses (pentose phosphate pathway), ou desviada para síntese de lipídeos. Estes resultados indicam que o treinamento físico intervém sobre a atividade lipogênica nos Ly, estimulando estas vias metabólicas. A maior incorporação lipídica encontrada nos Ly do grupo TA, para os ácidos AA e AO, poderiam então estar relacionadas a um fluxo aumentado da via lipogênica nesta célula, o que estimularia a incorporação dos lípidos captados em diversas frações lipídicas intracelulares, preferencialmente a sua oxidação. Por outro lado, a queda na radioatividade encontrada para determinados AG, AP e AL se contrapõem a esta hipótese. Uma vez que os ácidos graxos saturados estão mais diretamente relacionados ao metabolismo energético, a possibilidade de o ácido palmítico ter sofrido maior taxa de oxidação em comparação aos outros lípidos não poderia ser descartada, pois sua passagem pela membrana plasmática não encontra barreira significativa, visto a simplicidade de sua molécula. Não obstante, SEELANDER *et al.*, (1996) demonstraram que os Ly

apresentam significativa taxa de oxidação dos lipídeos acumulados intracelularmente, e sendo o AP o principal ácido graxo a adentrar a dupla membrana mitocondrial, a hipótese de sua descarboxilação é reforçada. A possibilidade de que estas moléculas tenham sido captadas, ou incorporadas em taxa reduzida nos Ly do grupo TA seria também explicação plausível a redução encontrada para AP e AL. Porém, redução no fluxo transmembrana destas moléculas no período pós-exercício estaria descartada, visto que para AA e AO esta intervenção foi hábil em elevar a captação e não reduzi-la. De qualquer modo, nossos dados mostram significativa incorporação lipídica, a partir de todos os AG utilizados, pelas células linfocitárias de ambos os grupos experimentais.

Uma vez que os AG [ $^{14}\text{C}$ ]-AA, [ $^{14}\text{C}$ ]-AL, [ $^{14}\text{C}$ ]-AO e [ $^{14}\text{C}$ ]-AP, foram ativamente incorporados pelos linfócitos dos animais C, TA e TR, a possibilidade destas espécies lipídicas serem transferidas para a musculatura esquelética foi investigada *in vitro*.

Nossos resultados de co-cultivo confirmam a hipótese de que ocorre incorporação de lípidos exportados por Ly na célula muscular esquelética (PERES, 2002; e NOGATA, 2005). Diferentemente do perfil observado nas células linfocitárias, o AG com maior taxa proporcional de incorporação no ME, em todos os grupos experimentais, foi o AP, seguido dos ácidos AA para o grupo TR e AO > AA > AL para o grupo TA. A incorporação lipídica pelo ME dos animais aerobiamente treinados (TR), foi menor para ambos os AG estudados nesta situação, (AA e AP). O estado energético da célula pode ser um

determinante de seu potencial para incorporar um substrato energético, e o conteúdo de glicogênio é uma variável mensurável razoável da reserva energética intracelular (GOBATTO, 2004). O treinamento físico é capaz de elevar o conteúdo de glicogênio intracelular da célula muscular esquelética (TAN *et al.*, 1982). O incremento do conteúdo glicídico no músculo esquelético pode, entre outros aspectos, ser devido a um aumento da glicogênese pelo mecanismo de supercompensação, onde após depleção deste substrato há ativação acentuada da enzima glicogênio sintase (GS). Tem sido demonstrado redução do conteúdo de glicogênio do ME após realização aguda de esforço (NAKTANI *et al.*, 1997), com subsequente aumento da concentração após 48 horas de repouso. Este efeito é ainda acentuado em animais treinados (TAN *et al.*, 198e; NAKATANI *et al.*, 1997, LAMB *et al.*, 1969). Estudos em animais diabéticos submetidos a treinamento aeróbio de natação observaram elevação dos estoques deste substrato energético após 4 semanas de exercício (ROGATTO; LUCIANO, 2000; LUCIANO; MELLO, 1998). Tem sido proposto também que a supercompensação observada após a depleção dos componentes glicídicos do músculo seria decorrente do aumento do número de transportadores de glicose GLUT4, o que favoreceria a repleção dos estoques de glicogênio muscular (KRISTIANSEN *et al.*, 2000).

No presente estudo, o treinamento físico foi eficiente em aumentar, de maneira significativa, o conteúdo intracelular de glicogênio do músculo sóleo do grupo TR quando comparado ao do grupo C (FIG 49). Assim, a menor captação de AG, como indicada pela menor radioatividade mensurada nos ME dos animais

do grupo TR, poderia estar relacionada ao acentuado estado energético deste tecido, o que conseqüentemente reduziria a necessidade de incorporação de qualquer outro substrato.

A radioatividade total encontrada no ME do grupo TA não foi diferente daquela do grupo C para os AG AP e AA, porém, encontramos aumento daquela provinda do AL e redução do AO.

O estudo do fluxo de substrato pelo do ciclo de krebs, através das análises de descarboxilação do AP, compõem um quadro que corrobora para o entendimento destes resultados. Uma vez que a capacidade oxidativa do ME do grupo TA mostrou-se significativamente maior em comparação à do grupo controle ( >5 vezes), parte do [ $^{14}\text{C}$ ] captado por este tecido foi desviado para síntese de [ $^{14}\text{CO}_2$ ], e assim liberado na atmosfera, impossibilitando sua incorporação em qualquer fração lipídica do ME. Foi mostrado que o aumento da cadeia carbônica diminui a transferência de AG entre vesículas (KAMP *et al.*, 1993), enquanto o aumento no número de duplas ligações, como comparado entre os AG esteárico, oléico e linoléico eleva a taxa de transferência (KAMP *et al.*, 1993). Dos AG estudados, o AP é o que apresenta a cadeia carbônica mais simples. Uma molécula saturada, com o menor número de carbonos (16). Sabe-se também, que o AP é o principal AG oxidado pela mitocôndria da célula muscular esquelética (SPRIET, 2002). Assim, mesmo com alta atividade oxidativa neste tecido, o que leva a perda de radioatividade na forma de [ $^{14}\text{CO}_2$ ], foi ainda possível detectar radioatividade provinda dos AG em quantidades similares àquelas encontradas no grupo C. Destacamos que o valor detectado

não representa a quantidade total de AG incorporados pela célula, mas sim o remanescente do que foi captado e oxidado. Isto possivelmente indica que o exercício agudo elevou a taxa de captação deste metabólito. O estado energético da célula tem importante função na modulação da captação de outros substratos, o que dá suporte ao dado mostrado para o grupo TA. O conteúdo de glicogênio do músculo sóleo, de maneira oposta ao verificado para o TR, sofreu depleção acentuada após sessão aguda de exercício (FIG 49). Este mesmo efeito tem sido mostrado em trabalhos recentes (KUDELSKA *et al.*, 1996; MURAKAMI *et al.*, 1997; ROGATTO; LUCIANO, 2000). ROEPSTORFF *et al.*, (2004) demonstraram que o baixo conteúdo de glicogênio intramuscular elevou em 100% a oxidação de AG em ME de humanos. Assim, o reduzido estado energético da célula contribuiria para a acentuada taxa de descarboxilação de AP verificada em TA (>5x vs c; e >3x vs TR), e conseqüentemente captação elevada deste substrato para suprir a necessidade da via oxidativa e, ainda assim, manter concentrações similares na quantidade total de lípidos encontrados intracelularmente quando comparado ao C, após o período de co-incubação.

