

Efeito dos ácidos graxos no desacoplamento mitocondrial e na produção de óxido nítrico durante a contração muscular – uma hipótese

Effect of fatty acids on mitochondrial uncoupling and nitric oxide production during muscle contraction – a hypothesis

HIRABARA, S.M.; SILVEIRA, L.R.; CAMARGO, L.F.T.; PROCÓPIO, J.; CARVALHO, C.R.O.; PHITON-CURI, T.C.; CURTI, R. Efeito dos ácidos graxos no desacoplamento mitocondrial e na produção de óxido nítrico durante a contração muscular – uma hipótese. *R. bras. Ci e Mov.* 2007; 15(2): 73-80.

RESUMO: Em exercícios físicos de intensidade moderada, a transição do metabolismo de predominantemente anaeróbio para predominantemente aeróbio nos músculos em atividade é um passo chave para melhorar o desempenho. O aumento no aporte de oxigênio e nutrientes, tais como ácidos graxos livres (AGL) e glicose, que acompanha o maior fluxo sanguíneo, é requerido para que esta transição ocorra. Os mecanismos envolvidos na dilatação dos vasos nos músculos esqueléticos durante o exercício físico não são completamente conhecidos. Propomos, neste artigo, a participação dos AGL neste processo. A presença das proteínas desacopladoras-2 e -3 (UCP-2 e -3) no músculo esquelético, cuja função é regulada por AGL, abre a possibilidade de que esses metabólitos podem atuar como desacopladores mitocondriais neste tecido. O aumento na atividade lipolítica no tecido adiposo durante o exercício físico resulta em aumento na concentração plasmática de AGL. Estes poderiam, então, atuar nas proteínas desacopladoras mitocondriais nos músculos em atividade, aumentando a produção de calor local. Propomos que este efeito calorigênico é importante para a ativação da óxido nítrico sintase, resultando em aumento na produção de óxido nítrico que é um vasodilatador potente. Desta forma, os AGL seriam mediadores importantes para a adaptação do metabolismo muscular durante o exercício físico prolongado, garantindo o aporte de oxigênio e nutrientes por aumento do fluxo sanguíneo para os músculos em contração.

PALAVRAS-CHAVE: ácidos graxos, músculo esquelético, exercício físico, desacoplamento mitocondrial, óxido nítrico.

HIRABARA, S.M.; SILVEIRA, L.R.; CAMARGO, L.F.T.; PROCÓPIO, J.; CARVALHO, C.R.O.; PHITON-CURI, T.C.; CURTI, R. Effect of fatty acids on mitochondrial uncoupling and nitric oxide production during muscle contraction – a hypothesis. *R. bras. Ci e Mov.* 2007; 15(2): 73-80.

ABSTRACT: In moderate physical exercise, the transition from predominantly anaerobic toward predominantly aerobic metabolism is a key step to improve performance. Increase in the supply of oxygen and nutrients, such as free fatty acids (FFA) and glucose, which accompanies high blood flow, is required for this transition. The mechanisms involved in the vasodilation in skeletal muscle during physical exercise are not completely known yet. In this article, we postulate that FFA participate in this process. The presence of uncoupling protein-2 and -3 (UCP-2 and -3) in skeletal muscle, whose function is regulated by FFA, suggests that these metabolites may act as mitochondrial uncouplers in this tissue. The increase in the lipolytic activity in adipose tissue during physical exercise leads to increased plasma FFA levels. The FFA can then act on the UCPs in contracting muscles, increasing the local heat production. We propose that this calorogenic effect of FFA is important for nitric oxide synthase activation, resulting in nitric oxide production that is a potent vasodilator. Therefore, FFA would be important mediators for adaptation of muscle metabolism during prolonged physical exercise, ensuring the appropriate supply of oxygen and nutrients by increasing blood flow in contracting skeletal muscle.

KEYWORDS: fatty acids, skeletal muscle, physical exercise, mitochondrial uncoupling, nitric oxide.