O fluxo de AG através da membrana plasmática tem sido motivo de diversos estudos (STEWART, 2000). Evidências de que o movimento transmembrânico de AG seja feito por mecanismo de *flip-flop* foram descritos por diversos autores, utilizando-se diferentes tipos celulares. (KAMP; HAMILTON *et al.*, 1992; KAMP *et al.*, 1993). Em contrapartida, para outros tipos celulares, como o ME, foram caracterizadas algumas classes de proteínas ligadoras de AG (FABP

– fatty acids binding protein), que poderiam estar envolvidas no transporte transmembrânico deste substrato (VEERKAMP *et al.*, 1991). Estudos recentes demonstram que ambos os mecanismos atuam de maneira concomitante na célula muscular (BONEN *et al.*, 2003 ; POWNALL *et al.*, 2003), e que a maior porção dos AG ganham passagem via mecanismo mediado por proteínas (SPRIET, 2001; CLARK *et al.*, 2004). Este processo pode envolver a passagem através da membrana muscular utilizando proteínas carreadoras, ou por facilitação de seu movimento através da membrana por ligação inicial a proteínas de transporte. Três proteínas ligadoras de AG têm sido amplamente relacionadas à captação deste metabólito na célula muscular esquelética: a proteína ligante de AG da membrana plasmática FABP<sub>pm</sub> (*do inglês fatty acid binding protein*), a traslocase de AG FAT/CD36 (*do inglês fatty ácid translocase CD36*) e a proteína transportadora de ácidos graxos FATP (*do inglês fatty ácid transport protein*) . 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 (IBRAHIMI *et al.*, 1999). Em adição, a captação de AG foi reduzida em camundongos que não apresentavam a proteína FAT/CD36. Recentemente foi também demonstrado um aumento na expressão de FAT/CD36 e caveolina 1 no músculo esquelético de humanos durante o período de recuperação após exercício prolongado (ROEPSTORFF *et al.*, 2004). A FABP<sub>pm</sub> e FATP também parecem exercer importante função no transporte de AGCL através da membrana plasmática do ME, principalmente aquele

composto por fibras oxidativas (Turcotte *et al.*, 1997), como é o caso do ME soleo. Expressão aumentada da FABP<sub>pm</sub> e FATP foi demonstrado em decorrência do treinamento físico (KIENS *et al.*, 1997; KIENS *et al.*, 1999). Uma vez captados, os AG podem ser oxidados na mitocôndria ou desviados a via lipogênica. Se a necessidade energética é baixa, a síntese de TAG intramusculares (TGIM) ganha espaço, caso contrário, a oxidação será a via de preferência, como demonstrado por ROEPSTORFF *et al.*, (2004), onde o baixo conteúdo de glicogênio intramuscular elevou em 100% a oxidação de AGCL pelo membro inferior exercitado. O reduzido conteúdo energético da célula muscular esquelética dos animais do grupo TA, evidenciado pelo baixo conteúdo de glicogênio muscular, foi responsável pelo aumento de 5 vezes na taxa de oxidação do AP por este tecido (FIG. 48), levando a redução na síntese da maioria das frações lipídicas, incluindo TGIM, quando comparadas à do grupo controle. Foi demonstrado que em ME de ratos, a captação de palmitato foi 50% a 75% maior após contração (BONEN *et al.*, 2000) o que foi correlacionado a expressão de FAT/CD36. O aumento na utilização de AGCL após treinamento tem sido associado a elevação do número e da atividade das proteínas ligantes de lipídeos. TURCOTTE *et al.*, (1999) mostraram que o ratos treinados apresentaram aumento da FABP<sub>pm</sub> no ME, juntamente com aumento na captação de palmitato induzida pela contração. Em adição, ROEPSTORFF *et al.*, (2004), mostraram que uma única sessão de exercício foi hábil em aumentar o conteúdo da FAT/CD36 (25%). Ainda, um achado interessante, foi o recente relato de que a FAT/CD36 é agudamente transportada de um pool

intracelular para a membrana plasmática durante contração (BONEN *et al.*, 2000).

A técnica de cromatografia de camada delgada permitiu investigarmos os lipídeos incorporados na musculatura esquelética a partir dos ácidos graxos exportados pelos Ly e nos sugere que estes metabólitos (AG) são rapidamente metabolizados no ME, esterificados em FL e outras frações lipídicas, ou oxidados, diminuindo o montante de AG livres no citoplasma, e favorecendo um influxo continuado desses ao interior da célula muscular esquelética. Outros estudos também demonstraram que não somente os AG, mas diversos outros lipídeos como, colesterol e fosfolipídios, são também exportados pelos Ly e captados por outros tecidos tais como ME (PARDAL, 2002), ilhota pancreática isolada (GARCIA JR, 2000) e macrófagos (HOMEM DE BITTENCOURT; CURI, 1998; NISHIYAMA-NARUKE; CURI, 2000).

A fração de FL foi a que apresentou maior taxa de incorporação de AG exportados e captados pelos ME em todos os grupos experimentais. Provavelmente isto ocorra porque os FL são os primeiros a terem contato com os lípidos do meio externo (GARCIA JÚNIOR, 2000). O AA foi o principal AG incorporado nesta fração lipídica, e mostrou um perfil inverso daquele observado na radioatividade total do ME. Dentre os grupos, TR mostrou a maior taxa de incorporação do AA em FL, seguido de TA e C. A maior incorporação do AA nesta fração lipídica deve-se ao fato deste lípido ser um dos principais constituintes dos FL de membrana (GARCIA JÚNIOR, 2000). No processo de incorporação do AA nas membranas celulares duas enzimas estão envolvidas:

araquidonoil-CoA sintetase, que acetila o araquidonato, possibilitando sua incorporação a membrana, e araquidonil-CoA hidrolase, que deacila o araquidonato, impedindo sua incorporação (COSTA ROSA *et al.*, 1994). Assim, o nível de atividade de uma destas enzimas em relação à outra seria responsável por maior, ou menor, utilização do AA no processo de renovação de membrana celular. De fato, o treinamento físico parece ser hábil em elevar o conteúdo de AA nos FL do ME sóleo de ratos normais (AYRE, 1998). As demais frações lipídicas sintetizadas a partir do AA foram reduzidas quando comparadas à do C para os grupos TA e TR. Este resultado poderia ser consequência da acentuada oxidação no ME do grupo TA, e a uma provável redução taxa de captação de AG pelos ME do grupo TR, devido a seu acentuado estado energético. As duas situações levariam a uma redução da quantidade de AG disponíveis para incorporação nas diferentes frações lipídicas analisadas. A modulação da incorporação do AP parece estar ligada aos mesmos fenômenos acima citados, uma vez que a incorporação deste metabólito foi menor, quando comparada à do C, para todas as frações lipídicas. O AL teve significativa maior incorporação pelo ME do grupo TA quando comparado ao do controle. Em virtude disto, todas as frações lipídicas sintetizadas a partir desta molécula, foram maiores para TA em comparação à do grupo C. Diferentemente do AO, que teve captação significativamente menor pelo ME do grupo TA quando comparada à do C, e assim, proporcional redução na incorporação em frações lipídicas do ME, com exceção para AGL, COL e ECOL.

Tem sido postulado que os linfócitos possam ser fonte adicional de AG para diversos tecidos (GARCIA JR, 2000; HOMEM DE BITTENCOURT; CURI, 1998; NISHIAMA) e o ME (PARDAL, 2002). Nossos dados dão suporte a esta hipótese pois com o treinamento físico ou após exercício agudo também demonstramos este fenômeno, o qual foi acompanhado de taxa de oxidação 5 vezes maior que aquela encontrada no ME do rato não exercitado. Uma vez que demosntramos isto, passamos a investigar algumas possíveis interações dos lípides com o metabolismo de glicose no ME, pois o metabolismo destes dois substratos têm íntima ligação, e suas vias metabólicas são interativas em diversas situações (WOLFE, 1998). O consumo de glicose pela célula pode ser regulado em várias etapas, sendo a primeira sua passagem pela membrana plasmática. O transporte de glicose ocorre por difusão facilitada através de gradiente, e como a mesma é fosforilada a glicose-6-fosfato pela hexoquinase ao adentrar a célula muscular esquelética, o fluxo deste metabólito pode continuar, uma vez que a concentração intracelular de glicose livre permanece baixa (KAHN, 1991).

A insulina aumenta a velocidade de captação da glicose no ME, o qual desempenha importância relevante na regulação da glicemia (aproximadamente 75% da glicose removida do sangue é captada pelos músculos esqueléticos (ZECCHIN *et al.*, 2004)). Assim, manutenção desta função e o entendimento dos possíveis mecanismos através dos quais esta pode ser comprometida torna-se de grande relevância.

É sabido que o aumento na concentração de AG plasmáticos é capaz de reduzir o metabolismo de carboidratos (RANDLE, 1963; WOLFE, 1998). Isto é atribuído ao aumento da oxidação destes lipídeos, o que levaria a maior concentração de intermediários metabólicos das vias aeróbias que, em última instância, inibiriam enzimas chaves da via glicolítica. Este fenômeno foi demonstrado por Philip Randle em 1963, e leva seu nome, o chamado ciclo ácido graxo-glicose ou Ciclo de Randle (RANDLE, 1963; WOLFE, 1998; RANDLE, 1994). Além disso, a captação de AG na forma não esterificada provoca redução do pH intracelular, condição que inibe enzimas chave da glicólise (HAMILTON *et al.*, 1998). Porém, a possibilidade dos lipídeos inibirem a captação de glicose mediada por insulina, através de sua interferência sobre mecanismos de sinalização insulínica também tem sido demonstrada (HIRABARA, 2005, ZECCHIN *et al.*, 2004, LOPES, 2004; RODEN, 2004). Enquanto alguns autores demonstraram que o AP, agudamente, reduz a captação basal de glicose estimulada pela insulina (GAZDAG *et al.*, 1998; HAJDUCH *et al.*, 2001) e a síntese de glicogênio (ARGYRAKY *et al.*, 1989; THOMPSON *et al.*, 2000) em músculo esquelético, outros não observaram alterações nestes parâmetros (BESSEY *et al.*, 1993; MAGNAN *et al.*, 1996.)

Nossos resultados corroboram o fato de AG serem capazes de reduzir a metabolização da glicose induzida por insulina em músculo esquelético. A presença do AP em concentrações fisiológicas (50 e 100  $\mu$ M) foi hábil em reduzir a produção de lactado estimulada por insulina para concentrações basais (FIG. 50). Interessantemente, nos grupos TA e TR, apesar de o AP

também reduzir a produção de lactato, este efeito não foi de mesma amplitude (FIGS. 51 e 52). Tem sido demonstrado aumento da sensibilidade periférica à insulina após realização de esforço físico, a qual pode persistir por período de tempo prolongado, (BORGHOUTS, L.B. 2000; CARTEE *et al.*, 1989). Isto tem sido atribuído ao aumento agudo na translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana plasmática muscular pós exercício (TAGUCHI *et al.*, 2000; HOST *et al.*, 1998). Além disso, é sabido que o treinamento físico é hábil em melhorar a responsividade à insulina da célula muscular esquelética não apenas agudamente (BORGHOUTS *et al.*, 2000). Este efeito se dá através de adaptações músculo-esqueléticas ao treinamento, dentre as quais estão mudanças na composição lipídica da membrana plasmática do ME (AYRE *et al.*, 1998, HELGE *et al.*, 1998). Em adição, uma sessão aguda de exercício é capaz de elevar a captação de glicose pela célula muscular esquelética, mesmo na ausência de insulina, através de um processo similar, uma vez que ambos os estímulos, insulina e contração muscular, levam a aumento na translocação de GLUT4 do pool intracelular para a membrana plasmática (TAGUCHI *et al.*, 2000). BERGGREN *et al.*, (2005), mostraram aumento da captação basal de glicose, não estimulado por insulina, em células músculo-esqueléticas humanas isoladas e cultivadas, de indivíduos treinados em endurance quando comparadas as de sedentários. Corroborando isto, TOKOYAMA *et al.*, (1993) mostraram que a captação de glicose, não mediada por insulina, é maior em homens treinados do que em destreinados. O transportador de glicose não dependente de insulina, GLUT 1, poderia ser responsável pelo aumento na

captação deste metabólito observado nos trabalhos supracitados (BERGGREN *et al.*, 2005; TOKOYAMA *et al.*, 1993). Após treinamento de endurance, BERGGREN *et al.*, (2005) demonstraram aumento de 131% na concentração do GLUT1. Nossos resultados corroboram estas informações, uma vez que a produção basal de lactato, sem a presença do hormônio, foi significativamente maior no grupo TA ( $p < 0,001$ ) quando comparado a produção basal encontrada no grupo controle, contudo não mensuramos a expressão do GLUT1.

Para verificar se a redução na produção de lactato na presença do AG seria devido a menor captação da glicose, a determinação da síntese de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicogênio a partir da [U- $^{14}\text{C}$ ]-D-glicose foi um parâmetro utilizado para responder esta questão. Mesmo com redução na metabolização do substrato, a captação da [U- $^{14}\text{C}$ ]-D-glicose não foi reduzida pela presença do AG, uma vez que a síntese de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicogênio permaneceu inafetada, ou elevou-se (FIGS 55, 54 e 53). Redução nas ações insulínicas foram observada em estudos que utilizaram concentrações supra-fisiológicas do AP, de 1 a 2,8 mM (ARGYRAKI *et al.*, 1989; GAZDAG *et al.*, 1998; THOMPSON *et al.*, 2000). No presente estudo, por outro lado, utilizamos concentrações fisiológicas do AG: 50 e 100  $\mu\text{M}$  (HIRABARA, 2005). Para afirmar se os efeitos do AP sobre o metabolismo da glicose estariam relacionados a sinalização insulínica, um estudo das proteínas envolvidas na captação de glicose estimulada por insulina, glicólise e síntese de glicogênio seria necessário. Embora estes dados não tenham sido objetos de análises, outros estudos recentes mostram que a exposição aguda ao ácido palmítico (1 hora), resulta em inibição da fosforilação de pp185 em

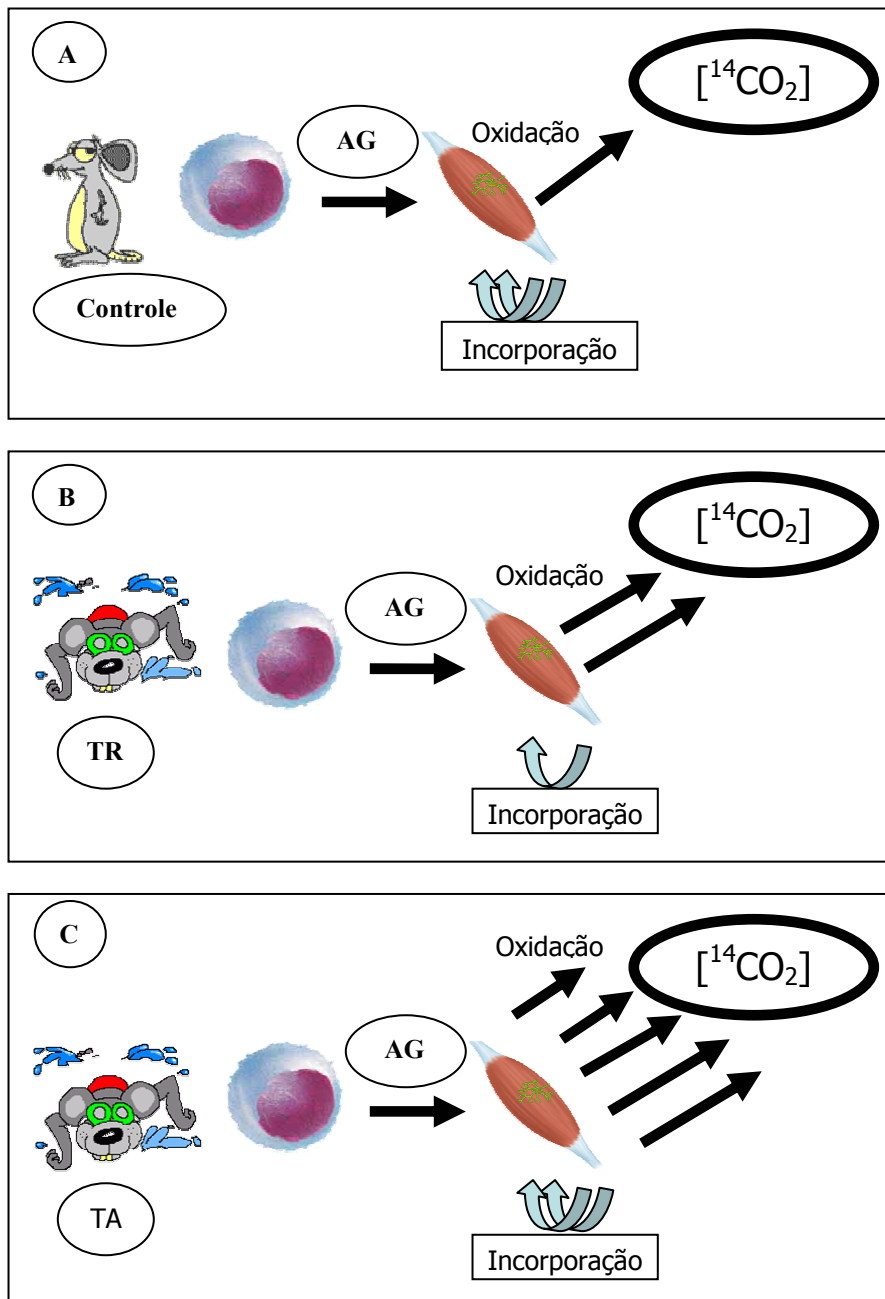
25%, IRS-1 (24%), Akt (51%) e GSK-3 (28%), porém, esta inibição parcial da sinalização insulínica não resulta em resistência ao hormônio, uma vez que a captação de glicose não foi alterada e a síntese de glicogênio potencializada nestes experimentos (HIRABARA 2005). Assim, a resistência ao hormônio quanto à captação de glicose, causada pelo AG em músculo esquelético, poderia requerer exposição mais prolongada a este substrato. Estudos com exposição prolongada aos AG (infusão lipídica por 5h), mostraram maior redução na fosforilação de IRS-1 (> 75%), atividade da PI3-quinase associada ao IRS-1 (>70%) e fosforilação (>50%) e atividade da Akt (>60%) (DRESSNER *et al.*, 1999; KRUSZYNSKA *et al.*, 2002). Desta maneira, em situações onde há aumento agudo na concentração de AG no plasma, como no exercício físico, a resistência à insulina estaria ausente. Diferentemente, durante exposições prolongadas aos AG, como em dietas ricas em gorduras, jejum prolongado, e dislipidemias a inibição da sinalização insulínica é exacerbada e acompanhada de resistência ao hormônio (HIRABARA, 2005). Isso posto, a redução na síntese de lactato na presença do AP encontrada em nossos experimentos, parece não ser devida à redução na captação de glicose, uma vez que a síntese de [<sup>14</sup>C]glicogênio não foi comprometida. Assim, existe a possibilidade de que a via glicolítica encontre-se bloqueada pelos mecanismos propostos por RANDLE (1963), levando a um acúmulo de glicose-6-fosfato, e potencializando ou mantendo a via glicogênica. Ainda de acordo com RANDLE *et al.*, (1963), o aumento na disponibilidade de AG para a célula muscular eleva a produção de acetil-CoA e NADH mitocondrial através da  $\beta$ -oxidação, os quais inibem a PDH.