Sandro M. Hirabara^{1,2},
Leonardo R. Silveira¹,
Luis F. T. Camargo²,
Joaquim Procópio¹,
Carla R. O. Carvalho¹,
Tania C. Phiton-Curi²,
Rui Curti¹

¹ Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo

² Programa de Pós-Graduação em Educação Física, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo

Recebimento: 12/08/2006
Aceite: 02/02/2007

Correspondência: Av. Prof. Lineu Prestes 1524, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 05508-000, São Paulo, SP. Fone: (11) 3091-7245, FAX: (11) 3091-7285, e-mail: ruicuri@icb.usp.br.

R. bras. Ci. e Mov. 2007; 15(2): 73-80

Introdução

No exercício físico, a demanda por ATP pode aumentar dezenas de vezes, conforme a intensidade e duração do esforço. As mitocôndrias são responsáveis pela produção da maior parte de ATP a partir da oxidação de glicose e ácidos graxos (AG). Vários ajustes metabólicos ocorrem para atender esta demanda. Estes compreendem aumento da lipólise no tecido adiposo, maior utilização de glicose no início da atividade, vasodilatação no músculo esquelético em contração e, conseqüentemente, aumento do fluxo sanguíneo. Em exercícios físicos de intensidade baixa a moderada, a transição do metabolismo de predominantemente anaeróbio para predominantemente aeróbio nos músculos em atividade é um passo chave para melhorar o desempenho. Neste trabalho, propomos que os AG liberados do tecido adiposo durante o exercício físico apresentam papel importante para que esta transição ocorra.

Ácidos graxos e desacoplamento mitocondrial

De acordo com a teoria quimiosmótica de Mitchell³² (1961), a energia para a síntese mitocondrial de ATP é proveniente do gradiente de prótons (gradiente eletroquímico) entre o espaço intermembranoso e a matriz mitocondrial. Este gradiente é gerado pela cadeia transportadora de elétrons constituída por várias moléculasceptoras e doadoras de elétrons, organizadas de forma que a passagem de elétrons ocorre sucessivamente para estados de energia mais baixos (complexos I, II, III e IV, respectivamente). O oxigênio é oceptor final de elétrons dessa cadeia (menor nível de energia). Os elétrons provenientes da oxidação de substratos são incorporados às moléculas de NAD⁺ e FAD, resultando na formação de NADH e FADH₂. Esses transportam e transferem seus elétrons aos complexos I e II da cadeia respiratória, respectivamente, onde são transportados até o complexo IV (citocromo c oxidase), o qual reduz a molécula de O₂, formando H₂O. Em cada passagem, ocorre liberação de energia, que é utilizada para a translocação de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranoso pelos complexos I, III e IV. Como resultado, ocorre a geração de um gradiente de prótons que, por sua vez, é utilizado pelo complexo F₀F₁ ATPase (com-

plexo V) para a síntese de ATP. Desta forma, a eficiência na síntese oxidativa de energia depende do grau de acoplamento entre a oxidação de substratos e a síntese de ATP. Há vários compostos capazes de aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial a prótons, funcionando, desta forma, como desacopladores mitocondriais por criarem uma via paralela à passagem pela via da ATP sintase. Como exemplo, temos o dinitrofenol e o FCCP (carbonyl cyanide p-(trifluorometoxy) phenylhydrazone)^{17,50}. AG de cadeia longa também possuem esta propriedade, embora os mecanismos envolvidos não sejam completamente conhecidos^{1,57}.

Em 1976, foi descoberta a primeira proteína desacopladora mitocondrial, específica de tecido adiposo marrom, a proteína desacopladora-1 (UCP-1)⁴¹. Esta pertence à família de proteínas carreadoras de ânions mitocondriais, localizadas na membrana interna dessas organelas. Sua função está claramente relacionada com a termogênese em mamíferos neonatos, adultos hibernantes e roedores^{10,35}. A UCP-1 dissipa a força próton-motora, desacoplando a respiração mitocondrial da síntese de ATP. Com isso, há maior produção de calor, aumento na oxidação de substratos, no consumo de O₂ e produção de CO₂ e redução na produção de ATP²⁴. Os AG são requeridos para a atividade da UCP-1 e purinas nucleotídeos agem como inibidores deste processo²⁵.