Aumento do conteúdo de acetil-CoA proveniente do AP também eleva a produção de citrato, que juntamente com a razão ATP/ADP elevada, inibe a fosfofrutoquinase, resultando em redução da atividade da via glicolítica. Conseqüentemente, há aumento no conteúdo de glicose-6-fosfato, que é desviada preferencialmente para a síntese de glicogênio. Em conjunto, estes dados reforçam a hipótese da possibilidade do sistema imunitário, por meio de suas células circulantes, prover substrato energético ou modulador para a musculatura esquelética. Além disso, grande parte deste substrato ganha passagem para as vias oxidativas quando no período pós exercício, evidenciando uma predominância do metabolismo energético, em detrimento do metabolismo lipogênico, para esta situação experimental (FIG 56).

Durante atividade física o fluxo sanguíneo pode elevar-se em até 10 vezes, o *turnover* energético no ME eleva-se em até 400 vezes e o consumo de O<sub>2</sub> pelo ME para mais de 100 vezes (CURI *et al.*, 2004; TONKONOGI; SAHLIN, 2002). Foi demonstrado ainda que, após treinamento, as vias do metabolismo lipogênico, que compõem a base do fenômeno de transferência lipídica entre células, estão estimuladas em Ly (BACURAL, 2000). Também é sabido que o exercício promove um aumento dos leucócitos circulantes incluindo os linfócitos, a leucocitose (KLARLUND, 2000). Assim, no indivíduo aerobiamente treinado, o maior fluxo sanguíneo proporciona um maior contato das células do sistema imune, com o ME. Este ambiente poderia fazer dos leucócitos uma significativa fonte de lipídeos para o ME durante situação de exercício. A correlação de resultados encontrados *in vitro* com a situação fisiológica real nunca é direta,

assim a mensuração e confirmação deste fenômeno *in vivo* ainda permanece, e fica aberto para estudos futuros.

Em suma, nossos dados supõem que os Ly são uma fonte adicional de AG para a musculatura esquelética, que este fenômeno é potencializado em decorrência do exercício agudo, e que estes lípides podem modular o metabolismo da glicose no ME, reduzindo a síntese de lactato a partir deste metabólito, porém, não interferindo sobre seu armazenamento na forma de glicogênio.



**FIGURA 56:** Resumo dos resultados de transferência lipídica entre linfócitos e ME. (A): No grupo controle (C), parte significativa dos AG transferidos incorporou-se nas diversas frações lipídicas do ME, e uma menor fração foi oxidada e liberada na forma de  $[^{14}\text{CO}_2]$ . (B): No grupo treinado (TR), menor porção dos AG transferidos foi encontrada nas frações lipídicas analisadas, porém a capacidade oxidativa deste tecido mostrou-se 2 vezes superior àquela do grupo C. (C): No grupo treinado e agudamente exercitado (TA), em comparação ao C, proporções similares de AG foram encontradas nas frações lipídicas analisadas, porém, a capacidade oxidativa deste tecido mostrou-se 5 vezes superior àquela encontrada no C e 3 vezes a do TR.

## 6. CONCLUSÕES

- A captação de AG por linfócitos esta diretamente relacionada ao tamanho da cadeia carbônica e ao número de insaturações das moléculas.
- O treinamento físico (TR) não interfere sobre a captação de AG por linfócitos.
- O treinamento físico, seguido de exercício agudo (TA) é capaz de modular a captação de AG por linfócitos.
- O treinamento físico (TR) reduz a concentração de AG encontrada no ME após co-incubação destes com Ly (transferência), e eleva em 2 vezes a oxidação deste metabólito pelo ME.
- O treinamento físico, seguido de exercício agudo (TA), modula a concentração de AG encontrada no ME após co-incubação destes com Ly (transferência), e eleva acima de 5 vezes a oxidação deste metabólito pelo ME.
- O treinamento físico modula a incorporação dos AG, em diferentes frações lipídicas, pela célula muscular esquelética. Tendo sido relevante o aumento da incorporação do AG araquidônico na fração de fosfolipídios dos animais fisicamente treinados.
- O AP, agudamente, reduz a produção de lactato estimulada por insulina pelo ME. Este efeito tem menor amplitude no ME de animais treinados (TR), ou treinados e agudamente exercitados (TR).

- O AP elevou a produção de glicogênio estimulada por insulina pelo ME incubado de ratos C na concentração de 50 $\mu$ M. Em outras situações o AP não alterou esta via metabólica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTEN, J., GLEESON, M., JEUKENDRUP, A.E. Determination of the exercise intensity that elicits maximal fat oxidation. **Med Sci Sports Exercise**, v34(1),p. 92 – 7, 2002.

ACHTEN, J., JEUKENDRUP, A.E. Maximal fat oxidation during exercise in trained men. **Int J Sports Med**, v24,p. 603 – 8, 2003.

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

ARGYRAKI, M, WRIGHT, P.D., VENABLES, C. W., PROUD, G. TAYLOR, R. In vitro study of human skeletal muscle strips: effects of nonesterified fatty acid supplu on glucose storage. **Metabolism**. V38, n2. p.1183-1187, 1989

BACURAU, R.F.P., BELMONTE, M.A., SEELAENDER, M.C.L., COSTA ROSA, L.F.B.P. Effect of a moderate inyensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumor bearing rats. **Cell Biochem Funct**, v18,p.249 – 58, 2000.

BERGGREN, J.R., CHERLES, J.T., TIMOTY, R. K. Glucose uptake in muscle cell cultures from endurance-trained men. **Med. Sci. Sport. Exerc.** Vp.579-583. 2005.

BESSEY, P.Q., PRUITT, S.K., WILMORE, D.W. The effect of free fatty acids on insulin-mediated glucose uptake. **J. Surg. Res.** V36, n5, p.462-469, 1984

BONEN A, LUIKEN JJ, ARUMUGAM Y, GLATZ JF, and TANDON NN. Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. **J Biol Chem** 275: 14501–14508, 2000.

BONEN A, LUIKEN JJ, ARUMUGAM Y, GLATZ JF, and TANDON NN. Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. **J Biol Chem** v275: p.14501–14508,2000.

BONEN, A., LUIKEN, J.J.F.P., ARUMUGAN, Y., GLATZ, J.F.C., TANDON, N.N. Acute regulation os fatty acid uptake involves he cellular redistribution of fatty acid translocase. **J Biol Chem**, v275, p.14501 – 508, 2000.

BORGHOUTS, L.B., KEIZER H. A. Exercise and insulin sensitivity: A Review. **J Sports Med** v21, p.1-12, 2000

BOYADJIEV, N. Increase of aerobic capacity by submaximal training and high fat diets. **Folia med (Plovdiv)**, v38(1), p. 49 – 59, 1996.

CABTREE, B., NEWSHOLME, E.A. A quantitative approach to metabolic control. **Current Topics of cellular regulation**, v.25, p.21 – 76, 1985.

CARTEE, G.D., YOUNG, D.A., SLEPER, M.D. Prolonged increase in insulin-stimulated glucose transport in muscle after exercise. **Am. J. Physiol.** V256, n19, p.494-499, 1989

CLARKE DC, MISKOVIC D, HAN XX, CALLES-ESCANDON J, GLATZ JF, LUIKEN JJ, HEIKKILA JJ, and 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.

CLEVINGER, C.V., ALTMAN, S.W., PRYSTOWSKY, M.V. Requirement of nuclear prolaction for interleukin kin-2-stimulated proliferation of T lymphocytes. **Science**, v253, p77 – 78, 1991.

COSTA-ROSA, L.F.B.P., CURI, R., BOND, J.A., NEWSHOLME, P. NEWSHOLME, E.A. Propionate modifies lipid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. **Gen. Pharmac.**, v.26. p.411-16, 1994

CURI, R., JÚNIOR, O. T., HIRABARA, A. F., PERES, C.M., PARDAL, D.P.H., PITHON-CURI, T.C., GARCIA JÚNIOR, J.R., PROCÓPIO, J., FERNANDES, L.C. Uma fonte adicional de ácidos graxos para o músculo esquelético: os leucócitos. **Rev. Bras. Ciên. e Mov.**2002;10:91-98.

CURI, R., NEWSHOLME, P., PITHON CURI, T.C., PIRES DE MELO, M., GARCIA, C., HOMEM DE BITTENCOURT Jr, P.I., GUIMARÃES, A.R.P. Metabólic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. **Brasil J Med Biol Res**, v32, p.15 - 21, 1999.

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

CURI, R., WILLIAMS, J.F., NEWSHOLME, E.A. Formation of ketone bodies by resting lymphocytes. **International Journal of Biochemistry**, v21, p.1133-1136,1989.

CURI, R., WILLIAMS, J.F., NEWSHOLME, E.A. Pyruvate metabolism by lymphocytes: evidence for na additional ketogenesis tissue. **Biochemistry international**, v.19, p.755-767, 1989.

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

DRESNER, A., LAURENT, D., MARCUCCI, M., GRIFFIN, M.E., DUFOUR, S. Effects of free fat acids on glucose transport and IRS-1 associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. **J Clin Invest**, v103(2), p.253 – 59, 1999.

ESPINAL, J., DOHM, G.L., NEWSHOLME, E.A. Sensitivity to insulin of glycolysis and glycogen synthesis of isolated soleous-muscle strips from sedentary, exercised and exercised-trained rats.**Biochem J**, v.212, n2, p.453-458, 1983.

ENGEL, P.C., JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assay involving the use of NAD<sup>+</sup> in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and others metabolites. **Anal Biochem**, v.88, n2, p.475-484, 1978

FOLCH, J., LEES, M., SLOANE, G.M.S., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol Chem**, v.226, p. 497 – 509, 1957.

FRAYN, K.N., The glucose-fat acid cycle: a physiological perspective. **Biochemical society transactions**.2003;31:1115-19.

FRIENDLANDER, A.L., Endurance training increases fatty acid turnover, but not fat acid oxidation, in young men. **J. Apply. Physiol**.1999;99:2097-105.

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, pp.63-71, 1996.

GARCIA JÚNIOR, J.R., LAGRANHA, C.J., PITHON-CURI, T.C. Metabolismo dos ácidos graxos no exercício físico. In: CURI, R., POMPÉIA, C., MIYASAKA, M.I.Y., PROCÓPIO, J., **Entendendo as gorduras: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002.p.201-214.

GARCIA JÚNIOR, J.R., **Tranferência lipídica de macrófagos e linfócitos para ilhotas pancreáticas co-cultivadas**. São Paulo, 2000. Tese de doutorado.Departamento de Fisiologia e Biofísica-Universidade de São Paulo.

GAZDAG, A.C., TUCKER, M.Z., TURCOTTE, L.P., DEAN, D.J., CARTEE, G.D. Effect of extracellular palmitate on 2-deoxy-d-glucose uptake in muscle from Ad libitum fed and calorie restricted rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v252, n3. p. 733-737. 1998.

GOBATTO, C.A., SIBUYA, C.Y., AZEVEDO, J.R.M., LUCIANI, E., KOKUBUN, E., MELLO, M.A.R. Caracterização da intensidade de exercício e do efeito de treinamento físico no modelo de natação de ratos wistar. **Motriz**, v7(1), p.s57 – s62, 2001.

GONZALEZ, C.I., MARTIN, C.E. Fatty acid-responsive control of mRNA stability. Unsaturated fatty acid-induced degradation of the *Saccharomyces OLE1* transcript. **J Biol Chem**, v271, p. 25801 – 9, 1996.

GUO, Z., BURGUERA, B., JENSEN, M.D. Kinetics of intramuscular triglyceride fatty acids in exercising humans. **J Appl Physiol**, v89, p.2057 – 64, 2000.

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

HAJDUCH, E., BALENDRAN, A., BATTY, I.H., LITHERLAND, G. J., BLAIR, A.S., DOWNES, C.P., HUNDAL, H.S. Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of protein kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells. **Diabetologia**, v.44, n2, p.173-183, 2001

HAMILTON, J.A., CISTOLA, D.P. Transfer of oleic acid between albumin and phospholipid vesicles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 83: 82-86, 1986.

HARBER, E.P. et al., Secreção da insulina: Efeito autócrino e modulação por ácidos graxos. **Arq. Brás. Endocrinol. Metab.**2001;45:219-27.

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.

HELGE, J.W., AYRE, K.J., HULBERT A.J., KIENS B, STORLIEN L.H., *Regular exercise modulates muscle membrane phospholipids profile in rats.* **J Nutr.**1999;129:1636 – 42.

HELGE, J.W., KRIKETOS, A.D., STORLIEN L.H. Insulin sensitivity, muscle fibre types and membrane lipid. *In* RICHTER E.A., KIENS B., GALBO H. **Skeletal muscle metabolism in exercise and diabetes.** Plenum Press, New York and London. P129-138. 1998.

HIRABARA, S.M. Efeito agudo de ácidos graxos no metabolismo de glicose em músculo esquelético. Tese de Doutorado. USP. 2005.

HIRABARA, S.M. et al., Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolism. **FEBS Letters.**2003;541:109-14.

HOMEM DE BITTENCOURT Jr., PERS, C.M., YANO, M.H., HIRATA AND CURI, R. Piruvata is a lipid precursor for rat lymphocytes in culture: Evidence for a lipid exporting capacity. **Biochem Mol Biol Int**, v30(4), p.631-41, 1993.