A partir de 1995, várias outras isoformas de UCPs foram descritas, a saber: UCP-2 (presente em muitos tecidos); UCP-3 (predominantemente em músculo esquelético); UCP-4 e UCP-5 (sistema nervoso central) e, ao menos, 3 isoformas distintas em plantas^{4,14,30,45,54}. Porém, suas funções não são ainda totalmente conhecidas.

As proteínas UCP-2 e -3, as duas isoformas presente no músculo esquelético, possuem 56-57% de homologia com a UCP-1. Também possuem ação protonofórica, agindo como proteínas desacopladoras mitocondriais⁹. Porém, devido à baixa expressão quando comparada à UCP-1, sua função principal parece não estar relacionada com a regulação da temperatura. Visto que os músculos esqueléticos representam cerca de 40% do peso corpóreo de um indivíduo magro, a taxa metabólica deste tecido é um componente importante do gasto energético total do organismo^{44,55}. A presença de UCPs

pode ter papel fundamental na determinação desta taxa e, portanto, na regulação do peso corpóreo^{7,40}. Várias outras funções foram propostas para estas proteínas, tais como regulação do metabolismo energético⁴⁰, defesa contra produção excessiva de espécies reativas de oxigênio⁸, proteção contra efeitos deletérios do acúmulo de AG em mitocôndrias⁴⁶ e termogênese adaptativa^{4,58}.

Há evidências de que os AG também atuam como ativadores de UCP-2 e -3. Por exemplo, leveduras com expressão de UCP-2 ou -3 apresentam transporte elevado de prótons na presença de AG de cadeia longa, sendo que este processo é inibido pela purina⁵⁸. Assim, o mecanismo envolvido na atividade da UCP-2 e -3 pode ser similar ao da UCP-1. Em lipossomos reconstituídos com UCP-2 ou -3, há maior vazamento de prótons na presença de AG²². Os AG também aumentam o consumo de O₂ em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético⁵². O músculo sóleo de rato, incubado por uma hora na presença de AG de cadeia longa, apresenta aumento na oxidação de glicose^{18,19}. A infusão endovenosa de ácido palmítico em ratos anestesiados resulta em aumento no consumo de O₂ e liberação de CO₂¹⁹, o que reflete indiretamente o metabolismo da musculatura esquelética, visto que este representa 40% da massa total do organismo. Além disso, células musculares cultivadas na presença de AG de cadeia longa apresentam redução na polarização mitocondrial (HIRABARA et al., 2005; artigo em preparação). Em conjunto, estes resultados são sugestivos de que AG de cadeia longa atuam como desacopladores mitocondriais em músculo esquelético (Tabela 1). Entretanto, a importância fisiológica deste efeito ainda não é conhecida. Aqui propomos um papel deste efeito dos AG durante a atividade física prolongada.

Hipótese: possível função do desacoplamento mitocondrial induzido por ácidos graxos em músculo esquelético

Durante a atividade física de intensidade baixa a moderada, é fundamental a transição do metabolismo de predominantemente anaeróbico para predominantemente aeróbico nos músculos em contração para assegurar a duração prolongada do exercício^{6,16}. O fluxo

sangüíneo é aumentado em até 100 vezes no músculo em atividade, conforme a intensidade do exercício^{1,47}, elevando a disponibilidade de O₂ e metabólitos para este tecido³⁸. Vários fatores estão envolvidos no aumento do diâmetro dos vasos sangüíneos no músculo esquelético durante a atividade física. Enquanto os fatores mecânicos (contração-relaxamento muscular) parecem estar envolvidos na elevação do fluxo sangüíneo inicial, outros são requeridos para a vasodilatação sustentada durante a atividade física. Estes compreendem fatores metabólicos (K⁺, H⁺ e tensão de O₂ e CO₂)^{11,33}, miogênicos (adenosina, óxido nítrico - NO)^{38,39,42}, endoteliais (fator relaxante derivado do endotélio, NO)^{13,21,38} e neurais (agonistas β -adrenérgicos)²⁰. Nessa revisão propomos que os AG podem também ter um papel importante neste processo.

Há consenso de que o óxido nítrico (NO) é um mediador importante na regulação do fluxo sangüíneo no músculo esquelético durante a contração^{3,37,51}. Os mecanismos que regulam a formação deste mediador, entretanto, ainda não estão totalmente elucidados.

A óxido nítrico sintase (NOS), enzima responsável pela formação do NO, existe em três isoformas: a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS)³⁴. Em ratos, o tecido muscular esquelético possui as isoformas eNOS e nNOS, sendo a primeira mais abundante em fibras do tipo I e a segunda em fibras do tipo II²⁸. Em humanos, as células musculares expressam a eNOS e a nNOS¹², além da μ NOS, uma isoforma específica do músculo esquelético devido ao splicing alternativo da nNOS⁵⁶.

Evidências da produção de NO pelas células musculares esqueléticas foram inicialmente obtidas por Balon & Nader³. Estes autores observaram aumento na produção de NO em músculo esquelético isolado sob estimulação elétrica. A formação de NO foi também demonstrada durante a atividade física^{26,31,42,49}, mas os mecanismos envolvidos não são conhecidos. Este aumento de NO pode ser devido à ativação das isoformas de NOS presentes no músculo esquelético como também pela atividade de eNOS presente no endotélio dos vasos sangüíneos deste tecido³⁸. Recentemente, Silveira et al.⁴⁹ encontraram que a contração aumenta a produção de NO em cultura primária de célula muscular esquelética livre de tecido endotelial. Este re-

sultado é sugestivo de que o NO produzido durante a atividade física é devida, ao menos parcialmente, à atividade das isoformas de NOS presentes no músculo esquelético.

Em um estudo de Venturini et al.⁵³, foi observado que a atividade da nNOS e da iNOS é estimulada por aumentos da temperatura mesmo em valores próximos ao fisiológico (30-42° C). A atividade da eNOS não foi alterada pela temperatura. Entretanto, sua afinidade ao substrato (L-arginina) foi significativamente elevada, o que pode ter relevância fisiológica, já que os ensaios foram realizados na presença de concentrações supra-fisiológicas do substrato⁵³. Assim, o aumento da temperatura pode elevar a atividade da nNOS e iNOS diretamente e da eNOS indiretamente (via modulação da sua afinidade).

Em adição aos achados acima, está bem estabelecido que a ativação do sistema nervoso simpático, durante a atividade física, estimula a lipólise no tecido adiposo (Figura 1)^{15,23,36,43}. Conseqüentemente, ocorre aumento de AG na corrente sangüínea e sua disponibilidade para os músculos em contração. Como descrito anteriormente, o aumento na disponibilidade de AG para o músculo esquelético resulta em desacoplamento mitocondrial (Tabela 1; Hirabara et al., 2005, artigo em preparação). Devido a isso, a atividade da cadeia de transporte de elétrons é acelerada, resultando em aumento na oxidação de substratos no ciclo de Krebs e no consumo de O₂^{5,10}. Nessas condições, a dissipação do gradiente eletroquímico da membrana mitocondrial interna na presença

de AG resulta em maior produção de calor (Figura 1)^{24,27}, aumentando, possivelmente, de forma sinérgica, a atividade da NOS e a produção de NO. Consistente com esta proposição, encontramos aumento na intensidade de fluorescência da sonda diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA), o que reflete a presença de NO²⁹, quando células musculares esqueléticas em cultura foram incubadas com AG⁴⁸ (Tabela 1).