HOROWITZ, J.F., KLEIN, S., Lipid metabolism during endurance exercise. **Am. J. Clin. Nutr.**2000;72(suppl):558S-63S.

HOST, H.H, HANSEN, P.A., NOLTE, L.A., CHEN, M.M., HOLLOSZY, J.O. Glycogen supercompensation masks the effect of a training induced increase in GLUT-4 on muscle glucose transport. **J. Apply. Physiol.** V85. n1. p.133-138, 1998.

HOWLEY, J.A. Symposium: Limits to fat oxidation by skeletal muscle during exercise. **Med Sci Sports Exercise**, v34(9),p. 1475 – 76, 2002.

IBRAHIMI A, BONEN A, BLINN WD, HAJRI T, Li X, ZHONG K,CAMERON R, and ABUMRAD NA. Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. **J Biol Chem** 274: 26761–26766, 1999.

KAMP, F., HAMILTON, J.A. Movement of fatty acids, fatty acid analogues, and bile acid across phospholipid bilayers. **Biochemistry.**, v32. p.11074-86, 1993

KAMP, F., HAMILTON, J.A. pH gradients across phospholipids membranes caused by fast flip-flop of un-ionized fatty acids. **Proc Natl Acad Sci USA**, v89,p. 11367 – 70, 1992.

KAMP, F., ZAKIN, D., ZHANG, F., NOY, N., HAMILTON, J.A. Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. **Biochemistry**, v34, 11928 – 37, 1991.

KIENS B, KRISTIANSEN S, RICHTER EA, TURCOTTE LP. Membrane associated FABP in human skeletal muscle is increased by endurance training. **Biochem Biophys Res Commun** v231:p. 463–465,1997.

KIENS B, ROEMEN THM, VAN der VUSSE GJ. Muscular longchain fatty acid content during graded exercise in humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 276: p.352–357, 1999.

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

KIM, K.J. et al., Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. **J Clin Invest.** 2004;113;n°5:756-763.

KLARLUND B.P. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **Br J Sports Med** 2000; v34. p.246-251.

KLENFIELD, A.M., Lipid phase fatty acid flip-flop, is it fast enough for cellular transport? **J Membr Biol.**, v175(2), p.79 – 96, 2000.

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(4),p. 1445 – 50, 2004.

KRISTIANSEN, S., GADE, J., WOJTASZEWSKI, J.F., KIENS, B., RICHTER, E.A. Glucose uptake is increased in trained vs untrained muscle during heavy exercise. **J. Apply. Physiol.** V.89, n.3, p.1151-1158

KRUZYNSKA, Y.T., WORRAL, D.S., OFRECIO, J. Fatty acid-induced insulin resistance: Decreased muscle PI3K activation but unchanged Akt Phosphorylation. **J Clin. Endocrinol Metab.** V87, n1, p.226-234. 2002

KUDELSKA, G., GÓRSKI, J., SWIATECKA, J., GÓRSKA, M. Effect of exercise on glycogen metabolism in muscle of triiodothyronine-treated rats. **European J. Apply. Physiol.** V.72, p. 5-6, 1996

LAMB, D.R., PETER, J.B., JEFRESS, R.N., WALLACE, H.A. Glycogen, hexokinase, and glycogen synthetase adaptations to exercise. **Am. J. Physiol.** V.217, p.1628-1632, 1969

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

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(5), p. 1668 – 78, 2003.

LOPES, H.F. Síndrome metabólica: importância do tecido adiposo e dos ácidos graxos livres. **Rev. Soc. Cardiol. SP**. v14. p.567-573.

LUCIANO, E., MELLO, M.A.R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Rev. Paulista de Ed. Fís.** V.12, p.202-209, 1998

MAGNAN, C., GILBERT, M., KAHN, B. B. Chronic free fatty acid infusion in rats results in insulin resistance but no alteration in insulin-responsive glucose transporter levels in skeletal muscle. **Lipids** v31, n11, p.1141-1149, 1996

MALLAMPALLI, R.K., SALOME, R.G., LI, C.H., VanHOLLINS, M., HUNNINGHAKE, G.W. Betamethasone activation of CPT: Cholinephosphate cytidyltransferase is mediated by fatty acids. **J Cell Physiol**, v162,p. 410 – 21, 1995.

MARX, J. The cell cycle: spinning further a field. **Science**, v252, p. 1490 – 92, 1991

MURAKAMI, T., SHIOMOMURA, Y., FUJITSUKA, N., SOKABE, M., OKAMURA. K., SAKAMOTO, S. Enlargement of glycogen store in rat liver and muscle by fructose-diet intake and exercise training. **J. Apply. Physiol.** V82. p.772-775, 1997

NAKATANI, A., HAN, D., HANSEN, P.A., NOLTE, L.A., HOST, H.H., HICKNER, R.C., HOLLOZY, J.O. Effect of endurance exercise training on muscle glycogen supercompensation in rats. **J. Apply. Physiol.** V.82, n.2, p.711-715, 1997.

NEWSHOLME, E.A. An introduction to the roles of the glucose – fatty acid cycle in sustained exercise.R.J., Shirreffs, S.M. **Biochemistry of exercise IX**. Human Kinetics publishers: Champaign, pp.119 - 125, 1996.

NEWSHOLME, P., LIMA, M.M.R., PROCÓPIO, J., PHITON CURI, T.C., DOI, S.Q., BAZOTTE, R.B., CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Braz J Med Biol Res**, v36, p.153 – 63, 2003.

NISHIAMA – NARUKE, A., CURI, R., Incorporation, exportation and transference of phosphatidylcholine by leucocytes. **Am J Physiol**, v275, p. 554 – 60, 2000.

ORDWAY, R.W., WALSH, J.V., SINGER, J.J. Arachidonic acid and other fatty acids directly activate potassium channels in smooth muscle cells. **Science**, v244, p. 1176 – 9, 1989.

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, pp.105 - 115, 1996.

OTTON, R., MENDONÇA, J.R., CURI, R. Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism. **J Endocrinol**, v174, p.55-61, 2002.

PARDAL, D.P.H., **Estudo de la transferencia de lipídeos de las células Del sistema imune al tejido muscular esquelético**. León, 2002. Tese de Doutorado. Departamento de Fisiologia.- Universidade de Leon.

PERES, C.M., OTTON, R., CURI, R., Glutamina e linfócitos. IN: CURI, R. **Glutamina – metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. p.177 – 188.

PERES, C.M., **Tranferência ácidos graxosa entre macrófagos e linfócitos em cultura**. São Paulo, 1997. Tese de mestrado. Departamento de Fisiologia e Biofísica- Universidade de São Paulo.

PERES, C.M., ZIMMERMAN, A.W., VEERKAMP, J.H. Proteínas ligadoras aos ácidos graxos (“Fatty acid-binding proteins”) In: CURI, R., POMPEIA, C., MIYASAKA, M.I.Y., PROCÓPIO, J., **Entendendo as gorduras: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002.p.93 -108.

PERES, C.M.; HOMEM-de-BITTENCOURT JR.; COSTA, M.; CURI, R.; WILLIAMS, J.F. Evidence for the transfer in culture of [ $^{14}\text{C}$ ] – labeled fatty acids from macrophages to lymphocytes. **Biochem Mol Bio Int.**1997;43;nº5:1137 – 1144.

POMPÉIA, C., CURI, R. Ácidos graxos e função dos leucócitos. In: CURI, R., POMPÉIA, C., MIYASAKA, M.I.Y., PROCÓPIO, J., **Entendendo as gorduras: os ácidos graxos.** São Paulo: Manole, 2002.p.201-214.

POMPÉIA, C., LOPES, L.R., MIYASAKA, C.K., PROCÓPIO, J., SANNOMIYA, P., CURI, R. Effect of fatty acids on leukocyte function. **Braz J Med Biol Res**, v33, p. 1255 – 68, 2002.

POWNALL HJ and HAMILTON JA. Energy translocation across cell membranes and membrane models. **Acta Physiol Scand** v.178: p.357–365, 2003.

PRIOR, B. M., LLOYD, P.G.,YANG, H.T.,TERJUNG, R. Exercise-induced vascular remodeling. **Exercise Sport Sciences Reviews**, v31(1),p. 26 – 33, 2003.

PRIOR, B.M., YANG, H.T., TERJUNG, R.L., What makes vessels grow with exercise training? **J Appl Physiol**, v97(3),p. 1119 – 28, 2004.

RANDLE, et al., The glucose-fat acid cycle-its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **The Lancet.**1963;785-89.

RANDLE, P.J. et al., Mechanisms modifying glucose oxidation in diabetes mellitus.**Diabetologia.**1994;37(S2):S155-S61.

RANDLE, P.J., *Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: The glucose fatty acid cycle after 35 years.* **Diabetes Metab. Rev.**1998;14:263-83.

RASMUSSEN, B.B., WOLFE, R.R., Regulation of fat acids oxidation in skeletal muscle. **Annu Rev Nutr** 1999;19:463-84.

RICHERI, G.V., OGATA, R.T., ZIMMERMAN, A.W., VEERKAMP, J.H., KLENFIELD, A.M. Fatty acid binding proteins from different tissues show distinct patterns of fatty acid interactions. **Biochemistry**, v39(24), p.7197 – 204, 2000.

RODEN, M. How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. **News Physiol Sci**. V19. p.92-96, 2004

ROEPSTORFF C, VISTISEN B, ROEPSTORFF K, KIENS B. Regulation of plasma long-chain fatty acid oxidation in relation to uptake in human skeletal muscle during exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab** v.287: p.696–705, 2004.

ROGATTO, G.P., LUCIANO, E. Efeitos do treinamento físico intenso sobre o metabolismo de carboidratos. **Ativ Fís Saúde**, v6(2), p.39 – 46, 2001.

ROGATTO, G.P., LUCIANO, E. Respostas metabólicas de ratos wistar ao treinamento físico intenso. **Rev. Brás. Cien. Mov.** (Edição. Especial), p.117, 2000

ROMBALDI, A.J. **Alguns efeitos bioquímicos da ingestão de carboidrato líquido na realização de trabalho intermitente de alta intensidade em ratos.** Tese de doutorado. Santa Maria, 1996.. Departamento de Educação Física. Universidade Federal de Santa Maria (RS).

SAHLIN, K., KATZ, A., BROBERG, S., Tricarboxylic acid cycle intermediates in human muscle during and after exercise. **Am J Physiol**, v.259, p. c834 – 41, 1990.

SEELANDER, M. C. L., COSTA-ROSA, L.F.B., CURI, R. Fatty acid oxidation in lymphocytes from walkre-256 tumor bearing rats. **Braz. J. Med. Res**; v.29. p.445-51, 1996

SPRIET, L., DYCK, D.J. The glucose – fatty acid cycle in skeletal muscle at rest and during exercise. In: Maughan, R.J., Shirreffs, S.M. **Biochemistry of exercise IX.** Human Kinetics publishers: Champaign, pp.127 - 155, 1996.

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

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

STEWART, J.M. The cytoplasmic fatty-acid-binding proteins: thirty years and counting. **Cell. Mol. Life. Sci.** V57. p.1346-1359, 2000

TAGUCHI, T., KISHIKAWA, H., MOTOSHIMA, H. Involvement of bradikinin in acute exercise-induced increase of glucose uptake and GLUT-4 translocation in skeletal muscle: Studies in normal and diabetic Humans and rats. **Metabolism**. V49, n7, p. 920-930, 2000

TAN, M.H., BONEN, A., GARNER, J.B., BELCASTRO, A.N. Physical training in diabetic rats: effect on glucose tolerance and serum lipids. **J. Appl. Physiol.**, v.52, p.1514-1518, 1982

THOMAS, T. R., LONDEREE, B. R., GERHARDT, K. O. & GEHRKE, C. W. Fatty acid profile and cholesterol in skeletal muscle of trained and untrained men. **J. Appl. Physiol.** 43: 709–713. 1977

THOMPSON, A.L., LIM-FRASER, M.Y., KRAEGEN, E.W., COONEY, G.J. Effects of individual fatty acids on glucose uptake and glycogen synthesis in soleus muscle in vitro. **Am. J. Physiol Endocrinol Metab.** V279, n3, p.577-584, 2000

TOKOYAMA, K.Y., HIGAKI, T. K. Intravenous glucose tolerance test-derived glucose effectiveness in physically trained humans. **Am. J. Physiol.** v265. p.298-303, 1993

TONKONOGLI, M., SAHLIN, K. Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle. **Exerc. Sports. Sci. Rew.** V30. n3. p.129-137, 2002.

TURCOTTE LP, SRIVASTAVA AK, and CHIASSON JL. Fasting increases plasma membrane fatty acid-binding protein [FABP(PM)] in red skeletal muscle. **Mol Cell Biochem** v166: p.153–158, 1997.

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., SRIVASTAVA, A.K., CHIASSON, J-L. Fasting increases plasma membrane fatty acid-binding protein (FABP<sub>pm</sub>) in red skeletal muscle. **Mol Cell Biochem**, v166, p.153 – 58, 1997.

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.

VEERKAMP, J.H., PEETERS, R.A., MAATMAN, R.G.J. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, 1081. p.1-24, 1991

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.

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.

ZECCHIN G.H., CARVALHEIRA, J.B.C., SAAD, M.J.A. Mecanismos moleculares de resistência a insulina na síndrome metabólica. **Rev. Soc. Cardiol. SP**. V14. p574-589, 2004