Nessa hipótese, propomos que o efeito calorigênico resultante do desacoplamento mitocondrial muscular, induzido por AG, pode estimular a atividade das isoformas das NOS presentes no próprio tecido muscular (ação autócrina) e no endotélio vascular (ação parácrina). Como resultado, ocorreria aumento na produção de NO, elevando a vasodilatação de arteríolas nos músculos em atividade. Desta forma, os AG seriam mediadores importantes para a adaptação do metabolismo muscular durante o exercício físico prolongado, garantindo o aporte de oxigênio e nutrientes (principalmente AG e glicose) através de um fluxo sangüíneo maior para os músculos em contração (Figura 1). Os nossos dados preliminares suportam esta hipótese. Em trabalho conjunto com especialistas da área da física estamos empenhados no desenvolvimento de um sistema miniaturizado para medir a produção de calor em células isoladas.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro da FAPESP, CNPq, PRONEX e CAPES.

Referências Bibliográficas

1. Andersen P, Saltin B. Maximal perfusion of skeletal muscle in man. *J Physiol*. 1985;366:233-49.
2. Andreyev AV, et al. The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria. *Eur J Biochem*. 1989 Jul 1; 182(3):585-92.
3. Balon TW, Nadler JL. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J Appl Physiol*. 1994;77(6):2519-21.
4. Boss O, et al. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett*. 1997 May;408(1):39-42.
5. Clapham JC, et al. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature*. 2000 Jul 27;406(6794):415-8.
6. Curi R, et al. Ciclo de Krebs como fator limitante na utilização de ácidos graxos durante o exercício aeróbico. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003 Apr;47(2):135-43.
7. Depieri TZ, Pinto RR, Catarin JK, Carli MCL, Garcia Jr JR. UCP-3: Regulação da expressão gênica no músculo esquelético e possível relação com o controle do peso corporal. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004 Jun;48(3):337-44.
8. Echtay KS, Murphy MP, Smith RA, Talbot DA, Brand MD. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *J Biol Chem*. 2002 Dec 6;277(49):47129-35.

9. Echtay KS, Winkler E, Frischmuth K, Klingenberg M. Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). **Proc Natl Acad Sci USA**. 2001 Feb 13;98(4):1416-21.
10. Erlanson-Albertsson C. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. **Acta Physiol Scand**. 2003 Aug;178(4):405-12.
11. Folkow B, Gaskell P, Waaler BA. Blood flow through limb muscles during heavy rhythmic exercise. **Acta Physiol Scand**. 1970 Sep;80(1):61-72.
12. Frandsen U, Lopez-Figueroa M, Hellsten Y. Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. **Biochem Biophys Res Commun**. 1996 Oct 3;227(1):88-93.
13. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. 1980 Nov 27;288(5789):373-6.
14. Gimeno RE, et al. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. **Diabetes**. 1997 May;46(5):900-6.
15. Gollnick PD, Soule RG, Taylor AW, Williams C, Ianuzzo CD. Exercise-induced glycogenolysis and lipolysis in the rat: hormonal influence. **Am J Physiol**, 1970 Sep;219(3):729-33.
16. Gollnick PD. Free fatty acid turnover and the availability of substrates as a limiting factor in prolonged exercise. **Ann N Y Acad Sci**. 1977;301:64-71.
17. Heytler PG. Uncouplers of oxidative phosphorylation. **Methods Enzymol**. 1979;55:462-72.
18. Hirabara SM, Carvalho CRO, Mendonça JR, Haber EP, Fernandes LC, Curi R. Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolization (Randle cycle). **FEBS Lett**. 2003 Apr 4;541(1-3):109-14.
19. Hirabara SM, Folador A, Leandro C, Mendonça JR, Carvalho CRO, Curi R. Efeitos de ácidos graxos sobre a descarboxilação de glicose muscular e o consumo de O₂ e produção de CO₂ em ratos anestesiados. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 2004;48:S203.
20. Honig CR, Frierson JL. Neurons intrinsic to arterioles initiate postcontraction vasodilation. **Am J Physiol**. 1976 Feb;230(2):493-507.
21. Hutcheson IR, Griffith TM. Release of endothelium-derived relaxing factor is modulated both by frequency and amplitude of pulsatile flow. **Am J Physiol**. 1991 Jul;261(1 Pt 2):H257-62.
22. Jaburek M, et al. Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. **J Biol Chem**. 1999 Sep 10;274(37):26003-7.
23. Jensen, M. D. Fate of fatty acids at rest and during exercise: regulatory mechanisms. **Acta Physiol Scand**. 2003;178:385-90.
24. Jezek P, Garlid KD. Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. **Int J Biochem Cell Biol**. 1998 Nov; 30(11):1163-8.
25. Jezek P, Orosz DE, Modriansky M, Garlid KD. Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its regulation by nucleotides and fatty acids. A new look at old hypotheses. **J Biol Chem**. 1994 Oct 21;269(42):26184-90.
26. Jungersten L, Ambring A, Wall B, Wennmalm A. Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. **J Appl Physiol**. 1997 Mar;82(3):760-4.
27. Klingenberg M, Winkler E, Echtay K. Uncoupling protein, H⁺ transport and regulation. **Biochem Soc Trans**. 2001 Nov;29(Pt 6):806-11.
28. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. **Nature**. 1994 Dec 8;372(6506):546-8.
29. Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T. Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. **Angew Chem Int Ed Engl**. 1999 Nov 2;38(21):3209-3212.
30. Mao W, et al. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. **FEBS Lett**. 1999 Jan 29;443(3):326-30.
31. Matsumoto A, et al. Increased nitric oxide production during exercise. **Lancet**. 1994 Apr 2;343(8901):849-50.
32. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**. 1961;191:144-148.
33. Mohrman DE, Regal RR. Relation of blood flow to VO₂, PO₂, and PCO₂ in dog gastrocnemius muscle. **Am J Physiol**. 1988 Nov;255(5 Pt 2):H1004-10.
34. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**. 1993 Dec 30;329(27):2002-12.
35. Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat. **Physiol Ver**. 1984 Jan;64(1):1-64.
36. Okuda H, Yanagi I, Fujii S. The mechanism of in vitro stimulation of lipolysis by adrenaline. **J Biochem**. 1966 May;59(5):438-42.

37. Persson MG, Wiklund NP, Gustafsson LE. Endogenous nitric oxide in single exhalations and the change during exercise. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Nov;148(5):1210-4.
38. Radegran G, Hellsten Y. Adenosine and nitric oxide in exercise-induced human skeletal muscle vasodilatation. *Acta Physiol Scand*. 2000 Apr;168(4):575-91.
39. Radegran G, Saltin B. Nitric oxide in the regulation of vasomotor tone in human skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1999 Jun;276(6 Pt 2):H1951-60.
40. Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol*. 2000 Nov 15;529(Pt 1):3-10.
41. Ricquier D, Kader JC. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976 Dec 6;73(3):577-83.
42. Roberts CK, Barnard RJ, Jasman A, Balon TW. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1999 Aug;277(2 Pt 1):E390-4.
43. Robertshaw D, Taylor CR, Mazzia LM. Sweating in primates: secretion by adrenal medulla during exercise. *Am J Physiol*. 1973 Mar;224(3):678-81.
44. Rolfe DF, Newman JM, Buckingham JA, Clark MG, Brand MD. Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *Am J Physiol*. 1999 Mar;276(3 Pt 1):C692-9.
45. Sanchis D, et al. BCMPL1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem*. 1998 Dec 18;273(51):34611-5.
46. Schrauwen P, et al. Etomoxir-induced increase in UCP3 supports a role of uncoupling proteins 3 as a mitochondrial fatty acid anion exporter. *FASEB J*. 2002 Oct;16(12):1688-90.
47. Shoemaker JK, Phillips SM, Green HJ, Hughson RL. Faster femoral artery blood velocity kinetics at the onset of exercise following short-term training. *Cardiovasc Res*. 1996 Feb;31(2):278-86.
48. Silveira, LR. Critical and methodological analyses on the determination of reactive species in skeletal muscle cells during contractions. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004 Dec; 48(6):812-822.
49. Silveira LR, Pereira-da-Silva L, Juel C, Hellsten Y. Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. *Free Radic Biol Med*. 2003 Sep;35(5):455-64.
50. Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Feb 25;1363(2):100-24.
51. Sundberg CJ. Exercise and training during graded leg ischaemia in healthy man with special reference to effects on skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 1994;615:S1-50.
52. Tonkonogi M, Krook A, Walsh B, Sahlin K. Endurance training increases stimulation of uncoupling of skeletal muscle mitochondria in humans by non-esterified fatty acids: an uncoupling-protein-mediated effect? *Biochem J*. 2000 Nov 1;351(Pt 3):805-10.
53. Venturini G, Colasanti M, Fioravanti E, Bianchini A, Ascenzi, P. Direct effect of temperature on the catalytic activity of nitric oxide synthases types I, II, and III. *Nitric Oxide*. 1999 Oct;3(5):375-82.
54. Vercesi AE, Martins IS, Silva MAP, Leite HMF, Cuccovia IM, Chaimovich H. PUMPing plants. *Nature*. 1995;375:24.
55. Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Jun 9;235(1):79-82.
56. Wang Y, et al. RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Oct 12;96(21):12150-5.
57. Winkler E, Klingenberg M. Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J Biol Chem*. 1994 Jan 28;269(4):2508-15.
58. Zackova M, Skobisova E, Urbankova E, Jezek P. Activating w-6 polyunsaturated fatty acid and inhibitory purine nucleotides are high affinity ligands for novel mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *J Biol Chem*. 2003 Jun 6;278(23):20761-9.

Legendas

Tabela 1: Resultados experimentais que evidenciam o desacoplamento mitocondrial e a produção do óxido nítrico (NO) induzido por ácidos graxos em músculo esquelético. DAF-2DA: diacetato de 4,5-diaminofluoresceína; EPA: ácido eicosapentaenóico.

Figura 1: Possível função dos ácidos graxos livres (AGL) na transição do metabolismo muscular de predominantemente anaeróbico para predominantemente aeróbico durante exercício físico prolongado. A ativação do sistema nervoso (SN) simpático durante a atividade física resulta em estimulação da lipólise no tecido adiposo tanto direto (via estimulação da

noradrenalina - NE) como indiretamente (via secreção de adrenalina pela medula adrenal). Como resultado, ocorre aumento na taxa de liberação de AGL para a circulação e, conseqüentemente, na disponibilidade destes para os músculos em contração. Nesta condição, os AGL poderiam atuar como desacopladores mitocondriais, resultando em aumento na produção de calor. Este efeito calorigênico pode ter um papel importante em promover a ativação da óxido nítrico sintase (NOS), resultando na produção de óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador. Como conseqüência, ocorre vasodilação muscular, garantindo o aporte de O₂ e AGL para os músculos em contração, fundamental para assegurar a duração prolongada da atividade física.

Tabela 1

Sistema analisado	Ácidos graxos testados	Achados
Mitôcondrias isoladas de músculo esquelético de rato	Palmítico (16:0) Oleico (18:1) Linoleico (18:2)	↓ Potencial elétrico mitocondrial ↑ Consumo de O ₂
Músculo sóleo incubado de rato (na ausência e presença de insulina)	Palmítico (16:0) Esteárico (18:0) Oleico (18:1) Linoleico (18:2) EPA (20:5)	↑ Oxidação de glicose
Cultura de células musculares esqueléticas (C2C12 e primária de rato)	Palmítico (16:0) Linoleico (18:2)	↓ Polaridade elétrica da membrana mitocondrial interna
Ratos machos Wistar anestesiados	Palmítico (16:0)	↑ Consumo de O ₂ ↑ Produção de CO ₂
Cultura de células musculares C2C12	Palmítico (16:0) Oleico (18:1)	↑ Intensidade de fluorescência do DAF-2DA (sonda para NO)

Figura 1:

