



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

Henver Simionato Brunetta

**Estudo dos efeitos da insulina, leucina e dieta hiperlipídica sobre a fisiologia
mitocondrial do músculo esquelético**

Florianópolis

2020

Henver Simionato Brunetta

**Estudo dos efeitos da insulina, leucina e dieta hiperlipídica sobre a fisiologia
mitocondrial do músculo esquelético**

Tese submetida ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção ao título de Doutor em Ciências Fisiológicas.
Orientador: Prof. Dr. Everson Araújo Nunes

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

BRUNETTA, HENVER SIMIONATO
ESTUDO DOS EFEITOS DA INSULINA, LEUCINA E DIETA
HIPERLIPÍDICA SOBRE A FISIOLÓGIA MITOCONDRIAL DO MÚSCULO
ESQUELÉTICO / HENVER SIMIONATO BRUNETTA ; orientador,
EVERSON ARAÚJO NUNES, coorientador, FERNANDA LIMA, 2020.
132 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas,
Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Ciências Fisiológicas. 2. MITOCÔNDRIA. 3. RESISTÊNCIA À
INSULINA. 4. OBESIDADE. 5. ENDOCRINOLOGIA. I. NUNES,
EVERSON ARAÚJO. II. LIMA, FERNANDA. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

Henver Simionato Brunetta

Estudo dos efeitos da insulina, leucina e dieta hiperlipídica sobre a fisiologia mitocondrial do músculo esquelético

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Alex Rafacho, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Alcir Dafre, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcelo Mori, Dr.

Universidade Estadual de Campinas

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas.

Prof^ª. Fernanda Lima, Dra.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Everson Araújo Nunes, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2020

Dedico este trabalho à minha mãe Sandra Brunetta,
pela vida que me deu, e pela vida que dedicou a
mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, prof. Dr. Everson Araújo Nunes, por ter aberto as portas de seu laboratório seis anos atrás. Nesses seis anos ao seu lado, aprendi tudo o que sei sobre ciência e, certamente, me tornei uma pessoa e um profissional melhor. Sou eternamente grato pela oportunidade que me foi dada e quero deixar aqui minha admiração e respeito. Agradeço ainda o prof. Dr. Alex Rafacho, que juntamente com o prof. Everson coordena o Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas (LIDoC), onde realizei minha pós-graduação. As conversas, dicas, tempo investido, e principalmente, a amizade me fizeram quem sou hoje. Obrigado por tudo, esses anos trabalhando com vocês não serão esquecidos e um dia pretendo ser metade dos profissionais e pessoas que vocês são.

Agradeço à banca examinadora pelo tempo investido em avaliar esse documento, Dr. Marcelo Mori, Dr. Alcir Dafre, Dr. Alex Rafacho e Dr. Guilherme Speretta. Agradeço também aos meus colegas do LIDoC, ao prof. Dr. Gustavo Santos, aos que já concluíram seus estudos e aos que ainda estão no laboratório. Em tempo, agradeço aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas Dr. Vander Baptista, Dra. Fernanda Lima e Dr. Eduardo Moreira, pelos conselhos e ensinamentos que permanecerão na minha memória.

Agradeço também aos professores que abriram as portas de seus laboratórios durante essa jornada, auxiliando na construção desse trabalho e me ensinando não apenas sobre ciência, mas também sobre a vida. Com especial menção à professora Dra. Andreza de Bem (CFS/UnB), ao professor Dr. Antonio Galina (IBqM/UFRJ), ao professor Dr. Graham Holloway (HHNS/University of Guelph) e à professora Dra. Evelize Nazari (BEG/UFSC). Adicionalmente, agradeço imensamente àqueles que estiveram lado a lado comigo diariamente na bancada, que passaram noites e fins de semana realizando experimentos, analisando dados, resolvendo problemas, compartilhando aflições, conquistas e café: Gabriela, Eduarda, Matheus, Manuela, Logan e Heather, muito obrigado. Agradeço aos meus amigos da vida, Gian, Léo, Marcelo, Frizzo, Robi e Luiza que certamente estiveram presentes nessa pequena jornada. À minha família, com especial agradecimento à minha mãe Sandra e à minha avó Zelcy.

Para finalizar, agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida para realização do doutorado. Adicionalmente, reconheço aqui a contribuição dos camundongos com suas vidas para a construção do conhecimento por meio da ciência experimental.

EPÍGRAFE

*“Não é a morte que desejamos evitar, mas a vida que desejamos viver” (Ayn Rand,
escritora e filósofa Russo-Americana)*

RESUMO

As mitocôndrias são capazes de responder a estímulos hormonais, metabólicos e nutricionais nas células, modulando sua função de diversas formas. Manipulações na dieta são capazes de modular a homeostase da glicose em modelos animais, sendo que a maioria apresenta também efeitos sobre a fisiologia mitocondrial. O objetivo deste trabalho foi investigar detalhadamente a resposta mitocondrial durante o desenvolvimento da resistência à insulina associada à obesidade, os efeitos agudos da insulina e da leucina sobre a função mitocondrial e os efeitos crônicos da leucina em um modelo de alteração na respiração mitocondrial causada por dieta hiperlipídica. Inicialmente, camundongos foram tratados com *high-fat diet* (HFD) por 7, 14 e 28 dias. Após 7 dias de tratamento, os camundongos apresentaram intolerância à glicose e hiperinsulinemia de jejum. Contudo, redução no conteúdo de glicogênio pós-estimulação por glicose/insulina e redução na ação sistêmica da insulina surgiram com 14 e 28 dias de tratamento, respectivamente. Houve redução da respiração mitocondrial no músculo sóleo e insensibilidade mitocondrial à insulina em todos os períodos observados. Após 7 e 14 dias de HFD, as mitocôndrias apresentaram menor emissão de H_2O_2 no estado 2, enquanto que com 28 dias de HFD, essa redução deixou de existir. Os efeitos *in vivo* da insulina (duas injeções agudas 3 U/kg) foram testados em camundongos alimentados com dieta padrão e com HFD por 8 semanas. A insulina aumentou o consumo máximo de O_2 e a sensibilidade aparente ao ADP no grupo controle. Contudo, nos camundongos que consumiram HFD, apenas os efeitos da insulina sobre a sensibilidade ao ADP foram mantidos. Além disso, a insulina agudamente aumentou a habilidade do ADP em suprimir a emissão mitocondrial de H_2O_2 no grupo que consumiu HFD, mas não no grupo controle. Por fim, o sóleo de camundongos controle foi incubado com leucina (5 mM por 1 hora). A leucina agudamente aumentou o consumo máximo de O_2 . O tratamento crônico com leucina (2,5% na água de beber) em camundongos com RI induzida por HFD foi capaz de melhorar a homeostase da glicose. Além disso, as mitocôndrias do sóleo dos camundongos tratados com leucina aumentaram a respiração no estado 3, a taxa de acoplamento mitocondrial e a área mitocondrial no subcompartimento intermiofibrilar. Assim, é possível concluir que as mitocôndrias do músculo esquelético apresentam plasticidade durante o desenvolvimento da RI e são responsivas à insulina e leucina de forma aguda, o que reforça a complexidade dessa organela na resistência à insulina.

Palavras-chave: fisiologia mitocondrial; resistência à insulina; músculo esquelético; obesidade; insulina; leucina.

ABSTRACT

Mitochondria can respond to hormone, metabolic and nutritional stimulation, having its function modulated in several ways. Dietetic manipulations can modulate glucose homeostasis in animal models, and most of these studies also show effects on mitochondrial physiology. The aim of this work was to investigate the mitochondrial response during the development of insulin resistance related to obesity. Also, we aimed to investigate acute insulin and leucine effects on the mitochondrial function, and the effects of leucine in a model of alteration in mitochondrial respiration caused by overnutrition. First, mice were treated with high-fat diet (HFD) for 7, 14 or 28 days. With 7 days of HFD, animals presented glucose intolerance and fasting hyperinsulinemia. However, they present a decrease in muscle glycogen content, after stimulation by glucose/insulin, and a reduction in insulin action appeared with 14 and 28 days of treatment, respectively. There was a reduction of soleus muscle mitochondrial respiration and mitochondrial insulin insensitivity in all time points. After 7 and 14 days of HFD-feeding, mitochondria showed less H₂O₂ emission in state 2, otherwise, with 28 days of HFD, this reduction was not detectable. The *in vivo* insulin effects (two injections of 3 U/kg) were tested in mice fed with control and high-fat diet for 8 weeks. Insulin increased maximal O₂ consumption and ADP apparent sensitivity in the control group. However, HFD-fed mice presented only an increase in ADP sensitivity after insulin injections. Additionally, insulin increased the ability of ADP to suppress mitochondrial H₂O₂ emission in the HFD-fed group but not in the control group. Afterward, soleus from control mice was incubated with leucine (5 mM for 1h). Acute exposition to leucine was able to increase O₂ flux linked to complex II and oxidative phosphorylation, with no alteration in respiratory control rate (RCR). Furthermore, chronic ingestion of leucine (2.5% in drinking water) in HFD-fed mice was able to improve glucose tolerance and insulin responsivity. Besides that, mitochondria from soleus of diet-induced obesity mice treated with leucine increased respiration in state 3, RCR, and intermyofibrillar area. Thus, it is possible to conclude that mitochondria of skeletal muscle present plasticity during the development of IR and are responsive to insulin and leucine acutely. These data reinforce the complexity of mitochondria in IR scenarios.

Key-words: mitochondrial physiology; insulin resistance; skeletal muscle; obesity; insulin; leucine.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Variação do quociente respiratório (QR) do jejum para o estado alimentado	22
Fig. 2	Teste de tolerância à glicose nos camundongos expostos à HFD por 7, 14 e 28 dias	49
Fig. 3	Teste de responsividade à insulina nos camundongos expostos à HFD por 7, 14 e 28 dias	50
Fig. 4	Conteúdo de glicogênio muscular em jejum e sob estimulação de glicose e insulina	52
Fig. 5	Conteúdo mitocondrial é reduzido no sóleo de camundongos expostos à HFD por 28 dias	53
Fig. 6	Respiração mitocondrial é reduzida nos roedores expostos à HFD ...	54
Fig. 7	Sensibilidade ao ADP não é alterada no sóleo de camundongos expostos à HFD	55
Fig. 8	Emissão de H ₂ O ₂ e fração de escape de elétrons em mitocôndrias de camundongos expostos à HFD	56
Fig. 9	Mitocôndrias do sóleo de camundongos obesos são irresponsivas à estimulação com insulina	57
Fig. 10	Consumo de O ₂ ligado à síntese de ATP e taxa de controle respiratório	58
Fig. 11	Estimulação com insulina não altera a emissão mitocondrial de H ₂ O ₂ no sóleo	59
Fig. 12	Resumo das alterações metabólicas e mitocondriais durante o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina	67
Fig. 13	Caracterização dos camundongos após o consumo de HFD por 8 semanas	74
Fig. 14	Validação das injeções de insulina pela concentração de glicose plasmática	75
Fig. 15	Respiração mitocondrial sob estimulação aguda de insulina	76
Fig. 16	Sensibilidade ao ADP após estimulação aguda com insulina <i>in vivo</i> .	77
Fig. 17	Respiração mitocondrial sob concentrações não-saturantes de ADP .	78
Fig. 18	Emissão mitocondrial de ROS sob estimulação com insulina	80
Fig. 19	Estado de fosforilação de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina	82
Fig. 20	Efeitos tardios da insulina sobre a sensibilidade ao ADP	83
Fig. 21	Efeitos agudos da leucina sobre respiração mitocondrial	95
Fig. 22	Efeitos da inibição da mTORC1 sobre respiração mitocondrial	96
Fig. 23	Consumo calórico e eficiência calórica em camundongos obesos suplementados com leucina	97
Fig. 24	Consumo de leucina e hídrico durante os 28 dias de tratamento	98
Fig. 25	Ganho de massa corporal durante a exposição à HFD e à leucina	98
Fig. 26	Parâmetros plasmáticos dos camundongos obesos expostos à HFD e suplementados com leucina	100
Fig. 27	Suplementação com leucina previne parcialmente a intolerância à glicose em camundongos tratados com HFD	101
Fig. 28	Teste de responsividade à insulina em camundongos obesos suplementados com leucina	102
Fig. 29	Respiração mitocondrial em camundongos obesos suplementados com leucina	103

Fig. 30 Suplementação com leucina previne a redução na área das mitocôndrias intermiofibrilares mas não subsarcolemais

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados de caracterização murinométrica em roedores expostos por 7, 14 e 28 dias à dieta hiperlipídica	47
Tabela 2	Caracterização bioquímica dos camundongos expostos por diferentes períodos à dieta hiperlipídica	48
Tabela 3	Massa relativa dos tecidos (g/kg) dos camundongos expostos à HFD e suplementados com leucina	99
Tabela 4	Análises morfológicas das mitocôndrias do músculo sóleo dos camundongos tratados com dieta hiperlipídica e/ou leucina	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC – Acetil-CoA carboxilase
ADP – Adenina difosfato
AGL – Ácidos graxos livres
AMP – Adenosina monofosfato
AMPK – Proteína cinase sensível ao AMP
ANT – Translocador de Nucleotídeo
Ant A – Antimicina A
ATP – Adenina Trifosfato
ATP5B – Subunidade β da ATP sintase
BCAA – Aminoácido de cadeia ramificada
BCAATm – Aminotransferase dos aminoácidos de cadeia ramificada
BCKD – Desidrogenase de cadeia ramificada
CaMK-II – Proteína cinase dependente de Ca^{++} /calmodulina
CI – Complexo I
CII – Complexo II
CIII – Complexo III
COX-IV – Citocromo *c* oxidase
CPT – Carnitina Palmitoil Transferase
CS – Citrato sintase
DMT2 – Diabetes Mellitus Tipo 2
EDL – Extensor digitorum longus
EROs – Espécies reativas de oxigênio
ER- α – Receptor de estrogênios α
eIF-4E – Fator de iniciação eucariótico 4E
FAD – Flavina adenina dinucleotídeo
FADH₂ – Flavina adenina dinucleotídeo, forma reduzida
FAS – Ácido graxo sintase
FRE – Fluxo reverso de elétrons
GLUT – Transportador de glicose
GSSG – Glutathiona oxidada
GSH – Glutathiona reduzida
GSK-3 – Glicogênio sintase cinase 3
G6Pase – Glicose 6 fosfatase
HFD – Dieta hiperlipídica
HK-II – Hexocinase II
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
IF-1 – Fator inibitório 1
IKK- β – Cinase inibitória do fator nuclear κ B
IL-6 – Interleucina 6
IMC – Índice de massa corporal
IRS – Substrato do receptor de insulina
JNK – c-Jun N-terminal cinase
KIC – α ceto-isocaproato
Leu – Leucina
LIMC – Lipídeos intramiocelulares

M – Malato
MAM – Membranas associadas à mitocôndria
MCP-1 – Proteína quimioatrativa de monócitos 1
Mfn - Mitofusina
mTORC-1 – Complexo alvo da rapamicina, subunidade Raptor
mtTFA – Fator de transcrição mitocondrial A
NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH + H⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, forma reduzida
NRF-1 – Fator respiratório nuclear 1
OMS – Organização mundial da saúde
Omy – Oligomicina
OXPHOS – Fosforilação oxidativa
O₂^{•-} - Ânion radical superóxido
P – Piruvato
PDH – Piruvato Desidrogenase
PDK – Piruvato Desidrogenase Cinase
PEPCK – Fosfoenol piruvato carboxicinase
PFK – Fosfofrutocinase
POMC – Pro-ópiomelanocortina
PPA2 - Fosfolipase A2
PGC-1 α – Coativador 1- α do receptor γ ativado por proliferador de peroxissomo
PI(3)K – Fosfatidil inositol 3 cinase
PKB/Akt – Proteína cinase B
PKC – Proteína Cinase C
PPAR- α – Receptor ativado por proliferador de peroxissomo
PTP – Proteína tirosina fosfatase
P70/S6K – Proteína ribossomal S6 cinase 70kDa
QR – Quociente respiratório
RCR – Taxa de acoplamento mitocondrial
RI – Resistência à insulina
RS – Retículo sarcoplasmático
SDH – Succinato desidrogenase
SIRT – Sirtuína
SOD – Superóxido dismutase
Suc – Succinato
STE – Sistema de transferência de elétrons
TMB – Taxa metabólica basal
UCP – Proteína desacopladora
YY-1 – Fator de transcrição yin-yang 1
4E-BP – Proteína ligadora do fator de iniciação eucariótico 4E

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I – O PROBLEMA	17
1.1	INTRODUÇÃO	17
1.1.1	Aspectos gerais da obesidade	17
1.1.2	Papel do músculo esquelético na homeostase da glicose	19
1.1.3	Participação mitocondrial na resistência à insulina no músculo esquelético	24
1.1.4	Efeitos da leucina sobre a homeostase da glicose	30
1.2	JUSTIFICATIVA	33
1.3	OBJETIVOS	34
1.3.1	Objetivo geral	34
1.3.2	Objetivos específicos	34
1.4	HIPÓTESES	35
2	CAPÍTULO II – ALTERAÇÕES MITOCONDRIAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA RESISTÊNCIA À INSULINA	36
2.1	INTRODUÇÃO	36
2.2	MÉTODOS	38
2.2.1	Desenho experimental	38
2.2.2	Caracterização murinométrica	38
2.2.3	Avaliação da tolerância à glicose <i>in vivo</i> (ipGTT)	39
2.2.4	Avaliação da responsividade à insulina <i>in vivo</i> (ipITT)	39
2.2.5	Estimulação da glicogênese muscular	39
2.2.6	Caracterização bioquímica	40
2.2.7	Respirometria de alta resolução	41
2.2.8	Preparação das fibras musculares permeabilizadas	41
2.2.9	Avaliação da respiração mitocondrial pelo protocolo SUIT	42
2.2.10	Sensibilidade aparente ao ADP	42
2.2.11	Emissão mitocondrial de H₂O₂	42
2.2.12	Fração de vazamento de elétrons	43
2.2.13	Estimulação <i>ex vivo</i> com insulina	43
2.2.14	Atividade da enzima citrato sintase	43
2.2.15	Determinação do conteúdo proteico	44
2.2.16	Tratamento estatístico	44
2.2.16.1	Cálculo amostral	44
2.2.16.2	Análise dos dados	45
2.3	RESULTADOS	45
2.4	DISCUSSÃO DOS ACHADOS	61
3	CAPÍTULO III – EFEITOS AGUDOS DA INSULINA SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL	68
3.1	INTRODUÇÃO	68
3.2	MÉTODOS	70
3.2.1	Desenho experimental	70
3.2.2	Calorimetria indireta	71
3.2.3	Avaliação da tolerância à glicose <i>in vivo</i> (ipGTT)	71
3.2.4	Preparação das fibras musculares permeabilizadas	71
3.2.5	Avaliação da respiração mitocondrial pelo protocolo SUIT	71
3.2.6	Sensibilidade ao ADP	72
3.2.7	Emissão de H₂O₂	72
3.2.8	Determinação do conteúdo proteico	73

3.2.9	Análise estatística	73
3.3	RESULTADOS	73
3.4	DISCUSSÃO DOS ACHADOS	83
4	CAPÍTULO IV – FEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DA LEUCINA SOBRE A RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL	90
4.1	INTRODUÇÃO	90
4.2	MÉTODOS	91
4.2.1	Comitê de ética	91
4.2.2	Camundongos	91
4.2.3	Efeitos agudos da leucina na respiração mitocondrial	91
4.2.4	Suplementação crônica com leucina	92
4.2.5	Preparação das fibras musculares permeabilizadas	92
4.2.6	Avaliação da respiração mitocondrial pelo protocolo SUIT	92
4.2.7	Avaliação da tolerância à glicose <i>in vivo</i> (ipGTT)	93
4.2.8	Avaliação da responsividade à insulina <i>in vivo</i> (ipITT)	93
4.2.9	Caracterização murinométrica	93
4.2.10	Caracterização bioquímica	93
4.2.11	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	93
4.2.12	Análises morfológicas	94
4.2.13	Análises estatísticas	94
4.3	RESULTADOS	95
4.3.1	Efeitos agudos da leucina sobre a respiração mitocondrial	95
4.3.2	Efeitos crônicos da suplementação com leucina sobre o metabolismo e função mitocondrial	96
4.4	DISCUSSÃO DOS ACHADOS	105
5	CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
	REFERÊNCIAS	117
	ANEXO I – APROVAÇÃO DO CEUA/UFSC	130

CAPÍTULO I – O PROBLEMA

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Aspectos gerais da obesidade

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2016 cerca de 1,9 bilhões de adultos estavam com sobrepeso ou obesidade, sendo que atualmente, a obesidade é mais prevalente em mulheres (14,9%) que em homens (10,8%) (WHO, 2017). Esses dados indicam que as mulheres apresentam maior risco de obesidade, enquanto o sobrepeso é mais prevalente em homens. Embora a prevalência de indivíduos obesos seja maior nas mulheres, a taxa de crescimento no número de obesos na população está aumentando de forma similar entre os dois sexos. Na atual taxa de aumento da obesidade, a perspectiva é de que em 2025 a prevalência global da obesidade será em torno de 18% em homens e maior que 21% em mulheres (NCD-RisC, 2016). No Brasil, os dados levantados pelo Sistema de Vigilância por Inquérito Telefônico (VIGITEL) relatam que nas 26 capitais dos estados brasileiros mais o Distrito Federal, a frequência de excesso de peso ($IMC > 25\text{kg/m}^2$) foi de 55,7%, sendo maior entre homens (57,8% do que entre as mulheres (53,9%) (VIGITEL BRASIL, 2019).

Embora ainda exista debate sobre a classificação ou não da obesidade como doença, ela é considerada por muitos uma das epidemias do século 21 (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017). Obesidade é definida como o acúmulo excessivo de tecido adiposo podendo ser diagnosticada e classificada de acordo com a proporção de massa corporal em relação à estatura do indivíduo (ARONNE, 2002), sendo esse critério denominado como Índice de Massa Corporal (IMC) cuja fórmula é: $IMC = \text{massa (kg)} / \text{estatura}^2 \text{ (m)}$.

Uma pessoa com IMC acima de 30 é classificada como obesa, contudo, valores acima desse ponto podem alterar a classificação do indivíduo e o risco de comorbidades (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017). A obesidade pode ou não ser acompanhada de um quadro de inflamação crônica de baixo grau (GO, 2012; HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993), cenário este que está relacionado com diversas comorbidades, tais como o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (ARONNE, 2002).

De forma simplificada, de acordo com a primeira lei da termodinâmica, o acúmulo de gordura no tecido adiposo resulta do desequilíbrio entre a ingesta calórica e o gasto energético. De acordo com essa visão, obesidade resulta de baixos níveis de atividade

física (estilo de vida sedentário) e do elevado consumo de alimentos com alta densidade energética. Entretanto, a etiologia da obesidade é mais complexa, tendo como variáveis intervenientes o status socioeconômico, fatores ambientais, pessoais e genéticos e epigenéticos (AKIL, LUMA; AHMAD, 2011; HERRERA; KEILDSON; LINDGREN, 2011). Dessa forma, o peso corporal, e por consequência a obesidade, é determinado pela interação de fatores genéticos, ambientais e psicossociais, que atuam por meio de diversos mediadores fisiológicos sobre o consumo alimentar, o gasto energético e o acúmulo de gordura.

Outro ponto importante em relação ao acúmulo de tecido adiposo na obesidade é a diferença anatômica e funcional que ocorre de acordo com o local de deposição. A obesidade visceral é geralmente associada ao excesso de gordura no fígado, coração e rins (denominado acúmulo ectópico de gordura). Por outro lado, essa relação é menos evidente com o acúmulo de tecido adiposo subcutâneo (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017).

Dentro de um balanço energético positivo, o acúmulo de tecido adiposo geralmente evolui lentamente com o tempo. O acúmulo de ácidos graxos, principalmente sob a forma de triacilglicerol, no tecido adiposo resulta em hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. Uma pessoa obesa com o peso corporal estável, quando comparada à uma pessoa magra com peso corporal estável, geralmente apresenta maior quantidade de tecido adiposo, massa magra, além de maior gasto energético basal, volume de ejeção cardíaco, pressão arterial e massa de células β pancreáticas (HALL et al., 2011; LINGOHR; BUETTNER; RHODES, 2002). Esses dados favorecem a forte associação da obesidade com doenças cardiovasculares e DMT2. De fato, em torno de 63% da prevalência de DMT2 é atribuída à obesidade (ARONNE, 2002), o que remete ao forte impacto que essa condição possui sobre o desenvolvimento de alterações no metabolismo da glicose.

Embora exista uma forte associação entre obesidade e resistência à insulina (RI), os mecanismos por trás dessa interação ainda não são totalmente esclarecidos. De fato, a secreção de insulina em jejum e após uma carga de glicose aumenta linearmente com o IMC (FERRANNINI et al., 2004). Atualmente existem algumas teorias que tentam explicar a relação entre o acúmulo de tecido adiposo e a redução na ação da insulina em órgãos-alvo, principalmente fígado, tecido adiposo e músculo esquelético.

A RI geralmente precede a hiperinsulinemia e a hiperglicemia. Defeitos na oxidação de ácidos graxos (KELLEY; SIMONEAU, 1994), bioenergética mitocondrial

alterada (KOVES et al., 2008) e acúmulo de lipídeos intramiocelulares (BONEN et al., 2015a; CHAURASIA; SUMMERS, 2015; KAKEHI et al., 2016) têm sido associados com a resistência à insulina e o DMT2.

As elevações nas concentrações plasmáticas e intracelulares de ácidos graxos livres (AGL) encontrados em indivíduos obesos (BONEN et al., 2015a; MASHARANI et al., 2011), indo ao encontro do que foi proposto por RANDLE et al. (1963), inibem a oxidação de glicose em diversos estágios metabólicos e conduzem à redução na ação da insulina (BONEN et al., 2015a; KAKEHI et al., 2016). De certa forma, essa resposta poderia ser protetora e uma adaptação fisiológica para as células de uma sobrecarga descontrolada de substratos (principalmente glicose), que poderia conduzir à glicolipotoxicidade (NOLAN et al., 2015). A redução na captação de glicose e preferência pela oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético, sendo protetora ou não, poderia fazer a ligação entre a obesidade e as alterações encontradas no perfil dos adipócitos de indivíduos obesos e resistentes à insulina.

A RI é definida como a redução nos efeitos celulares à insulina quando comparado com sujeitos com tolerância normal à glicose e sem histórico familiar de diabetes (GOODPASTER; SPARKS, 2017). Contudo, devido aos diversos efeitos desse hormônio em sistemas biológicos, a RI pode ter diversas subdefinições de acordo com o tecido-alvo (i. e. fígado, tecido adiposo, músculo esquelético) e com o substrato mobilizado (i. e. metabolismo de proteínas, ácidos graxos e carboidrato). O tópico seguinte focará nas alterações encontradas nos indivíduos obesos em relação ao metabolismo da glicose e a participação do músculo esquelético nesses eventos.

1.1.2 Papel do músculo esquelético na homeostase da glicose

O músculo esquelético é o maior local de captação de glicose pós-prandial em humanos em certas condições experimentais. Durante um *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, em torno de 80% da captação de glicose ocorre no músculo esquelético (THIEBAUD, D; JACOT, E; DEFRONZO, R A; MAEDER, E; JEQUIER, E; FELBER, 1982). Em situações menos artificiais, como após uma refeição mista ou uma sobrecarga oral de glicose, a participação do músculo esquelético é menor devido a captação de glicose pelo leito esplênico e fígado. Contudo, o músculo ainda exerce papel relevante nesse contexto, tanto pelas quantidades absolutas de glicose captadas devido à sua massa (o músculo esquelético corresponde à ~40% da massa corporal) quanto pela

sua dependência da ação da insulina (KELLEY et al., 1988). Durante a hiperinsulinemia fisiológica (80-100U/mL), a captação de glicose no músculo esquelético aumenta linearmente com o tempo, atingindo um platô em torno de 10mg/kg de músculo por minuto após 60 minutos (DEFRONZO et al., 1981).

A glicose é captada pelas células do músculo esquelético por difusão facilitada, devido à translocação de transportadores de glicose (GLUT) para a membrana sarcoplasmática. Nesse tecido existem duas isoformas de GLUT: o GLUT-1 que se apresenta de forma constitutiva na membrana sarcoplasmática e possui maior sensibilidade à glicose, com K_m em torno de 1mM e; o GLUT-4 que se encontra no sarcoplasma das células musculares ancorado à vesículas e é translocado até a membrana sarcoplasmática sob estimulação com insulina (GASTER et al., 2018; GOTTESMAN et al., 1982). A glicose captada pelo músculo esquelético pode ter diversos destinos dentro da célula: 1) entrar na rota de glicogênese com o objetivo de estocagem de energia; 2) ser hidrolisada a piruvato com posterior entrada nas mitocôndrias e oxidação completa até CO_2 e H_2O ; 3) ser convertida, ainda no sarcoplasma, a lactato (processo denominado fermentação láctica) e; 4) ser destinada à via das pentoses para síntese de ácidos nucleicos. Juntos, a taxa de oxidação da glicose e o metabolismo da glicose não-oxidativo (que reflete principalmente a síntese de glicogênio), remetem à capacidade do músculo em captar a glicose da corrente sanguínea. Em humanos, aproximadamente 75% da glicose é metabolizada da forma não-oxidativa (DEFRONZO et al., 1981). Os prejuízos na síntese de glicogênio têm sido apontados como um dos primeiros defeitos metabólicos na redução da ação da insulina associada ao DMT2 (DEFRONZO, 2004). Além da rota de glicogênese, indivíduos que apresentam resistência na ação da insulina podem apresentar alterações na via oxidativa mitocondrial, direcionando a glicose para a via anaeróbia, com maior produção e exportação de lactato mesmo sob captações equivalentes de glicose (MITRAKOU, KELLEY, VENEMAN, JENSSEN, PANGBURN, REILLY, 1990). Embora indiretamente, a liberação de lactato para a corrente sanguínea contribui significativamente para a intolerância à glicose observada em indivíduos obesos resistentes à insulina. O lactato é convertido à glicose pelos hepatócitos, pelo processo descrito por CORI; CORI (1946) e liberado na grande circulação. Dessa forma, o lactato contribui com 15-20% da produção endógena de glicose para a manutenção da glicemia em períodos de jejum (FELIG, 1972). Contudo, devido à sua maior produção no músculo esquelético em indivíduos obesos e resistentes à insulina, pode contribuir também para as elevadas concentrações de glicose nesses indivíduos. Vale ressaltar que a supressão na

produção endógena de glicose também é um fator que se encontra reduzido em indivíduos obesos resistentes à insulina (DEFRONZO, 2004; SAMUEL; SHULMAN, 2016).

As alterações no destino da glicose dentro das células musculares (MITRAKOU, KELLEY, VENEMAN, JENSSEN, PANGBURN, REILLY, 1990), adicionadas à redução da captação de glicose (LAINE et al., 1998; WILLIAMS et al., 2003), resultam em valores de glicemia elevados após uma refeição ou sobrecarga de glicose. Esses períodos de elevadas concentrações de glicose, mesmo que transitórios, resultam em aumento na síntese e secreção de insulina pelas células β do pâncreas. A redução da captação e oxidação de glicose somada às elevadas concentrações de insulina descrevem a redução da flexibilidade metabólica encontrada em indivíduos obesos (STORLIEN; OAKES; KELLEY, 2004).

A flexibilidade metabólica é caracterizada pela habilidade de um organismo em responder ou se adaptar de acordo com as alterações das demandas metabólicas e energéticas do ambiente (GOODPASTER; SPARKS, 2017). Um conceito mais direto da flexibilidade metabólica remete à capacidade de selecionar e alterar a utilização de substratos energéticos nas transições do jejum para o estado alimentado (KELLEY, 2005). A flexibilidade metabólica pode ser mensurada pela variação no quociente respiratório (QR) na transição do estado de jejum para o alimentado, ou vice-versa. O quociente respiratório (QR) é dado pela seguinte equação $QR = VCO_2 / VO_2$, onde VCO_2 é a produção de CO_2 mensurada pelo ar expirado e VO_2 é a utilização de O_2 mensurada pelo ar inspirado.

Em uma situação hipotética, sem incluir a taxa de oxidação de aminoácidos, a oxidação exclusiva de ácidos graxos resultaria em um QR próximo de 0,7. Por outro lado, durante a oxidação unicamente de glicose, o QR é igual a 1. Em situações fisiológicas de jejum, o QR permanece baixo, porém, após uma carga de glicose e, sob efeito da insulina, o QR sobe em direção à 1 como resultado da oxidação de glicose e inibição da oxidação de ácidos graxos (KELLEY, 2005). Portanto, na transição do estado de jejum para o estado alimentado, um indivíduo que apresenta um alto ΔQR em função de uma baixa variação na insulinemia pode ser considerado metabolicamente flexível (Figura 1).

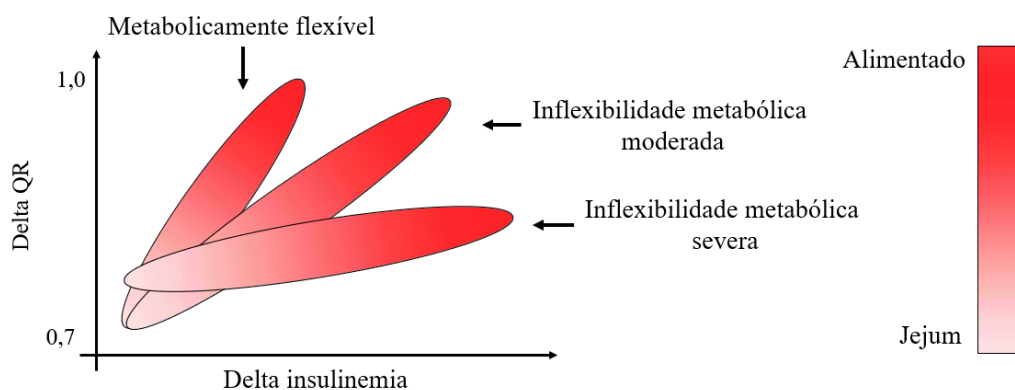


Figura 1 – Variação do quociente respiratório (QR) e da insulinemia em estado de jejum para o alimentado. Fonte: o autor.

A relação entre o Δ QR em função da variação das concentrações de insulina faz da mensuração da flexibilidade metabólica um parâmetro útil na investigação da resistência à insulina. Como as ações da insulina transcendem o metabolismo dos carboidratos e possuem ações no metabolismo de proteínas e ácidos graxos também, para total efetividade da insulina na oxidação de glicose em células musculares a oxidação de ácidos graxos deve ser suprimida. Dessa forma, a flexibilidade metabólica pode ser utilizada para verificação da dinâmica entre a utilização e metabolismo desses dois substratos.

Indivíduos obesos e resistentes à insulina apresentam maior conteúdo intramiocelular de (LIMC) (BONEN et al., 2015a; SINHA et al., 2002). O acúmulo intramuscular de lipídeos pode interferir no metabolismo da glicose de duas formas: 1) reduzir a oxidação de glicose pela competição mitocondrial que ocorre por meio dos ácidos graxos, descrito por Randle, Hales, Garland e Newsholme (1963) e, 2) reduzir a ativação dos alvos-moleculares da insulina de forma direta por intermediários lipídicos com ação biológica, como diacilgliceróis e ceramidas (CHAURASIA; SUMMERS, 2015; SZENDROEDI et al., 2014). Os impactos dos lipídeos no metabolismo e na viabilidade celular foram denominados como “lipotoxicidade”, apresentando papel relevante entre o acúmulo ectópico de lipídeos e as desordens metabólicas observadas em obesos e pacientes com DMT2 (UNGER et al., 2010). A seguir serão descritos os possíveis mecanismos em que os ácidos graxos interferem no metabolismo da glicose no músculo esquelético, tanto na forma direta dos alvos-moleculares pertencentes à via da insulina quanto as alterações no fluxo e utilização da glicose.

O acúmulo de LIMC ocorre quando há um desbalanço entre a oxidação mitocondrial de ácidos graxos e a captação de lipídeos pelas células musculares (BONEN et al., 2015a). Enquanto há uma forte correlação entre o acúmulo de LIMC e a resistência à insulina (MASHARANI et al., 2011; SINHA et al., 2002), triacilgliceróis têm sido dissociados desses eventos, sugerindo assim, que outras subclasses de lipídeos (i. e. diacilgliceróis e ceramidas) devem estar envolvidas nas alterações celulares observadas na resistência à insulina.

As elevações de diacilglicerol parecem estar atreladas a prejuízos de aspecto proximal na via de sinalização da insulina. A fosforilação em resíduos de tirosina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) que é estimulada por insulina e a ativação da fosfatidil-inositol 3 cinase (PI3K) associada ao IRS-1 estão reduzidas no músculo esquelético de humanos (DRESNER et al., 1999) e roedores (YU et al., 2002) sob acúmulo de diacilglicerol. Aparentemente, o acúmulo de diacilglicerol ativa as proteínas cinases C θ (PKC- θ) que possui efeito inibitório sobre a fosforilação em IRS-1 (SZENDROEDI et al., 2014; YU et al., 2002).

Ceramidas são precursores para a maioria dos esfingolípídios nas células, que são componentes integrais das membranas celulares (GAULT, OBEID, 2011). Diversos estudos têm reportado alterações nas concentrações plasmáticas e intramiocelulares de ceramidas em obesos e pacientes com DMT2 (ADAMS et al., 2004; HAUS et al., 2009; MELLO; LANKINEN; SCHWAB, 2009). Isto sugere que esses compostos poderiam ter papel ativo na RI observada nessa população. Os efeitos biológicos das ceramidas resultam da sua habilidade em inibir a estimulação da proteína cinase B (PKB) induzida pela insulina (BOURBON; SANDIRASEGARANE; KESTER, 2002). A PKB é uma serina/treonina cinase que possui função determinante nos efeitos celulares da insulina, também chamada de Akt. Aparentemente, os efeitos mediados pelas ceramidas sobre a via Akt/PKB ocorrem por meio de dois fatores independentes: proteína fosfatase 2A (PP2A) e proteína cinase C- ζ (PKC- ζ) (STRATFORD et al., 2004).

As alterações no fluxo de substratos induzidas por lipídeos foram descritas em músculo cardíaco e esquelético (RANDLE; HALES; GARLAND; NEWSHOLME, 1963). O aumento na oxidação de ácidos graxos conduz o aumento na razão acetil-CoA/CoA e da forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) sobre a forma oxidada (NAD⁺), resultando na redução na atividade do complexo da piruvato desidrogenase (PDH) (PATEL; NEMERIA; FUREY, 2014) por meio de regulação

alostérica. Além disso, a oxidação aumentada de ácidos graxos conduz ao aumento nas concentrações de citrato, que por sua vez, é capaz de inibir a fosfofrutocinase (PFK) (RANDLE, HALES, GARLAND, 1963), uma enzima regulatória da via glicolítica. A inibição da PFK resulta em aumento nas concentrações de glicose-6-fosfato, que exerce inibição alostérica sobre a atividade da hexocinase II (HK-II). Como resultado, observa-se aumento nas concentrações intramiocelulares de glicose e redução na captação dessa hexose (RODEN et al., 1996).

A interação entre o metabolismo de ácidos graxos e o metabolismo da glicose tem sido investigada com o propósito de melhorar a responsividade à insulina pelo músculo esquelético em modelos de RI induzida por obesidade. De fato, a deleção do gene da piruvato desidrogenase cinase 4 (PDK-4), enzima que fosforila a piruvato desidrogenase (PDH) com efeito inibitório sobre a mesma, resulta em aumento da atividade da PDH e melhora na tolerância à glicose e glicemia de jejum em camundongos C57Bl/J6 expostos à HFD (JEOUNG; HARRIS, 2018). Além disso, a inibição da carnitina palmitoil transferase 1 (CPT-1) (enzima que faz o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para dentro das mitocôndrias) em camundongos obesos resultou em redução da oxidação de ácidos graxos, aumento na oxidação de glicose, na atividade da PDH e na tolerância à glicose (KEUNG et al., 2013). Esses dados reforçam a relação entre o metabolismo de ácidos graxos e o metabolismo da glicose no músculo esquelético.

1.1.3 Participação mitocondrial na resistência à insulina no músculo esquelético

Indivíduos obesos resistentes à insulina e portadores de DMT2 apresentam, no músculo esquelético, redução de 2-3 vezes na atividade do complexo NADH oxidase (C-I) (KELLEY et al., 2002; RITOV et al., 2010). Além disso, a redução na atividade desse complexo está associada à redução no seu conteúdo proteico (LEFORT et al., 2010). De forma simultânea, associada à redução na atividade do sistema de transferência de elétrons (STE), foi mostrado *in vivo*, por meio da técnica de recuperação das concentrações de fosfocreatina pós-exercício (SCHRAUWEN-HINDERLING et al., 2007) e *ex vivo* por meio da respiração mitocondrial estimulada por adenina dinucleotídeo (ADP) (JØRGENSEN et al., 2017a; MOGENSEN et al., 2007; SEYSSEL et al., 2014), redução de 25-35% na capacidade oxidativa mitocondrial, independente de alterações no conteúdo. Vale destacar que, em alguns casos, após a normalização da respiração mitocondrial pelo seu conteúdo, não é possível observar diferenças entre indivíduos sensíveis e resistentes à insulina (BOUSHEL et al., 2007).

A redução no conteúdo mitocondrial é encontrada frequentemente na população que apresenta RI (BOUSHEL et al., 2007; MORINO et al., 2005; RITOV et al., 2010). Esse fenômeno tem sido mostrado por diversas metodologias diferentes, tais quais a atividade da citrato sintase (CS), conteúdo de cardiolipina e cópias de DNAm (BONNARD et al., 2008; LEFORT et al., 2010; PAGLIALUNGA et al., 2012). O conteúdo mitocondrial é o resultado de processos de fusão e fissão dessa organela, atrelados à gênese de novas mitocôndrias e eventualmente, mitofagia de mitocôndrias não funcionais (GOTTLIEB; BERNSTEIN, 2016). Todos esses processos são denominados genericamente de “dinâmica mitocondrial” e são coordenados pela ativação de diversos genes e proteínas. Indivíduos que apresentam redução na ação da insulina apresentam redução no RNAm do coativador 1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR) (PGC-1 α) e de diversas subunidades do sistema de fosforilação oxidativa, tanto as codificadas pelo DNAm como a cadeia 6 da NADH-ubiquinona oxidoreductase (ND6) quanto os codificados pelo DNA nuclear, como a flavoproteína da succinato desidrogenase (SDHA), a proteína 1 do ubiquinol citocromo-C redutase (UQCRC1), a subunidade 5A da citocromo C oxidase (COX5A) e da subunidade β da ATP sintase (ATP5B) (KRISTENSEN; SKOV; PETERSSON, 2014). A exposição à dietas hiperlipídica (HFD, do inglês *high-fat diet*), conhecidas por induzir obesidade e resistência à insulina, reduzem a expressão de genes similares aos supracitados, os quais estão relacionados à biogênese mitocondrial e fosforilação oxidativa em humanos (SPARKS et al., 2005) e roedores (WARREN et al., 2014). Vale destacar que a presença de obesidade, DMT2 ou histórico de diabetes na família acarreta em redução na expressão de outros genes relacionados à biogênese e dinâmica mitocondrial, tais como o fator nuclear respiratório 1 (NRF-1), o receptor ativado por proliferador de peroxissomo γ (PPAR- γ) e a mitofusina 2 (Mfn-2) (BACH et al., 2005; PATTI et al., 2003). Dessa forma, a condição de redução na ação da insulina e obesidade alteram o perfil de expressão de genes relacionados tanto à dinâmica mitocondrial quanto à biogênese mitocondrial, o que poderia explicar, ao menos em parte, as alterações no conteúdo mitocondrial observadas nessas populações.

Sob o ponto de vista mitocondrial, o aumento na oxidação de ácidos graxos resulta em acúmulo de acetil-CoA, que inibe a atividade PDH, reduzindo o fluxo glicolítico nas células musculares (RANDLE; HALES; GARLAND; NEWSHOLME, 1963). Adicionalmente, com o objetivo de manter as concentrações de acetil-CoA baixas, este

pode ser convertido em acetilcarnitina, pela atividade da carnitina aciltransferase. No entanto, em condições de resistência à insulina e acúmulo de lipídios, a atividade da carnitina aciltransferase está reduzida (SEILER et al., 2014). É importante destacar que em modelos de obesidade induzida por HFD, as concentrações de carnitina livre estão reduzidas (NOLAND et al., 2009). As concentrações de carnitina livre e de acetilcarnitina observadas em cenários de resistência à insulina indicam a oxidação incompleta de ácidos graxos (KOVES et al., 2008). Além disso, a suplementação com carnitina parece aumentar a oxidação de ácidos graxos e reverter alguns parâmetros mitocondriais observados em camundongos com resistência à insulina (WESSELS et al., 2015). Vale ressaltar que outras abordagens que parecem atenuar os prejuízos metabólicos causados pela exposição à HFD, como a super expressão do transportador de glicose 4 (GLUT-4) no músculo esquelético, resultam na redução da acilcarnitina de jejum e aumento na oxidação de palmitoil-carnitina (GURLEY et al., 2016). Esses dados reforçam os argumentos sobre a participação mitocondrial na redução na ação da insulina por meio da oxidação incompleta de ácidos graxos e acúmulo de intermediários lipídicos.

Outra rota metabólica para o acetil-CoA é a sua condensação com o oxaloacetato e formação de citrato, pela ação da primeira enzima do ciclo do ácido tricarboxílico, CS. Nesse contexto, o citrato pode sair da mitocôndria por meio de um trocador citrato/malato (GNONI et al., 2009) e, no citosol, sofrer a reação reversa e ser convertido em acetil-CoA novamente e oxaloacetato. O citrato citosólico, além de inibir a via glicolítica, é capaz de ativar a acetil-CoA carboxilase (ACC), que condensa acetil-CoA e forma malonil-CoA como produto, caracterizando as reações iniciais da lipogênese *de novo*. Contudo, vale destacar que o malonil-CoA apresenta efeito direto na função mitocondrial, com ação inibitória sobre o transportador palmitoil carnitina transferase 1 (CPT-1) (MCGARRY et al., 1983), podendo ser apontado como um agente ativo nas alterações encontradas na função mitocondrial e no acúmulo intramuscular de lipídios em indivíduos com resistência à insulina.

A oxidação incompleta de ácidos graxos devido à sobrecarga de lipídios na obesidade e o acúmulo de intermediários lipídicos têm sido apresentados como uma possível relação entre as alterações observadas na fisiologia mitocondrial e o desenvolvimento da RI. Aparentemente, as ações inibitórias do malonil-CoA sobre a CPT-1 parecem dar um suporte funcional para os dados encontrados no músculo esquelético e no plasma em relação ao metabolismo de lipídios nas condições de RI. Todavia, alguns pontos merecem ser analisados.

Primeiramente, a inibição da CPT-1 com oxfenicina reduz sua atividade em torno de 50%, porém, mesmo sob exposição à dieta hiperlipídica, os camundongos com inibição da CPT-1 apresentaram menor conteúdo de lipídios intramiocelulares. Além disso, os mesmos apresentaram atenuação dos prejuízos sobre a homeostase glicêmica causados pela HFD, com aumento na atividade da PDH, aumento na tolerância à glicose, fosforilação da Akt e capacidade aeróbia (KEUNG et al., 2013). Ainda, a deleção do gene da CPT-1 no músculo esquelético conduz à uma adaptação bioenergética, com aumento do conteúdo total e fosforilado da proteína cinase sensível ao AMP (AMPK), biogênese mitocondrial e resistência aos efeitos deletérios da HFD sobre o ganho de peso e homeostase da glicose (WICKS et al., 2015).

Ainda, ao contrário do que é sugerido em relação à disfunção mitocondrial e a incapacidade de oxidação de ácidos graxos frente à sobrecarga de lipídios, as mitocôndrias de camundongos obesos apresentam maior, e não menor, capacidade de oxidar ácidos graxos quando comparadas aos camundongos controle (BONEN et al., 2015a; HOEKS et al., 2011; PINHO et al., 2017). O aumento da capacidade oxidativa em camundongos expostos à HFD ocorre devido ao aumento na expressão do transportador de ácidos graxos CD36, sem alteração na atividade da CPT-1 e com concomitante acúmulo de intermediários lipídicos (triacilgliceróis, diacilgliceróis e ceramidas) (BONEN et al., 2015a). Além disso, o aumento na capacidade de oxidação de ácidos graxos ocorre de forma mais pronunciada em músculos com maior prevalência de fibras do tipo I (i. e. sóleo) do que em fibras com maior prevalência de fibras do tipo IIa e IIb (i. e. epitroclearis) (ARIANO, M. A. ARMSTRONG, R. B. EDGERTON, 1973; PINHO et al., 2017). Esses dados sugerem que o que ocorre efetivamente não é um acúmulo de lipídios por incapacidade mitocondrial de oxidá-los, e sim, um aumento adaptativo na capacidade oxidativa para esses substratos. E que, ainda, devido ao alto potencial/densidade de energia desse substrato, paralelo à manutenção da demanda energética, resulta em acúmulo de intermediários lipídicos mesmo sob aumento na oxidação dos mesmos.

O aumento na capacidade oxidativa das mitocôndrias para ácidos graxos poderia restringir a participação das mitocôndrias na RI para um ponto de vista puramente bioenergético, relacionado à seleção de substratos (MUOIO, 2014). Porém, é importante enfatizar, alguns aspectos que emergem do aumento da oxidação de ácidos graxos: o aumento na produção de acetil-CoA e alteração nas razões $\text{NADH}_2/\text{FADH}^+$.

Anteriormente foram descritas duas rotas pelos quais o acetil-CoA poderia ser metabolizado, a primeira delas foi a conversão em acetilcarnitina pela carnitina acetiltransferase e a segunda, a condensação com oxaloacetato pela citrato sintase gerando citrato (esse citrato pode seguir pelo ciclo do ácido cítrico ou ser exportado da mitocôndria em troca da importação de um malato). No entanto, o acúmulo de acetil-CoA, dentro ou fora das mitocôndrias, pode resultar em acetilação de proteínas e outras biomoléculas. O processo de acetilação é uma modificação pós-traducional, que pode ser enzimática ou não enzimática, em que o acetil do acetil-CoA reage com resíduos de lisina em proteínas, liberando o CoA. Acetilação é um mecanismo de regulação pós-traducional muito comum em proteínas mitocondriais e estima-se que em torno de 60% das proteínas mitocondriais apresentam ao menos uma lisina que pode ser acetilada (HOSP et al., 2016; STRAM; PAYNE, 2016). Proteínas do STE, ciclo do ácido tricarboxílico, metabolismo dos aminoácidos, metabolismo redox e da β -oxidação apresentam sua atividade alterada pela acetilação, e de forma geral, a acetilação tem efeito inibitório sobre essas proteínas (BAEZA; SMALLEGAN; DENU, 2016). De fato, a exposição a dietas hiperlipídica resulta no aumento de proteínas acetiladas (LANTIER et al., 2015). Além disso, a expressão e atividade da SIRT-3 (uma deacetilase mitocondrial), estão reduzidas em modelos de sobrecarga energética e lipídica (JING et al., 2011). A inibição de proteínas-chave relacionadas a diversos aspectos da função mitocondrial poderia ser uma explicação para as alterações encontradas nos quadros de RI associados à obesidade (MOGENSEN et al., 2007; PHIELIX et al., 2014; RITOV et al., 2005).

Outro ponto que emerge da oxidação aumentada de ácidos graxos é o desbalanço nas razões NADH/FADH₂. Em 1961, Chance e Hollunger, descreveram um mecanismo em que mitocôndrias isoladas produzem NADH a partir de NAD⁺ sob estimulação com succinato (um substrato do complexo II). A redução de NAD⁺ para NADH ocorre com elétrons oriundos do ubiquinol, um processo denominado fluxo reverso de elétrons (FRE). O FRE tem sido associado com produção elevada de radicais livres. Embora os mecanismos exatos da geração do FRE ainda não estejam totalmente esclarecidos, é conhecido que esse fenômeno ocorre nas mitocôndrias que possuem o *pool* de coenzima Q muito reduzido com elétrons da cadeia respiratória, principalmente do complexo II (succinato desidrogenase).

Esse dado é particularmente importante no contexto da RI associada à obesidade. O aumento na oxidação de ácidos graxos observado como resultado da sobrecarga de lipídios e redução da oxidação de glicose devido à resistência à insulina altera as razões

de carreadores reduzidos. A oxidação de glicose produz 5 moléculas de NADH para cada molécula de FADH₂ (razão de 5:1), que alimentarão posteriormente a cadeia de transferência de elétrons. Por outro lado, quando ácidos graxos são oxidados, a taxa de NADH/FADH₂ altera para 2:1, o que resulta em uma ultra redução do *pool* de Coenzima Q, estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelo FRE (PERALES-CLEMENTE et al., 2016).

O envolvimento causal da EROs na resistência à insulina no músculo esquelético relacionado à obesidade tem sido descrito em diversos trabalhos (ANDERSON et al., 2009; LEFORT et al., 2010; PAGLIALUNGA et al., 2012; PHIELIX et al., 2014). Embora a participação das EROs na resistência à insulina reforce o papel causal das mitocôndrias nessa condição, ainda existem alguns pontos que permanecem sem resposta, por exemplo: 1) são as mitocôndrias as responsáveis pela geração de EROs com possível efeito regulatório sobre a sinalização da insulina? E se sim, 2) quais dos 11 locais de geração mitocondrial de EROs fazem a ligação entre EROs e resistência à insulina e se todos apresentam o mesmo papel nesse contexto? 3) os efeitos nocivos das EROs provêm de quais moléculas (Ânion radical superóxido - O₂^{•-}, peróxido de hidrogênio - H₂O₂, radical hidroxila - OH[•])? 4) as ações, negativas ou positivas, das EROs são dependentes de concentrações e tempo sobre a ação da insulina?

Essas perguntas emergem das variações encontradas na literatura devido aos modelos experimentais, métodos para mensuração de EROs e principalmente ao papel dual das EROs sobre a sinalização da insulina. Os efeitos negativos das EROs sobre as ações da insulina podem ocorrer devido a inibição direta de cinases sensíveis à insulina (AL-LAHHAM; DEFORD; PAPAConstantinou, 2016), ou indireta, pela ativação de proteínas ativadas por stress, como a c-Jun NH₂-terminal cinase (JNK) (AGUIRRE et al., 2000) e cinase inibitória do fator nuclear κB cinase β (IKK-β) (STORZ; TOKER, 2003). Os efeitos negativos das EROs sobre a sinalização da insulina têm sido confirmados pelo uso de estratégias que reduzem a emissão de EROs em modelos de resistência à insulina apresentam efeitos benéficos nas ações da insulina, captação e utilização da glicose e função mitocondrial (ANDERSON et al., 2009; BARBOSA et al., 2013). Por outro lado, as EROs podem apresentar efeitos positivos sobre a sinalização da insulina, devido à inativação de proteínas tirosinas fosfatases (PTPs) em resíduos de cisteína pelo H₂O₂ (LOH et al., 2010).

As variações nos efeitos celulares das EROs podem ocorrer devido a dois fatores: a natureza e a origem das EROs. Em adultos obesos e resistentes à insulina, a emissão

mitocondrial de H_2O_2 é encontrada aumentada com a utilização de diversos substratos mitocondriais (LEFORT et al., 2010; PHIELIX et al., 2014). De fato, a exposição células musculares C2C12 ao palmitato, conhecido por induzir RI, resulta em aumento da emissão mitocondrial de H_2O_2 (BARBOSA et al., 2013). Adicionalmente, indução a distúrbios no metabolismo como injeção de streptozotocina, dietas com excesso de frutose/sacarose ou lipídios são capazes de aumentar a emissão mitocondrial de EROs (ANDERSON et al., 2009; BONNARD et al., 2008). As alterações encontradas na emissão de H_2O_2 tornam-se mais complexas quando os sistemas antioxidantes e controladores da produção de EROs são analisados. Por exemplo, Anderson et al. (2009) demonstraram que camundongos expostos à HFD apresentavam maiores concentrações de glutathiona oxidada (GSSG) e menor razão GSH/GSSG e redução de glutathiona reduzida (GSH), o que remete a uma situação pró-oxidante. Além disso, o tratamento desses camundongos com SS-31, um peptídeo antioxidante, reduziu a emissão de H_2O_2 e melhorou a tolerância à glicose. Por outro lado, camundongos obesos que apresentavam maior emissão de H_2O_2 tiveram maior atividade da enzima superóxido dismutase, além disso, o tratamento desses camundongos com o íon antioxidante plastoquinonil deciltrifenilfosfônio (SkQ), reduziu a emissão de EROs, a atividade da superóxido dismutase (SOD), mas não produziu nenhum efeito sobre a homeostase da glicose (PAGLIALUNGA et al., 2012).

Esses dados reforçam o fato de que a origem das EROs pode produzir diferentes desfechos na responsividade celular à insulina e, além disso, que aumento na emissão de H_2O_2 não pode ser traduzida de forma simplista como disfunção mitocondrial e nem remetida à sobrecarga energética e aumento do potencial de membrana para produção de EROs, como observado pelo aumento da expressão de proteínas desacopladoras em contexto de obesidade (BOUDINA et al., 2012; PINHO et al., 2017).

1.1.4 Efeitos da leucina sobre a homeostase da glicose

A leucina é um aminoácido pertencente ao grupo dos aminoácidos alifáticos apolares. Junto com a valina e a isoleucina, forma o grupo dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA, do inglês *branched-chain amino acids*). Em humanos, a leucina não pode ser produzida endogenamente, dessa forma, deve ser consumida pela dieta.

A leucina entra nas células por meio de um transportador do tipo L, que troca a entrada de leucina pela saída de glutamato (TAYLOR, 2014). Após a entrada da leucina nas células, ela pode ter dois destinos: 1) ser incorporada na estrutura de novas proteínas

ou 2) ser oxidada. Ocorre pouca degradação direta de leucina nos hepatócitos, sendo que a maior parte da leucina é metabolizada no tecido muscular esquelético. Primeiramente, a leucina é convertida em α -cetoisocaproato (KIC) pela ação da aminotransferase de cadeia ramificada (BCAT). Após essa etapa, o KIC é descarboxilado pela desidrogenase de cadeia ramificada (BCKD). Após estes dois passos iniciais, os intermediários metabólicos passam por uma série de reações até chegar no produto, acetil-CoA, que entra no ciclo do ácido tricarboxílico para ser convertido em CO₂ e oxaloacetato (BROSNAN; BROSNAN, 2006).

A suplementação com leucina tem sido utilizada com o objetivo de modular ou atenuar distúrbios metabólicos relacionados à obesidade, resistência à insulina e DM2. A utilização da leucina como possível modulador do metabolismo se baseia nos seus efeitos secretagógicos nas células β das ilhotas pancreáticas (HUTTON; MALAISSE, 1980) e suas ações em tecidos periféricos (i. e. músculo esquelético, fígado e tecido adiposo). Os efeitos secretagógicos da leucina potencializam a secreção de insulina estimulada por glicose nas células β . Além disso, a leucina parece estimular a síntese e secreção do peptídeo similar ao glucagon 1 (GLP-1) nas células L do íleo e do cólon (XU et al., 2015). Nos tecidos periféricos, a leucina apresenta efeitos na biogênese mitocondrial, na ativação da AMPK e na termogênese pelo aumento na expressão das proteínas desacopladoras (UCPs) (LI et al., 2016; ZHANG et al., 2007). Esses efeitos celulares da leucina podem impactar a homeostase da glicose de forma global.

Devido à diversidade de desenhos experimentais (dose, via de administração, tempo de suplementação, etc.), modelos de indução de desordem metabólica e da variedade de resultados obtidos, uma revisão sistemática foi realizada para encontrar padrões de resultados publicados na literatura e nortear as escolhas referentes à essas variáveis (BRUNETTA; CAMARGO; NUNES, 2018). A questão de pesquisa foi adaptada do modelo PICO (do inglês, *population, intervention, comparison and outcomes*). População – modelos roedores de intolerância à glicose e resistência à insulina; Intervenção e comparação – uso crônico de leucina comparado ao controle; Desfecho (*outcome*) – parâmetros quantitativos relacionados ao metabolismo da glicose.

A suplementação com leucina reduziu as concentrações de glicose de jejum em 4 estudos e não teve efeito em 7 deles. As concentrações de insulina foram reduzidas em 6 estudos, contudo, 4 estudos mostraram nenhum efeito do tratamento com leucina. A leucina melhorou a tolerância à glicose (mensurada pelo teste de tolerância à glicose) em 4 estudos, adicionalmente, em um trabalho o grupo suplementado apresentou maior taxas

de infusão de glicose durante o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, considerado o padrão-ouro para avaliar a ação periférica da insulina.

A ingestão de leucina modificou positivamente pelo menos uma variável em 66% dos estudos analisados nessa revisão. Contudo, é importante notar que 4 estudos não foram capazes de encontrar qualquer efeito ligado à leucina (BAUM et al., 2016; BONG et al., 2010; FU, 2015; TORRES-LEAL et al., 2011). Dois desses estudos suplementaram os animais após a indução da desordem metabólica (BONG et al., 2010; TORRES-LEAL et al., 2011). Tais dados sugerem que os potenciais efeitos relacionados à suplementação com leucina podem ser encontrados se a leucina for ofertada durante o desenvolvimento da obesidade ou da desordem metabólica. Baseado nisso, parece que a leucina não seria capaz de reverter um quadro já instalado. Um estudo conduzido por Binder et al. (2013) corrobora essa ideia: os autores observaram melhoras no metabolismo causadas pela ingestão de leucina em um modelo de obesidade induzida pela dieta em camundongos C57Bl/6J apenas quando a indução da obesidade e da resistência à insulina foi concomitante com a suplementação. Nesse estudo, a suplementação de camundongos obesos com leucina por 17 semanas (1,5% na água de beber) não causou nenhum efeito nos parâmetros investigados.

Além do momento da suplementação, outro aspecto que é frequentemente discutido como relevante para produzir qualquer efeito observável quando há suplementação com leucina é a dose aplicada no desenho experimental. Dois dos estudos selecionados nessa revisão sistemática não foram capazes de encontrar efeitos da leucina nas variáveis mensuradas (BAUM et al., 2016; FU, 2015). Esses pesquisadores utilizaram doses relativamente baixas de leucina (~72 mg/dia/animal e ~48 mg/dia/animal) (Fu et al., 2015; Baum et al., 2016), quando comparado a outros que apresentam algum efeito da leucina nos parâmetros relacionados à homeostase da glicose (de 90 à 150 mg/dia). Isso sugere que a suplementação com leucina poderia ter uma dose mínima para produzir seus efeitos no metabolismo da glicose. Aparentemente, a dose selecionada deve ser capaz de aumentar as concentrações plasmática de leucina para produzir algum efeito biológico nos tecidos periféricos. Esse tópico será discutido de forma mais aprofundada nos próximos parágrafos.

As concentrações plasmáticas e a disponibilidade biológica da leucina nos tecidos periféricos (i. e. tecido adiposo e músculo esquelético) em modelos animais de suplementação com esse aminoácido parecem ser um aspecto importante a ser observado. Entretanto, poucos estudos têm mensurado as variações plasmáticas da leucina durante o

período experimental. No estado alimentado, Elie et al. (2014), mostraram aumento de 50% nas concentrações plasmática de leucina (de 400 $\mu\text{mol/L}$ para 600 $\mu\text{mol/L}$) quando o aminoácido era administrado via água de beber na concentração de 1,5%. Também no estado alimentado, Nairizi et al. (2009) mostraram um aumento em torno de 32% nas concentrações plasmáticas de leucina (de ~ 185 $\mu\text{mol/L}$ para aproximadamente 330 $\mu\text{mol/L}$) quando o aminoácidos foi administrado via água de beber enriquecida em 2% de leucina. Zhang et al. (2007) mostraram o mesmo padrão encontrado por Nairizi et al. (2009), durante o estado alimentado quando a suplementação de leucina via água de beber em 1,5%, mas sem alterações nas concentrações plasmática de leucina no período pós-absortivo. Adicionalmente, Li et al. (2016) mostraram um aumento de mais de 100% na leucina sérica (de ~ 225 -245 $\mu\text{mol/L}$ no grupo não suplementado para ~ 480 -500 $\mu\text{mol/L}$ no grupo suplementado) e Macotella et al. (2011) mostraram aumento de 50% na leucina circulante quando oferecido via água de beber em 1,5%. Entretanto, esses últimos dois estudos não informaram o estado metabólico dos animais quando as amostras foram coletadas. Pela análise do padrão dos dados quando comparado com outros estudos supracitados, pode ser assumido que os camundongos C57Bl/6J estavam no estado alimentado. Usando um modelo diferente, Torres-Leal et al. (2011), testaram uma dieta enriquecida com 5% de leucina em ratos Sprague-Dawley com obesidade induzida pela dieta. Curiosamente, mesmo testando uma dose relativamente alta, esses autores não foram capazes de encontrar aumento nas concentrações plasmáticas em jejum de leucina. Esses dados sugerem que a suplementação com leucina, quando adicionada à dieta ou à água de beber, não é capaz de alterar as concentrações plasmáticas de leucina no estado de jejum. Todavia, na condição alimentada, as concentrações plasmáticas de leucina estão elevadas em animais suplementados via água de beber.

Dessa forma, parece que a leucina exerce efeitos positivos na homeostase da glicose em modelos de resistência à insulina e obesidade induzidas por dieta. Contudo, esses efeitos são condicionados à intervenção concomitante com leucina durante a indução do distúrbio metabólico e à dose mínima (> 90 mg/dia) capaz de aumentar, de forma transitória, as concentrações circulantes desse aminoácido para produzir seus efeitos biológicos.

1.2 JUSTIFICATIVA

A obesidade e o sobrepeso, somados, estão presentes em mais de 50% da população mundial. No Brasil, os dados levantados pelo Sistema de Vigilância por Inquérito

Telefônico (VIGITEL) relatam que nas 26 capitais brasileiras mais o Distrito Federal, a frequência de excesso de peso é de cerca de 54%. A obesidade é um forte fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas não-transmissíveis, tais como câncer, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares. Nesse contexto, a resistência periférica à insulina é um quadro clínico que precede em anos o diagnóstico de DM2.

Os mecanismos da redução nas ações da insulina ainda não são totalmente descritos, contudo, dados na literatura sugerem a participação direta das mitocôndrias nesse contexto. Dessa forma, compreender as alterações mitocondriais durante o desenvolvimento da RI possibilita complementar as informações disponíveis no que diz respeito aos fatores causais dessa condição. Essas informações auxiliarão na compreensão dos desfechos mitocondriais quando a resistência à insulina já está instalada. Adicionalmente, os efeitos da insulina sobre a função mitocondrial têm sido praticamente ignorados ao longo dos anos, o que sugere que alterações mitocondriais poderiam reduzir as ações celulares da insulina, mas também que a RI poderia produzir as alterações mitocondriais observadas. Compreender os fenômenos em ambos os sentidos certamente apresentará uma nova perspectiva sobre a participação dessa organela no desenvolvimento da resistência à insulina.

Além disso, as mitocôndrias são altamente responsivas às alterações no estilo de vida, como sedentarismo, exercício e fatores nutricionais. Portanto, conhecer como fatores nutricionais podem modular a função mitocondrial em cenários de obesidade pode prover estratégias não farmacológicas para melhorar a condição de vida dos indivíduos resistentes à insulina.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 **Objetivo geral**

- Investigar os efeitos da insulina, leucina e dieta hiperlipídica sobre a fisiologia mitocondrial do músculo esquelético.

1.3.2 **Objetivos específicos**

- Avaliar a sequência das alterações mitocondriais no músculo sóleo durante o desenvolvimento da resistência à insulina associada à obesidade.
- Analisar a responsividade mitocondrial à insulina no músculo esquelético.
- Investigar os efeitos agudos *in vitro* da leucina sobre a respiração mitocondrial no músculo sóleo.

- Averiguar os efeitos crônicos *in vivo* da leucina sobre a homeostase glicêmica e respiração mitocondrial.

1.4 HIPÓTESES

H₀ – As alterações da função mitocondrial não ocorrem antes do aparecimento da resistência à insulina.

H₁ – As alterações mitocondriais ocorrem antes do aparecimento da resistência à insulina.

H₀ – A exposição aguda a leucina não altera a respiração mitocondrial.

H₁ – A exposição aguda a leucina altera a respiração mitocondrial

H₀ – A exposição crônica a leucina não previne a disfunção mitocondrial induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica.

H₁ – A exposição crônica a leucina previne a disfunção mitocondrial induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica.

H₀ – O aumento agudo da insulinemia não altera a função mitocondrial no músculo esquelético.

H₁ – O aumento agudo da insulinemia altera a função mitocondrial no músculo esquelético.

CAPÍTULO II – ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA RESISTÊNCIA À INSULINA

2.1 INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como um acúmulo excessivo de tecido adiposo e está associada com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, determinados tipos de câncer, e DM2 (GONZÁLEZ-MUNIESA, MÁRTINEZ-GONZÁLES et al., 2017). A RI, que é caracterizada pela redução da resposta celular aos efeitos da insulina, é um fator fundamental nos estágios iniciais do DM2 (DEFRONZO, 2009). Dado que o músculo esquelético é responsável por uma proporção significativa da captação de glicose induzida pela insulina (KELLEY et al., 1988; PETERSEN et al., 2007), o desenvolvimento da RI no músculo esquelético durante a obesidade é uma área de intensa investigação.

Dados sugerem que a função mitocondrial no músculo esquelético desempenha um papel fundamental no desenvolvimento das disfunções metabólicas associadas à obesidade. De fato, pacientes portadores de DM2 e obesos com RI têm alterações na função mitocondrial no músculo esquelético, tais como redução no conteúdo mitocondrial (BOUSHEL et al., 2007), alterações na dinâmica e estrutura mitocondrial e redução na expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial (SPARKS et al., 2005). Redução na fosforilação oxidativa (OXPHOS) (FABBRI et al., 2017; MOGENSEN et al., 2007; VAN DE WEIJER et al., 2013) e na atividade de enzimas relacionadas à função mitocondrial é frequentemente observada nessa população (KELLEY et al., 2002; RITOV et al., 2010). Além disso, obesos portadores de RI e DM2 apresentam no músculo esquelético taxas mais altas de produção de EROs e/ou prejuízos nas defesas antioxidantes (LEFORT et al., 2010; PHIELIX et al., 2014). Nesse contexto, estresse oxidativo têm sido implicado na gênese da RI associada com a obesidade (ANDERSON et al., 2009; BARBOSA et al., 2013).

Embora a disfunção mitocondrial seja observação frequente em condições crônicas de DM2 e obesidade, estudos examinando a função dessa organela em intervenções curtas têm produzido resultados inconsistentes. A exposição à dieta hiperlipídica é capaz de aumentar marcadores de biogênese (HANCOCK et al., 2008) e conteúdo mitocondrial em roedores (TURNER et al., 2007). Em humanos, uma refeição com alto teor de lipídios (63% das calorias oriundas da dieta) aumentou a expressão do receptor ativado por PPAR- γ , do PGC-1 α e NADH desidrogenase (ANDERSON et al., 2016). Além disso, infusão de lipídios por 8 h foi capaz de reduzir o potencial de

membrana mitocondrial em humanos saudáveis (CHAVEZ et al., 2010). Três dias ou duas semanas de exposição à dieta hiperlipídica reduziu a taxa de produção de ATP pelas mitocôndrias de camundongos (BOUDINA et al., 2012; DIDIER et al., 2007). De fato, exposição à dieta hiperlipídica é capaz de aumentar a expressão de proteínas desacopladoras no músculo esquelético de camundongos com obesidade induzida por dieta (PINHO et al., 2017; TURNER et al., 2007), o que poderia explicar a redução no potencial de membrana e na produção de ATP. Esses dados sugerem que distintas alterações nas respostas mitocondriais poderiam ocorrer durante o desenvolvimento dos prejuízos metabólicos induzidos pela obesidade. De forma interessante, existem poucos estudos pré-clínicos avaliando as adaptações na respiração mitocondrial e emissão de EROs durante o desenvolvimento da obesidade e RI relacionadas à sobrecarga calórica (ANDERSON et al., 2009; BONEN et al., 2015b; DIDIER et al., 2007). Adicionalmente, nenhum dos estudos citados avaliou a interação entre a RI, respiração mitocondrial e produção de EROs no desenvolvimento da obesidade em camundongo. A descrição da sequência completa de eventos, principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento da obesidade, é importante para revelar o papel das mitocôndrias na resistência à insulina.

O objetivo do presente estudo foi examinar se a respiração, emissão de EROs e conteúdo mitocondrial, seriam alterados previamente às alterações sistêmicas ou *in vitro* na responsividade à insulina durante o desenvolvimento da obesidade. A hipótese inicial foi que a função mitocondrial seria alterada antes de qualquer prejuízo detectável na responsividade do sóleo à insulina. Para responder essa questão, nós investigamos as alterações na respiração mitocondrial ao longo do tempo, emissão de EROs e responsividade mitocondrial à insulina em fibras permeabilizadas do músculo sóleo de camundongos durante o desenvolvimento da obesidade e RI. Foi encontrado que a obesidade induzida por dieta reduz a respiração e a responsividade mitocondrial à insulina antes de uma redução detectável no conteúdo dessas organelas. Adicionalmente, o perfil de emissão de H_2O_2 nos estágios iniciais da obesidade induzida por dieta é diferente daqueles encontrados quando a resistência à insulina está estabelecida. Essas alterações ocorrem antes do aparecimento de prejuízos metabólicos causados pela obesidade no músculo esquelético sóleo.

2.2 MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Catarina sob o protocolo número 6191300316.

2.2.1 Desenho experimental

Camundongos Swiss machos, com 5 semanas de idade, foram utilizados nesse estudo. Os camundongos provenientes do Biotério Central da UFSC chegaram ao biotério setorial com 35 dias de vida. Após 5 dias de ambientação, iniciaram os procedimentos experimentais. Esse desenho foi construído com o objetivo de observar a sequência de eventos no que tange à função mitocondrial e à homeostase glicêmica. Os camundongos foram divididos em dois grupos, um recebeu dieta padrão (CTL) (Nuvilab CR-1; Nuvital, Colombo, PR, Brasil) e o outro recebeu dieta hiperlipídica e hipercalórica com 60% de calorias oriundas da gordura (HFD, do inglês *high-fat diet*) (PragSoluções Bioscience n-60, Jaú, SP, Brasil) (CINTRA et al., 2012). Ambos os grupos tiveram acesso a água e ração *ad libitum*. Os grupos CTL e HFD foram avaliados por três períodos distintos de exposição à dieta: um grupo foi eutanasiado com 7 dias de tratamento; o segundo grupo foi eutanasiado com 14 dias de tratamento; por fim, o terceiro grupo foi eutanasiado com 28 dias de tratamento. Para evitar discrepâncias quanto ao tempo de tratamento e estresse dos camundongos, os experimentos de caracterização metabólica (ipGTT, ipITT e estimulação da glicogênese muscular), foram realizados em animais diferentes. Todos os experimentos foram realizados de forma não cega. Ao final de cada período de exposição à dieta, foram realizados testes metabólicos *in vivo* e protocolos de função mitocondrial *in vitro*. Lotes separados foram utilizados para diferentes abordagens.

2.2.2 Caracterização murinométrica

Os camundongos tiveram a massa corporal e a ingesta calórica verificada no início do tratamento e a cada 3 dias durante o protocolo experimental. Ao final do tratamento, após a eutanásia, os camundongos foram dissecados para pesagem do fígado, tecido adiposo peri-epididimal e retroperitoneal, rins, coração, baço, sóleo e gastrocnêmio. A eficiência energética foi calculada conforme equação:

$$\text{Eficiência energética} = \delta \text{ massa corporal (g)} / \text{consumo calórico (kcal)}.$$

2.2.3 Avaliação da tolerância à glicose *in vivo* (ipGTT)

A avaliação da tolerância à glicose foi realizada com os camundongos em jejum (5 h) não anestesiados. No período vespertino, às 13 horas, os camundongos tiveram a extremidade da cauda seccionada para a coleta de 2 gotas de sangue. A primeira gota foi descartada e a segunda utilizada para determinação da glicemia no tempo 0. Imediatamente após a coleta do sangue de jejum, foi administrada solução de glicose 50% (2 g/kg de peso corpóreo) via intraperitoneal e foram coletadas amostras de sangue da cauda dos camundongos em 15, 30, 60 e 120 min para determinação das concentrações de glicose sanguínea (Andrikopoulos et al., 2008).

2.2.4 Avaliação da responsividade à insulina *in vivo* (ipITT)

Os camundongos foram submetidos ao teste de responsividade à insulina às 8 horas da manhã, na condição alimentado. Insulina humana recombinante (Humulin® Lilly, Indianapolis, IN, USA) equivalente a 1 U/kg de peso corpóreo foi injetada intraperitonealmente imediatamente após verificação da glicemia basal (tempo 0). Uma gota de sangue, proveniente da extremidade caudal, foi descartada e outra utilizada para dosagem das concentrações de glicose sanguínea nos tempos 5, 10, 15 e 20 e 60 min por meio de um glicosímetro (AccuChek Performa, Roche Diagnóstico, SP, Brasil). A constante de decaimento de glicose (k) foi calculada a partir do *slope* da linha de regressão linear obtida com valores de glicose log-transformadas entre 0 e 25 min (PROTZEK et al., 2014; RAZOLLI et al., 2015).

2.2.5 Estimulação da glicogênese muscular

Os camundongos permaneceram em jejum por 5 horas e então foram pesados e a glicemia de jejum foi coletada nos mesmos períodos descritos para o ipGTT. Após a coleta da glicemia basal, uma solução de glicose 50% foi injetada intraperitonealmente, na concentração de 2 g/kg). Quinze minutos após a injeção de glicose, a glicemia foi mensurada e após essa etapa, uma injeção de insulina 1 U/kg foi aplicada no peritônio dos camundongos. No 45º minuto de experimento (30 minutos após a injeção de insulina), os camundongos foram eutanasiados e o sóleo foi rapidamente removido, inserido em nitrogênio líquido e mantido em -80°C até a determinação do conteúdo de glicogênio muscular.

A determinação do conteúdo de glicogênio muscular foi realizada de acordo com Lo Siu et al., (1970) com pequenas modificações. As amostras de músculo foram

transferidas para microtubos com 4 vezes a massa de KOH 30% e fervidas por 1 hora até a digestão completa do tecido. Uma solução de Na₂SO₄ foi adicionada para precipitação do glicogênio com etanol. As amostras foram centrifugadas à 400 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o glicogênio dissolvido em água 37°C. Uma segunda lavagem foi realizada com etanol, centrifugada e o pellet restante foi diluído em água destilada. O conteúdo de glicogênio foi mensurado pela reação da amostra com o reagente fenol em H₂SO₄ na água fervente por 15 minutos. Uma curva padrão foi feita utilizando glicose de 1 mg/dL até 10 mg/dL. A absorbância foi configurada em 490nm e lida em um espectrofotômetro da marca Spectramax ® Paradigm (CA, USA).

2.2.6 Caracterização bioquímica

A glicemia de jejum dos camundongos foi mensurada às 16 horas da tarde, após a remoção da oferta de ração por 5 horas em todos os camundongos antes do início do tratamento e ao final de cada um dos 3 períodos. Um pequeno corte na cauda do animal foi feito com uma tesoura, a primeira gota de sangue foi descartada e a segunda utilizada para dosagem automática das concentrações de glicose por meio de um glicosímetro (AccuChek Performa, Roche Diagnóstico, SP, Brasil).

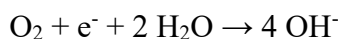
Após cada período de tratamento, os camundongos permaneceram em jejum por 4-5 horas, foram sedados com isoflurano e foi realizada uma punção cardíaca para coleta do sangue total em tubos contendo EDTA. Após esse procedimento, foi realizado deslocamento cervical para confirmação da morte dos mesmos e remoção dos tecidos para mensuração da massa e armazenagem (quando pertinente). O plasma foi obtido pelo método de separação por centrifugação (10 min 5000 g, temperatura ambiente). A dosagem do colesterol e do triacilglicerol plasmático foi realizada por kit comercial pelo método colorimétrico enzimático e lida em 505 nm no espectrofotômetro Spectramax® Paradigm (CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante (Biotécnica®, Varginha, MG, Brazil). Insulina plasmática de jejum foi dosada com o kit AlphaLisa de acordo com as instruções do fabricante (Perkin-Elmer). Brevemente, *beads* aceptores Alphalisa anti-analito (10 µg/mL) foi conjutado com o anticorpo anti-analito biotilado (1 nM), e 5µL de plasma foram incubados por 60 minutos. *Beads* doadores com streptavidina (40 µg/mL) foram adicionados e a placa de 96 poços foi incubada à temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. Após esse período a placa foi lida em um leitor Enspire (PerkinElmer) usando o protocolo AlphaScreen.

2.2.7 Respirometria de alta resolução

A função mitocondrial foi estudada em fibras musculares permeabilizadas. As fibras do músculo sóleo dos camundongos foram permeabilizadas utilizando saponina. A técnica de permeabilização de fibras foi escolhida porque, comparada ao método de isolamento de mitocôndrias, essa técnica permite a preservação das conexões com outras organelas celulares (i. e. lisossomos e peroxissomos), morfologia, degradação da matriz proteica, além de exigir menor quantidade de amostra (KUZNETSOV et al., 2008).

2.2.8 Preparação das fibras musculares permeabilizadas

Respirometria é a mensuração quantitativa da respiração. A respirometria provê uma abordagem indireta para mensurar alterações metabólicas, por meio da variação nas concentrações de oxigênio (O₂), com consequente produção de dióxido de carbono (CO₂). A base para esse tipo de mensuração baseia-se na utilização do eletrodo de Clark. O eletrodo de Clark é um eletrodo que mede o O₂ em uma superfície de platina utilizando a reação que segue:



Seu funcionamento se baseia em uma membrana de platina exposta e de uma membrana que reduz o O₂. O compartimento do eletrodo é isolado da câmara de reação por uma fina membrana de Teflon. Essa membrana é permeável ao oxigênio molecular e permite ao gás reagir com o cátodo, onde é eletroliticamente reduzido. A redução permite uma corrente fluir, isso cria uma diferença de potencial que é gravada. Dessa forma a atividade do O₂ pode ser medida. O fluxo de corrente é proporcional à atividade do O₂ no meio de reação. O meio de reação é um compartimento hermeticamente isolado, permitindo assim detecções de pequenas variações nas concentrações de O₂ do meio.

Após a excisão, o músculo sóleo foi imerso imediatamente em tampão BIOPS, constituído por EGTA 10 mM, MgCl₂ 6,56 mM, ATP 5,77 mM, fosfocreatina 15 mM, pH 7,1. As fibras musculares foram separadas no tampão BIOPS, no gelo, utilizando duas pinças não-magnetizadas. Após esse procedimento as fibras foram colocadas em 2 mL de tampão BIOPS, 4°C, com saponina 50 µg/mL por 30 minutos. Após a permeabilização, as fibras foram lavadas duas vezes por 5 minutos cada em meio de respiração constituído por sacarose 320 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 4 mM, KH₂PO₄ 5 mM, TrisHCl 10 mM e BSA/FF 1 mg/mL (BRUNETTA et al., 2018; CAVALCANTI-DE-ALBUQUERQUE et al., 2014). Após as lavagens, as fibras foram inseridas em câmaras do oxígrafo Oroboros

(Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) para avaliação dos parâmetros mitocondriais descritos abaixo.

2.2.9 Avaliação da respiração mitocondrial pelo protocolo SUIT

As fibras musculares do sóleo dos animais submetidos ao teste de tolerância à insulina (em torno de 1,5-2,5 mg) foram secadas em filtro de papel, pesadas e inseridas no oxígrafo da marca Oroboros (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) com 2 mL de tampão de respiração à 37°C. Para acessar o fluxo de O₂ os substratos foram adicionados na seguinte ordem: piruvato 5 mM, malato 5 mM, ADP 3 mM, succinato 10 mM, oligomicina 2 µg/mL, antimicina A 1 mM. Cada etapa foi espaçada por um período de estabilização entre as injeções. Os dados obtidos foram extraídos e analisados pelo software DatLab (Oroboros Instruments).

2.2.10 Sensibilidade aparente ao ADP

Em um grupo separado de animais, a sensibilidade aparente ao ADP foi determinada por adições subseqüentes de ADP nas seguintes concentrações: 12,5; 25; 50; 100; 250; 500; 1000; 2000 e 4000 µM (PERRY et al., 2012). Fluxo basal foi mensurado com as mitocôndrias energizadas com piruvato/malato 5mM. O K_m aparente ao ADP foi determinado por meio da equação de cinética enzimática de Michaelis-Menten, sendo que $Y = V_{max} * X / (K_m + X)$, onde X é [ADP livre] e Y é J_{O_2} em [ADP livre]. As equações foram realizadas pelo software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

A linearização de Lineweaver-Burk foi calculada usando a equação, $Y = 1 / J_{O_2}$ [pmol/(s * mg)] e $X = 1/[ADP livre]$. É importante destacar que valores para $Y = 0$ e $Y = -0,025$ foram extrapolados da reta obtida após a linearização, portanto são valores preditos e não mensurados.

2.2.11 Emissão mitocondrial de H₂O₂

Emissão mitocondrial de H₂O₂ foi mensurada como estimativa da produção de ROS por meio da taxa de produção de resorufin, que é o produto da reação do H₂O₂ e do AmplexRed catalisada pela enzima peroxidase. A mensuração da fluorescência foi realizada no fluorímetro Cary Eclipse Fluorescence Spectrofotometer (Varian Instruments, Mulgrave, Victoria, Austrália), com excitação em 563nm e emissão em 587nm. As mensurações foram realizadas após a adição dos seguintes substratos:

piruvato/malato 5 mM, succinato 20 mM, ADP 3 mM, oligomicina 1 µg/mL, trifluoro-carbonilcianida fenilhidrazona (FCCP) 50 nM e Antimicina A 10 mM. Uma curva padrão foi realizada utilizando uma solução estoque de H₂O₂ adicionando a cada pulso 30 pM (concentração final). A taxa específica de produção de H₂O₂ foi determinada utilizando uma regressão linear por meio do software Origin 8.0. Emissão de H₂O₂ é expressa em pmol/(min*mg) (RAMOS-FILHO et al., 2015). É importante sublinhar que todos os experimentos de emissão mitocondrial de EROs e estimulação com insulina foram realizados em um grupo separado de animais.

2.2.12 Fração de vazamento de elétrons

Para determinar a produção de H₂O₂ pelo fluxo de O₂ de cada fibra, foi utilizado o JO₂ da respiração e a emissão de H₂O₂ para cada condição compatível, como segue elétron *leakage* = emissão H₂O₂ [pmol/(min*mg)] / JO₂ [pmol/(s * mg)]. Ambos os valores foram previamente normalizados pela quantidade de tecido utilizada no experimento. É importante destacar que diferentes grupos de fibras foram utilizados para cada avaliação.

2.2.13 Estimulação *ex vivo* com insulina

Amostras de músculo (~2,5 mg) foram removidas dos camundongos e transferidas imediatamente para o tampão BIOPS. Os músculos foram incubados na presença de insulina 40 nM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA), no gelo, por 1 hora. Após esse período as fibras foram permeabilizadas utilizando saponina (50 µg/mL) durante 30 minutos, lavadas em tampão Mir05 duas vezes por 10 minutos e levadas ao oxígrafo para determinação da respiração mitocondrial (PHIELIX et al., 2014).

2.2.14 Atividade da enzima citrato sintase

Amostras do sóleo foram homogeneizadas em tampão de lise utilizando um Ultra Turrax T18 (IKA, Werke Staugen, Alemanha). Após 30 minutos no gelo, o tecido lisado foi centrifugado (14000g, 30 min, 4°C). O meio de reação utilizado para o ensaio de atividade da enzima citrato sintase foi Tris-HCl 20 mM, pH 8, acetil-CoA 0,4 mM, DTNB 0,1 mM e 10 µg de proteína total. O meio, os reagentes e as amostras foram incubadas a 37°C por 5 minutos. A reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato 0,5 mM. A redução de 5',5'-ditiobis (ácido nitrobenzoico) pela enzima citrato sintase foi mensurada espectrofotometricamente por 5 minutos em 412nm. Atividade é expressa como citrato

($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) (CAVALCANTI-DE-ALBUQUERQUE et al., 2014). É importante sublinhar que a atividade da enzima citrato sintase foi medida em um lote separado de animais, os mesmos animais em que o conteúdo proteico de enzimas da cadeia respiratória foi determinado por *western blotting*.

2.2.15 Determinação do conteúdo proteico

Amostras de todo o sóleo (cerca de 20 mg) e 40 mg de fígado foram homogeneizados em tampão de lise (EDTA 10mM, Tris-Base 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM e fluoreto fenilmetasulfonil 2 mM) e centrifugados por 30 min à 10.000 r.p.m., 4°C. A concentração de proteínas das amostras foi mensurada pela reação das mesmas com o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250, com kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad) (BRADFORD, 1976), e carregados igualmente para IDE 1:500 (Abcam), β -actina 1:10000 (Abcam) e MitoProfile Total OXPHOS 1:1000 (MitoSciences Abcam). As proteínas foram separadas por SDS-PAGE gel, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas em solução de bloqueio (2h em temperatura ambiente em tampão Tris contendo leite 5%). Após o bloqueio, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo primário (em TBTS com leite 3%) *overnight* em 4°C sob agitação contínua. Na manhã seguinte, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário (em TBTS com leite 1%) por 2 horas e lidas (RAFACHO et al., 2013). As proteínas de interesse foram detectadas por luminescência (ECL) por meio de um fotodocumentador ChemiDoc (BioRad). As imagens foram analisadas utilizando o Software ImageLab da BioRad Systems®.

2.2.16 Tratamento estatístico

2.2.16.1 Cálculo amostral

De acordo com os experimentos planejados e os critérios estatísticos adotados, os camundongos foram utilizados em uma sequência de eventos pré-determinada em que um experimento esteve em função do resultado do outro. Adicionalmente, existem experimentos que tem efeito substancial no resultado ou execução de outros, esse tipo de viés inviabiliza a utilização do mesmo animal em alguns casos, exigindo a realização de lotes extras.

Para confiança estatística dos dados gerados, um cálculo amostral foi realizado baseado em testes prévios em nosso laboratório diante dos parâmetros fisiológicos mais importantes, como glicemia de jejum, área sob a curva do teste de tolerância à glicose e a constante de decaimento do teste de responsividade à insulina. O cálculo utilizado para determinação amostral é número de camundongos = $\{[(z_A + z_B) * s] / D\}^2$. Sendo que A é considerado o erro α , que é a probabilidade aceitável de encontrar uma diferença estatística quando ela não existe. O erro α foi fixado em 0,05, sendo que o valor de z obtido na tabela para hipóteses bi-caudais é 1,96. B é considerado um erro do tipo 2, que é a probabilidade aceitável de não encontrar diferença estatística quando ela existe. O erro β foi fixado em 0,10, sendo que o valor de B obtido na tabela de valores de z é 1,82. S é o desvio-padrão para as variáveis estudadas, diante dos estudos oriundos de nosso laboratório, o valor de s ficou estabelecido em 20%. D é a diferença entre as médias ou proporções das variáveis mensuradas, sendo 25% o valor fixado para esse estudo. Resolvendo o cálculo tem-se $n = \{[(1,96+1,28) * 20] / 25\}^2 = \sim 7 + 10\%$ para potenciais perdas amostrais = 7,7 = 8 por grupo.

2.2.16.2 Análise dos dados

Os dados estão apresentados como média \pm desvio-padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil de acordo com a distribuição Gaussiana dos mesmos. Os dados foram considerados simétricos quando obtivessem respostas positivas para dois dos três testes que seguem: 1) diferença menor que 10% entre média e mediana; 2) coeficiente de variação $< 25\%$, sendo que Coeficiente de variação = $((\text{desvio-padrão} / \text{média}) * 100)$ e 3) $P < 0,05$ para o teste de Shapiro-Wilk.

Para testar a diferença entre os grupos foi utilizado o Teste t de Student para amostras não pareadas, ou teste de Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados. Para as incubações *ex vivo* (insulina, leucina e rapamicina), foi utilizado o teste t de Student para amostras pareadas. Todos os testes tiveram diferença significativa aceita quanto o erro α foi menor que 5% ($P < 0,05$). O software GraphPad Prism, versão 6.0 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para as abordagens descritas.

2.3 RESULTADOS

A massa corporal total ao final dos 7 dias de tratamento não foi diferente entre os grupos tratados com dieta hiperlipídica e dieta controle, contudo, o ganho de massa nesse período foi maior no grupo HFD ($P < 0.05$; Tabela 1). O exposto à dieta hiperlipídica

consumiu 18% menos calorias nos 7 dias de exposição. Por outro lado, quando os camundongos foram tratados por 14 e 28 dias, os mesmos consumiram em torno de 10% mais calorias que o grupo controle, resultando em ganho diferenciado de massa corporal que os seus respectivos grupos controle. A eficiência calórica foi 1,6 e 3,0 vezes maior nos grupos que consumiram dieta hiperlipídica nos três períodos observados. Adicionalmente, houve um significativo aumento, em torno de 90-100%, na massa de tecido adiposo (depósitos periepididimal, retroperitoneal, subcutâneo e interescapular) nos grupos que consumiram dieta hiperlipídica.

O perfil lipídico plasmático foi avaliado durante o desenvolvimento da obesidade nesses camundongos (Tabela 2). As concentrações circulantes de colesterol total estiveram aumentadas em torno de 32% após 14 dias de consumo de HFD, e permaneceram elevadas nos camundongos tratados com essa dieta por 28 dias. Nesse modelo, não foram encontradas alterações nas concentrações plasmáticas de triacilglicerol. A glicemia de jejum foi similar entre os grupos em todos os períodos observados (Tabela 2). Contudo, houve um aumento nas concentrações circulantes de insulina no período de jejum após 7 dias de consumo da dieta hiperlipídica. Esses valores permaneceram elevados até o final do período observado.

Tabela 1 – Dados de caracterização murinométrica dos camundongos expostos por 7, 14 e 28 dias à dieta hiperlipídica

	Duração da dieta					
	7 dias		14 dias		28 dias	
	CTL	HFD	CTL	HFD	CTL	HFD
Massa inicial (g)	35,7 ± 1,3	34,0 ± 2,8	35,3 ± 2,6	35,4 ± 2,8	35,5 ± 2,4	35,9 ± 2,9
Massa final (g)	38,2 ± 2,1	39,1 ± 4,6	41,2 ± 3,5	46,2 ± 4,6*	46,1 ± 4,0	57,0 ± 5,9***
Δ massa (g)	2,0 [1,0 – 3,5]	5,0 [3,8 – 7,0]*	5,9 ± 1,8	10,8 ± 2,5*	10,6 ± 2,2	21,1 ± 4,9***
Consumo calórico [@] (kcal/dia/animal)	25,7 ± 1,4	21,6 ± 2,5***	19,5 ± 1,6	21,6 ± 2,1*	19,5 ± 1,6	21,5 ± 2,2*
Eficiência calórica [§]	0,011 [0,006-0,018]	0,033 [0,026-0,042]*	0,021 ± 0,005	0,035 ± 0,005*	0,019 ± 0,002	0,034 ± 0,005*
TA periepididimal [%]	17,1 ± 3,8	39,9 ± 10,1*	18,2 ± 6,2	38,8 ± 8,8*	15,0 ± 6,9	37,4 ± 8,2*
TA retroperitoneraral [%]	8,8 ± 2,7	19,7 ± 5,3*	10,6 ± 5,2	24,7 ± 6,2*	18,5 ± 8,7	44,1 ± 11,9*
TA subcutâneo [%]	7,5 ± 1,3	21,4 ± 1,8****	11,2 ± 2,2	24,2 ± 1,2****	5,5 ± 2,2	24,3 ± 7,3***
TA interescapular [%]	10,9 ± 0,6	19,8 ± 1,4****	18,1 ± 3,1	29,1 ± 3,5***	8,3 ± 3	21,1 ± 3,6***
Massa do fígado [%]	46,7 ± 1,4	51,6 ± 8,4	47,8 ± 5,0	48,2 ± 4,6	47,9 ± 6,5	48,6 ± 8,1
Massa dos rins [%]	13,1 ± 1,2	13,5 ± 1,3	15,2 ± 2,5	12,5 ± 1,2	14,2 ± 0,9	11,5 ± 1,8*
Massa do coração [%]	4,1 ± 0,3	3,9 ± 0,2	4,5 ± 0,3	3,0 ± 0,5***	4,4 ± 0,5	4,1 ± 0,8

CTL = grupo controle; HFD = grupo *high-fat diet*. Valores apresentados em média ± 1 desvio-padrão ou mediana [intervalo interquartil]. N = 9-10/grupo. [§] Eficiência calórica = Δ massa (g) / consumo calórico (kcal). TA = tecido adiposo; [@] kcal/animal/dia. [%] mg/g; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001 em relação ao respectivo grupo controle.

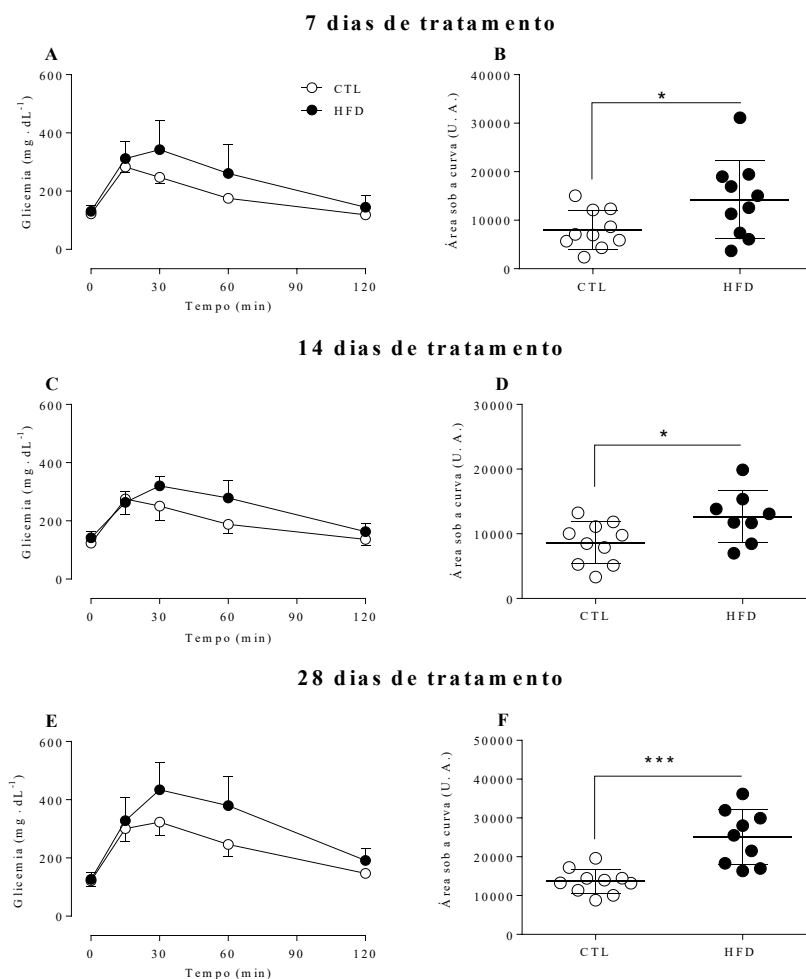
Tabela 2 – Caracterização bioquímica dos camundongos expostos por diferentes períodos à dieta hiperlipídica.

	Duração da dieta					
	7 dias		14 dias		28 dias	
	CTL	HFD	CTL	HFD	CTL	HFD
Glicemia de jejum inicial (mg/dL)	104 ± 10	125 ± 28	128 ± 27	120 ± 11	135 ± 18	121 ± 10
Glicemia de jejum final (mg/dL)	122 ± 14	131 ± 21	123 ± 17	140 ± 19	121 ± 21	126 ± 24
Glicemia alimentado (mg/dL)	140 ± 17	170 ± 22*	141 ± 10	160 ± 14**	151 ± 23	162 ± 16
Insulinemia de jejum (ng/mL)	0,12 ± 0,0	0,63 ± 0,1***	0,12 ± 0,06	1,10 ± 0,01****	0,16 ± 0,01	1,20 ± 0,09****
Triaciglicerol (mg/dL)	157 ± 10	146 ± 7	140 ± 3	138 ± 7	139 ± 8	131 ± 4
Colesterol total (mg/dL)	132 ± 18	148 ± 11	127 ± 4	168 ± 18**	133 ± 19	176 ± 21**

CTL = grupo controle; HFD = grupo *high-fat diet*. Valores apresentados em média ± 1 desvio-padrão. N = 9-10/grupo. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001 em relação ao respectivo grupo controle.

A homeostase da glicose foi avaliada por meio de três protocolos experimentais. No teste de tolerância à glicose, por via intraperitoneal, houve um prejuízo no controle da glicemia após 7 dias de consumo de dieta hiperlipídica, que permaneceu alterado por 14 e 28 dias de tratamento (Figura 2A, C e E). Os efeitos da dieta hiperlipídica podem ser mais bem observados pela análise da área sob a curva, que se mostrou >30% para todos os períodos avaliados (Figura 2B, D e F).

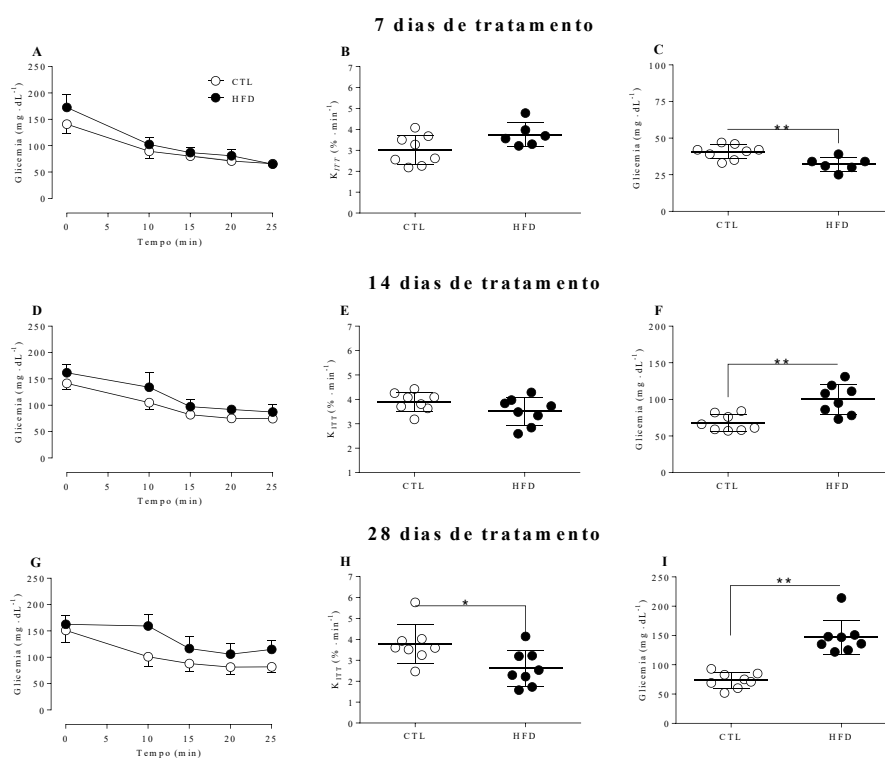
Figura 2 – Teste de tolerância à glicose nos camundongos expostos à HFD por 7, 14 e 28 dias.



Círculos brancos representam os camundongos controle (CTL); círculos pretos representam os camundongos expostos à dieta hiperlipídica (HFD). Valores apresentados em média \pm 1 desvio padrão nos gráficos A, C e E. Valores apresentados individualmente com indicação da média \pm 1 desvio padrão do grupo nos gráficos B, D e F. Gráficos A, C e E = dinâmica da glicose sanguínea durante o teste. Gráficos B, D e F = área sob a curva da glicemia durante o teste. Gráficos A/B, C/D e E/F representam os camundongos tratados por 7, 14 e 28 dias, respectivamente. * $P < 0,05$. *** $P < 0,001$. Fonte: o autor.

Em resposta à uma injeção de insulina, não houve diferença no decaimento de glicose entre os grupos após 7 ou 14 dias de tratamento (Figura 3A-F). Contudo, após 28 dias de consumo de dieta hiperlipídica, houve uma redução no decaimento da glicose nesses camundongos (Figura 3G). Esse prejuízo na ação da insulina pode ser melhor observado pelo cálculo da constante de decaimento da glicose, que se mostrou em torno de 30% menor após 28 dias de consumo de HFD (Figura 3H). De forma interessante, quando as concentrações sanguíneas de glicose foram medidas 60 minutos após a injeções de insulina, o grupo que consumiu HFD por 7 dias apresentou menores valores de glicemia (Figura 3C). Contudo, esse efeito desapareceu após 14 dias de consumo de dieta hiperlipídica (Figura 3F) e se mostrou aumentado após 28 dias de tratamento (Figura 3I).

Figura 3 – Teste de responsividade à insulina nos camundongos expostos à HFD por 7, 14 e 28 dias.



Círculos brancos representam os camundongos pertencentes ao grupo controle; círculos pretos representam os camundongos expostos à dieta hiperlipídica. Valores apresentados em média \pm 1 desvio padrão nos gráficos A, D e G. Valores apresentados individualmente com indicação da média \pm 1 desvio padrão do grupo nos gráficos B, C, E, F, H e I. Gráficos A, C e E = comportamento da glicemia durante o teste para os camundongos tratados por 7, 14 e 28 dias, respectivamente. Gráficos B, E e H = constante de decaimento da glicose de 0 a 25 minutos do teste para os camundongos tratados por 7, 14 e 28 dias, respectivamente. Gráficos C, F e I = glicemia 60 minutos após a injeção de insulina para os camundongos tratados por 7, 14 e 28 dias, respectivamente. * P<0,05. *** P<0,001. Fonte: o autor.

Para investigar a participação do músculo sóleo na homeostase da glicose, foi utilizado um protocolo de sobrecarga de glicose e insulina para avaliar a capacidade desse tecido em estocar glicose na forma de glicogênio (Figura 4). Após 7 dias de consumo de HFD, os camundongos apresentaram um aumento no conteúdo de glicogênio muscular após a estimulação com glicose/insulina na mesma magnitude dos camundongos controle (Figura 4A). Nesse cenário, o conteúdo muscular de glicogênio permaneceu ~0,07-0,08 mg/100 mg de tecido maior após o estímulo quando comparado com as condições em jejum em ambos os grupos. Após o consumo de HFD por 14 e 28 dias, os camundongos foram incapazes de aumentar o conteúdo de glicogênio muscular após a estimulação com glicose/insulina (Figura 4C e 4E). É importante frisar que após 28 dias de consumo de HFD, os camundongos apresentaram redução no desaparecimento de glicose sanguínea quando comparados com o grupo controle (Figura 4F).

Figura 4 – Conteúdo de glicogênio muscular em jejum e sob estimulação de glicose e insulina.

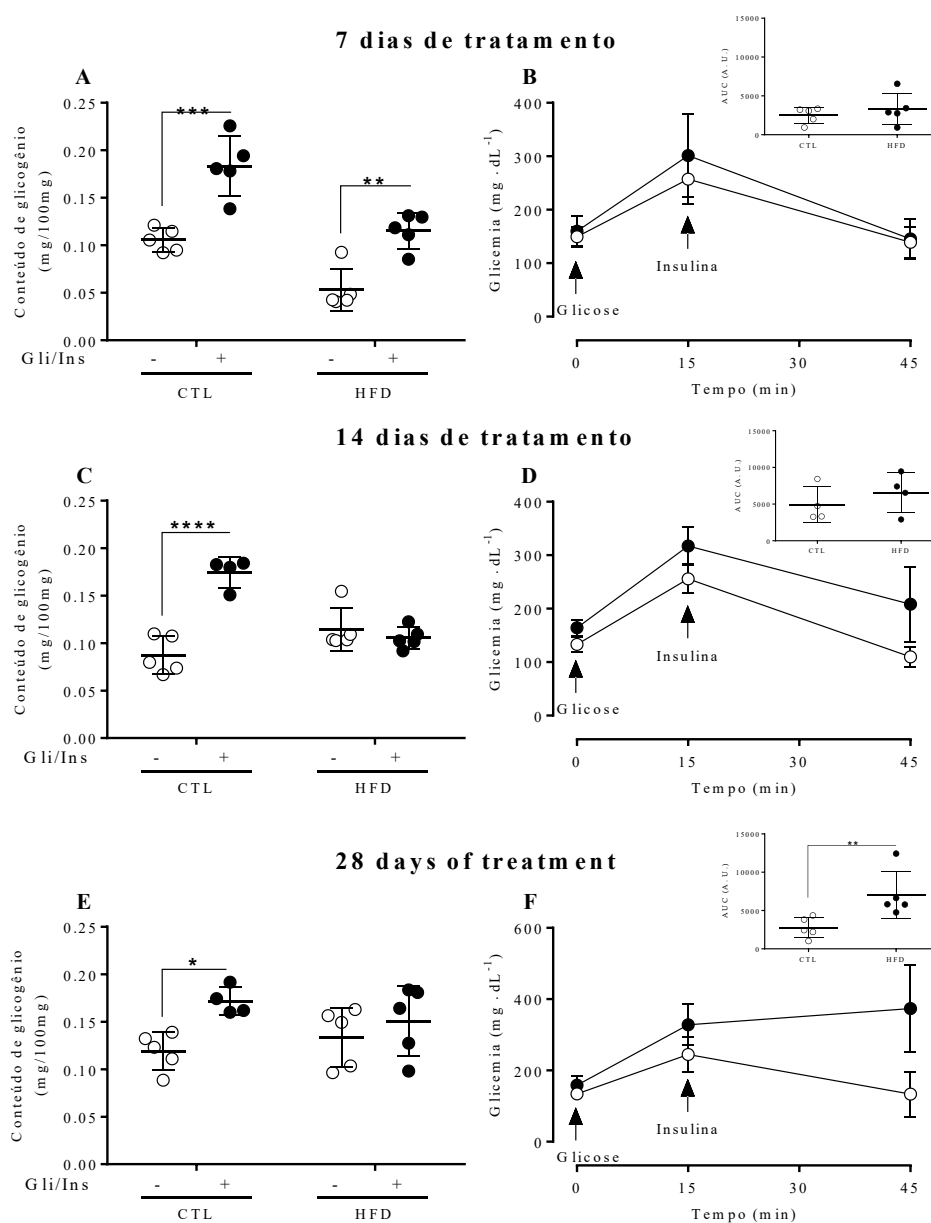
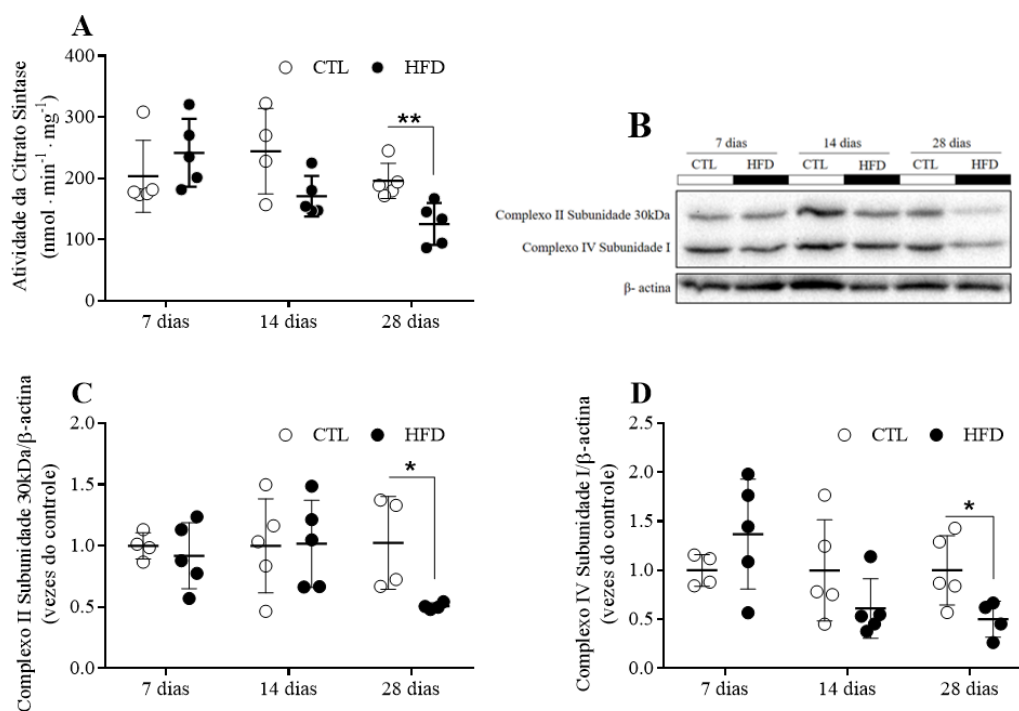


Figura 4A, C e E representam o conteúdo de glicogênio no músculo sóleo dos camundongos expostos à dieta hiperlipídica por 7, 14 e 28 dias, respectivamente, em jejum e sob estimulação com glicose e insulina. Figura 4B, D e F apresenta a variação na glicemia dos camundongos durante o teste. No canto superior direito dos gráficos B, D e F são apresentadas as áreas sob a curva da dinâmica da glicose durante a estimulação da glicogênese. Dados são apresentados em valores individuais nas figuras A, B e E, com indicação da média \pm 1 desvio-padrão para os camundongos tratados por 7, 14 e 28 dias. Dados são apresentados em média \pm 1 desvio-padrão em B, D e F para os camundongos tratador por 7, 14 e 28 dias, respectivamente. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. Fonte: o autor.

Atualmente, não existe consenso sobre qual o marcador indireto mais acurado para quantificar o conteúdo mitocondrial. Diante disso, tem sido recomendado o uso de mais do que um marcador para esse tipo de análise. No presente estudo, a atividade da enzima mitocondrial citrato sintase, juntamente com a determinação do conteúdo proteico dos complexos II e IV, foram utilizados para a estimativa do conteúdo mitocondrial no músculo sóleo (Figura 5). Não houve diferença na atividade da enzima citrato sintase após o consumo de HFD por 7 e 14 dias, contudo, os camundongos que consumiram HFD por 28 dias apresentaram uma redução em torno de 40% na atividade dessa enzima (Figura 5A). De forma similar, o conteúdo proteico dos complexos II e IV não foram alterados após 7 e 14 dias de dieta hiperlipídica, contudo, houve uma redução em torno de 50% em ambos os complexos após 28 dias de tratamento (Figura 5B-D).

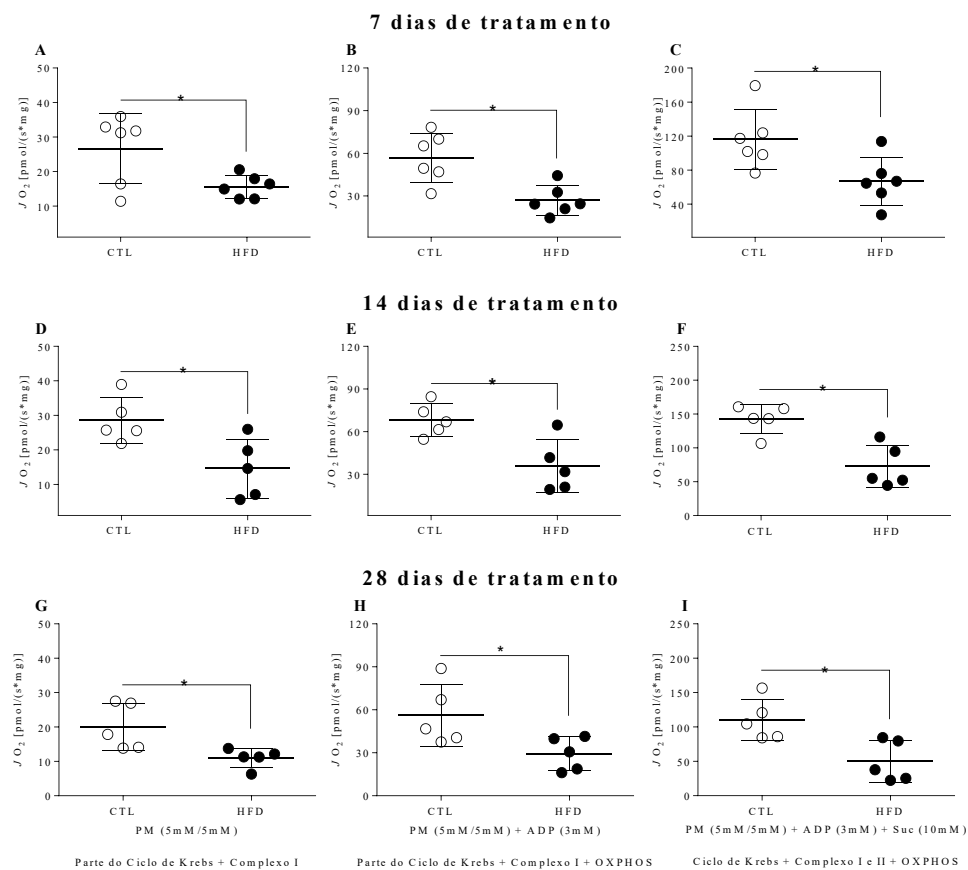
Figura 5 – Conteúdo mitocondrial é reduzido no sóleo de camundongos expostos à HFD por 28 dias.



Círculos brancos representam camundongos controle enquanto círculos pretos representam camundongos expostos à dieta hiperlipídica. Atividade da enzima citrato sintase (Figura 9A). Representação do western blot do complexo II, complexo IV e da β -actina (figura 9B). Imunoconteúdo do complexo II subunidade 30kDa e do complexo IV subunidade I (Figura 9C e 9D, respectivamente). Dados apresentados em valores individuais com indicação da média \pm 1 desvio-padrão. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Fonte: o autor.

A respiração mitocondrial foi avaliada em fibras de sóleo permeabilizadas com saponina (Figura 6). Para acessar a função mitocondrial, foi utilizado um protocolo multisubstrato para avaliar a respiração mitocondrial acoplada ao complexo I (piruvato + malato), complexo II (succinato). Estimulação do complexo I com piruvato + malato, no estado não fosforilante, mostrou um consumo de O_2 reduzido no grupo que consumiu dieta hiperlipídica por 7, 14 ou 28 dias (Figura A, D e G). O acoplamento da atividade do complexo I com a fosforilação oxidativa após a adição de ADP mostrou uma menor responsividade à esse substrato por parte do grupo que consumiu HFD (Figura 6B, E e H). Além disso, a máxima respiração mensurada após a adição de succinato (substrato para o complexo II) foi reduzida no grupo exposto à dieta hiperlipídica nos três períodos observados (Figura 6C, F e I).

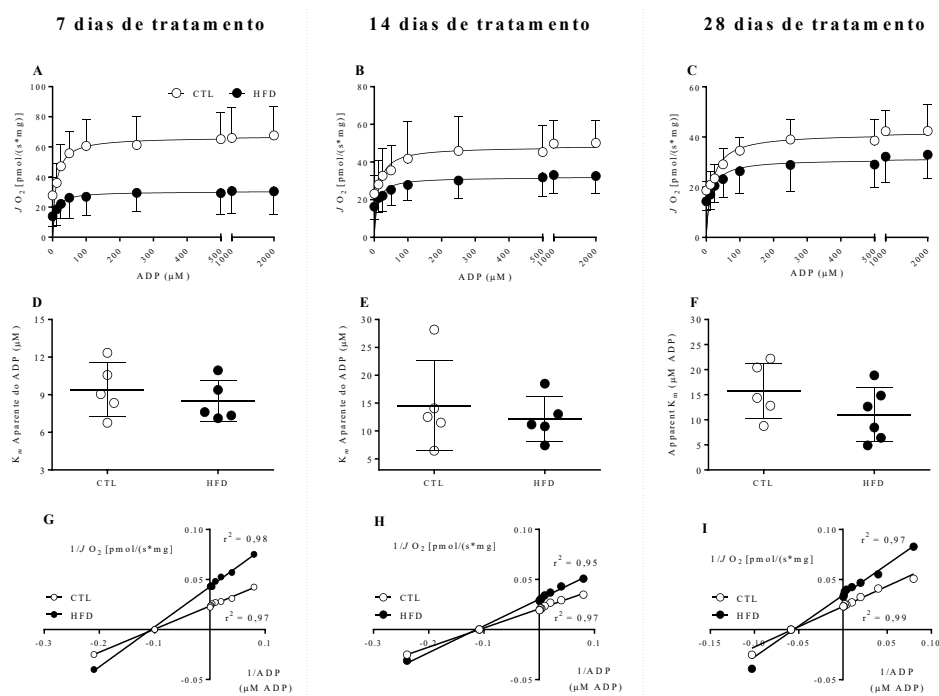
Figura 6 – Respiração mitocondrial é reduzida nos camundongos expostos à HFD.



Círculos brancos representam os camundongos do grupo controle (CTL). Círculos pretos representam os camundongos expostos à dieta hiperlipídica (HFD). Valores apresentados individualmente com indicação da média \pm 1 desvio padrão do grupo. P = piruvato; M = malato; ADP = adenosina difosfato; Suc = succinato; OXPHOS = fosforilação oxidativa. * $P < 0,05$.
Fonte: o autor.

Tendo observado uma redução na responsividade ao ADP nos camundongos tratados com dieta hiperlipídica, foi investigado a sensibilidade ao ADP nessas condições (Figura 7). Para isso, as mitocôndrias foram energizadas com PM e adições crescentes de ADP foram realizadas. Foi observado que embora a máxima respiração esteve reduzida no grupo que consumiu HFD, o formato da curva de resposta ao ADP foi similar nos tempos observados (Figura 7A-C). Esse resultado foi confirmado pelo cálculo da constante de Michaelis-Mentel. O K_m aparente ao ADP para ambos os grupos foi similar nos três períodos observados (Figura 7D-F). Além disso, após a linearização dos valores proposta por Lineweaver-Burk, houve intersecção de ambos os grupos no eixo x, com dispersão das linhas no eixo y (Figura 7G-I), o que teoricamente indica uma inibição não-competitiva nessa enzima.

Figura 7 – Sensibilidade ao ADP não é alterada no sóleo de camundongos expostos à HFD.

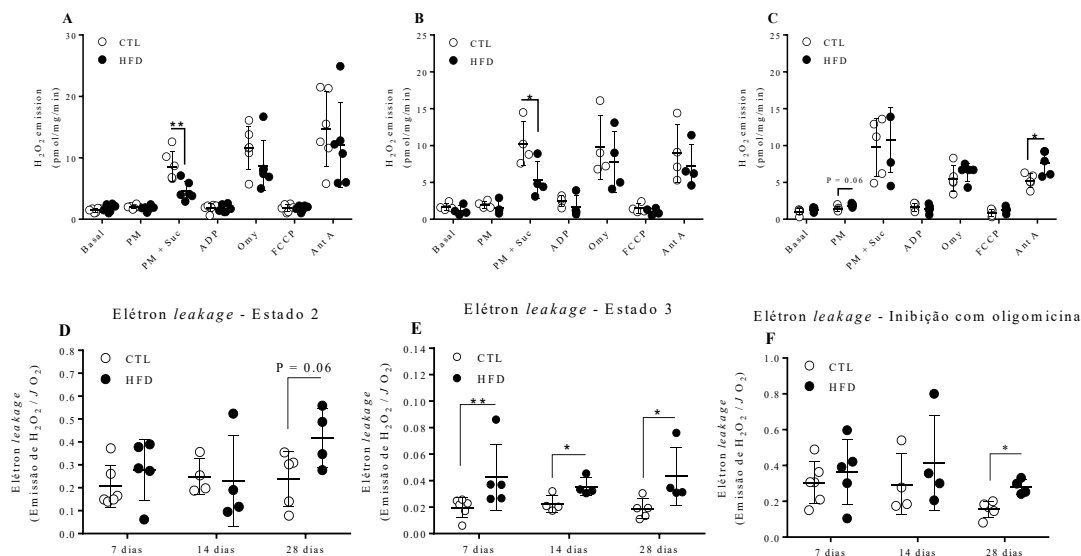


Círculos brancos representam os camundongos controle enquanto os círculos pretos representam os camundongos com obesidade induzida pela dieta. Figuras 11A, B e C apresentam os dados em média \pm 1 desvio-padrão para os camundongos tratados por 7, 14 e 28 dias, respectivamente. Figuras 11D, E e F demonstra o K_m aparente ao ADP calculado a partir da constante de Michaelis-Mentel para os camundongos tratados por 7, 14 e 28 dias, respectivamente. Valores apresentados individualmente com indicação da média \pm 1 desvio padrão. Figuras 11G, H e I demonstram a linearização de Lineweaver-Burk para os animais tratados por 7, 14 e 28 dias, respectivamente. Nesses gráficos as indicações de dispersão dos dados foram omitidas para clarificar os gráficos. Valores médios para $Y = 0$ e $Y = -0,025$ foram extrapolados a partir da reta calculada com os valores obtidos. Fonte: o autor.

Indivíduos com resistência à insulina e portadores de DM2 em geral apresentam desbalanço no estado redox, o que sugere que EROs poderia estar envolvida na gênese da resistência à insulina. Contudo, não está claro como esse cenário é modulado durante os estágios iniciais em contextos de sobrecarga lipídica e energética. Portanto, foi investigada a emissão mitocondrial de H_2O_2 durante a modulação do potencial de membrana mitocondrial na presença ou ausência de ADP, inibidores e desacopladores mitocondriais após 7, 14 e 28 dias de consumo de dieta hiperlipídica ou controle (Figura 8). De forma interessante, após o consumo de HFD por 7 ou 14 dias, houve redução na emissão de H_2O_2 durante o estado 2 mitocondrial, ou seja, na ausência de ADP (Figura 8A-B). Contudo, essa redução não esteve presente nos camundongos tratados por 28 dias (Figura 8C). Adicionalmente, a emissão de EROs após a inibição do complexo III com Antimicina A foi maior no grupo que consumiu dieta hiperlipídica por 28 dias do que no grupo controle (Figura 8C).

Por meio da mensuração do fluxo de O_2 no oxígrafo e da emissão de H_2O_2 no fluorímetro foi possível calcular a fração de elétrons que escapam do sistema de transferência de elétrons em 3 estados mitocondriais. No estado 2, o escape de elétrons não foi diferente em todos os períodos observados, embora com 28 dias de tratamento, os camundongos expostos à dieta hiperlipídica tenham apresentado uma tendência ($P = 0,06$) ao maior escape de elétrons nessa condição (figura 8D). Na presença de ADP, estado 3, o escape de elétrons foi maior nos camundongos obesos quando comparados aos controles nos 3 períodos observados (Figura 8E, $P < 0,01$ para 7 dias e $P < 0,05$ para 14 e 28 dias de tratamento). Inibição da ATP sintase com oligomicina conduz ao aumento do potencial de membrana e geração de radicais livres. Nesse cenário, não houve diferença no escape de elétrons entre os grupos acompanhados por 7 e 14 dias (Figura 8F, $P > 0,05$). Contudo, quando os camundongos foram expostos à dieta hiperlipídica por 28 dias foi apresentada maior fração de escape de elétrons (Figura 8F, $P < 0,05$). Esses dados sugerem que durante o desenvolvimento dos prejuízos metabólicos relacionados à obesidade, as mitocôndrias perdem sua capacidade de manejar a geração de EROs.

Figura 8 – Emissão de H₂O₂ e fração de escape de elétrons em mitocôndrias de camundongos expostos à HFD.

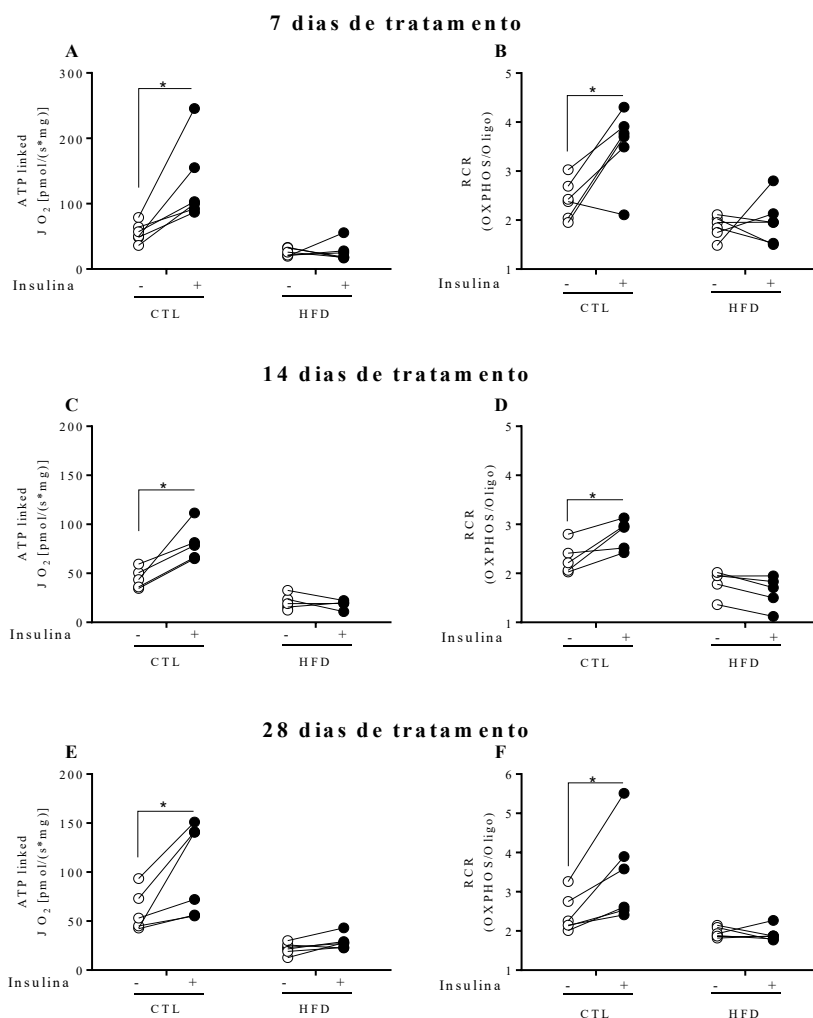


Círculos brancos representam camundongos controle enquanto círculos pretos representam camundongos expostos à HFD tratados por 7, 14 e 28 dias (Figura 8A, B e C, respectivamente). A fração de liberação de H₂O₂ pelo fluxo de O₂ no estado 2, estado 3 e sob inibição por oligomicina (figura 8D, E e F, respectivamente). Estado 2 – piruvato, malato e succinato (PMS) na ausência de ADP. Estado 3 – PMS na presença de 1mM de ADP; e OXPHOS sob inibição da ATP sintase com oligomicina. Valores apresentados individualmente com indicação da média \pm 1 desvio-padrão. * P < 0,05; ** P < 0,01. Condições: Basal – sem substrato ou inibidores; PM – 5mM piruvato + 2,5mM malato; PM + Suc – 10mM succinato; ADP – 3mM adenosina difosfato; Omy - 1 μ g/mL oligomicina; FCCP 50nM; Ant A – 1mM antimicina A.

Incubação *in vitro* com insulina foi utilizada para investigar os efeitos desse hormônio sobre a respiração mitocondrial e a emissão de EROs. Após 1 hora de incubação com insulina, respiração mitocondrial foi maior sob estimulação com ADP nos camundongos tratados com dieta padrão (Figura 9A, C, E e G). É importante destacar que esses efeitos foram observados apenas sob estimulação com ADP (Estado 3), por outro lado, não houve diferença pela incubação com insulina na respiração baseada na atividade dos complexos I e II. Os efeitos da insulina foram observados nos 3 períodos de tratamento nos camundongos sob dieta padrão (figura 9C, E e G para 7, 14 e 28 dias de tratamento, respectivamente). Por outro lado, os camundongos expostos à dieta hiperlipídica foram incapazes de mostrar diferenças na respiração mitocondrial após estimulação com insulina, tanto para a atividade do STE e da OXPHOS (Figura 9B, D, F e H para 7, 14 e 28 dias de tratamento, respectivamente).

Alguns parâmetros mitocondriais podem ser extraídos dos experimentos utilizando os protocolos SUIT (descrição completa nos itens 4.7.3 dos métodos). O fluxo de O_2 ligado à síntese de ATP aumentou após incubação com insulina nas mitocôndrias dos camundongos do grupo controle, contudo, não houve alteração nesse parâmetro nos camundongos com obesidade induzida pela dieta (figura 14A, C e E para 7, 14 e 28 dias de tratamento, respectivamente). Ainda, a taxa de controle respiratório (RCR) não foi diferente nos camundongos expostos à dieta hiperlipídica nos 3 períodos observados, enquanto nos camundongos controle o RCR aumentou em 7, 14 e 28 dias de tratamento (figura 14B, D e F, respectivamente).

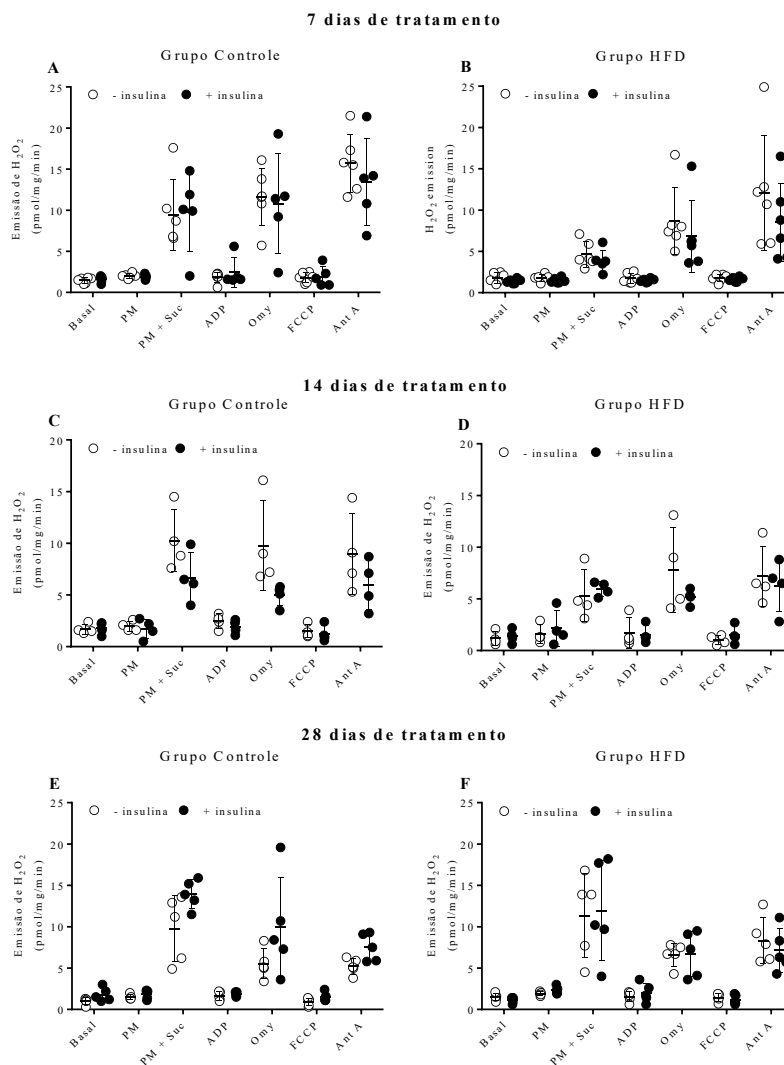
Figura 10 - Consumo de O_2 ligado à síntese de ATP e taxa de controle respiratório (RCR).



Linhas do topo, meio e do fundo se referem aos camundongos acompanhados por 7, 14 e 28 dias, respectivamente. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. Fonte: o autor.

A insulina pode aumentar a produção de EROs para garantir sua total efetividade na sinalização celular. A emissão de H_2O_2 foi mensurada em fibras permeabilizadas com saponina sob estimulação com insulina. A incubação por 1 hora com insulina não alterou a emissão de H_2O_2 nos camundongos controle e nos camundongos expostos à dieta hiperlipídica por 7, 14 e 28 dias (Figura 11A-F).

Figura 11 – Estimulação com insulina não altera a emissão mitocondrial de H_2O_2 no sóleo.



Círculos brancos representam a condição sem insulina enquanto os círculos pretos representam a condição sob estimulação com insulina. A coluna da esquerda representa os camundongos controle enquanto a coluna da direita representa os camundongos expostos à dieta hiperlipídica. Linha superior, do meio e inferior representa os tratamentos de 7, 14 e 28 dias, respectivamente. Condições: Basal – sem substrato ou inibidor; PM – piruvato 5 mM + malato 2,5 mM; PM + Suc – succinato 10 mM; ADP – adenosina difosfato 3 mM; Omy – oligomicina 1 μ g/mL; FCCP 50 nM; Ant A – Antimicina A 10 mM. Dados são apresentados individualmente com indicação da média \pm 1 desvio-padrão. Fonte: o autor.

2.4 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo descrever as alterações temporais na função mitocondrial do músculo esquelético sóleo e sua relação com o desenvolvimento da resistência à insulina em um modelo de obesidade induzida por dieta. Nesse cenário, três principais achados se destacam. Primeiramente, a redução no consumo de O₂ mitocondrial nos camundongos expostos à HFD apresenta a mesma magnitude nos estágios iniciais e finais do desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina. Em segundo lugar, as mitocôndrias do músculo esquelético dos camundongos obesos são insensíveis à estimulação com insulina, principalmente no que diz respeito a taxa de acoplamento respiratório e ao consumo de O₂ ligado à síntese de ATP. Finalmente, o perfil de emissão mitocondrial de EROs encontrado após 28 dias de tratamento é diferente daquele observado nos estágios iniciais da sobrecarga energética e nutricional.

Dietas hiperlipídica têm sido frequentemente utilizadas para induzir resistência periférica à insulina (BONEN et al., 2015a; DIDIER et al., 2007). O desenvolvimento da redução das ações da insulina na obesidade ainda não é totalmente descrito, porém, neste trabalho, alguns pontos podem ser analisados. A intolerância à glicose e elevação das concentrações plasmática de insulina estiveram presentes nos estágios iniciais (7 dias) da obesidade. A homeostase da glicose é um resumo da captação/utilização da glicose e da ação da insulina em todos os tecidos do corpo, contudo, nem todos os tecidos apresentam a mesma rota metabólica da glicose ou dependência da insulina. Portanto, a participação do músculo esquelético na intolerância à glicose pode não ocorrer ao mesmo tempo que outros tecidos sensíveis à insulina (por exemplo tecido adiposo e fígado). A produção hepática de glicose parece ser uma das primeiras alterações no desenvolvimento da resistência à insulina (BRØNS et al., 2009; SMALL, L. BRANDON, A. TURNER, N. COONEY, 2017), a deficiência na supressão hepática de glicose durante o ipGTT poderia contribuir para a diferença no pico de glicemia observado nos camundongos após 7 dias de HFD. Além disso, embora os camundongos expostos à HFD tenham apresentado menor conteúdo de glicogênio muscular após 7 dias de tratamento, os mesmos foram capazes de aumentar as concentrações de glicogênio na mesma magnitude que os camundongos do grupo controle após a estimulação com glicose e insulina. Aparentemente, a redução no conteúdo muscular de glicogênio parece ser uma resposta aguda à exposição à dieta hiperlipídica (JORDY et al., 2014). Entretanto, com a extensão da dieta hiperlipídica, foi observada uma redução no conteúdo de glicogênio após 14 e 28 dias de tratamento, sugerindo a participação tardia do sóleo na homeostase da glicose.

Ainda, sob a mesma captação de glicose, indivíduos com resistência à insulina apresentam menor síntese de glicogênio e oxidação mitocondrial da glicose, direcionando a rota da glicose para a produção de lactato (MITRAKOU, KELLEY, VENEMAN, JENSSEN, PANGBURN, REILLY, 1990). Deste modo, os dados mostram diferenças temporal entre o aparecimento da intolerância à glicose, redução no conteúdo de glicogênio sob estimulação e responsividade à insulina nos camundongos expostos à dieta hiperlipídica.

Sobre a avaliação da tolerância à glicose em modelos experimentais, alguns pontos devem ser considerados e que podem interferir nos desfechos avaliados. Primeiramente, foi utilizado um período de 5 horas de restrição calórica, durante o ciclo claro dos camundongos. Esse procedimento é mais fisiológico e reduz o estresse metabólico causado pela restrição alimentar noturna ou mais longa (10-12 horas). Devido à alta taxa metabólica basal e ao consumo alimentar ser predominante no ciclo escuro (até 80% do consumo), a restrição noturna pode reduzir até 15% do peso corporal do animal (ANDRIKOPOULOS et al., 2008). A rota de administração escolhida foi intraperitoneal com o objetivo de excluir a ação das incretinas na secreção de insulina que ocorre pelas administrações pela via oral. Além disso, a via intraperitoneal possui menor variabilidade comparada à via oral devido às diferenças no esvaziamento gástrico que ocorre no organismo dos camundongos (BOWE et al., 2014).

Em segundo lugar, outro ponto importante que merece ser enfatizado é a ausência de correção na dose de glicose por massa magra dos camundongos. A dose ofertada aos camundongos é corrigida pela massa corporal global. Contudo, como os tecidos que possuem maior participação na captação de glicose são o músculo e o fígado, portanto, camundongos com maior acúmulo de tecido adiposo poderiam ter doses relativas maiores de glicose. A escolha da dose não ajustada pela massa magra dos camundongos foi principalmente por limitações operacionais. No entanto, ressalta-se que na rotina clínica, a dose de glicose utilizada durante esse teste também não é ajustada, tornando factíveis potenciais translações dos achados. Adicionalmente, indivíduos obesos possuem acentuada taxa metabólica basal (TMB), além de maior quantidade de massa magra, o que poderia ser um fator de correção intrínseco do indivíduo para o teste (HUANG et al., 2006).

A exposição por curto período (7 dias) causou redução na respiração mitocondrial do sóleo sem alterações nos marcadores de conteúdo mitocondrial. Exposições curtas à HFD são capazes de induzir acúmulo de lipídios no músculo de roedores e humanos

(BONEN et al., 2015a; DIDIER et al., 2007; JORDY et al., 2014). O acúmulo sob poucos dias de HFD (5 dias) foi associado com a redução na síntese de ATP mitocondrial. No entanto, estendendo a exposição à HFD, a síntese de ATP é restaurada, enquanto as concentrações intramusculares de lipídios permanecem elevadas (DIDIER et al., 2007). Adicionalmente, Nirs e Affourtit (2016) mostraram que o palmitato induz uma redução na demanda por ATP (mensurado pela taxa de síntese proteica, síntese de DNA e atividade da Na^+/K^+ ATPase) em mioblastos de roedores e humanos. Assim, é plausível deduzir que a redução no consumo de O_2 mitocondrial nos estágios iniciais da obesidade, encontrada no presente estudo, seria mais uma resposta transitória frente à sobrecarga de lipídio e à demanda de ATP do que uma disfunção mitocondrial propriamente dita. Além disso, é importante ressaltar que a redução no consumo de O_2 nos estágios iniciais da obesidade não foi seguida com alterações no conteúdo mitocondrial, e apenas quando a resistência à insulina estava instalada, foi observado redução na atividade da enzima CS e do conteúdo do complexo II e IV mitocondrial.

Ainda, é fundamental enfatizar que, embora as inferências sobre o fluxo respiratório sejam remetidas aos complexos mitocondriais (CI e CII) do sistema de transferência de elétrons, os substratos utilizados podem influenciar no resultado observado. Um exemplo desse aspecto é a utilização do piruvato como substrato redutor de NAD^+ para a avaliação do complexo I. O complexo da PDH catalisa a conversão de piruvato em acetil-CoA, com concomitante redução de NAD^+ à NADH (PATEL; NEMERIA; FUREY, 2014). Contudo, ressalta-se que o complexo PDH (e outros solicitados com o uso de substratos mitocondriais) tem sua atividade regulada e podem apresentar modulação de acordo com o modelo experimental utilizado. De fato, o complexo PDH é regulado por reações alostéricas e pela fosforilação, catalisada pela enzima PDK (DENTON et al., 1975). Nesse sentido, a PDK exerce, por meio de fosforilação, efeito inibitório sobre o complexo PDH (PATEL; NEMERIA; FUREY, 2014). Ratas Wistar expostas à HFD apresentaram aumento no imunoconteúdo de PDK-2 e -4 no músculo esquelético sóleo, resultando em aumento nas concentrações de piruvato e redução na atividade do complexo PDH (HOLNESS et al., 2000). Nesse estudo, os autores concluíram que a inibição da PDH pela PDK em modelos de obesidade poderia explicar, ao menos em parte, a redução da captação de glicose pelo músculo esquelético. Por outro lado, a ativação da PDH com dicloroacetato (um inibidor da PDK), aumentou a atividade da PDH e reduziu as concentrações de lactato, embora não tenha

aumentado a captação muscular de glicose em modelo de obesidade induzida por dieta (SMALL et al., 2018).

Outro ponto que vale ser destacado foi a redução na emissão de H_2O_2 no estado 2 nos camundongos expostos à HFD por 7 e 14 dias. Como a emissão de EROs é diretamente proporcional ao Δp (força próton motriz) (MURPHY, 2009), seria possível especular que as mitocôndrias dos camundongos obesos não seriam capazes de gerar um potencial de membrana apropriado. Recentemente, Pinho et al. (2017) demonstraram que a dieta hiperlipídica causa um aumento de 100% na expressão da UCP-2 e -3, um dado que sugere que a redução na emissão de EROs nos estágios iniciais da obesidade observada nesse estudo poderia estar ligada ao desacoplamento mitocondrial. Por outro lado, os camundongos tratados por 28 dias não apresentaram redução na emissão de EROs no estado 2. Além disso, a emissão de H_2O_2 e o vazamento de elétrons foi maior sob inibição do complexo III com Antimicina A. Esses dados sugerem que a redução na emissão de EROs nos estágios iniciais da obesidade poderia ser uma resposta transitória sob a sobrecarga de lipídios para proteger as mitocôndrias do excesso de nutrientes. Entretanto, com o prolongamento do tratamento, a lipotoxicidade poderia ter um efeito direto na eficiência mitocondrial. É importante ressaltar que o maior vazamento de elétrons observado nos camundongos obesos no estado 3 é provavelmente causado pela redução no consumo de O_2 na presença de ADP e não a uma maior emissão de H_2O_2 nessa condição. Portanto, esses dados sugerem que o quadro metabólico observado quando a resistência à insulina já está estabelecida poderia não ser o mesmo daquele observado durante os primeiros dias da dieta no músculo sóleo. Além disso, é importante salientar que a emissão mitocondrial de H_2O_2 mensurada pela sonda fluorescente AmplexRed é dependente da taxa de conversão do ânion radical superóxido à peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase mitocondrial (SOD-Mn), e é influenciada pela taxa de depuração do H_2O_2 na matriz mitocondrial e no espaço intermembranas. Como não foi mensurada a atividade das defesas antioxidantes, trabalhos adicionais são necessários para confirmar esses dados e checar se a redução na emissão de EROs nos estágios iniciais da obesidade é dependente do potencial de membrana ou se envolve o sistema de depuração de EROs.

A menor emissão de EROs ligada à menor Δp nos camundongos obesos tratados por 7 e 14 dias poderia explicar a baixa responsividade ao ADP sem alterações na sensibilidade aparente (constante de Michaelis-Mentel). Por outro lado, camundongos tratados por 28 dias não apresentaram redução na emissão de EROs, sugerindo que a

exposição por longos períodos à HFD poderia desencadear alterações adicionais na fisiologia mitocondrial. A resposta mitocondrial ao ADP envolve diversos mecanismos que estão além da atividade intrínseca da ATP sintase, tais como o potencial de membrana mitocondrial, o sistema antiporte trocador de ADP/ATP e regulações adicionais no sistema de fosforilação oxidativa. O translocador nucleotídeo de adenina (ANT) pode ser acetilado em seus resíduos de lisina (MIELKE et al., 2014), reduzindo sua atividade. A exposição à HFD produz acúmulo de acetil-CoA e redução da atividade das sirtuínas (SIRT) (KENDRICK et al., 2012; LANTIER et al., 2015), conduzindo à hiperacetilação de proteínas. Além disso, foi demonstrado que indivíduos obesos e pacientes com DMT2 apresentam maior atividade do fator inibitório 1 (IF-1) na matriz mitocondrial (FORMENTINI et al., 2017). Essa proteína é conhecida por reduzir a atividade da ATP sintase, conduzindo a um maior Δp e maior vazamento de elétrons (ESPARZA et al., 2017).

Phielix et al. (2014) foram os primeiros a utilizar o termo “resistência mitocondrial à insulina” quando demonstraram que pacientes obesos resistentes à insulina e portadores de DMT2 eram incapazes de aumentar o fluxo de O_2 após a estimulação com insulina. No presente estudo, foram confirmados os achados de Phielix et al. (2014), ao demonstrar que as mitocôndrias de camundongos expostos à HFD são incapazes de aumentar a responsividade ao ADP após a estimulação com insulina. Atualmente, acredita-se que o incremento no RCR após a estimulação com insulina esteja ligado ao aumento na demanda de ATP induzido pela insulina. A insulina ativa diversas cascatas de sinalização celulares que resultam em reações anabólicas (i. e. síntese de glicogênio e de proteínas, transcrição do DNA) (BEDINGER; ADAMS, 2015). Portanto, alterações na função mitocondrial poderia ocorrer para atender ao aumento na demanda de ATP. Contudo, é importante notar que os efeitos da insulina sobre a função mitocondrial não são totalmente descritos, portanto, ações celulares da insulina em mecanismos pós-traducionais em proteínas mitocondriais não estão descartadas. A ausência da resposta mitocondrial à insulina tem sido demonstrada por outros pesquisadores *in vivo* e *in vitro* (BREHM et al., 2006; PHIELIX et al., 2014; YERBY et al., 2008). Sugere-se que a ineficiência das mitocôndrias em responder ao estímulo insulínico é atribuído ao acúmulo intramuscular de lipídios (ou intermediários lipídicos), visto que ratos Sprague-Dawley após 8 semanas de HFD não foram capazes de aumentar a síntese de ATP durante um *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico. Adicionalmente, em um estudo diferente, incubação de mioblastos humanos com palmitato 8 mM anulou os efeitos da insulina sobre o RCR (NISR;

AFFOURTIT, 2014). Essa associação com o acúmulo de lipídios intramuscular e a resistência mitocondrial à insulina foi confirmada em um estudo com humanos, em que pacientes com resistência periférica à insulina, filhos de indivíduos portadores de DMT2, apresentaram um aumento no conteúdo de lipídios intramiocelulares e não foram capazes de aumentar a síntese de ATP durante um *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico. Além disso, a participação dos lipídios na responsividade mitocondrial à insulina foi testada por Brehm et al. (2006), que infundiram lipídios em homens saudáveis durante um *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico e observaram a ausência de alterações no acoplamento mitocondrial durante o teste. Entretanto, esses dados necessitam ser cuidadosamente analisados visto que a infusão aguda de lipídios não foi capaz de aumentar o conteúdo de lipídios intramiocelular, diferentemente ao cenário encontrado em indivíduos resistentes à insulina e portadores de DMT2. A ausência de resposta mitocondrial sob estimulação com insulina emerge a questão sobre a participação das mitocôndrias na patogênese da resistência à insulina como causa ou consequência. A interação entre as alterações na função mitocondrial e a redução na sensibilidade à insulina poderia ser bidirecional e permanece a ser demonstrado se os efeitos inibitórios dos lipídios na resposta mitocondrial à insulina agem diretamente sobre a função mitocondrial ou sobre a sinalização da insulina.

É necessário apontar que este estudo investigou os efeitos da HFD (60% de calorias oriundas da gordura) sobre as mitocôndrias do músculo sóleo. Dessa forma, os resultados observados poderiam não ser aplicados em modelos ou músculos diferentes. Recentemente, demonstrou-se que as mitocôndrias de diferentes músculos respondem de forma diferente à HFD (PINHO et al., 2017). Adicionalmente, a composição da dieta utilizada para induzir o distúrbio metabólico pode modular a fisiologia mitocondrial de forma diferente (JØRGENSEN et al., 2017b). Por exemplo, ratos sob exposição de frutose apresentaram redução na respiração mitocondrial no músculo extensor digitorium longus (EDL) mas não no sóleo (WARREN et al., 2014). É importante ressaltar que a predominância das fibras musculares é muito diferente nesses músculos. A porcentagem de fibras do tipo I, tipo IIa e tipo IIb no sóleo e EDL é 84/10/0 e 3/57/40, respectivamente (ARIANO, M. A. ARMSTRONG, R. B. EDGERTON, 1973). Também deve ser notado que o protocolo de permeabilização das fibras musculares não é capaz de distinguir as mitocôndrias do espaço intermiofibrilar e subsarcolemal. Trata-se de um ponto de considerável relevância, visto que tem sido observado que as mitocôndrias intermiofibrilares e subsarcolemais apresentam características metabólicas distintas em

condições de obesidade e resistência à insulina (LAI; HOPPEL, 2017). A Figura 12 resume a sequência de eventos entre as alterações metabólicas e mitocondriais encontradas durante o desenvolvimento da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica.

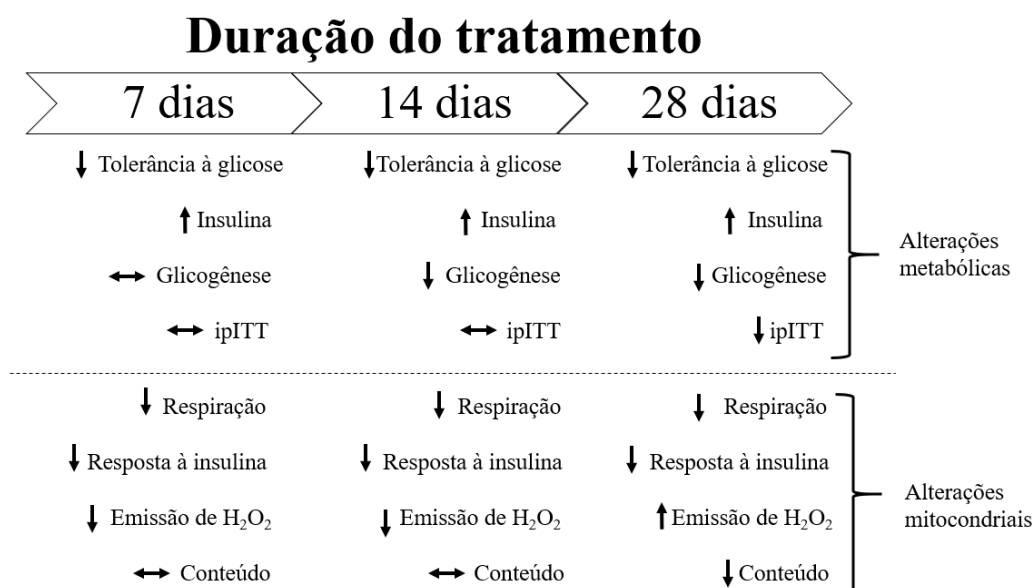


Figura 12 – Resumo das alterações metabólicas e mitocondriais durante o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina. IpITT – teste de responsividade à insulina; H₂O₂ – peróxido de hidrogênio; ↑ - aumento; ↓ - redução; ↔ sem efeito.

Resumidamente, a respiração e responsividade mitocondrial à insulina apresentam as mesmas alterações em curtas e longas exposições à HFD em camundongos machos. Contudo, a emissão de EROs revela um padrão diferente durante o desenvolvimento da obesidade e da resistência periférica à insulina. Assim, a plasticidade mitocondrial quanto ao consumo de O₂, emissão de H₂O₂, conteúdo e responsividade à insulina não ocorrem no mesmo momento durante o desenvolvimento da obesidade e da resistência à insulina. Esses dados trazem nova perspectiva e sugerem atenção com relação às conclusões extraídas a respeito dos modelos de obesidade induzida pela dieta e a participação da função mitocondrial em desordens metabólicas.

CAPÍTULO III – EFEITOS AGUDOS DA INSULINA SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL

3.1 INTRODUÇÃO

A insulina é um hormônio peptídico sintetizado e secretado pelas células beta pancreáticas. A insulina é responsável por diversas funções fisiológicas, principalmente no que diz respeito ao metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos. Os efeitos fisiológicos da insulina são exercidos por meio de sua ação em diversos tecidos-alvo. No músculo esquelético, os efeitos da insulina são particularmente importantes devido a necessidade desse hormônio para a captação de glicose, síntese de glicogênio e manutenção da massa magra. Diversos sinais intracelulares são necessários para dar suporte aos efeitos fisiológicos observados pela ação da insulina.

As ações da insulina iniciam após a ligação entre o hormônio e seu receptor, inserido na membrana plasmática das células. O receptor de insulina apresenta atividade autocatalítica, ou seja, após a ligação da insulina é capaz de se autofosforilar em resíduos de tirosina, que se encontram localizados na estrutura intracelular do receptor. Após ativado, o receptor de insulina recruta e fosforila proteínas denominadas substratos do IRS-1 e -2. Após ativado, a IRS1/2 recruta o complexo proteico p85/p110-PI3K na membrana plasmática, produzindo o segundo mensageiro lipídico PIP3K (SALTIEL; KAHN, 2001). A ativação da cascata de segundo mensageiro resulta na ativação de diversas proteínas no citosol das células, como a PDK1, a proteína serina/treonina cinase B (PKB/Akt) e as proteínas cinases atípicas C (PKC), isoformas ζ e λ . Muito embora a total ativação da Akt somente ocorra pela fosforilação em dois resíduos (treonina 308 e serina 473), a regulação do estado da fosforilação e defosforilação ocorrem de maneira independente (MANNING; TOKER, 2017; SALTIEL; KAHN, 2001). Dentre os efeitos fisiológicos da ativação da Akt no músculo esquelético estão o aumento da translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática, resultando em aumento da captação de glicose; indução da síntese de glicogênio por meio da inibição da enzima glicogênio sintase cinase 3 (GSK3); e supressão da proteólise por meio da ativação do complexo TSC-mTORC1. Adicionalmente, a insulina aumenta a captação de potássio e fosfato do plasma, além de aumentar, transientemente as concentrações intracelulares de cálcio. De forma geral, os efeitos da insulina são majoritariamente anabólicos, o que por definição, aumenta a demanda celular por ATP para sustentar essas reações. Dessa forma, poderia ser esperado que a função mitocondrial respondesse à essa demanda energética alterada.

Em humanos saudáveis, o aumento das concentrações plasmáticas de insulina por

8 h, pelo uso do *clamp*, foi capaz de aumentar a taxa de síntese de ATP, a quantidade de mRNA para proteínas mitocondriais e a atividade da enzima citocromo c oxidase (COX) e da enzima CS (STUMP, 2003). Em concordância com esses resultados, utilizando o *clamp* em conjunto com ressonância magnética com marcação para ^{31}P e 1h, Brehm (2006) mostraram que uma elevação nas concentrações de insulina circulantes foi capaz de aumentar a taxa de síntese de ATP no músculo esquelético de homens saudáveis. É fundamental destacar que esses estudos apresentam algumas limitações, por exemplo a técnica de *clamp* geralmente aumenta as concentrações de insulina acima dos valores fisiológicos e é sustentada por 4-8 horas, o que faz com que os achados sejam questionados quando expostos a condições menos extremas.

Por outro lado, a exposição *in vitro* de células musculares à insulina tem sido utilizada para testar os efeitos desse hormônio sem os efeitos metabólicos oriundos do aumento da captação e utilização de glicose. A estimulação *in vitro* com insulina por 1 hora aumentou o consumo de O_2 quando na presença de substratos para o complexo I e II (PHIELIX et al., 2014). Em uma condição similar, a estimulação *in vitro* com insulina aumentou a taxa de acoplamento respiratório e reduziu o vazamento de prótons (NISR; AFFOURTIT, 2017). Esses dados sugerem fortemente a possibilidade de efeitos diretos da insulina sobre a função mitocondrial. Contudo, a descrição detalhada dos efeitos da insulina sobre a função mitocondrial e as vias de sinalização que permitem a existência desses efeitos permanece por ser demonstrada. De forma interessante, quando os efeitos da insulina foram testados em células musculares previamente expostas ao palmitato, não foi possível encontrar alterações na função mitocondrial mediadas pela insulina (NISR; AFFOURTIT, 2017). Esses dados indicam que os efeitos negativos do palmitato sobre a sinalização da insulina interferem nos efeitos da insulina sobre a respiração mitocondrial. Esses resultados poderiam explicar o porquê os efeitos da insulina sobre a função mitocondrial não são observados quando testados em indivíduos obesos.

Adicionalmente, os estudos que avaliam os efeitos da insulina sobre a respiração mitocondrial os fazem utilizando substratos em concentrações saturantes (BRUNETTA et al., 2018; PHIELIX et al., 2014), o que poderia resultar em achados diferentes daqueles que poderiam ser encontrados em concentrações fisiológicas. Além disso, a avaliação da respiração mitocondrial responde apenas parte das perguntas no que diz respeito à função dessa organela, que compreende produção de espécies reativas de oxigênio, homeostase do cálcio, apoptose, entre outros. O balanço redox mitocondrial tem produzido achados paradoxais em relação à sinalização e ação da insulina. Enquanto por um lado, a literatura

mostra que a produção excessiva de EROs em condições de sobrecarga energética ou obesidade reduz a ação da insulina (ANDERSON et al., 2009; JAIN et al., 2014a; MIOTTO; LEBLANC; HOLLOWAY, 2018); por outro lado, uma redução significativa das concentrações basais de espécies reativas de oxigênio também resulta em diminuição das ações celulares da insulina. Esses resultados demonstram que o balanço redox celular tem uma função bifásica, em que baixas concentrações de radicais livres são necessárias para a manutenção de vias de sinalização, enquanto por outro lado, a produção excessiva pode ser danosa para a função celular. Diante desse contexto, ainda não é conhecido se as possíveis ações da insulina sobre a respiração mitocondrial também repercutem sobre a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio. A descrição desses eventos poderia estabelecer uma possível comunicação retrógrada em que as mitocôndrias teriam papel direto, de forma aguda e transiente, sobre a via de sinalização da insulina.

Assim, o objetivo desse estudo foi investigar os efeitos agudos *in vivo* da insulina sobre a respiração e produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio em camundongos expostos à uma dieta com baixa concentração de gordura e outra com alta concentração de gordura. A hipótese desse estudo é que a insulina exerce efeitos sobre a função mitocondrial e que a resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica atenuaria os efeitos mitocondriais da insulina.

3.2 MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da University of Guelph sob o protocolo número 4142.

3.2.1 Desenho experimental

Camundongos C57Bl machos e fêmeas, com 15 semanas de idade, foram utilizados nesse estudo. Os camundongos foram criados em biotério próprio e mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas. Os camundongos foram aleatoriamente expostos à dieta padrão (Grupo controle) ou dieta hiperlipídica (Grupo HFD) (ResearchDiet, New Brunswick, NJ, USA) por 8 semanas. Na sétima semana de tratamento, os camundongos foram expostos à avaliação da calorimetria indireta. Dois dias após a calorimetria indireta, os camundongos foram expostos ao teste de tolerância à glicose. Dois dias após o ipGTT, os camundongos foram anestesiados para remoção do gastrocnêmio, porção vermelha, para as avaliações propostas. De forma importante, um subgrupo de camundongos, tanto do grupo controle quanto do grupo HFD, foi utilizado para testar os efeitos agudos da

insulina sobre a função mitocondrial. Os camundongos tiveram a massa corporal e a ingesta alimentar verificada no início do tratamento e semanalmente durante o protocolo experimental.

A estimulação aguda com insulina foi dada por meio de duas injeções de insulina na concentração de 3 U/kg com os camundongos no estado alimentado. O intervalo entre as injeções de insulina foi de 30 minutos e no minuto 55 do teste, os camundongos foram anestesiados com isoflurano 2% para remoção da porção vermelha do gastrocnêmio para as avaliações propostas. Duas injeções de salina 0,9% foram dadas nos mesmos tempos experimentais nos grupos controle. Para fins de controle experimental, as concentrações de glicose foram mensuradas antes das injeções de insulina e 45 e 60 minutos após as injeções.

3.2.2 Calorimetria indireta

Na sétima semana de tratamento, os camundongos foram submetidos à calorimetria indireta. Para isso, os camundongos foram colocados em gaiolas metabólicas (Columbus Instruments, OH, USA) individuais com capacidade de mensuração do consumo de oxigênio (VO_2) e produção de dióxido de carbono (VCO_2). Os camundongos foram mantidos nessas gaiolas por ~36h e os dados obtidos nos períodos claro e escuro foram utilizados para calcular a taxa de troca respiratória (RER, do inglês *respiratory exchange rate*). O RER tem sido utilizado para avaliação da flexibilidade metabólica e estimativa da utilização de substratos. Para isso, valores que se aproximam de 0,7 se referem à maior utilização de lipídios enquanto valores que se aproximam de 1,0 se referem à maior utilização de carboidratos como substrato energético.

3.2.3 Avaliação da tolerância à glicose *in vivo* (ipGTT)

A avaliação da tolerância à glicose foi realizada conforme descrito no item 2.2.3.

3.2.4 Preparação de fibras permeabilizadas

A preparação das fibras musculares da porção vermelha do músculo gastrocnêmio foi realizada conforme o descrito no item 2.2.8.

3.2.5 Avaliação da respiração mitocondrial pelo protocolo SUIIT

As fibras musculares da porção vermelha do gastrocnêmio foram inseridas no oxígrafo da marca Oroboros (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) na presença de

blebistatina (inibidor da ATP-ase da miosina) com 2 mL de tampão de respiração MiR05 à 37°C. Para acessar o fluxo de O₂ os substratos foram adicionados na seguinte ordem: piruvato 5 mM, malato 5 mM, ADP 3 mM, succinato 10 mM, citocromo c 5 µM foi utilizado para verificação da integridade de membrana mitocondrial. Cada etapa foi espaçada por um período de estabilização entre as injeções. Os dados obtidos foram extraídos e analisados pelo software DatLab (Oroboros Instruments). Todos os experimentos foram realizados em duplicada e as fibras musculares utilizadas foram recuperadas e secas à vácuo para normalização dos dados de respiração mitocondrial.

3.2.6 Sensibilidade aparente ao ADP

Sensibilidade aparente ao ADP foi determinada por adições subsequentes de ADP nas seguintes concentrações: 100; 175; 250; 500; 1000; 2000, 4000, 6000, 8000 e 10000 µM (MIOTTO; LEBLANC; HOLLOWAY, 2018; PERRY et al., 2012). Fluxo basal foi mensurado com as mitocôndrias energizadas com piruvato/malato 5mM. O K_m aparente ao ADP foi determinado por meio da equação de cinética enzimática de Michaelis-Menten, sendo que $Y = V_{max} * X / (K_m + X)$, onde X é [ADP livre] e Y é JO_2 em [ADP livre]. As equações foram realizadas pelo software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

3.2.7 Emissão mitocondrial de H₂O₂

Emissão mitocondrial de H₂O₂ foi mensurada como estimativa da produção de ROS por meio da taxa de produção de resorufin, que é o produto da reação do H₂O₂ e do AmplexRed® (Invitrogen, Waltham, MA, USA) catalisada pela enzima peroxidase. A mensuração da fluorescência foi realizada por fluorescência com excitação em 563 nm e emissão em 587 nm. As mensurações foram realizadas após a adição dos seguintes substratos: succinato 20 mM e ADP 100 µM. Adicionalmente, os valores de emissão de H₂O₂ na presença ou ausência de ADP foram utilizados para calcular a % de supressão da emissão de H₂O₂ pelo ADP. Uma curva padrão foi realizada utilizando uma solução estoque de H₂O₂ adicionando a cada pulso 30 pmol de concentração final. A taxa específica de produção de H₂O₂ foi determinada utilizando uma regressão linear por meio de uma curva padrão conhecida. As fibras musculares utilizadas em cada experimento foram recuperadas e secas à vácuo. Todos os experimentos foram realizados ao menos em duplicada e as médias utilizadas para fins estatísticos. Emissão de H₂O₂ é expressa em pmol/(min*mg de massa seca) (MIOTTO; LEBLANC; HOLLOWAY, 2018).

3.2.8 Determinação do conteúdo proteico

Amostras do gastrocnêmio vermelho foram homogeneizadas em tampão de lise (EDTA 10 mM, Tris-Base 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluorido de sódio 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM e fluorido fenilmetasulfonil 2 mM) e centrifugados por 30 min à 10.000 r.p.m., 4°C. A concentração de proteínas das amostras foi mensurada pela reação das mesmas com o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250, com kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad) (BRADFORD, 1976), e carregados igualmente para CaMK-II 1:1000 (Abcam), p-CaMK-II 1:1000 (Abcam), p-AktSer473 1:1000 (CellSig), p-AktThr308 1:1000 (CellSig), total-Akt 1:500 (CellSig), p-p38MAPK 1:1000 (Abcam), total-p38MAPK (Abcam), p-Erk1/2 1:500 (CellSig) e total-Erk1/2 1:1000 (CellSig). As proteínas foram separadas por SDS-PAGE gel, transferidas para membranas de PVDF e incubadas em solução de bloqueio (2 h em temperatura ambiente em tampão Tris contendo leite 5%). Após o bloqueio, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo primário (em TBTS 3%) *overnight* em 4°C sob agitação contínua. Na manhã seguinte, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário (em TBTS 1%) por 2 horas e lidas (RAFACHO et al., 2013). As proteínas de interesse foram detectadas por meio de um fotodocumentador e as imagens foram analisadas utilizando o AlphaView®.

3.2.9 Análise estatística

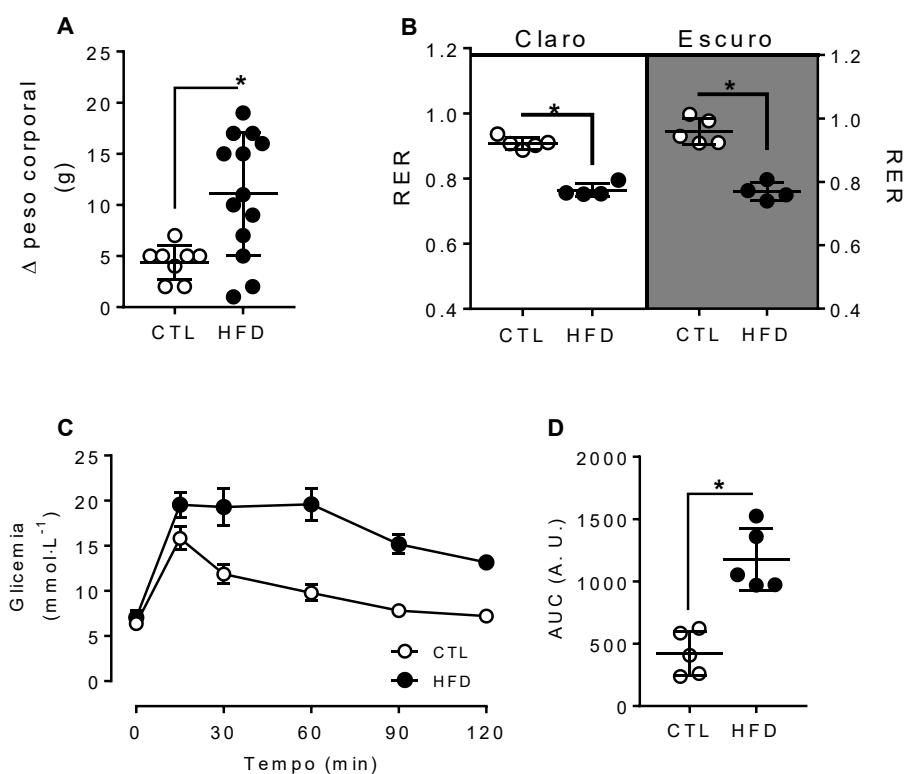
Os dados são apresentados de forma individual com indicação da média \pm desvio-padrão. Testes de normalidade de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e coeficiente de variação foram utilizados para verificar a distribuição dos dados. As comparações foram realizadas utilizando test *t* de student ou ANOVA two-way seguido de pós-teste de LSD. A diferença estatística foi considerada quando $P < 0,05$. Todos os dados foram inseridos e analisados no software GraphPad Prism (Versão 6.0, La Jolla, CA, USA).

3.3 RESULTADOS

A exposição à dieta hiperlipídica causou aumento diferenciado na massa corporal e na preferência de substrato energético tanto nos períodos claros quanto escuros (Figura 13A). Nesse sentido, o consumo de dieta hiperlipídica aumentou a oxidação de lipídeos nos dois momentos observados (Figura 13B). Em relação aos efeitos da dieta hiperlipídica na homeostase da glicose, após 8 semanas de consumo, os camundongos apresentaram

intolerância à glicose observada pela flutuação da glicemia no ipGTT. A intolerância à glicose foi quantificada pela área sob a curva, que se mostrou aumentada nesses camundongos (Figura 13C-D). Em resumo, o consumo de dieta hiperlipídica por 8 semanas aumentou a massa corporal, a oxidação de lipídeos e causou intolerância à glicose em camundongos.

Figura 13 – Caracterização dos camundongos após o consumo de HFD por 8 semanas.

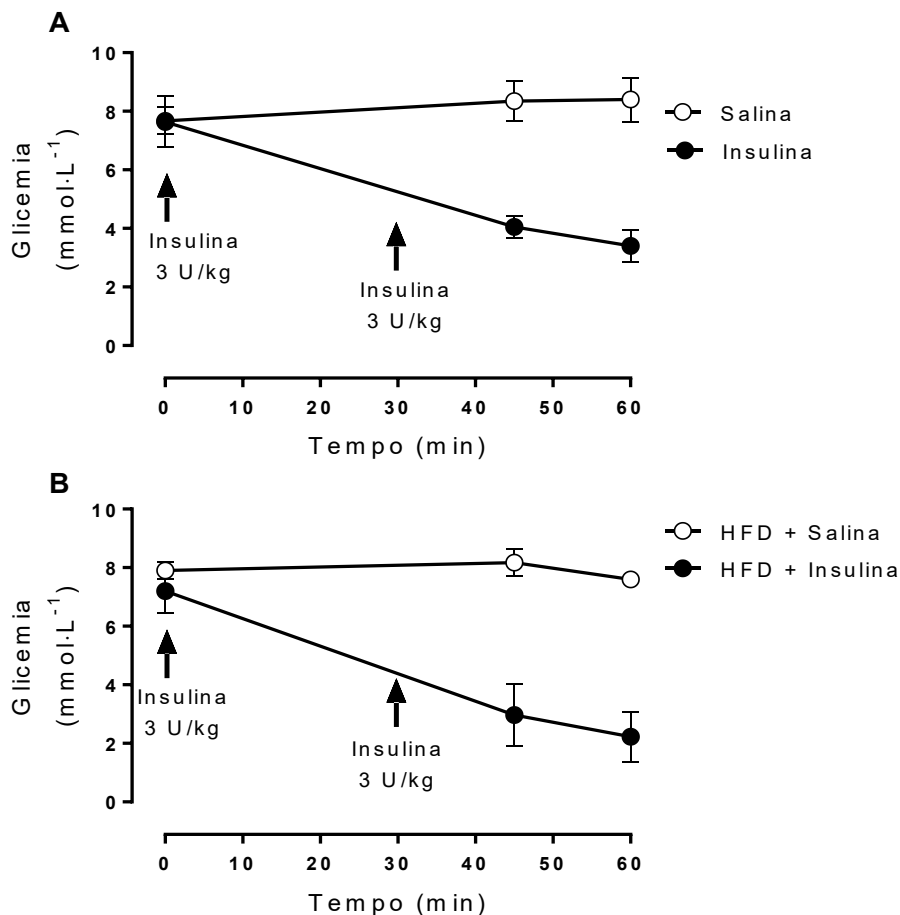


Círculos brancos representam os camundongos controle (CTL); círculos pretos representam os camundongos expostos à dieta hiperlipídica (HFD). Valores apresentados em média \pm 1 desvio padrão no gráfico C. Valores apresentados individualmente com indicação da média \pm 1 desvio padrão do grupo nos gráficos A, B e D. Gráfico A apresenta a variação da massa corporal nas 8 semanas de tratamento; gráfico B apresenta razão de troca respiratória (RER do inglês, *Respiratory Exchange Ratio*) durante os ciclos claro e escuro; gráfico C apresenta a flutuação da glicose durante o ipGTT e o gráfico D apresenta a área sob a curva da glicemia calculada a partir dos valores obtidos no ipGTT. Análise estatística realizada pelo test *t* de Student para amostras não pareadas. * $P < 0,05$. *** $P < 0,001$. Fonte: o autor.

Após a caracterização do fenótipo metabólico dos camundongos após o consumo de HFD por 8 semanas, foi iniciado o procedimento experimental com as injeções de insulina. A validação das injeções de insulina está demonstrada na Figura 14, em que as

concentrações de glicose diminuem após as injeções do hormônio. No grupo controle, as injeções de salina não foram capazes de alterar as concentrações de glicose plasmáticas.

Figura 14 – Validação das injeções de insulina pela concentração de glicose plasmática no grupo que recebeu dieta padrão e no grupo que recebeu HFD.

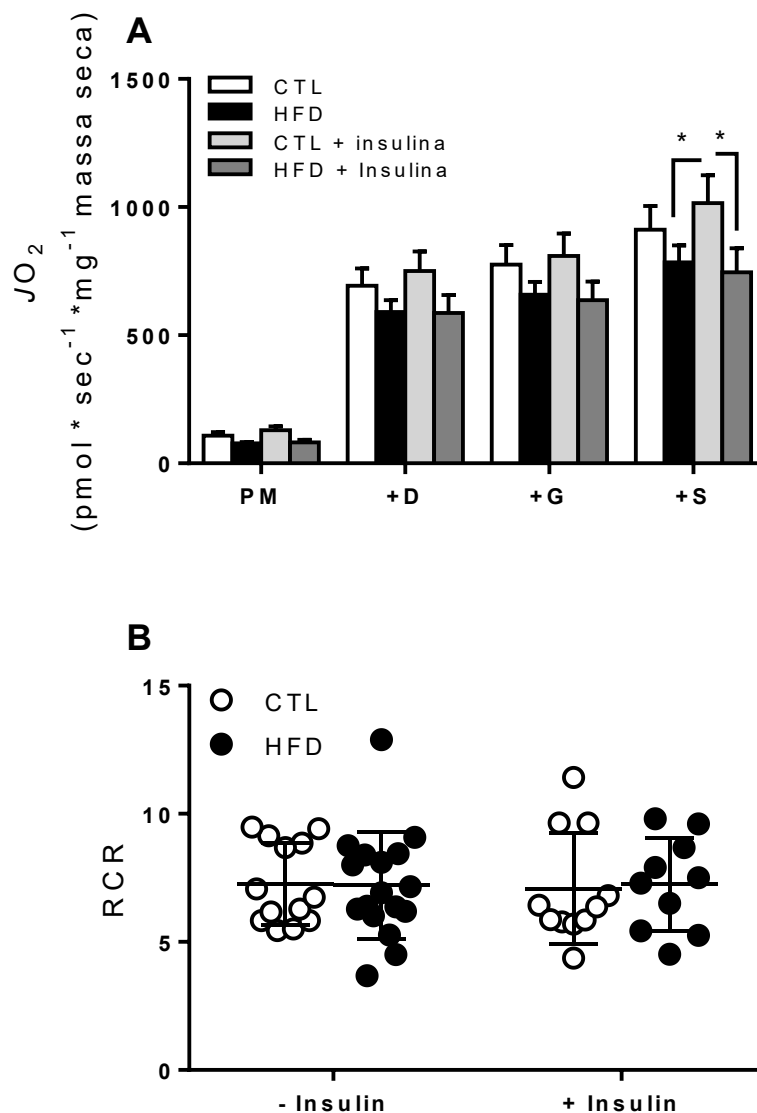


Injeções de salina 0,9% foram utilizadas nos grupos que não receberam insulina. Fonte: o autor.

A respiração mitocondrial não foi alterada pela exposição à dieta hiperlipídica quando comparado ao grupo controle. De forma interessante, quando os camundongos do grupo controle receberam agudamente insulina, a respiração mitocondrial se mostrou aumentada quando na presença de todos os substratos para complexo I (piruvato, malato e glutamato) e para o complexo II (succinato) no estado 3 mitocondrial (Figura 15A-B). Esse aumento na respiração mitocondrial no estado fosforilante não foi observado quando os camundongos que consumiram HFD por 8 semanas tiveram insulina injetada de forma aguda. Adicionalmente, quando foram comparados apenas os camundongos que tiveram insulina injetada, a injeção de insulina aumentou a respiração mitocondrial em todos os cenários testados quando comparados aos camundongos que foram expostos à HFD e

estimulados com insulina. Em tempo, nem a dieta hiperlipídica nem as injeções agudas de insulina foram capazes de alterar a taxa de acoplamento mitocondrial (Figura 15B).

Figura 15 – Respiração mitocondrial sob estimulação aguda de insulina.

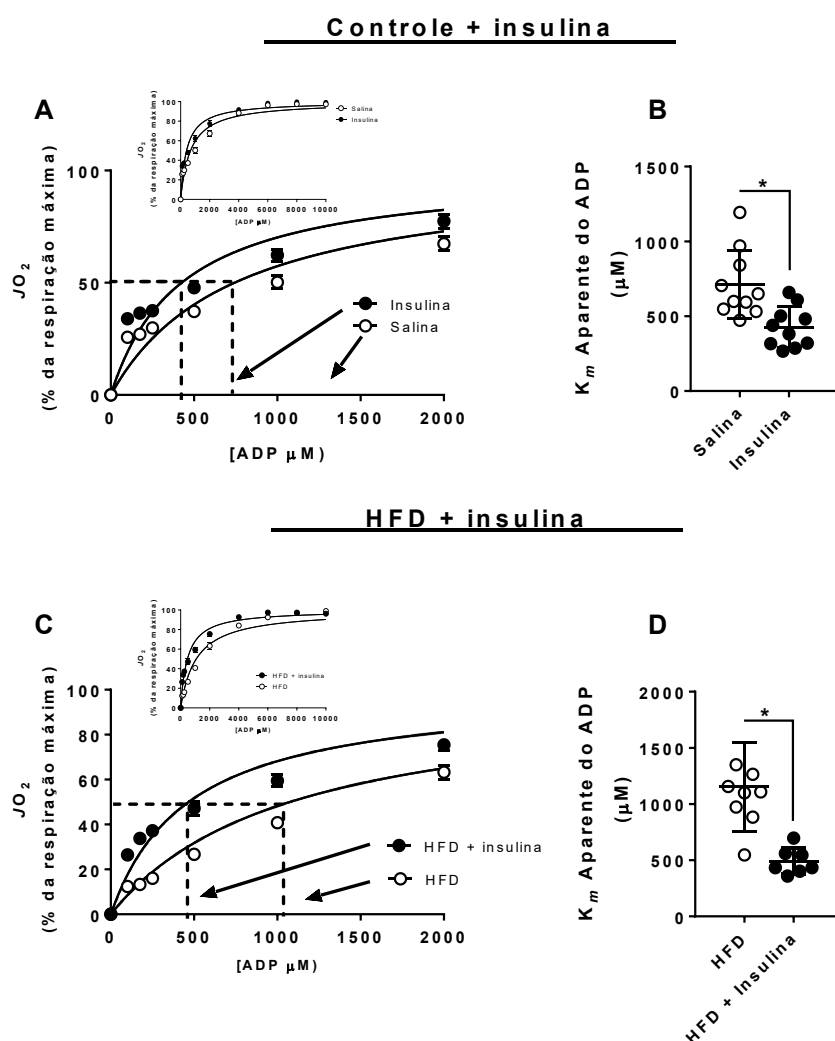


Barras brancas = grupo controle; barras pretas = grupo HFD; barras cinza-claros = grupo controle + insulina; barras cinza escuro = grupo HFD + insulina. PM = piruvato + malato; D = ADP; G = glutamato; S = succinato; RCR = *respiratory control ratio*. Análise estatística realizada pela ANOVA two-way com pós-teste LSD. * P<0,005. Fonte: o autor.

Após a avaliação da respiração mitocondrial em concentrações saturantes, a avaliação da sensibilidade ao ADP foi mensurada por meio de adições submáximas crescentes de ADP com as mitocôndrias energizadas com piruvato e malato (Figura 16). Embora não houve efeito da insulina na respiração máxima na presença de ADP nos camundongos do grupo controle, a cinética do consumo de O₂ foi alterada, promovendo

assim um aumento na sensibilidade ao ADP após as injeções de insulina (Figura 16 A-B). Esse dado pode ser visualizado pelo resultado da constante de Michaelis-Mentel, que se mostrou menor no grupo que recebeu as injeções de insulina. De forma interessante, quando os camundongos que consumiram HFD por 8 semanas foram avaliados, o mesmo efeito da insulina sobre a sensibilidade ao ADP foi observado. As injeções de insulina reduziram o K_m aparente ao ADP em torno de 50% nesses camundongos (Figura C-D).

Figura 16 – Sensibilidade ao ADP após estimulação aguda com insulina *in vivo*.

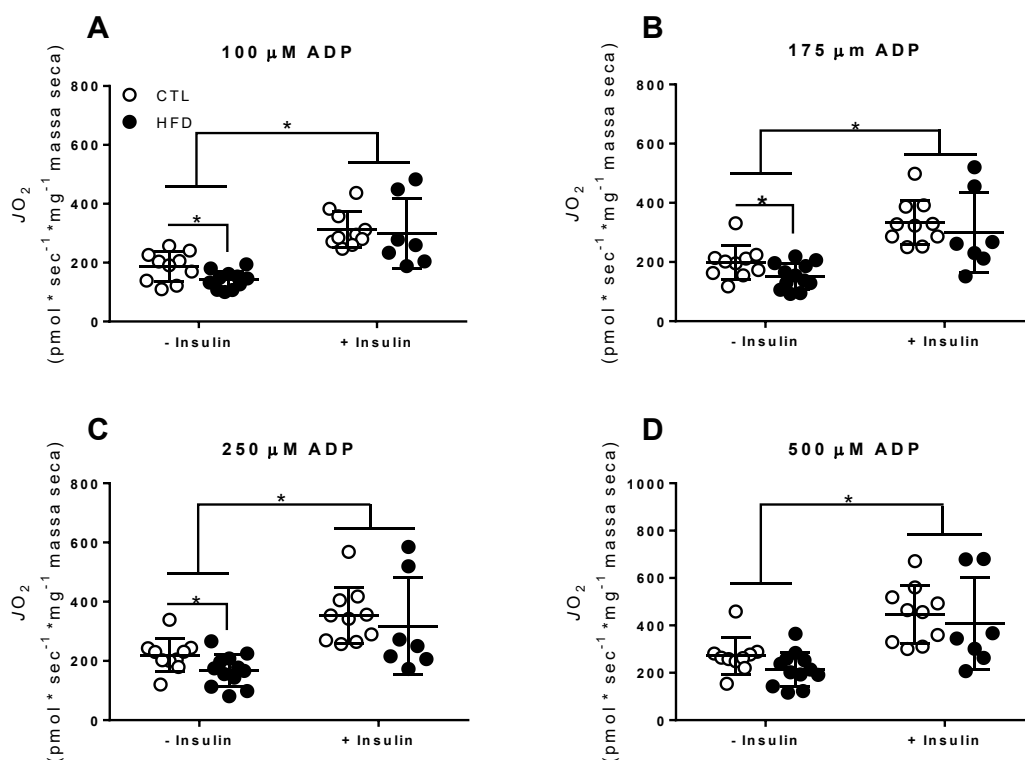


Círculos brancos representam os camundongos sem estimulação com insulina (CTL nos gráficos superiores e HFD nos gráficos inferiores); círculos pretos representam os camundongos sob estimulação aguda de insulina (CTL nos gráficos superiores e HFD nos gráficos inferiores). Valores apresentados em média \pm 1 desvio padrão nos gráficos A e C. Análise estatística realizada pelo teste *t* de Student para amostras não-pareadas. * $P < 0,05$. Fonte: o autor.

O aumento na sensibilidade ao ADP produz um maior consumo de O_2 nas concentrações mais baixas de ADP. Dessa forma, a figura 17 apresenta os valores de

fluxo de O_2 em nas quatro primeiras adições de ADP. Nessa figura é possível observar que o consumo de dieta hiperlipídica conduz à uma redução no consumo de O_2 na presença de ADP em 100, 175 e 250 μM . Entretanto, quando os efeitos da insulina foram comparados aos camundongos controle, foi possível observar que para as quatro concentrações iniciais (100, 175, 250 e 500 μM), houve um aumento no fluxo de O_2 (Figura 17A-D), o que suporta o aumento na sensibilidade ao ADP obtido após o cálculo da constante de Michaelis-Mentel. Da mesma forma, como foi observado um aumento na sensibilidade ao ADP exercido pela insulina nos camundongos que consumiram HFD por 8 semanas, as análises do consumo de O_2 na presença de concentrações submáximas de ADP também se mostraram alteradas. Para as quatro concentrações apresentadas na figura 17 (100, 175, 250 e 500 μM), após a estimulação com insulina, houve um aumento na respiração mitocondrial quando comparado ao seu respectivo grupo sem as injeções de insulina.

Figura 17 – Respiração mitocondrial sob concentrações não-saturantes de ADP.



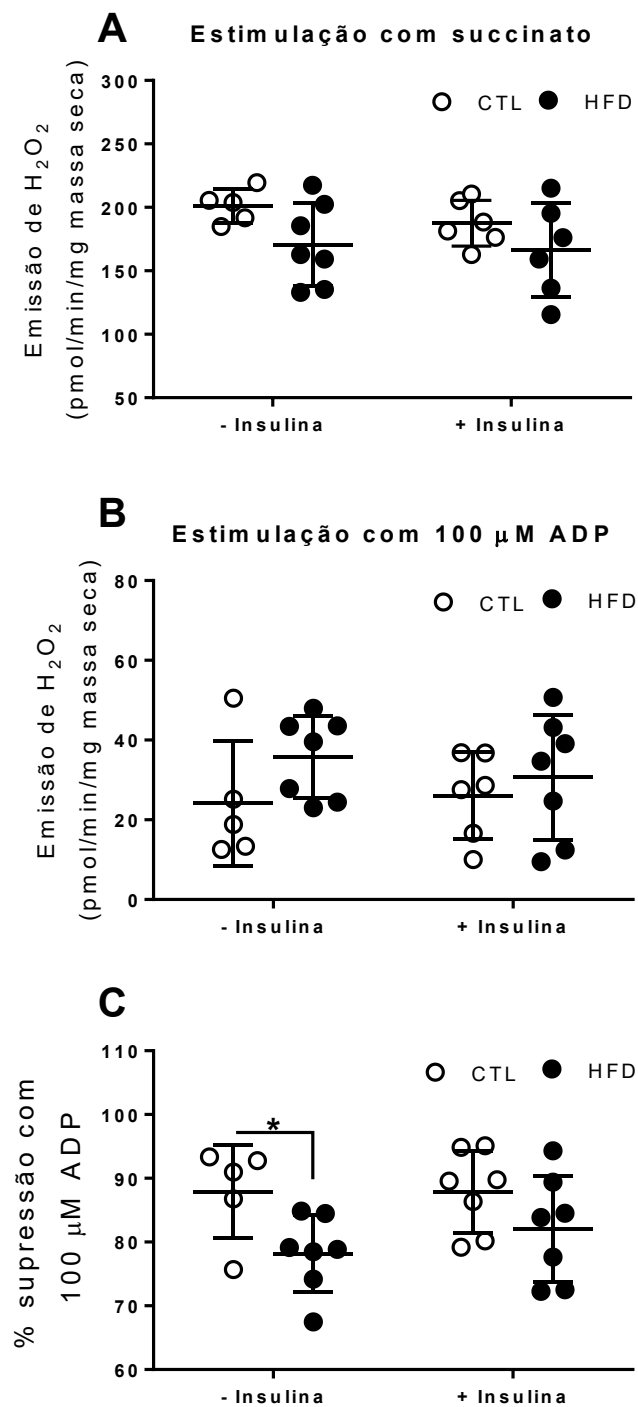
Círculos brancos representam os camundongos controle (CTL); círculos pretos representam os camundongos expostos à dieta hiperlipídica (HFD). Gráficos A, B, C e D representam a respiração mitocondrial na presença de 100, 175, 250 e 500 μM de ADP. Agrupamentos na esquerda representam a condição sem insulina enquanto os agrupamentos na direita representam a condição com insulina. Análise estatística realizada pela ANOVA two-way com pós-teste LSD. * $P < 0,05$. Fonte: o autor.

A produção de ROS é estreitamente relacionada ao potencial de membrana mitocondrial e ao fluxo de elétrons pelo sistema de transferência de elétrons inserido na membrana mitocondrial interna. A efetiva ação da insulina nas células musculares é dependente de uma elegante regulação do balanço redox nessas células, visto que alterações nesse balanço estão relacionadas à redução da ação da insulina (LOH et al., 2010). No desenho experimental utilizado no presente estudo, a máxima produção de ROS mitocondrial foi estimulada pela adição de succinato e a emissão mitocondrial de ROS foi mensurada pela sonda fluorescente AmplexRed[®]. Nem o consumo de HFD ou as injeções de insulina foram capazes de alterar a máxima emissão de ROS (Figura 18A).

Para simular um cenário mais fisiológico, foi injetado ADP 100 μ M, que resulta na redução do potencial de membrana mitocondrial e, por consequência, redução na produção de ROS. A presença de ADP reduziu a produção de ROS em todos os grupos (Figura 18B), o que além de validar o protocolo experimental, demonstrou que os grupos não diferem na emissão mitocondrial de ROS na presença de concentrações submáximas de ADP.

Devido ao fato que a máxima produção mitocondrial de ROS foi alterada pela dieta, uma outra abordagem sobre a produção mitocondrial de ROS é a avaliação da porcentagem de supressão da emissão de ROS causada ADP. Nesse sentido, o consumo de dieta hiperlipídica reduziu a supressão da emissão mitocondrial de ROS exercida por ADP. Quando os efeitos da insulina foram analisados nessas condições, não houve efeito desse hormônio no grupo de camundongos que consumiu a dieta padrão, contudo, no grupo que consumiu a dieta hiperlipídica, a supressão na emissão mitocondrial de ROS exercida por ADP foi maior quando o grupo com ou sem insulina foi comparado.

Figura 18 – Emissão mitocondrial de ROS sob estimulação com insulina.

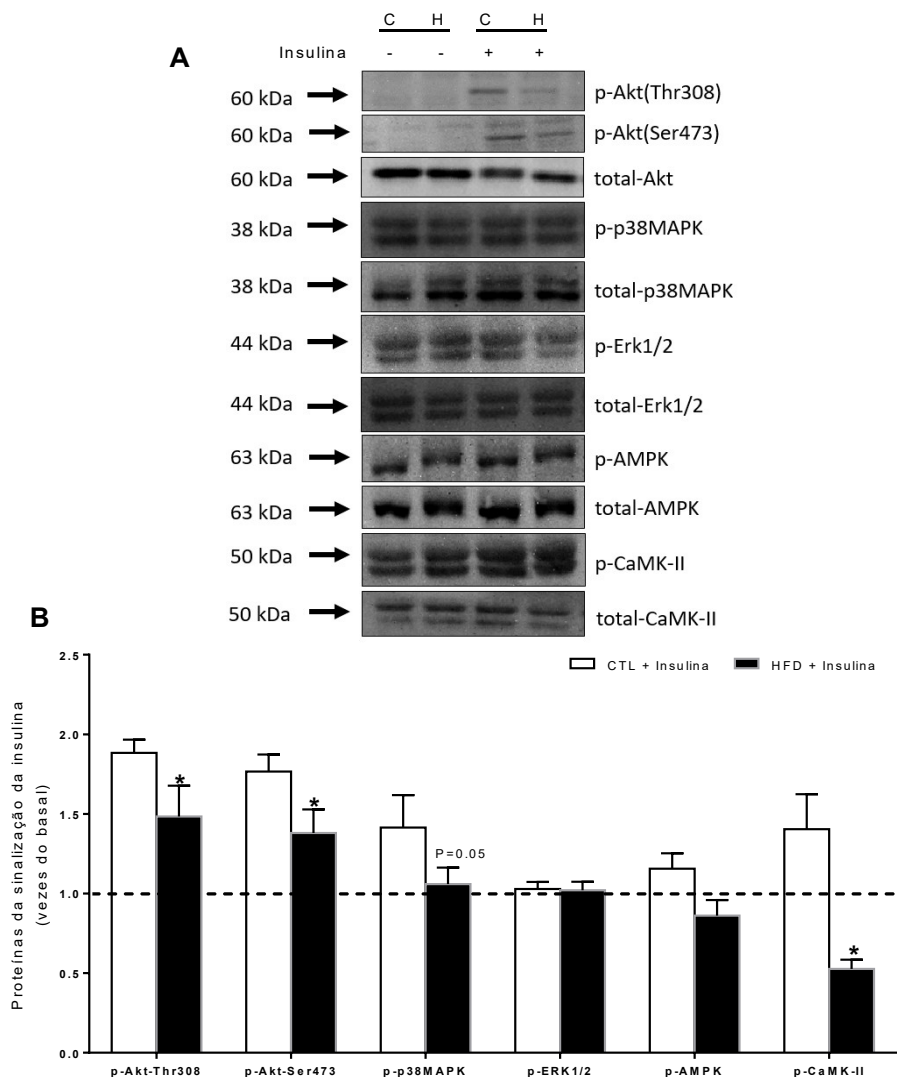


Círculos brancos representam os camundongos controle (CTL); círculos pretos representam os camundongos expostos à dieta hiperlipídica (HFD). Gráfico A = máxima produção estimulada por succinato; gráfico B = produção mitocondrial de ROS na presença de 100 μM de ADP; gráfico C = % da supressão da emissão de ROS pela exercida pelo ADP. Agrupamentos na esquerda representam a condição sem insulina enquanto os agrupamentos na direita representam a condição

com insulina. Análise estatística realizada pela ANOVA two-way com pós-teste LSD. * $P < 0,05$. Fonte: o autor.

Os diversos efeitos celulares da insulina são mediados pela ativação de diferentes proteínas intracelulares, que são responsáveis por funções tais como translocação de GLUT4 para a membrana sarcoplasmática, síntese de glicogênio, inibição da degradação proteica, ciclo celular e crescimento. A ativação por fosforilação de algumas dessas proteínas está apresentada na figura 20. A insulina aumentou a fosforilação em dois resíduos (Serina 473 e Treonina 308) da proteína Akt. Contudo, no grupo que recebeu ração controle, o aumento da fosforilação da Akt foi maior do que no grupo HFD. Ainda, o estado de fosforilação da p38MAPK se encontrou diferente entre o grupo controle e HFD após a estimulação com insulina. Por outro lado, a insulina não foi capaz de alterar os níveis de fosforilação das proteínas Erk1/2 e AMPK. Curiosamente, enquanto a insulina aumentou a fosforilação da CaMK-II no grupo controle, o mesmo não ocorreu no grupo HFD, o que sugere que exista uma alteração na homeostase do cálcio nos camundongos que consumiram HFD por 8 semanas.

Figura 19 – Estado de fosforilação de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina.

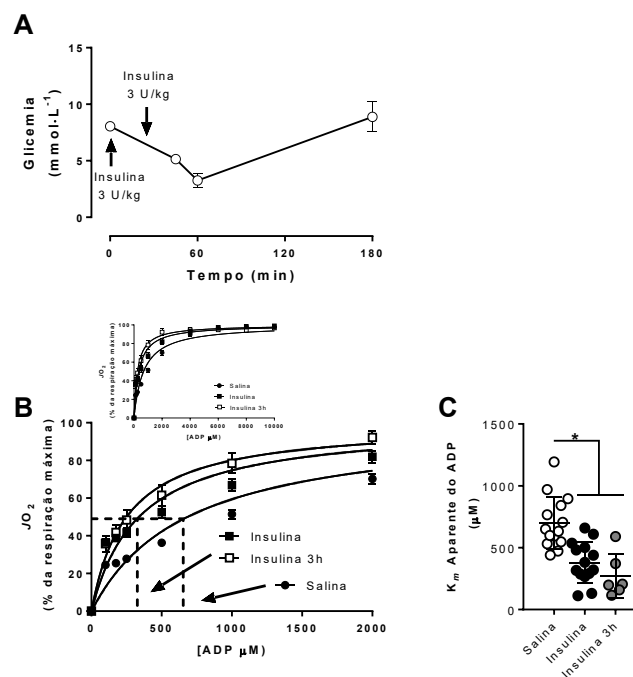


Imagens representativas obtidas no fotodocumentador (A), e semiquantificação das mesmas (B) pela razão entre o conteúdo fosforilado e o conteúdo total. Barras brancas representam o grupo controle enquanto barras pretas representam o grupo HFD. N = 7-8/grupo. Análise estatística realizada pelo teste *t* de Student para amostras não-pareadas. * P < 0,05. Fonte: o autor.

As concentrações de insulina flutuam ao longo do dia de acordo com o estado metabólico do indivíduo. Devido à essa flutuação e à sua meia-vida relativamente curta (em torno de 8 minutos), os efeitos fisiológicos da insulina podem ser divididos de acordo com seu tempo de ação entre rápidos e lentos. Por exemplo, a captação de glicose induzida por insulina pode ser classificada como uma resposta rápida, enquanto os processos de lipogênese e glicogênese requerem mais tempo e podem ser considerados como resposta lenta. Esses conceitos levantaram a hipótese de por quanto tempo as ações da insulina

permaneceriam sobre a sensibilidade mitocondrial ao ADP. Para isso, o mesmo protocolo de duas injeções de insulina foi aplicado em um conjunto de camundongos adultos machos que consumiram dieta padrão. Após 3 horas da primeira injeção, os valores de glicose retornaram aos valores basais (Figura 20A), por outro lado, quando as fibras musculares foram avaliadas, a sensibilidade ao ADP ainda esteve aumentada. A figura 20B apresenta a cinética de utilização do ADP em % da máxima respiração em comparação com os dados apresentados na figura 16A, em que é possível observar um deslocamento da curva para a esquerda após as injeções de insulina independente do tempo. A figura 20C faz a mesma comparação utilizando os dados da figura 16C para os valores de K_m obtidos após o cálculo da constante de Michaelis-Mentel. De acordo com o deslocamento para a esquerda apresentado na figura 20B, os valores de K_m no grupo que recebeu insulina e foi avaliado 3 horas depois permaneceram mais baixos, sugerindo um aumento na sensibilidade ao ADP comparáveis com os efeitos agudos da insulina sobre essa variável.

Figura 20 – Efeitos tardios da insulina sobre a sensibilidade ao ADP.



Glicemia dos camundongos após as duas injeções de insulina (A). Sensibilidade ao ADP após estimulação aguda com insulina *in vivo* (B). Sensibilidade aparente ao ADP obtida a partir da Equação de Michaelis-Mentel (C). Círculos brancos representam os camundongos sem estimulação com insulina, círculos pretos representam os camundongos sob estimulação aguda de insulina e círculos cinzas 3 horas após as injeções de insulina. Indicação da média e desvio-padrão em adição aos valores individuais. Análise estatística realizada pela ANOVA one-way com pós-teste LSD. *P<0,05. Fonte: o autor.

3.4 DISCUSSÃO DOS ACHADOS

Alterações na função mitocondrial têm sido apontadas como possíveis causadores da resistência às ações celulares da insulina. Essa relação causa-efeito poderia ser explicada por: 1) redução da capacidade mitocondrial em oxidar lipídeos, o que resultaria em maior deposição desse substrato orgânico, principalmente no que diz respeito aos intermediários lipídicos, conhecidamente prejudiciais às ações celulares da insulina; 2) pela maior produção de espécies reativas de oxigênio por uma possível alteração na cadeia de transferência de elétrons; 3) funcionamento do sistema de dissipação do potencial de membrana mitocondrial para produção de ATP; 4) dos sistemas enzimáticos de depuração de ROS. Embora exista um conjunto razoavelmente grande de dados demonstrando a participação mitocondrial no desenvolvimento da RI, os efeitos da insulina sobre essa organela têm sido praticamente ignorados ao longo dos anos. Os resultados apresentados neste documento mostram que a insulina, de forma aguda, aumenta a respiração mitocondrial quando na presença de substratos redutores de todos os complexos do sistema de transferência de elétrons e no estado fosforilante. De forma interessante, Ngo et al. (2018) têm demonstrado os efeitos agudos da insulina sobre a atividade do complexo II no tecido adiposo. De fato, em nosso desenho experimental, a respiração mitocondrial só aumenta de forma significativa comparado ao grupo controle quando o complexo II é estimulado com succinato. Ainda, quando os efeitos da insulina no grupo controle são comparados com os efeitos da insulina no grupo que consumiu HFD por 8 semanas, pôde-se observar uma redução da respiração mitocondrial no grupo que consumiu HFD na respiração mitocondrial máxima na presença de substratos para complexo I e II. Esses dados sugerem que os prejuízos mitocondriais causados pela HFD, observados em outros estudos até o momento, têm sido subestimados pelo fato de as mitocôndrias não terem sido testadas sob a estimulação da insulina. Isso sugere que em períodos pós-prandiais ou pós-absortivos, quando há aumento nas concentrações plasmáticas de insulina e as mitocôndrias são estimuladas a alterar sua função, isso não ocorre na mesma magnitude em indivíduos com resistência à ação desse hormônio.

Do ponto de vista do metabolismo energético celular, os efeitos da insulina sobre a respiração mitocondrial poderiam ser explicados de duas formas, pelo aumento da demanda de ATP devido aos efeitos anabólicos da insulina ou por uma via de sinalização direta entre a insulina e as mitocôndrias. Embora a insulina apresente efeitos celulares que aumentam a necessidade de ATP (i. e. glicogênese, síntese proteica, transcrição de

DNA), ela também aumenta a expressão de genes de várias proteínas mitocondriais, como a NADH desidrogenase subunidade IV, a COX-IV (STUMP et al., 2003), contudo, o aumento da expressão gênica de proteínas mitocondriais não é capaz de explicar os efeitos agudos encontrados neste trabalho. Os efeitos da insulina sobre a função mitocondrial por meio do aumento na demanda de ATP são reforçados pelo aumento da taxa de síntese de ATP pelas mitocôndrias e pelo aumento na síntese de proteínas mitocondriais estimulada pela insulina (BOIRIE et al., 2001; STUMP et al., 2003). Atualmente, sugere-se uma dissociação dos efeitos mitocondriais da insulina da demanda energética. A associação mecanística da sinalização da insulina com a função mitocondrial decorre da cascata de sinalização da insulina pelo IRS, PI3K e Akt, por meio da inibição do fator transcricional FoxO-1 (BRUNET et al., 1999). O FoxO-1 ativa a HMOX1 que oxida heme para biliverdina e Fe^{3+} . Considerando o caráter essencial do heme para a função e estabilidade das proteínas do STE, os efeitos inibitórios da insulina sobre a FoxO-1 resultariam em melhora da atividade do STE, além disso, a maior eficiência do STE resulta em aumento na oxidação de NADH, alterando a razão NAD^+/NADH , o que é fundamental para a atividade das deacetilases SIRTs dependentes de NAD^+ .

De forma importante, independentemente da dieta consumida, as injeções de insulina foram capazes de aumentar a sensibilidade ao ADP, observada pela redução do K_m aparente ao ADP. A cinética do consumo de oxigênio pelo aumento das concentrações de ADP é dependente do potencial de membrana mitocondrial, da atividade intrínseca da ATP sintase e do sistema de troca de nucleotídeos, com especial atenção ao ANT-1. Todos esses fatores são passíveis de regulação pós-traducional, o que dificulta o apontamento de uma proteína alvo para os efeitos da insulina. Contudo, como a respiração máxima mitocondrial foi aumentada pela insulina no grupo controle e não teve alteração pela insulina no grupo HFD, é possível sugerir que a redução na ação da insulina nesse grupo não explica a manutenção dos seus efeitos na sensibilidade ao ADP. Portanto, seria razoável sugerir que a insulina possui algum efeito sobre o sistema de trocadores de nucleotídeos, principalmente a proteína ANT-1 e que esse efeito ainda é mantido mesmo em cenários de resistência à insulina (ao menos aquela mensurada pela fosforilação em resíduos da Akt) induzida por 8 semanas de consumo de HFD. Se isso for verdade, a insulina poderia alterar a função mitocondrial por não uma, mas por mais do que uma via de sinalização. No desenho experimental investigado no presente estudo, uma destas vias ainda estaria preservada enquanto a outra não.

Embora tenha sido demonstrado que o consumo de dieta hiperlipídica induz resistência à insulina com concomitante redução da captação de glicose, os efeitos celulares da insulina são resultado da ativação de diversas proteínas intracelulares. O aumento da sensibilidade ao ADP após a estimulação aguda com insulina mesmo nos camundongos que consumiram a dieta hiperlipídica por 8 semanas sugere que existe um mecanismo de demanda de ATP, que é percebido pelas mitocôndrias e é independente da RI induzida por HFD. Pouco se conhece sobre a regulação da sensibilidade ao ADP pelas mitocôndrias, contudo, essas organelas são conhecidas por alterar sua função de forma robusta de acordo com o estado ou a demanda energética da célula. Exemplos dessa rápida modulação são o aumento rápido na produção de ATP devido à contração muscular ou ao aumento na frequência cardíaca no músculo cardíaco (VENTURA-CLAPIER et al., 2011). Enquanto os dados apresentados nesse documento mostram que a insulina aumenta a sensibilidade ao ADP, o exercício físico é conhecido por reduzir a sensibilidade à esse nucleotídeo (MIOTTO; HOLLOWAY, 2016, 2018). Esse efeito oposto do exercício sobre a sensibilidade ao ADP sugere que as mitocôndrias são capazes de regular esse aspecto de acordo com o estado energético da célula e que isso ocorre de forma independente à demanda de ATP. Esse divórcio entre estado energético celular e demanda ao ATP pode ser um bom indício de mecanismo envolvido por trás dessa regulação, contudo, os dados existentes no momento ainda não permitem nenhuma conclusão adicional.

Como descrito anteriormente, a cascata de sinalização da insulina é complexa e envolve diversos fatores. Um aspecto interessante sobre os requisitos necessários para a total efetividade da insulina é o aumento transitório das concentrações de cálcio no sarcoplasma das células musculares. Aparentemente, a flutuação das concentrações de cálcio exercida pela insulina é resultado da liberação do estoque sarcoplasmático de cálcio, que fica armazenado no retículo sarcoplasmático (RS). O aumento transitório nas concentrações intracelulares de cálcio pode ser medido pelo grau de fosforilação da proteína CaMK-II, que é fosforilada pela proteína sensível ao cálcio denominada calmodulina. Uma vez ativada, a CaMK-II poderia ser responsável pela ativação de vias de sinalização intracelulares que aumentariam a capacidade oxidativa mitocondrial, observada no presente estudo. Contudo, o exercício agudo é largamente conhecido por aumentar a fosforilação da CaMK-II (MIOTTO; HOLLOWAY, 2018), porém com efeitos opostos ao da insulina sobre a sensibilidade ao ADP. Além desses dados excluirmos a ativação da CaMK-II para a sensibilidade mitocondrial ao ADP, quando a insulina foi

injetada nos camundongos que consumiram HFD por 8 semanas, ainda ocorreu aumento na sensibilidade ao ADP mesmo diante da ausência da ativação da CaMK-II. Novamente, embora o aumento na sensibilidade ao ADP pareça ser dependente do estado energético das células, mas não da demanda ao ATP, os dados apresentados aqui reforçam a capacidade das mitocôndrias alterarem sua sensibilidade ao ADP de forma rápida em resposta às ações da insulina.

Outro ponto importante é que tão logo as concentrações intracelulares de cálcio aumentam, mecanismos regulatórios são ativados para remover o cálcio do sarcoplasma reestabelecendo as concentrações basais desse íon. As concentrações intracelulares de cálcio são mantidas pelo trocador NCX localizado na membrana sarcoplasmática, pela atividade da SERCA no RS, e mais recentemente, tem sido descrito as mitocôndrias como importantes organelas envolvidas no tamponamento do cálcio. De fato, as mitocôndrias têm maior capacidade de armazenamento de cálcio do que o próprio RS, porém, devido à baixa sensibilidade de seus canais ao cálcio, a captação mitocondrial de cálcio só ocorre quando elevações razoavelmente robustas ocorrem. Recentemente tem sido descrito um mecanismo pelo qual as mitocôndrias interagem fisicamente com o RS, conhecido como MAM (do inglês, *mitochondrial associated membranes*) (THEUREY; RIEUSSET, 2016). Devido às altas concentrações intrasarcoplasmáticas de cálcio, a interação física entre as mitocôndrias e o RS produziria um gradiente químico capaz de induzir a movimentação desse cátion para dentro das mitocôndrias. Uma vez dentro das mitocôndrias, o cálcio é capaz de aumentar a atividade da piruvato desidrogenase, glutamato desidrogenase e ATP sintase (GIORGI; MARCHI; PINTON, 2018). Esses efeitos diretos do cálcio sobre importantes enzimas mitocondriais poderiam explicar o aumento da capacidade oxidativa mitocondrial observada após as injeções com insulina no presente estudo.

De forma interessante, quando os camundongos que consumiram dieta hiperlipídica foram avaliados, o conteúdo de p-CaMK-II já se encontrava acima dos valores basais encontrados no grupo controle. Adicionalmente, a estimulação com insulina não foi capaz de aumentar o grau de fosforilação dessa proteína, independentemente da redução do K_m ao ADP. Esses dados sugerem que a exposição à dieta hiperlipídica por 8 semanas induz uma alteração na homeostase do cálcio, aumentando a fosforilação da CaMK-II em situações basais. De fato, tem sido descrito que em cenários de obesidade e resistência à insulina, ocorre um vazamento de cálcio do RS devido à oxidação nos resíduos de cisteína dos receptores de rianodina (JAIN et al.,

2014). É importante ressaltar que embora o cálcio tenha alguns efeitos positivos sobre a função mitocondrial, esses efeitos são tempo e concentração dependentes. Portanto, a exposição crônica ao cálcio nos camundongos que consumiram HFD poderia ser um dos fatores envolvidos na redução da capacidade oxidativa das mitocôndrias.

Embora a participação das EROs seja frequentemente associada à redução na ação da insulina, o fato é que concentrações basais de EROs são necessárias para a total resposta celular à sinalização estimulada por insulina. Os efeitos da insulina sobre a sensibilidade mitocondrial ao ADP podem ser observados também sobre a emissão mitocondrial de EROs. A produção mitocondrial de EROs é maior quando o potencial de membrana mitocondrial se encontra mais negativo, geralmente quando as mitocôndrias se encontram no estado 4 respiratório, ou seja, na ausência de ADP (MURPHY, 2009). Quando ADP é adicionado ao meio, o movimento desse nucleotídeo para dentro das mitocôndrias estimula a produção de ATP e por consequência a redução do potencial de membrana mitocondrial. Após 8 semanas de consumo de HFD, os camundongos apresentaram menor supressão exercida pelo ADP na emissão de EROs, o que foi prevenida pela insulina de forma aguda, mas não no grupo controle. Esses dados podem parecer contraditórios à primeira vista, mas devido ao fato de que as mitocôndrias de camundongos controle já apresentam uma supressão próxima de 90% na presença de 100 μM ADP, é possível que a técnica utilizada para emissão de EROs (fluorescência) não tenha resolução suficiente para mensurar diferenças tão pequenas na supressão da produção de EROs. Variações em torno de 2-3% são encontradas com frequência sendo atribuídas ao ruído da mensuração e não à algum aspecto fisiológico relevante. Por outro lado, no grupo que consumiu HFD por 8 semanas, a supressão exercida por concentrações submáximas de ADP gira em torno de 70-80%, portanto, existe um intervalo razoável para que os efeitos da insulina sobre a sensibilidade ao ADP sejam captados pelo aparelho.

Ao contrário da nossa hipótese sobre os efeitos transientes da insulina sobre a sensibilidade mitocondrial ao ADP, três horas após as injeções de insulina, o aumento da sensibilidade ao ADP ainda estava presente nas fibras permeabilizadas. De forma interessante, três horas após as injeções de insulina, a glicemia dos camundongos havia retornado ao normal, o que sugere que os efeitos rápidos da insulina haviam cessados. Contudo, processos como glicogênese e lipogênese, que exigem ATP, poderiam levar mais tempo. Se a hipótese de que a sensibilidade ao ADP estaria aumentada para suportar a demanda energética requerida pela insulina, esses efeitos tardios induzidos pela insulina

poderiam explicar a manutenção tardia da sensibilidade ao ADP. Contudo, os mecanismos que controlam esses efeitos necessitam ser devidamente descritos.

Em resumo, a insulina apresenta efeitos sobre a máxima capacidade respiratória e a sensibilidade ao ADP em camundongos alimentados com dieta controle. Em camundongos com resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica, os efeitos da insulina sobre a capacidade máxima respiratória deixam de ser observados, contudo, o aumento na sensibilidade ao ADP ainda está presente, observado pelo consumo de oxigênio e pela emissão de EROs. Embora os mecanismos por trás desse fenômeno não puderam ser explicados no presente estudo, os dados sugerem fortemente uma relação bilateral entre a insulina e a função mitocondrial por meio da ativação de vias não clássicas de sinalização intracelular desse hormônio.

CAPÍTULO IV – EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DA LEUCINA SOBRE A RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL

4.1 INTRODUÇÃO

A leucina é um aminoácido essencial que tem sido estudado em modelos pré-clínicos de obesidade e resistência à insulina devido ao seu potencial efeito benéfico sobre o metabolismo da glicose (BRUNETTA; CAMARGO; NUNES, 2018). Em tais modelos, a ingestão crônica de leucina reduz o peso corporal total e o acúmulo de tecido adiposo, com concomitante melhora na homeostase da glicose e de lipídeos (BRUNETTA; CAMARGO; NUNES, 2018; MACOTELO et al., 2011; ZHANG et al., 2007). Tais efeitos sobre o metabolismo têm sido atribuídos às ações da leucina sobre as células beta pancreáticas e os tecidos-alvo da insulina, como fígado, tecido adiposo e músculo esquelético (LI et al., 2012; MACOTELO et al., 2011; ZHANG et al., 2007). Contudo, ainda não é totalmente conhecido como a leucina exerce tais efeitos.

Tem sido sugerido que as mitocôndrias estão envolvidas no desenvolvimento da resistência à insulina no músculo esquelético. De fato, vários estudos têm demonstrado alterações na bioenergética mitocondrial (PAULA; LEBLANC; HOLLOWAY, 2018), responsividade mitocondrial à insulina (BRUNETTA et al., 2018), dinâmica mitocondrial (BACH et al., 2003), e balanço redox (JAIN et al., 2014b) em modelos pré-clínicos de resistência à insulina. Além disso, intervenções genéticas ou farmacológicas que visam a melhoria da função mitocondrial em modelos de obesidade e resistência à insulina, têm mostrado ser benéficas em desfechos como a tolerância a glicose e a responsividade à insulina (ANDERSON et al., 2009; LANTIER et al., 2015). De forma mecanística, os efeitos da leucina nos tecidos-alvo da insulina parecem ser relacionados com a ativação de várias vias de sinalização, incluindo o aumento na expressão e atividades da SIRT, PGC-1 α , PPAR- γ e UCPs (LI et al., 2012; ZHANG et al., 2007). De forma importante, essas vias moleculares são conhecidas por estarem envolvidas na manutenção da função e qualidade mitocondrial. Além disso, experimentos com cultura de células do músculo esquelético mostram que a leucina, de forma aguda, pode aumentar o consumo de O₂ (VAUGHAN et al., 2013), a oxidação de palmitato (LIANG et al., 2014) e a biogênese mitocondrial (LIANG et al., 2014; SCHNUCK et al., 2016). Portanto, os efeitos metabólicos positivos da leucina em modelos de obesidade induzida por dieta podem ser devido a melhoras na função mitocondrial. Contudo, nenhum desses estudos investigou de forma aprofundada os efeitos crônicos da suplementação com leucina sobre a função e morfologia mitocondrial.

O nosso grupo de pesquisa tem mostrado que a função mitocondrial pode estar reduzida antes do aparecimento global ou muscular da resistência à insulina em um modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos (BRUNETTA et al., 2018). Portanto, tendo em vista que a leucina parece alterar a função mitocondrial em culturas de células (LIANG et al., 2014; SCHNUCK et al., 2016; VAUGHAN et al., 2013) e atenuar os efeitos deletérios de dietas hipercalóricas sobre o metabolismo (BRUNETTA; CAMARGO; NUNES, 2018), nós questionamos se a leucina poderia influenciar a função e morfologia mitocondrial no músculo sóleo de camundongos machos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da leucina, *in vitro* e *in vivo*, sobre a respiração mitocondrial no músculo sóleo de camundongos. O presente estudo mostra que, *in vitro*, a leucina agudamente aumenta a respiração mitocondrial sem alterar a taxa de acoplamento respiratório. Além disso, esses efeitos foram mitigados quando complexo alvo da rapamicina, subunidade 1 foi bloqueado. Adicionalmente, ingestão crônica de leucina atenuou o acúmulo de massa corporal e triacilgliceróis hepáticos em associação com efeitos positivos sobre a respiração mitocondrial, área superficial e complexidade no músculo esquelético sóleo.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Comitê de ética

Todos os procedimentos e técnicas aplicados neste estudo foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Camundongos – CEUA/ da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o número de aprovação 6191300316 (ANEXO I).

4.2.2 Camundongos

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, variedade albina, espécie *Mus Musculus*. Todos os camundongos foram provenientes do Biotério Central da UFSC e chegaram ao biotério setorial com 35 dias de vida. Após 5 dias de ambientação, iniciaram os procedimentos experimentais.

4.2.3 Efeitos agudos *in vitro* da leucina na respiração mitocondrial

Para estudar os efeitos da leucina sobre a respiração mitocondrial, camundongos que não receberam nenhuma intervenção prévia foram mortos por deslocamento cervical e o sóleo foi removido. Após a separação das fibras musculares (descrição no item 2.2.8), as fibras foram incubadas na presença de leucina 5 mM por 1 hora em tampão BIOPS.

Após esse período, as fibras foram transferidas para outro poço contendo o mesmo tampão na presença de saponina 50 µg/mL por 30 minutos. Após a permeabilização, as fibras foram lavadas duas vezes por 10 minutos em tampão MiR05 e colocadas (em torno de 1,5 mg) no oxígrafo para avaliação da respiração mitocondrial. Para avaliar os efeitos da inibição da atividade fosforilante do complexo proteico mTORC1, foi utilizada a rapamicina. Rapamicina 200 nM foi incubada na presença de leucina 5 mM por 1 hora à 4°C (mesmos procedimentos descritos anteriormente). Como controle foi utilizada a incubação de leucina na presença do veículo da rapamicina (DMSO 0,1%).

4.2.4 Suplementação crônica com leucina

Após a chegada ao biotério setorial com 35 dias de vida, os camundongos foram mantidos por 5 dias para ambientação e separados aleatoriamente entre os grupos experimentais. Após a separação, a massa corporal e a glicemia de jejum foram mensuradas com o objetivo de não haver diferenças basais entre os camundongos para essas variáveis. Os camundongos foram mantidos em ciclo claro-escuro (12 h) com acesso a ração e água *ad libitum*. Os camundongos receberam dieta padrão ou dieta hiperlipídica (60% de calorias oriundas da gordura) a partir dos 40 dias de idade concomitante com a ingestão de leucina, solubilizada na água de beber 2,5% (2,5 g em 100 mL de água), por 4 semanas. Para os testes metabólicos e análises da função mitocondrial, os camundongos tiveram a oferta de leucina retirada 24 horas antes.

4.2.5 Preparação de fibras permeabilizadas

As fibras do músculo sóleo foram preparadas conforme descrito no item 2.2.8.

4.2.6 Avaliação da respiração mitocondrial pelo protocolo SUIIT

As fibras musculares do sóleo (em torno de 1,5-2,5mg) foram secadas em filtro de papel, pesadas e inseridas no oxígrafo da marca Oroboros (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) com 2 mL de tampão de respiração à 37°C. Para acessar o fluxo de O₂ os substratos foram adicionados na seguinte ordem: piruvato 5 mM, malato 5 mM, ADP 3 mM, succinato 10 mM, oligomicina 2 µg/mL, Antimicina A 1 mM. Cada etapa foi espaçada por um período de estabilização entre as injeções. Os dados obtidos foram extraídos e analisados pelo software DatLab (Oroboros Instruments).

4.2.7 Avaliação da tolerância à glicose *in vivo* (ipGTT)

A avaliação da tolerância à glicose foi realizada conforme descrito no item 2.2.3.

4.2.7 Avaliação da responsividade à insulina *in vivo* (ipITT)

A avaliação da responsividade à insulina foi realizada conforme descrito no item 2.2.4.

4.2.9 Caracterização murinométrica

A caracterização murinométrica foi realizada conforme descrito no item 2.2.2.

4.2.10 Caracterização bioquímica

A caracterização bioquímica foi realizada conforme descrito no item 2.2.5.

4.2.11 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada conforme publicação prévia com pequenas modificações (FERREIRA, NAZARI & MULLER, 2018). Brevemente, o músculo sóleo foi cortado longitudinalmente e fixado em solução tampão contendo glutaraldeído 2,5% , paraformaldeído 2,5%, e cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 24 horas à 4 °C. Após essa etapa, as amostras foram lavadas em tampão com cacodilato 0,1 M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% (OsO₄) por 1 hora à temperatura ambiente. A desidratação foi feita em etapas sequenciais com adições crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). As amostras foram então infiltradas com resina de Spurr em solução de acetona/resina de Spurr por 24 h. Por fim, o músculo sóleo foi posicionado na posição longitudinal em resina 100%, à 70°C por 24h. Secções semifinas (700nm) foram cortadas e marcadas com azul de toluidina 1% para verificação da orientação e qualidade da amostra. Secções ultrafinas (70 nm) foram subsequentemente cortadas com a utilização de uma lâmina de diamante em ultramicrótomo (Leica UC7) e montadas em grids de chumbo para marcação com solução aquosa de acetato de uranila 5% e citrato 1%. As secções foram examinadas e fotografadas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão TEM JEM 1011 (JEOL, Tóquio, Japão) à 80kV.

4.2.12 Análises morfológicas

Os músculos foram fotografados com aumento de 20,000 e 50,000 vezes para análise da morfologia mitocondrial. As regiões subsarcolemas (SS) e intermiofibrilares (IMF) foram analisadas. Para cada camundongo, quatro regiões ricas em mitocôndrias para cada fibra foram analisadas, tanto para o subcompartimento intermiofibrilar quanto subsarcolemal. Essa estratégia permitiu a análise de ao menos 30 mitocôndrias por subcompartimento por foto, o que resultou em mais de 200 mitocôndrias por animal. A média de 4-5 fotos foi utilizada para cada parâmetro analisado.

A morfologia mitocondrial foi analisada utilizando o software ImageJ (Versão 1.42q, Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, USA) pelo traçado manual de mitocôndrias íntegras e discerníveis. As mitocôndrias localizadas em ambos os subcompartimentos (menos de 1%) foram excluídas das análises. A área de superfície média (tamanho mitocondrial) foi reportada em μm^2 ; *aspect ratio* (AR) foi calculada a partir da equação [(maior eixo)/(menor eixo)], significando a razão comprimento/largura dessa organela; form fator (FF) foi calculado seguindo [(perímetro)/($4\pi \cdot$ área superficial)] significando a complexidade da organela; circularidade [$4\pi \cdot$ (área superficial/perímetro)] e *roundness* [$4 \cdot$ (área superficial)/($\pi \cdot$ maior eixo)] são dois índices 2D da esfericidade com valor = 1 indicando uma esfera perfeita (PICARD; WHITE; TURNBULL, 2013). Os valores foram computados no software Excel® (Microsoft, USA) para posteriores análises estatísticas.

4.2.12 Análise estatística

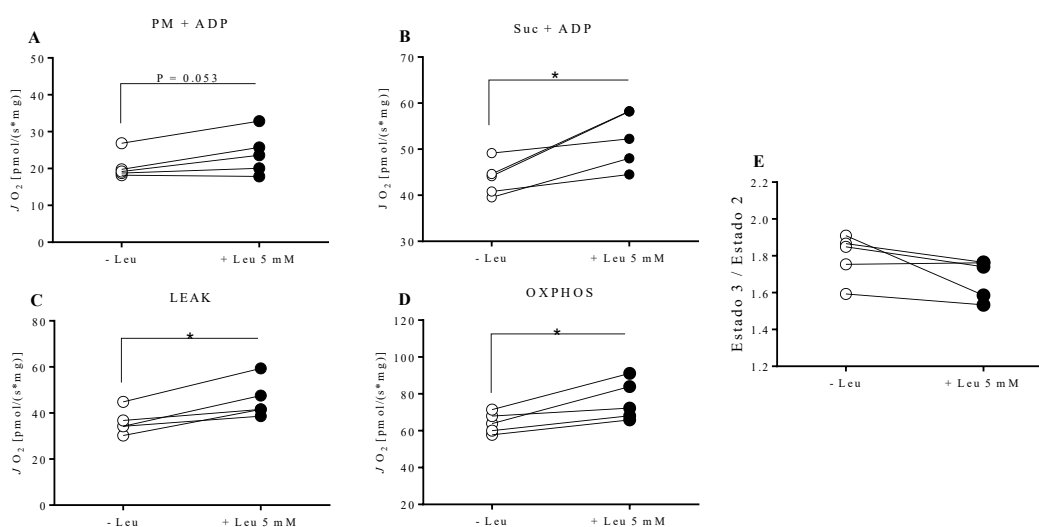
Os dados são apresentados em média \pm desvio-padrão ou mediana e intervalo interquartil dependendo da distribuição Gaussiana. Testes de normalidade de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e coeficiente de variação foram utilizados para verificar a distribuição dos dados. As comparações foram realizadas utilizando teste *t* de Student para amostras pareadas nos experimentos de incubação com ou sem leucina utilizando as fibras musculares dos mesmos camundongos. Os dados dos experimentos testando a ingestão crônica de leucina foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA one-way) seguido por pós-teste de Sidak ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, de acordo com a distribuição dos dados. A correção de Holm-Sidak foi utilizada para ajustar os valores de P para múltiplas comparações quando necessário. A diferença estatística foi considerada quando $P < 0,05$. Todos os dados foram inseridos e analisados no software GraphPad Prism (Versão 6.0, La Jolla, CA, USA).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Efeitos agudos da leucina sobre a respiração mitocondrial

A incubação com leucina aumentou a respiração mitocondrial quando o complexo II foi estimulado (succinato) no estado fosforilante (Figura 21B). O LEAK e a fosforilação oxidativa também foram aumentados pela incubação com leucina (figura 21C, 21D), não obstante o RCR (Figura 21E) não foi alterado por essa condição, o RCR não foi alterado devido ao aumento concomitante do LEAK e da OXPHOS.

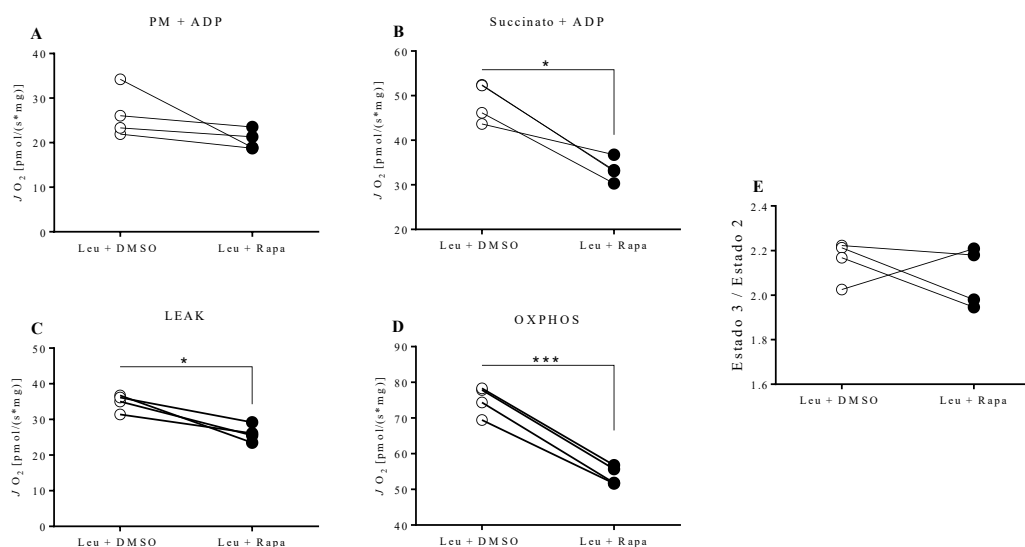
Figura 21 – Efeitos agudos da leucina sobre respiração mitocondrial.



Círculos brancos representam o sóleo sem leucina enquanto os círculos pretos representam a respiração mitocondrial do sóleo sob estimulação com leucina 5mM por 1 hora. RCR = LEAK/OXPHOS. * $P < 0,05$. Fonte: o autor.

Considerando o papel da leucina na ativação do complexo proteico mTORC1, foi utilizada rapamicina (200 nM) (um inibidor da atividade de cinase desse complexo) juntamente com leucina no músculo sóleo extraído de camundongos controle. A respiração estimulada com succinato + ADP, LEAK e OXPHOS foi reduzida nas mitocôndrias incubadas com rapamicina (Figura 22B, C e D). A respiração no estado fosforilante do complexo I não foi alterada pela inibição da mTORC1 (Figura 22A), no entanto, destaca-se que esse parâmetro mitocondrial não foi alterado pela leucina inicialmente. Devido à redução na respiração no estado 2 (LEAK) e no estado 3 (OXPHOS), o RCR não foi alterado pela incubação com rapamicina.

Figura 22 – Efeitos da inibição da mTORC1 sobre respiração mitocondrial.

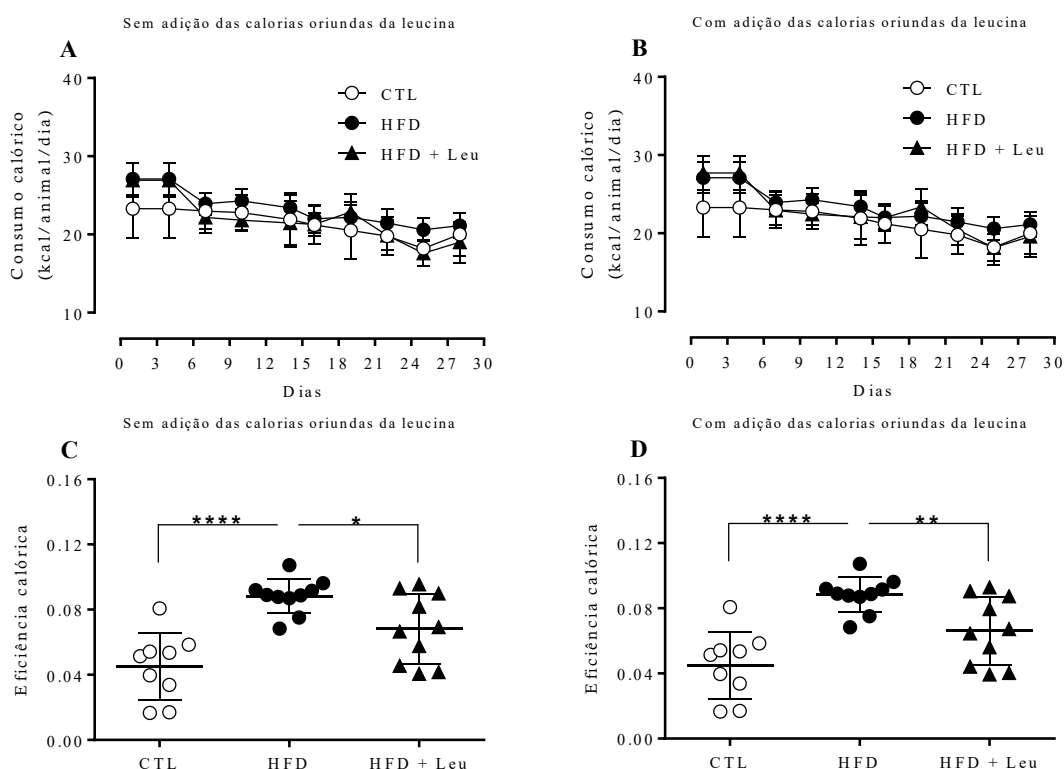


Círculos brancos representam a condição com leucina 5 mM + DMSO 0,1% enquanto os círculos pretos representam a condição com leucina 5 mM + rapamicina 200 nM. RCR = LEAK/OXPHOS. * P < 0,05; *** < 0,001. Fonte: o autor.

4.3.2 Efeitos da suplementação crônica de leucina em camundongos obesos

Os camundongos foram mantidos sob dieta hiperlipídica e leucina (solubilizada na água de beber) por 28 dias. O consumo calórico não foi diferente entre os grupos durante todo o tratamento (Figura 23A), independentemente dos efeitos aditivos da leucina (Figura 23B). O grupo HFD apresentou maior eficiência calórica quando comparado ao grupo controle (Figura 23C), ainda, o tratamento com leucina reduziu a eficiência calórica. A Figura 23B apresenta a eficiência calórica dos grupos com a adição das calorias oriundas da leucina, contudo, não houve efeito da leucina sobre esse parâmetro. Em resumo, é possível observar que o padrão de consumo calórico e eficiência calórica não varia após a adição das calorias da leucina, o que demonstra que os efeitos calóricos da leucina são irrelevantes para os desfechos encontrados.

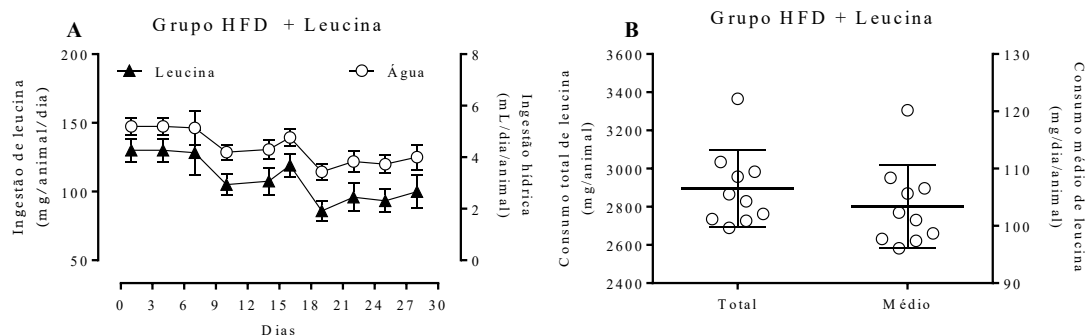
Figura 23 – Consumo calórico e eficiência calórica em camundongos obesos suplementados com leucina.



Círculos brancos representam o grupo sob dieta padrão. Círculos pretos representam o grupo sob dieta hiperlipídica. Triângulos pretos representam o grupo sob dieta hiperlipídica e concomitante tratamento com leucina na água de beber 2,5%. São indicadas as médias \pm 1 desvio-padrão para cada grupo experimental. Eficiência calórica = Δ massa corporal (g) / consumo total calórico (kcal). Gráficos A e C sem a adição das calorias oriundas da leucina. Gráficos B e D remetem os valores após a adição das calorias oriundas da suplementação com leucina. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$. Fonte: o autor.

A Figura 24 apresenta o consumo de leucina durante o tratamento de 28 dias com HFD no grupo HFD + Leucina. A Figura 24A exibe o consumo hídrico, e como a leucina foi solubilizada na água de beber, é possível observar que as variações no consumo de leucina seguiram as variações no consumo hídrico. Durante o período de tratamento, houve um pequeno decréscimo na ingestão hídrica dos camundongos, que foi acompanhado pela redução no consumo de leucina pelos camundongos. A Figura 24B expõe o consumo total de leucina no período de tratamento (lado esquerdo) e o consumo médio estimado (lado direito), sendo que este ficou entre 100-110 mg de leucina/dia/animal.

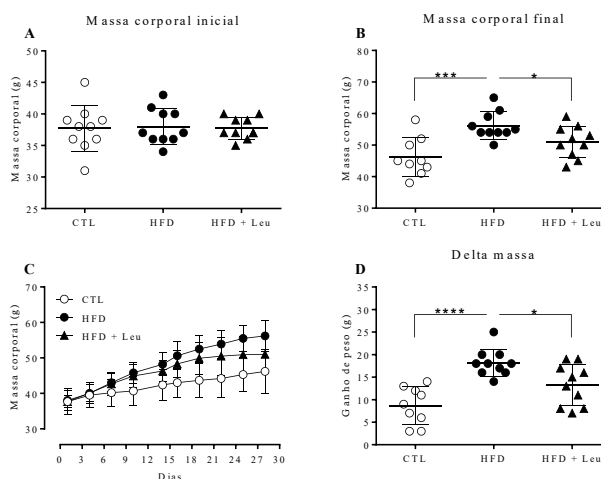
Figura 24 – Consumo de leucina e hídrico durante os 28 dias de tratamento.



Ingestão hídrica (A) e consumo total de leucina (eixo y da esquerda) e médio (eixo y da direita) no período experimental dos camundongos expostos à HFD (B). Leucina foi solubilizada na concentração de 2,5g/L de água. Dados são apresentados em média \pm 1 desvio-padrão (A) e valores individuais com indicação da média \pm 1 desvio-padrão (B). Fonte: o autor.

A Figura 25 representa a massa corporal inicial (A) e final (B) durante o tratamento com HFD e leucina. A exposição à HFD conduziu ao aumento de peso nos camundongos comparados ao controle (Figura 25B). Ainda, a leucina foi capaz de reduzir a massa corporal final dos camundongos quando comparados ao grupo HFD, efeito que pode ser observado através do ganho de peso dos camundongos (Figura 25D), que teve o mesmo comportamento observado na massa corporal final dos grupos (Figura 25B).

Figura 25 – Ganho de massa corporal durante a exposição à HFD e à leucina.



Círculos brancos representam o grupo sob dieta padrão. Círculos pretos representam o grupo sob dieta hiperlipídica. Triângulos pretos representam o grupo sob dieta hiperlipídica e concomitante tratamento com leucina na água de beber 2,5%. Massa corporal inicial (A) e final (B). Ganho de peso durante o tratamento (C) e delta de peso ao final do tratamento (D). São indicadas as médias \pm 1 desvio-padrão para cada grupo experimental. * P < 0,05; *** P < 0,001; **** P < 0,0001. Fonte: o autor.

A Tabela 3 representa a massa dos órgãos dos camundongos em relação à massa corporal total. O grupo HFD apresentou maior massa para todos os tecidos adiposos (periepididimal, retroperitoneal, subcutâneo e inter-escapular) mensurados em relação ao grupo controle. Além disso, o grupo HFD apresentou redução na massa de rins, coração, pâncreas e baço quando comparado ao grupo sob dieta padrão. A suplementação com leucina foi capaz de reduzir a massa de tecido adiposo periepididimal e retroperitoneal. Além disso, houve diferença no grupo HFD + Leucina quando comparado ao grupo HFD na massa dos rins e do baço.

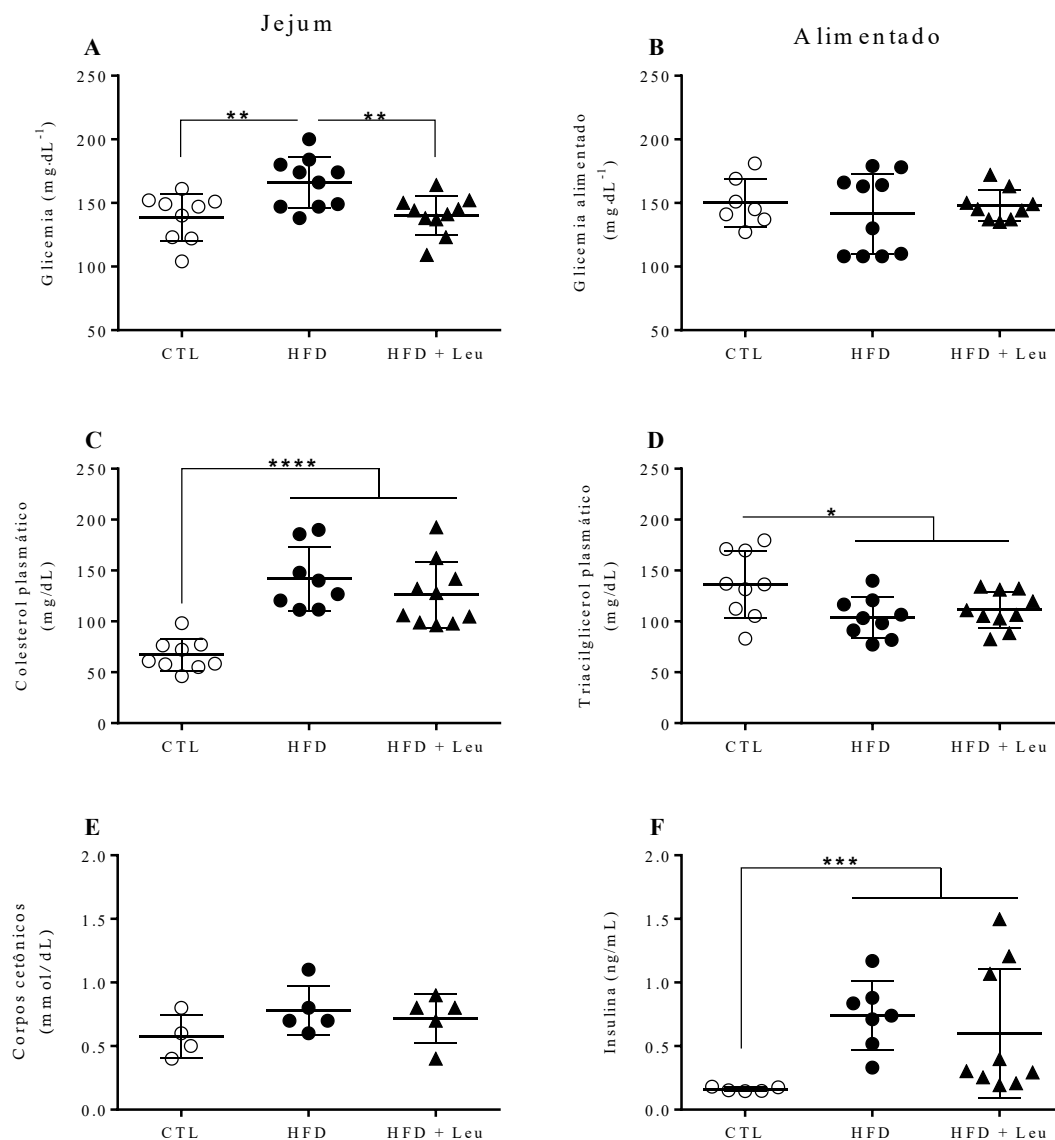
Tabela 3 – Massa relativa dos tecidos (g/kg) dos camundongos expostos à HFD e suplementados com leucina.

	Grupo Controle	Grupo HFD	Grupo HFD + Leucina
TA Periepididimal ^a	21,7 ± 7,9	52,0 ± 5,9*	41,4 ± 8,4 [#]
TA Retroperitoneal ^a	12,6 ± 5,7	35,1 ± 4,5*	25,3 ± 10,6 [#]
TA Subcutâneo ^a	15,4 ± 5,8	44,6 ± 10,9*	33,9 ± 19,8
TA Inter escapular ^a	7,4 ± 1,3	15,7 ± 3,0*	13,0 ± 4,1
Fígado	42,8 ± 4,6	41,6 ± 4,7	37,5 ± 4,3
Rins ^a	11,8 ± 1,3	9,8 ± 0,9*	11,7 ± 1,6 [#]
Coração	3,7 ± 0,7	3,2 ± 0,3*	3,5 ± 0,3
Pâncreas	5,1 ± 0,6	4,1 ± 0,7*	3,9 ± 0,7
Sóleo ^a	0,2 ± 0,07	0,2 ± 0,05	0,2 ± 0,06
Gastrocnêmio ^a	4,7 ± 1,6	4,3 ± 0,3	4,5 ± 1,0
Baço	3,8 ± 0,7	2,7 ± 0,8*	3,6 ± 0,7 [#]

Legenda: Unidade de massa = g/kg. Dados apresentados em média ± 1 desvio-padrão. * P<0,05 entre o Grupo Controle vs. Grupo HFD; # P<0,05 entre o Grupo HFD vs. Grupo HFD + Leucina, de acordo com análise pelo ANOVA one-way com pós-teste de Sidak. N = 9-10/grupo. TA = tecido adiposo. ^a porções bilaterais dos tecidos foram pesadas. Fonte: o autor.

A exposição à dieta hiperlipídica foi capaz de aumentar a glicemia de jejum, colesterol plasmático e insulina de jejum comparado ao controle (Figura 26A, B, C e F). Curiosamente, o grupo HFD apresentou menor concentração de triacilglicerol plasmático (Figura 26D) sem alteração na concentração de corpos cetônicos (Figura 26E). A suplementação com leucina foi capaz de reduzir a glicemia de jejum (figura 26A), todavia, os outros parâmetros plasmáticos não foram alterados pelo tratamento.

Figura 26 – Parâmetros plasmáticos dos camundongos obesos expostos à HFD.

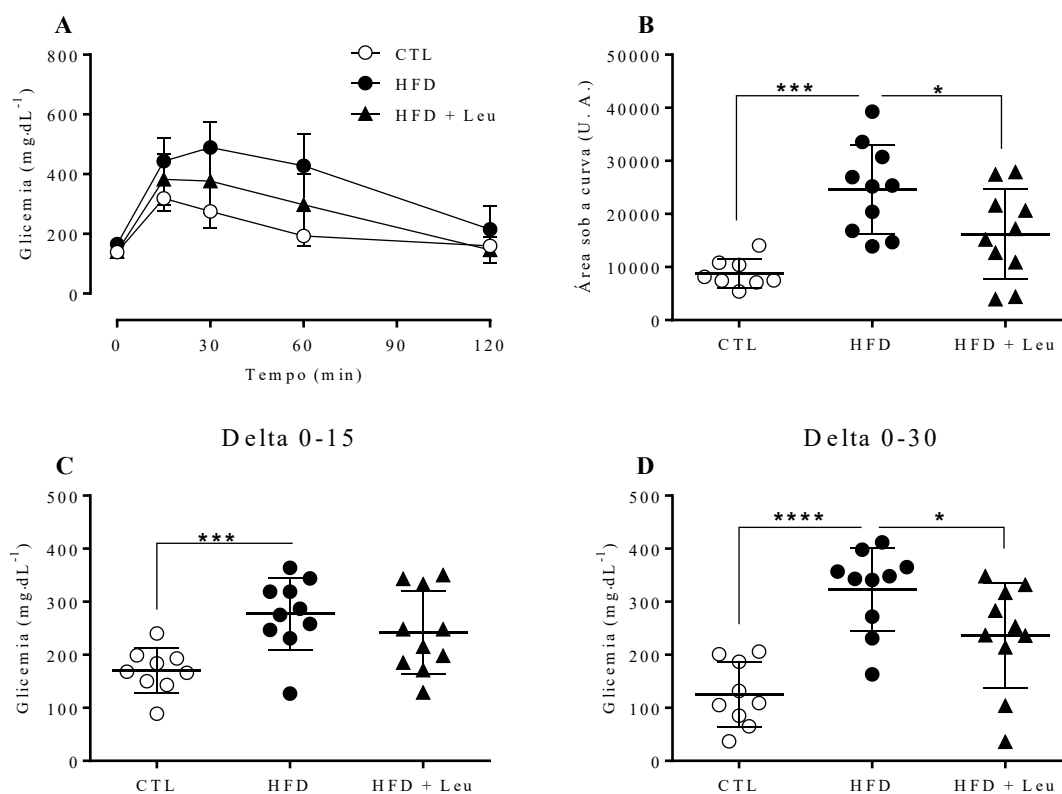


Círculos brancos representam o grupo sob dieta padrão. Círculos pretos representam o grupo sob dieta hiperlipídica. Triângulos pretos representam o grupo sob dieta hiperlipídica e concomitante tratamento com leucina na água de beber 2,5%. Glicemia de jejum (A), glicemia alimentado (B), colesterol (C), triacilglicérol (D), corpos cetônicos (E) e insulina (F). Com exceção da glicemia alimentado, todos os parâmetros foram dosados com os camundongos em restrição alimentar por 4-5 horas. São indicadas as médias \pm 1 desvio-padrão para cada grupo experimental. * P < 0,05; ** P < 0,01; **** P < 0,0001. Fonte: o autor.

O grupo HFD apresentou intolerância à glicose após 28 dias de tratamento (Figura 27A e B), um prejuízo na homeostase da glicose que pode ser visto pelo deslocamento do pico da glicemia durante o ipGTT do minuto 15 para o minuto 30 no grupo HFD, além do valor mais elevado no pico. O cálculo de área sob a curva (Figura 27B) representa toda

a dinâmica da glicose alterada nesse grupo quando comparada ao controle. O tratamento com leucina foi capaz de contrabalancear os efeitos deletérios da HFD, com redução da área sob a curva e melhora na tolerância à glicose nesse grupo.

Figura 27 – Suplementação com leucina previne parcialmente a intolerância à glicose em camundongos tratados com HFD.

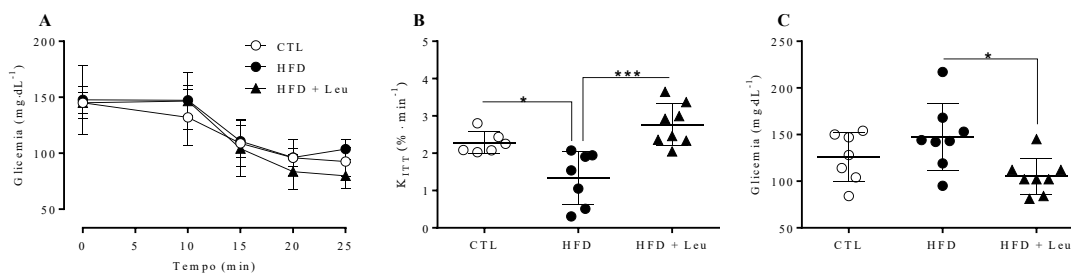


Círculos brancos representam o grupo sob dieta padrão. Círculos pretos representam o grupo sob dieta hiperlipídica. Triângulos pretos representam o grupo sob dieta hiperlipídica e concomitante tratamento com leucina na água de beber 2,5%. Dinâmica da glicemia após a injeção intraperitoneal de glicose (2 g/kg) com os camundongos em jejum de 4-5 horas (Figura 28A); Área sob a curva calculada a partir dos valores de glicemia obtidos no teste (figura 28B); Delta de incremento na glicemia 15 e 30 minutos após a injeção de glicose (figura 28C e 28D, respectivamente). São indicadas as médias \pm 1 desvio-padrão para cada grupo experimental. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Fonte: o autor.

A dinâmica da glicose durante o teste de responsividade à insulina está representada na figura 28A. O grupo HFD apresentou menor responsividade à insulina quando comparado ao grupo controle (Figura 28B) pela constante de decaimento da glicemia, contudo, o grupo HFD + Leucina restaurou os valores para essa constante, o

que sugere maior responsividade periférica a esse hormônio. É importante destacar que além de um valor de constante maior para o grupo HFD + Leucina, esse grupo apresentou valores de glicemia mais baixos 60 minutos após a injeção intraperitoneal de insulina (Figura 28C).

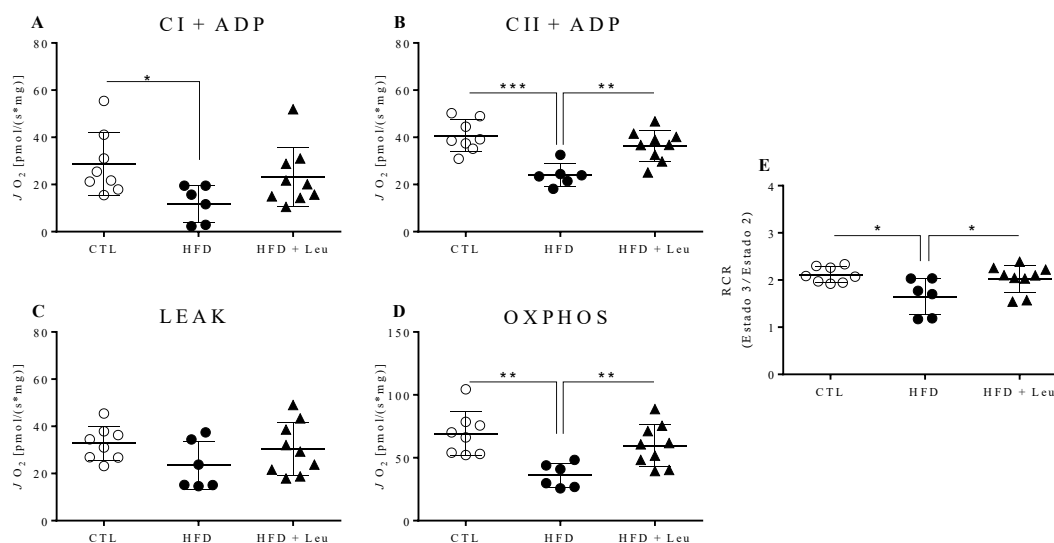
Figura 28 – Teste de responsividade à insulina em camundongos obesos suplementados com leucina.



Círculos brancos representam o grupo sob dieta padrão. Círculos pretos representam o grupo sob dieta hiperlipídica. Triângulos pretos representam o grupo sob dieta hiperlipídica e concomitante tratamento com leucina na água de beber 2,5%. Dinâmica da glicemia após a injeção intraperitoneal de insulina (1U/kg) (Figura 28A). Constante de decaimento da glicemia (Figura 28B); Concentração de glicose plasmática 60 minutos após a injeção de insulina (Figura 28C). São indicadas as médias \pm 1 desvio-padrão para cada grupo experimental. * P < 0,05; *** P < 0,001. Fonte: o autor.

A respiração mitocondrial em fibras permeabilizadas do músculo sóleo foi realizada em um oxígrafo com o protocolo SUIT. Os camundongos expostos apenas à dieta hiperlipídica apresentaram menor respiração mitocondrial associada ao complexo I e ao complexo II (Figura 29A e B). Ainda, a fosforilação oxidativa e a taxa de controle respiratório foram menores nos camundongos obesos quando comparados ao grupo controle (Figura 29D e E, respectivamente). A suplementação com leucina foi capaz de restaurar a respiração mitocondrial associada ao complexo II, a fosforilação oxidativa e a taxa de acoplamento mitocondrial. Nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar o vazamento de elétrons estimulado apenas pela presença de piruvato, malato e succinato (Figura 29C).

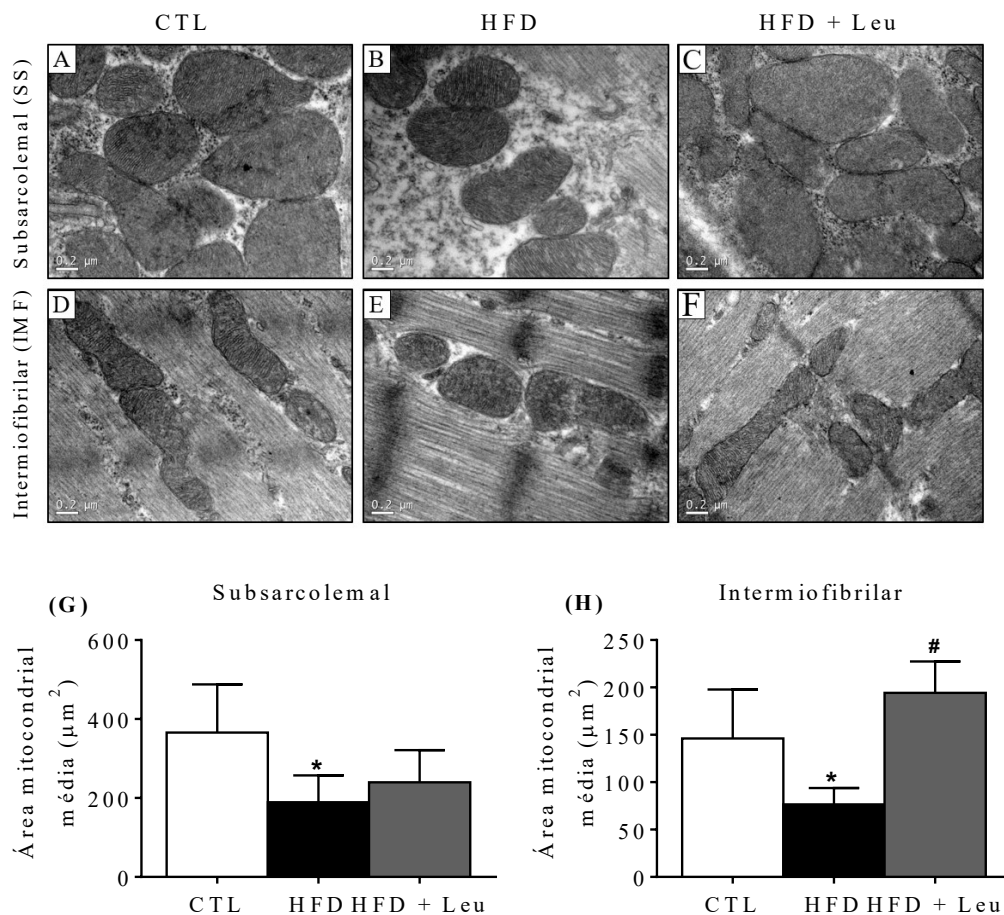
Figura 29 – Respiração mitocondrial em camundongos obesos suplementados com leucina.



Círculos brancos representam o grupo sob dieta padrão. Círculos pretos representam o grupo sob dieta hiperlipídica. Triângulos pretos representam o grupo sob dieta hiperlipídica e concomitante tratamento com leucina na água de beber 2,5%. Respiração associada ao complexo I e ao complexo II (Figura 29A e 29B, respectivamente). Os valores apresentados como associados aos complexos foram extraídos do fluxo de O_2 após a adição de rotenona no estado 3 mitocondrial. Respiração estimulada apenas com substratos (piruvato/malato e succinato) na ausência (figura 29C) e na presença de ADP (Figura 29D). Taxa de acoplamento mitocondrial mensurada pela divisão entre os fluxos de O_2 no estado 3 e no estado 2 (Figura 29E). Os valores são apresentados de forma individual e são indicadas as médias \pm 1 desvio-padrão para cada grupo experimental. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Fonte: o autor.

Para melhor caracterizar o envolvimento das mitocôndrias nos desfechos metabólicos observados pela exposição à dieta hiperlipídica e leucina, foi avaliado o conteúdo e morfologia mitocondrial no músculo esquelético sóleo. Imagens representativas dos subcompartimentos SS e IMF estão mostradas na figura 30A-F. A média da área de superfície mitocondrial foi menor no músculo de camundongos expostos à dieta hiperlipídica comparado com seus controles (Figura 30G-H). De forma interessante, a suplementação com leucina preveniu a redução na área mitocondrial no subcompartimento IMF, mas não SS.

Figura 30 – Suplementação com leucina previne a redução na área das mitocôndrias intermiofibrilares mas não subsarcolemais.



Imagens representativas de mitocôndrias subsarcolemais de camundongos controle, expostos à dieta hiperlipídica e expostos à dieta hiperlipídica com suplementação com leucina (A, B, e C, respectivamente). Imagens representativas de mitocôndrias intermiofibrilares de camundongos controle, expostos à dieta hiperlipídica e expostos à dieta hiperlipídica com suplementação com leucina (D, E, e F, respectivamente). Área mitocondrial média nos compartimentos subsarcolemais (G) e intermiofibrilares (H). Dados são apresentados em média \pm desvio-padrão. * $P < 0,05$ entre grupo controle e HFD; # $P < 0,05$ entre grupo HFD e HFD + Leucina. Fonte: o autor.

A Tabela 4 apresenta os parâmetros de morfologia mitocondrial avaliados a partir das fotos obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. A redução na área mitocondrial média observada no grupo que consumiu dieta hiperlipídica não foi acompanhada por alterações na sua morfologia no subcompartimento SS. Contudo, no subcompartimento IMF, o consumo de dieta hiperlipídica por 4 semanas reduziu o *aspect*

ratio e o *form factor* (ambos parâmetros de complexidade mitocondrial), e aumentou o *roundness* e circularidade (ambos parâmetros relacionados ao arredondamento dessa organela). De forma interessante, a suplementação com leucina preveniu os efeitos da dieta hiperlipídica no *roundness*, circularidade e *form factor* no subcompartimento IMF mas não no SS.

Tabela 4 – Análises morfológicas das mitocôndrias do músculo sóleo dos camundongos tratados com dieta hiperlipídica e/ou leucina.

	Subcompartimento subsarcolemmal (SS)			Subcompartimento intermiofibrilar (IMF)		
	CTL	HFD	HFD + Leu	CTL	HFD	HFD + Leu
<i>Aspect ratio</i>	1,65 ± 0,21	1,57 ± 0,12	1,71 ± 0,17	2,33 ± 0,45	1,64 ± 0,20*	2,15 ± 0,14
<i>Form factor</i>	1,22 ± 0,08	1,17 ± 0,05	1,23 ± 0,09	1,38 ± 0,13	1,19 ± 0,05*	1,37 ± 0,10 [#]
<i>Circularity</i>	0,82 ± 0,05	0,85 ± 0,03	0,81 ± 0,06	0,73 ± 0,06	0,84 ± 0,04*	0,74 ± 0,04 [#]
<i>Roundness</i>	0,69 ± 0,08	0,68 ± 0,06	0,64 ± 0,08	0,57 ± 0,09	0,69 ± 0,05*	0,54 ± 0,03 [#]

HFD – high-fat diet; Leu – leucina, Valores estão expressos em média ± desvio-padrão, n = 3-5/grupo, * P<0,05 entre HFD vs, CTL; # P<0,05 entre HFD + Leu vs, HFD grupo. Fonte: o autor.

4.4 DISCUSSÃO

A leucina é considerada um aminoácido essencial devido à ausência de produção endógena significativa e pelo seu papel na estrutura de proteínas e de sinalização via ativação do complexo mTORC1 (DODD; TEE, 2012). Nesse estudo, o objetivo foi investigar os efeitos agudos da leucina sobre a respiração mitocondrial e os seus efeitos crônicos em um modelo de obesidade induzida por dieta. Dentre os principais achados deste trabalho, destaca-se os efeitos agudos apresentados pela leucina sobre a respiração mitocondrial e que esses efeitos são anulados quando a mTORC1 é inativada. Os efeitos crônicos da leucina estiveram relacionados ao menor ganho de peso corporal e acúmulo de gordura no tecido adiposo, melhora na homeostase global da glicose. No músculo

sóleo, houve uma prevenção na respiração mitocondrial no estado fosforilante e na taxa de acoplamento mitocondrial.

A incubação do músculo sóleo de camundongos aparentemente saudáveis com leucina 5 mM por 1 hora foi capaz de aumentar a respiração mitocondrial associada ao complexo II no estado fosforilante e da fosforilação oxidativa, sem alterar a taxa de acoplamento mitocondrial. A leucina após ser transaminada pela BCAATm é convertida em α -cetoisocaproato (KIC), e esse, pela ação da desidrogenase BCKDH, pode reduzir NAD^+ à NADH (BROSNAN; BROSNAN, 2006). Dessa forma, os efeitos da leucina sobre a respiração mitocondrial poderiam ser atribuídos ao seu papel de substrato, e não a um efeito biológico por ativação de uma via de sinalização ou regulação enzimática. Contudo, é importante destacar que os efeitos mitocondriais observados pela estimulação com leucina não foram aparentes na respiração associada ao complexo I (Complexo oxidante de NADH). Portanto, os efeitos redutores da leucina sobre a NAD^+ não foram observados pela respiração associada ao *pool* de NADH nas mitocôndrias, o que sugere um papel adicional da leucina sobre a respiração mitocondrial. Além disso, a oxidação de aminoácidos de cadeia ramificada requer a presença de bicarbonato e um estado energético mitocondrial com maiores concentrações de ATP (BRUNETTA; HOLLOWAY, 2019; GOLDBERG et al., 2019) quando comparadas aquelas utilizadas no protocolo experimental do presente estudo. Isto reforça a participação mínima da oxidação de leucina nos achados. De fato, a co-incubação de leucina com rapamicina, reverteu os efeitos mitocondriais observados pela ação da leucina.

A leucina ativa esse complexo proteico mTORC1 por meio da inibição da sestrina 2, que exerce um efeito inibitório sobre a mTORC1 (PARMIGIANI et al., 2015). Atualmente a sestrina 2 é considerada o sensor intracelular de leucina (WOLFSON et al., 2016). Retomando o papel da mTORC1 como um regulador chave no metabolismo, alguns aspectos em relação a esse complexo e a fisiologia mitocondrial merecem ser enfatizados. Os efeitos do complexo mTORC1 sobre a função mitocondrial se dão pela regulação do eixo PGC-1 α /fator de transcrição yin-yang 1 (YY-1) e da inibição das proteínas ligadoras do fator de iniciação eucariótica (4E-BP) (CUNNINGHAM et al., 2007; SIKSTRO et al., 2013). A mTORC1 regula a biogênese mitocondrial por meio da ativação da PGC-1 α , receptor de estrogênios α (ER- α) e NRF-1 (CUNNINGHAM et al., 2007). Além disso, pela ativação do fator de iniciação eucariótica 4E (eIF-4E), ativa a transcrição de genes do STE (Complexo I) e da ATP sintase (MORITA et al., 2015; SIKSTRO et al., 2013). Adicionalmente, a mTORC1 apresenta efeitos diretos e pós-

traducionais sobre a função mitocondrial. A inibição da atividade de cinase desse complexo proteico resulta em menor consumo de O_2 e aumento na produção de lactato (RAMANATHAN; SCHREIBER, 2009).

Modelos de obesidade têm sido acompanhados de inflamação hipotalâmica e resistência à ação da leptina. Nesse contexto, a leucina tem sido apresentada como possível modulador da ingestão alimentar, por ativação da via da mTORC1 em centros hipotalâmicos relacionados ao consumo alimentar (COTA; WOODS; SEELEY, 2006). Além disso, a leucina atua em diversos circuitos neuronais envolvidos no controle da ingesta calórica e saciedade, com ações excitatórias em neurônios que expressam a pro-ópiomelanocortina (POMC) no hipotálamo médiobasal, neurônios oxitocínicos do hipotálamo paraventricular e neurônios do núcleo do trato solitário que agudamente suprimem a ingesta alimentar. Essa regulação parece ser via ativação central da p70/S6 cinase e Erk1/2 (JO; LI; SCHWARTZ, 2009). A administração intracerebroventricular de leucina no terceiro ventrículo em camundongos privados de alimento por 24 h antes do início do ciclo escuro causou uma redução no consumo alimentar que foi evidente em torno de 4 h após o tratamento e durou ao menos 24 h. Além disso, o estímulo anorexígeno causado pela leucina foi acompanhado de redução do peso corporal (COTA; WOODS; SEELEY, 2006). Entretanto, é necessário ressaltar que no modelo utilizado nesse estudo, o consumo calórico dos camundongos do grupo HFD não foi maior que dos camundongos controle, provavelmente devido à redução da ingesta de ração. Nesse cenário, os efeitos metabólicos da leucina poderiam ser explicados pela menor ingesta calórica devido à ativação de vias centrais hipofágicas, no entanto, observou-se fenômeno distinto. O consumo calórico dos camundongos do grupo HFD + leucina foi igual ao do grupo HFD, sugerindo que os efeitos da leucina sobre as alterações metabólicas encontradas no modelo são de origem periférica, e não por redução da ingestão calórica. Ainda, essa dedução é embasada pelo resultado de eficiência calórica, que foi reduzida no grupo HFD + leucina comparado ao grupo HFD, visto que a eficiência calórica remete à quantidade de calorias que o organismo é capaz de estocar a partir do seu consumo, uma redução nesse valor remete à menor capacidade de estocagem de calorias pelos camundongos do grupo HFD + leucina.

A redução no ganho de peso corporal foi acompanhada por redução na massa do tecido adiposo periepididimal e retroperitoneal. Os prejuízos metabólicos causados pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo parecem ter ligação com algumas regiões anatômicas, sendo que o acúmulo visceral parece ser o mais prejudicial para desfechos

cardiometabólicos quando comparado ao acúmulo subcutâneo (CAESAR et al., 2010). Zhang et al. (2007), mostraram que a suplementação com leucina (1,5% na água de beber) reduziu o ganho de peso em camundongos expostos à HFD, sendo que essa redução no peso corporal ocorreu por conta da redução da massa do tecido adiposo, sem alterações na massa magra dos camundongos. Dado que as concentrações plasmáticas de leptina estão diretamente relacionadas à massa adiposa, esses camundongos apresentaram redução de aproximadamente 50% nas concentrações séricas desse hormônio (ZHANG et al., 2007). Além disso, a suplementação com leucina apresenta outros efeitos no tecido adiposo de camundongos obesos, como o aumento nas concentrações plasmáticas de adiponectina (TORRES-LEAL et al., 2011). Esta, é uma adipocina conhecida por apresentar efeitos benéficos no metabolismo, aumento no conteúdo e marcadores de biogênese mitocondrial no tecido adiposo marrom (LI et al., 2012) e redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e a proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1) (FU et al., 2015). Além disso, a leucina foi capaz de aumentar a expressão de UCP-3 no tecido adiposo branco (ZHANG et al., 2007), o que poderia ser considerado um efeito de *browning* nesse tecido, resultando em aumento no gasto energético basal e redução do peso corporal. Destaca-se que o excesso de tecido adiposo, fator característico da obesidade, tem sido estreitamente associado à redução da sensibilidade periférica à insulina e prejuízos na homeostase da glicose (FERRANNINI et al., 2004; MASHARANI et al., 2011).

Os efeitos da leucina sobre a homeostase da glicose podem ter origens em múltiplos órgãos e mecanismos. A leucina estimula a liberação de insulina pelas células β do pâncreas e reduz a resistência à insulina nos órgãos-alvo (HUTTON; MALAISSE, 1980; JICHUN, YUJING, BRANT, YOUFEI, 2011). Os dados obtidos dos experimentos com os camundongos expostos à HFD e suplementados com a leucina relacionados à homeostase da glicose sugerem alguns pontos a serem considerados. Visto que a suplementação com leucina não foi capaz de alterar as concentrações séricas de insulina em jejum, a redução da glicemia de jejum poderia ter outras origens. De fato, camundongos expostos à HFD e suplementados com leucina apresentam redução nas concentrações plasmáticas de glucagon e expressão hepática da enzima glicose 6 fosfatase (G6Pase), quando comparados aos camundongos obesos sem suplementação (ZHANG et al., 2007), o que sugere que a leucina poderia apresentar efeitos de ordem hepática sobre o metabolismo da glicose. No presente estudo, os camundongos do grupo HFD apresentaram maior pico da glicemia comparado aos controles nos intervalos 0-15

e 0-30 minutos, o que sugere uma redução da supressão da produção hepática de glicose ou defeitos na secreção de insulina, ou ambos. Os camundongos do grupo leucina + HFD apresentaram redução no pico de glicemia apenas no intervalo 0-30 minutos. Além disso, o resumo da dinâmica da glicose durante toda a execução do teste, inferido pela área sob a curva, foi menor no grupo leucina + HFD. Embora os efeitos da leucina sobre a secreção de insulina não tenham sido investigados nesse estudo, a melhora na tolerância à glicose poderia ser devido aos efeitos desse aminoácido sobre as células β pancreáticas somada aos efeitos nos órgãos-alvo da insulina. É importante sinalizar que a melhora na tolerância à glicose em camundongos obesos suplementados com leucina foi observada em outros trabalhos (BINDER et al., 2013; MACOTELA et al., 2011).

A redução na área sob a curva no ipGTT pode ser atribuída à maior capacidade de secreção de insulina pelas células β do pâncreas endócrino e/ou pela maior responsividade periférica a esse hormônio. É possível que a redução da área sob a curva não esteja relacionada à maior secreção de insulina, visto que as concentrações séricas em jejum desse hormônio não apresentaram alterações no grupo suplementado, e os possíveis efeitos secretagogos da leucina não estão presentes na condição de jejum. Ainda que as concentrações plasmáticas de leucina não tenham sido mensuradas no presente estudo, esse tipo de suplementação parece não alterar as concentrações séricas de leucina em jejum (ZHANG et al., 2007). Adicionalmente, os efeitos da responsividade à insulina sobre a homeostase da glicose foram medidos pelo ipITT, em que os camundongos do grupo leucina + HFD apresentaram maior decaimento da glicemia associada à permanência das baixas concentrações de glicose 60 minutos após a injeção do hormônio. Os efeitos globais da leucina sobre a homeostase da glicose parecem estar atrelados ao aumento da fosforilação da Akt (ELLER et al., 2013) no músculo esquelético e menor expressão hepática de genes relacionados à gliconeogênese, como a G6Pase e fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) (LI et al., 2013).

Os efeitos globais da leucina sobre a homeostase da glicose podem ser parcialmente explicados pela melhora no metabolismo dos lipídios no fígado. Após a suplementação com leucina, os camundongos apresentaram menor conteúdo de triacilglicerol hepático sem alteração no imunoconteúdo da IDE. De fato, a suplementação com leucina é capaz de atenuar a esteatose hepática induzida pela HFD, além de reduzir a expressão da ácido graxo sintase (FAS) e da acetil-CoA carboxilase (ACC) (MACOTELA et al., 2011). É essencial apontar que a suplementação com leucina também foi capaz de reduzir as concentrações de hidroperóxidos lipídicos, um marcador

de dano oxidativo em lipídios. Desta forma, seria possível ponderar que a leucina possui efeitos benéficos sobre danos oxidativos no tecido hepático causado pela HFD. Todavia, alguns aspectos devem ser destacados: 1) não foi mensurada a atividade das enzimas antioxidantes e nem a geração de EROs pelos sistemas geradores (mitocôndrias, NADPH oxidase, xantina oxidase) nas células, dois pontos fundamentais para as conclusões relacionadas ao estresse oxidativo; e 2) como houve redução no conteúdo de triacilglicerol, a redução nos hidroperóxidos lipídicos poderia ser reflexo da redução do conteúdo total de lipídios nos hepatócitos, e não uma alteração intrínseca no estado redox.

A suplementação com leucina em camundongos com obesidade induzida pela dieta apresentou efeitos sobre a respiração mitocondrial em fibras permeabilizadas do sóleo. É importante ressaltar que a respirometria de alta-resolução não é capaz de corrigir o fluxo de O_2 pelo número de mitocôndrias. Deste modo, os experimentos conduzidos neste trabalho foram corrigidos pela massa total de tecido colocada na câmara, porém, possíveis efeitos da leucina sobre a biogênese mitocondrial não podem ser descartados. Uma das vias mais efetivas da biogênese mitocondrial é o eixo SIRT-1/AMPK/PGC-1 α . Esse eixo é um sensor central do status energético da célula e medeia o metabolismo de lipídios e a função mitocondrial e, para ambos os desfechos, esse eixo está suprimido na obesidade (FU et al., 2015). Em cultura de miócitos, a leucina foi capaz de aumentar a expressão de SIRT e AMPK (BRUCKBAUER et al., 2012b), ainda, esses mesmos alvos moleculares estiveram aumentados em modelo de obesidade induzida por dieta *in vivo* (ZHANG et al., 2007). A suplementação com leucina por 32 semanas em camundongos expostos à HFD foi capaz de aumentar o número de DNAm e a expressão do TFAM, porém, o imunoc conteúdo dos complexos respiratórios não foi alterado nesse modelo (LIU et al., 2017). O aumento no conteúdo mitocondrial poderia explicar, ao menos parcialmente, os resultados encontrados na oxigrafia do músculo sóleo, como por exemplo o consumo de O_2 do complexo II no estado fosforilante e a fosforilação oxidativa. Entretanto, as possíveis alterações na quantidade de mitocôndrias não são capazes de explicar o aumento no RCR mitocondrial observado nos camundongos expostos à HFD e suplementados com leucina.

Os efeitos da leucina sobre a expressão e atividade das SIRT têm sido demonstrados por diversos trabalhos. A leucina é capaz de reduzir o K_m da SIRT para o NAD^+ , o que aumenta sua atividade mesmo com concentrações mais baixas de NAD^+ (BANERJEE; BRUCKBAUER; ZEMEL, 2016). Embora a SIRT exerça seus efeitos no conteúdo mitocondrial (como foi relatado anteriormente), a sua atividade de deacetilase

pode agir diretamente sobre proteínas mitocondriais, podendo assim, modular a função mitocondrial. É estimado que cerca de 80% das proteínas mitocondriais apresentem ao menos uma lisina que pode ser acetilada, e, de forma geral, a acetilação dessas proteínas apresenta efeitos inibitórios na sua atividade. Tem sido demonstrado que o ANT, responsável por fazer a troca de ATP/ADP para fora e dentro da mitocôndria, respectivamente, apresenta 3 resíduos de lisina que podem ser acetilados, reduzindo assim sua atividade de transporte (MIELKE et al., 2014). Portanto, os efeitos da leucina sobre a função mitocondrial poderiam ser atribuídos ao aumento da atividade da SIRT e redução da acetilação nesse modelo de obesidade induzida por dieta. Contudo, futuros estudos devem testar essa hipótese.

A função mitocondrial é estreitamente relacionada com sua morfologia (PUTTI et al., 2016). Modelos experimentais de alterações metabólicas, incluindo obesidade, exibem efeitos sobre a função e morfologia mitocondrial. Em geral, a melhora em um parâmetro mitocondrial é associada à melhora em outro (LEDUC-GAUDET et al., 2019; LIESA; SHIRIHAI, 2013). A contribuição da disfunção da disfunção e morfologia mitocondrial no contexto da resistência à insulina induzida por obesidade não é totalmente esclarecida, sendo que os resultados geralmente variam de acordo com o modelo de obesidade, o grau de resistência à insulina e o tipo de fibra muscular avaliado (CHOMENTOWSKI et al., 2011; HOLLOWAY et al., 2010). Neste trabalho, após 4 semanas de consumo de HFD, foi encontrada uma redução na área das mitocôndrias subsarcolemais e intermiofibrilares, enquanto as alterações morfológicas foram restritas às mitocôndrias intermiofibrilares. Enquanto a principal alteração morfológica induzida pelo consumo de HFD foi um aumento no formato arredondado e redução da complexidade dessas organelas, a obesidade é associada com um aumento da maquinaria proteica pró-fissão e redução maquinaria pró-fusão (BACH et al., 2003; PUTTI et al., 2016). Portanto, um desbalanço entre os processos de fissão e fusão poderiam explicar a aparência mais arredondada das mitocôndrias intermiofibrilares nos camundongos que consumiram HFD.

Por outro lado, o aumento na respiração mitocondrial nos camundongos que consumiram HFD e foram suplementados com leucina foi seguido por alterações na área de superfície mitocondrial e morfologia, especificamente no compartimento intermiofibrilar. A suplementação com leucina aumentou a biogênese mitocondrial por meio da redução da acetilação em lisina da PGC-1 α (LI et al., 2016). Esses efeitos poderiam reverter os impactos da sobrecarga energética sobre a dinâmica mitocondrial.

Contudo, pelo fato do tamanho e complexidade mitocondrial ser o resumo de diversos processos diferentes, porém interconectados, ainda é preciso determinar em quais desses eixos de regulação (fusão, fissão, mitofagia) a leucina poderia estar atuando.

Em tempo, é necessário investigar nesse modelo se as concentrações plasmáticas de leucina permanecem iguais entre os grupos no período alimentado. Esse ponto é importante para identificar se os efeitos observados no metabolismo da glicose são de ordem periférica (ou seja, nos tecidos-alvo da insulina) ou sobre a síntese e secreção de insulina pelas células β das ilhotas pancreáticas. Um segundo ponto cuja relevância deve ser considerada para os resultados encontrados é a dinâmica de aparecimento e desaparecimento da leucina no modelo de obesidade. Considerando que frequentemente se observa um aumento nas concentrações plasmáticas de BCAA (LEE et al., 2016), em indivíduos obesos e resistentes à insulina, podendo inclusive ser considerado como um marcador precoce de resistência à insulina. Neste contexto, o metabolismo da leucina poderia estar alterado e, conseqüentemente, influenciar de forma direta os desfechos investigados.

Os resultados deste estudo confirmam os efeitos da suplementação com leucina na atenuação dos prejuízos metabólicos causados pela HFD e, pela primeira vez, detalham seus efeitos na respiração mitocondrial do músculo sóleo. Dessa forma, é possível concluir que a modulação de aspectos nutricionais, mesmo sob ambiente obesogênicos, poderia reverter alguns dos parâmetros metabólicos e mitocondriais alterados em modelos de obesidade.

CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

As mitocôndrias são organelas fundamentais para a manutenção da vida em organismos complexos, suportando energeticamente a vasta maioria das reações celulares bem como exercendo papel de sinalização celular, apoptose e outros (BRUNETTA et al., 2019; GIORGI; MARCHI; PINTON, 2018; JESSICA; MARCIA, 2018; RIEUSSET, 2018). Recentemente, a função mitocondrial tem sido colocada como protagonista no desenvolvimento de diversas doenças como diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, Alzheimer, câncer e outros. Devido à complexidade dessa organela, o estudo da função mitocondrial requer uma compreensão de parâmetros que inicialmente podem ser apontados como independentes, mas certamente atuam em conjunto. Exemplos dessa complexidade podem ser destacados pela manipulação de algum parâmetro da dinâmica mitocondrial ter influência sobre a bioenergética (BACH et al., 2003; LEDUC-GAUDET et al., 2019); ou a alteração na disponibilidade de algum substrato energético alterar o balanço redox ou a própria biogênese mitocondrial (BONEN et al., 2015; JAIN et al., 2014).

Esse trabalho de tese foi baseado na avaliação primária de dois aspectos fundamentais para a função mitocondrial: 1) o consumo de oxigênio e a 2) produção de espécies reativas de oxigênio. Com intuito de complementar os dados supracitados, avaliações no conteúdo de proteínas do sistema de transferência de elétrons e morfologia mitocondrial foram realizadas de forma pontual. Sobre esses dois parâmetros, alguns pontos em comum merecem ser destacados. Primeiro, as mitocôndrias apresentam uma plasticidade rápida de acordo com estímulos nutricionais ou hormonais. Essa plasticidade foi exemplificada pela redução na emissão de EROs após 7 dias de consumo de uma dieta hiperlipídica e o aumento do consumo de O₂ após as exposições agudas à leucina ou insulina. Os ácidos graxos são conhecidos por induzir maior produção de EROs devido à alteração na razão de NADH⁺/FADH₂ em comparação à oxidação de glicose (SCIALÒ; FERNÁNDEZ-AYALA; SANZ, 2017). A redução na emissão de EROs após 7 dias poderia ser considerado um mecanismo dissipador do excesso de energia fornecido à essas células pelo aspecto hipercalórico da dieta dos camundongos. Além disso, a incubação *in vitro* com leucina e insulina, e a estimulação *in vivo* com insulina, apresentaram efeitos sobre a respiração mitocondrial aumentando o consumo de oxigênio e a sensibilidade ao ADP (este último apenas para os experimentos *in vivo* com insulina). Embora nem todos os efeitos sejam os mesmos para os diferentes compostos e desenhos experimentais, o que os dados em conjunto sugerem é que sinais anabólicos para as

células são capazes de modular a respiração mitocondrial para suportar as suas ações. Vale ressaltar que essas interpretações necessitam ser cuidadosamente analisadas, visto que os aspectos metabólicos parecem influenciar na função mitocondrial e que mesmo após 8 semanas de consumo de dieta hiperlipídica para a indução da RI, os efeitos da insulina sobre a sensibilidade ao ADP ainda puderam ser observados.

Outro ponto que merece ser destacado é a discrepância dos resultados da cinética ao ADP entre os estudos 1 (*Time course*) e 2 (efeitos *in vivo* da insulina). No capítulo 2 em que foram avaliadas as alterações na bioenergética e estado redox mitocondrial durante o desenvolvimento da RI, não foram encontradas diferenças na cinética de utilização do ADP e por consequência na sensibilidade a esse nucleotídeo após o consumo de HFD. Por outro lado, no estudo investigando os efeitos agudos *in vivo* da insulina, houve uma redução na sensibilidade ao ADP em torno de 30-40% nos camundongos que consumiram HFD. Essa inconsistência entre os achados pode ser explicada de várias formas, como por exemplo, tempo de dieta (4 vs. 8 semanas), músculo analisado (sóleo vs. porção vermelha do gastrocnêmio), dieta consumida (PragSolutions Bioscience vs. ResearchDiet), linhagem dos roedores (Swiss vs. C57Bl) e idade dos mesmos no início do tratamento (6 semanas vs. 15 semanas). Contudo, um ponto importante é a adição de blebistatina ao tampão MiR05 utilizado para os experimentos de respiração mitocondrial. A blebistatina é um inibidor da ATPase da miosina, o que impede a contração da fibra muscular durante o experimento e a reciclagem de ADP devido à hidrólise de ATP por esse sistema enzimático. Tem sido demonstrado que os experimentos de cinética de utilização do ADP na presença e ausência de blebistatina alteram em torno de 10 vezes os valores de Michaelis-Mentel (em torno de 30-50 μM na ausência e 500-800 μM na presença de blebistatina). Portanto, a aparente ausência de alteração na sensibilidade ao ADP encontrado no primeiro estudo poderia ser explicada por uma menor resolução no desenho experimental, visto que aqueles experimentos foram realizados na ausência de blebistatina.

Em resumo, de acordo com os objetivos propostos nesse trabalho, os principais achados que podem ser destacados neste documento de doutorado são 1) a transiente redução da emissão de mitocondrial de EROs nos estágios iniciais do desenvolvimento da resistência à insulina. Embora o desbalanço redox têm sido demonstrado efetivamente reduzir as ações celulares da insulina, segundo os dados apresentados aqui, esse fenômeno ocorre após a exposição prolongada à dieta hiperlipídica, sendo que nos estágio iniciais houve uma redução na produção de EROs sem alterações no conteúdo proteico de

algumas proteínas do sistema de transferência de elétrons; 2) o consumo de dieta hiperlipídica aboliu os efeitos da incubação *in vitro* com insulina sobre a respiração máxima mitocondrial, contudo, os efeitos da injeção *in vivo* de insulina sobre a cinética do ADP permaneceram mesmo após 8 semanas de dieta hiperlipídica. Esses dados reforçam os efeitos mitocondriais exercidos pela insulina e a sua complexidade dependente dos efeitos metabólicos oriundos das ações desse hormônio. Embora os mecanismos não puderam ser esclarecidos nesta tese, foi demonstrado pela primeira vez que a insulina de forma aguda é capaz de aumentar a sensibilidade mitocondrial ao ADP, independentemente da resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica; 3) a leucina aumenta a respiração mitocondrial via ativação da mTORC-1. Em cultura de células, tem sido demonstrado que a leucina aumenta a respiração mitocondrial. Nesta tese, foram descritos os parâmetros mitocondrial alterados pela incubação aguda com leucina e sua dependência pela ativação da mTORC-1, o que sugere que esses efeitos sejam independentes da oxidação de leucina como substrato mitocondrial; e 4) os efeitos metabólicos positivos da suplementação crônica com leucina ocorrem de forma associada ao aumento da respiração e alterações na morfologia mitocondrial em um modelo de resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica. Esses dados além de reforçar a relação entre alterações na função mitocondrial e prejuízos na homeostase glicêmica no modelo utilizado, sugerem que a função mitocondrial pode ser um alvo nutricional para prevenir os prejuízos metabólicos encontrados nessas condições.

Embora alguns pontos foram endereçados neste trabalho de tese, devido à complexidade do tema, muitas perguntas permanecem em aberto. Por exemplo, quais os mecanismos responsáveis pela redução na produção de EROs mitocondriais nos estágios iniciais da resistência à insulina e como eles deixam de apresentar seus efeitos no decorrer do desenvolvimento dessa condição? Quais as vias de sinalização responsáveis pelos efeitos da insulina sobre a função mitocondrial? Porque as mitocôndrias se tornam mais eficientes em utilizar ADP sob estimulação com insulina, independentemente da redução das ações clássicas desse hormônio induzidas por dieta hiperlipídica? Qual é a duração dos efeitos mitocondriais da leucina e quais os benefícios celulares de uma respiração mitocondrial aumentada após ativação do complexo mTORC-1? Os efeitos agudos da leucina sobre a respiração mitocondrial permanecem após as alterações crônicas no metabolismo dos BCAA induzidos por dieta hiperlipídica?

Em conclusão, os dados apresentados aqui destacam a complexidade da fisiologia mitocondrial no contexto da resistência à insulina e que simplificações buscando causa e

efeitos devem ser evitadas. Além disso, a plasticidade mitocondrial frente à hormônios e contextos nutricionais foi demonstrada em distintos desenhos experimentais, o que sugere que as investigações sobre a fisiologia mitocondrial e RI são tempo- e estado metabólico-dependentes.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. M. et al. Ceramide Content Is Increased in Skeletal Muscle From Obese Insulin-Resistant Humans. **Diabetes**, v. 53, p. 25–31, 2004.
- AGUIRRE, V. et al. The c-Jun NH₂-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser 307. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 12, p. 9047–9054, 2000.
- AKIL, LUMA; AHMAD, A. Effects of Socioeconomic Factors on Obesity Rates in Four Southern States and Colorado. **Ethnic Medicine**, v. 21, n. 1, p. 58–62, 2011.
- AL-LAHHAM, R.; DEFORD, J. H.; PAPACONSTANTINO, J. Mitochondrial-generated ROS down regulates insulin signaling via activation of the p38MAPK stress response pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 419, p. 1–11, 2016.
- ANDERSON, A. et al. Early Skeletal Muscle Adaptations to Short-Term High-Fat Diet in Humans Prior to Changes in Insulin Sensitivity. **Obesity**, v. 23, n. 4, p. 720–724, 2016.
- ANDERSON, E. J. et al. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 3, p. 573–581, 2009.
- ANDRIKOPOULOS, S. et al. Evaluating the glucose tolerance test in mice. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 295, p. 1323–1332, 2008.
- ARIANO, M. A. ARMSTRONG, R. B. EDGERTON, V. R. Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 21, n. 1, p. 51–55, 1973.
- ARONNE, L. J. Classification of Obesity and Assessment of Obesity-Related Health Risks. **Obesity Research**, v. 10, p. 105–115, 2002.
- BACH, D. et al. Mitofusin-2 Determines Mitochondrial Network Architecture and. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 19, p. 17190–17197, 2003.
- BACH, D. et al. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A Gene, in Human Skeletal Muscle Effects of Type 2 Diabetes, Obesity, Weight Loss, and the Regulatory Role of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-6. **Diabetes**, v. 54, p. 2685–2693, 2005.
- BAEZA, J.; SMALLEGAN, M. J.; DENU, J. M. Mechanisms and Dynamics of Protein Acetylation in Mitochondria. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 231–244, 2016.
- BANERJEE, J.; BRUCKBAUER, A.; ZEMEL, M. B. Activation of the AMPK/Sirt1 pathway by a leucine/metformin combination increases insulin sensitivity in skeletal muscle, and stimulates glucose and lipid metabolism and increases life span in *Caenorhabditis elegans*. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 65, n. 11, p. 1679–1691, 2016.
- BARBOSA, M. R. et al. Hydrogen peroxide production regulates the mitochondrial function in insulin resistant muscle cells: Effect of catalase overexpression. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1832, p. 1591–1604, 2013.

- BAUM, J. I. et al. Leucine supplementation at the onset of high-fat feeding does not prevent weight gain or improve glycemic regulation in male Sprague-Dawley rats. **Journal of Physiological Biochemistry**, n. 72, p. 781–789, 2016.
- BEDINGER, D. H.; ADAMS, S. H. Molecular and Cellular Endocrinology Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: A tissue-specific perspective for insulin receptor activators. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 415, p. 143–156, 2015.
- BINDER, E. et al. Leucine Supplementation Protects from Insulin Resistance by Regulating Adiposity Levels. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.
- BOIRIE, Y. et al. Tissue-Specific Regulation of Mitochondrial and Cytoplasmic Protein Synthesis Rates by Insulin. **Diabetes**, v. 50, 2001.
- BONEN, A. et al. Extremely rapid increase in fatty acid transport and intramyocellular lipid accumulation but markedly delayed insulin resistance after high fat feeding in rats. **Diabetologia**, v. 58, n. 10, p. 2381–2391, 2015.
- BONG, H. Y. et al. Effects of corn gluten hydrolyzates, branched chain amino acids , and leucine on body weight reduction in obese rats induced by a high fat diet. **Nutrition Research Practice**, v. 4, n. 2006, p. 106–113, 2010.
- BONNARD, C. et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 789–800, 2008.
- BOUDINA, S. et al. Early Mitochondrial Adaptations in Skeletal Muscle to Diet-Induced Obesity Are Strain Dependent and Determine Oxidative Stress and Energy Expenditure But Not Insulin Sensitivity. **Endocrinology**, v. 153, n. 6, p. 2677–2688, 2012.
- BOURBON, N. A.; SANDIRASEGARANE, L.; KESTER, M. Ceramide-induced Inhibition of Akt Is Mediated through Protein Kinase C. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 5, p. 3286–3292, 2002.
- BOUSHEL, R. et al. Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. **Diabetologia**, p. 790–796, 2007.
- BOWE, J. E. et al. Assessing glucose homeostasis in rodent models. **Journal of Endocrinology**, v. 222, p. 13–25, 2014.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 254, p. 248–254, 1976.
- BREHM, A. et al. Increased Lipid Availability Impairs Insulin-Stimulated ATP Synthesis in Human Skeletal Muscle. **Diabetes**, v. 55, 2006.
- BRØNS, C. et al. Impact of short-term high-fat feeding on glucose and insulin metabolism in young healthy men. **The Journal of Physiology**, v. 10, p. 2387–2397, 2009.
- BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. Branched-Chain Amino Acids : Metabolism , Physiological Function , and Application. **The Journal of Nutrition**, n. 3, p. 207–211, 2006.
- BRUCKBAUER, A. et al. Synergistic effects of leucine and resveratrol on insulin

sensitivity and fat metabolism in adipocytes and mice. **Nutrition & metabolism**, v. 9, n. 1, p. 77, 2012.

BRUNET, A. et al. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor University of California at San Diego. **Cell**, v. 96, p. 857–868, 1999.

BRUNETTA, H. S. et al. Decrement in resting and insulin-stimulated soleus muscle mitochondrial respiration is an early event in diet-induced obesity in mice. **Experimental Physiology**, p. 1–32, 2018.

BRUNETTA, H. S. et al. Mitochondrial ROS and Aging : Understanding Exercise as a Preventive Tool. **Journal of Science in Sport and Exercise**, n. 123456789, 2019.

BRUNETTA, H. S.; CAMARGO, C. Q.; NUNES, E. A. Does l-leucine supplementation cause any effect on glucose homeostasis in rodent models of glucose intolerance? A systematic review. **Amino Acids**, v. 50, n. 12, p. 1663–1678, 2018.

BRUNETTA, H. S.; HOLLOWAY, G. P. New tools for an old question : dependence of ATP and bicarbonate for branched-chain keto acids oxidation. **Biochemical Journal**, p. 2235–2237, 2019.

CAESAR, R. et al. A Combined Transcriptomics and Lipidomics Analysis of Subcutaneous, Epididymal and Mesenteric Adipose Tissue Reveals Marked Functional Differences. **PlosOne**, v. 5, n. 7, 2010.

CAVALCANTI-DE-ALBUQUERQUE, J. P. A et al. Role of estrogen on skeletal muscle mitochondrial function in ovariectomized rats: a time course study in different fiber types. **Journal of Applied Physiology (1985)**, v. 116, n. 7, p. 779–89, 2014.

CHANCE BRITTON, H. G. The Interaction of Energy and Electron Reactions in Mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 236, n. 5, p. 1534–1544, 1961.

CHAURASIA, B.; SUMMERS, S. A. Ceramides – Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 10, p. 538–550, 2015.

CHAVEZ, A. O. et al. Effect of Short-Term Free Fatty Acids Elevation on Mitochondrial Function in Skeletal Muscle of Healthy Individuals. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 1, p. 422–429, 2010.

CHOMENTOWSKI, P. et al. Skeletal Muscle Mitochondria in Insulin Resistance: Differences in Intermyo-fibrillar Versus Subsarcolemmal Subpopulations and Relationship to Metabolic Flexibility. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 96, n. 2, p. 494–503, 2011.

CINTRA, D. E. et al. Unsaturated Fatty Acids Revert Diet-Induced Hypothalamic Inflammation in Obesity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.

CORI CF, C. G. Carbohydrate metabolism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 15, p. 193–218, 1946.

COTA, D.; WOODS, S. C.; SEELEY, R. J. Hypothalamic mTOR Signaling Regulates Food Intake. **Science**, v. 312, n. 12, p. 927–930, 2006.

CUNNINGHAM, J. T. et al. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1 – PGC-1 a transcriptional complex. **Nature**, v. 450, p. 736–741, 2007.

DEFRONZO, R. A. et al. The Effect of Insulin on the Disposal of Intravenous Glucose: Results from Indirect Calorimetry and Hepatic and Femoral Venous Catheterization. **Diabetes**, v. 30, p. 1000–1007, 1981.

DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Medical Clinics of North America**, v. 88, p. 787–835, 2004.

DEFRONZO, R. A. Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, p. 157–163, 2009.

DENTON, R. M. et al. Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 9, n. 1, p. 27–53, 1975.

DIDIER, L. et al. Diet-induced modulation of mitochondrial activity in rat muscle. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 2139, p. 1169–1177, 2007.

DODD, K. M.; TEE, A. R. Intracellular Signals for Skeletal Muscle Adaptation Leucine and mTORC1: a complex relationship. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 302, p. 1329-1342, 2012.

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

ELIE, M. et al. Leucine Supplementation Modulates Fuel Substrates Utilization and Glucose Metabolism in Previously Obese Mice. **Obesity**, v. 22, n. 3, p. 713–720, 2014.

ELLER, L. K. et al. Dietary leucine improves whole-body insulin sensitivity independent of body fat in diet-induced obese Sprague – Dawley rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1285–1294, 2013.

ESPARZA, P. B. et al. Regulation of the H^+ -ATP synthase by IF1: a role in mitohormesis. **Cell Molecular Life Sciences**, v. 74, p. 2151–2166, 2017.

FABBRI, E. et al. Insulin Resistance Is Associated With Reduced Mitochondrial Oxidative Capacity Measured by ^{31}P -Magnetic Resonance Spectroscopy in Participants Without Diabetes From the Baltimore Longitudinal Study of Aging. **Diabetologia**, v. 66, p. 170–176, 2017.

FELIG, B. P. The Glucose-Alanine Cycle. **Progress in Endocrinology and Metabolism**, v. 22, n. 2, p. 179–207, 1972.

FERRANNINI, E. et al. Beta-Cell Function in Obesity. **Diabetes**, v. 53, p. 26–33, 2004.

FORMENTINI, L. et al. Mitochondrial H^+ -ATP synthase in human skeletal muscle : contribution to dyslipidaemia and insulin resistance. **Diabetologia**, v. 60, n. 10, p. 2052–2065, 2017.

FU, L. Interaction between leucine and phosphodiesterase 5 inhibition in modulating insulin sensitivity and lipid metabolism. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, p. 227–239, 2015.

FU, L. et al. Leucine amplifies the effects of metformin on insulin sensitivity and glycemic control in diet-induced obese mice. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 64, n. 7, p. 845–856, 2015.

- GASTER, M. et al. Direct evidence of fiber type-dependent GLUT-4 expression in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 278, p. 910–916, 2018.
- GAULT CR, OBEID LM, AND H. Y. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 688, p. 1–23, 2011.
- GIORGI, C.; MARCHI, S.; PINTON, P. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. november, 2018.
- GNONI, G. V et al. The Mitochondrial Citrate Carrier : Metabolic Role and Regulation of its Activity and Expression. **IUBMB Life**, v. 61, p. 987–994, 2009.
- GO, S. Obesity, inflammation and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, p. 332–338, 2012.
- GOLDBERG, E. J. et al. Tissue-specific characterization of mitochondrial branched-chain keto acid oxidation using a multiplexed assay platform. **Biochemical Journal**, v. 1, n. 1, 2019.
- GONZÁLEZ-MUNIESA P, MÁRTINEZ-GONZÁLES MIGOUEL A, F. B. et al. Obesity. **Nature Reviews**, v. 3, n. 1, 2017.
- GOODPASTER, B. H.; SPARKS, L. M. Metabolic Flexibility in Health and Disease. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 5, p. 1027–1036, 2017.
- GOTTESMAN, I. et al. Insulin Increases the Maximum Velocity for Glucose Uptake without Altering the Michaelis Constant in Man: evidence that insulin increases glucose uptake merely by providing additional transport sites. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 70, p. 1310–1314, 1982.
- GOTTLIEB, R. A.; BERNSTEIN, D. Mitochondrial remodeling: Rearranging, recycling, and reprogramming. **Cell Calcium**, v. 60, n. 2, p. 88–101, 2016.
- GURLEY, J. M. et al. Enhanced GLUT4-Dependent Glucose Transport Relieves Nutrient Stress in Obese Mice Through Changes in Lipid and Amino Acid Metabolism. **Diabetes**, v. 65, p. 3585–3597, 2016.
- HALL, J. E. et al. Obesity-induced Hypertension : Role of Sympathetic Nervous System , Leptin , and. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 23, p. 17271–17276, 2011.
- HANCOCK, C. R. et al. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 22, p. 7815–7820, 2008.
- HAUS, J. M. et al. Plasma Ceramides Are Elevated in Obese Subjects With Type 2 Diabetes and Correlate With the Severity of Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 58, p. 337–343, 2009.
- HERRERA, B. M.; KEILDSON, S.; LINDGREN, C. M. Genetics and epigenetics of obesity. **Maturitas**, v. 69, n. 1, p. 1–15, 2011.
- HOEKS, J. et al. High Fat Diet-Induced Changes in Mouse Muscle Mitochondrial Phospholipids Do Not Impair Mitochondrial Respiration Despite Insulin Resistance.

PlosOne, v. 6, n. 11, p. 1–10, 2011.

HOLLOWAY, G. P. et al. Compensatory Increases in Nuclear PGC1 α Protein Are Primarily Associated With Subsarcolemmal Mitochondrial Adaptations in ZDF Rats. **Diabetes**, v. 59, n. April, p. 819–828, 2010.

HOLNESS, M. J. et al. Targeted Upregulation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDK)-4 in Slow-Twitch Skeletal Muscle Underlies the Stable Modification of the Regulatory Characteristics of PDK Induced by High-Fat Feeding. **Diabetes**, v. 49, n. 6, p. 775–781, 2000.

HOSP, F. et al. Lysine acetylation in mitochondria: From inventory to function. **Mitochondrion**, 2016.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. **Science**, v. 259, p. 87–91, 1993.

HUANG, K. et al. Resting Metabolic Rate in Severely Obese Diabetic and Nondiabetic Subjects. **Obesity Research**, v. 12, n. 5, 2006.

HUTTON, J. C.; MALAISSE, W. J. Interaction of Branched Chain Amino Acids and Keto Acids upon Pancreatic Islet Metabolism and Insulin Secretion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 15, p. 7340–7346, 1980.

JAIN, S. S. et al. High-Fat Diet – Induced Mitochondrial Biogenesis Is Regulated by Mitochondrial- Derived Reactive Oxygen Species Activation of CaMKII. **Diabetes**, v. 63, n. May 2013, p. 1907–1913, 2014.

JEOUNG, N. H.; HARRIS, R. A. Pyruvate dehydrogenase kinase-4 deficiency lowers blood glucose and improves glucose tolerance in diet-induced obese mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 1, p. 1–19, 2018.

JESSICA, S.; MARCIA, H. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. **Nature Cell Biology**, 2018.

JING, E. et al. Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 35, p. 1–6, 2011.

JO, Y.; LI, X.; SCHWARTZ, G. J. Mediobasal Hypothalamic Leucine Sensing Regulates Food Intake through Activation of a Hypothalamus–Brainstem Circuit. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 26, p. 8302–8311, 2009.

JORDY, A. B. et al. Insulin sensitivity is independent of lipid binding protein trafficking at the plasma membrane in human skeletal muscle : effect of a 3-day , high-fat diet. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative, Comparative Physiology**, n. 53, p. 1136–1145, 2014.

JØRGENSEN, W. et al. Your mitochondria are what you eat: a high-fat or a high-sucrose diet eliminates metabolic flexibility in isolated mitochondria from rat skeletal muscle. **Physiological Reports**, v. 5, n. 6, p. 13207, 2017.

KAKEHI, S. et al. Increased intramyocellular lipid / impaired insulin sensitivity is associated with altered lipid metabolic genes in muscle of high responders to a high-fat diet. p. 32–40, 2016.

- KELLEY, D. et al. Skeletal Muscle Glycolysis, Oxidation, and Storage of an Oral Glucose Load. **Journal of Clinical Investigation.**, v. 81, p. 1563–1571, 1988.
- KELLEY, D. D. E. Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 7, p. 1699–702, 2005.
- KELLEY, D. E. et al. Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. October, 2002.
- KELLEY, D. E.; SIMONEAU, J. Impaired Free Fatty Acid Utilization by Skeletal Muscle in Non-Insulin- dependent Diabetes Mellitus. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, p. 2349–2356, 1994.
- KENDRICK, A. A. et al. Fatty liver is associated with reduced SIRT3 activity and mitochondrial protein hyperacetylation. **Biochemical Journal**, v. 433, n. 3, p. 505–514, 2012.
- KEUNG, W. et al. Inhibition of Carnitine Palmitoyltransferase-1 Activity Alleviates Insulin Resistance in Diet-Induced Obese Mice. **Diabetes**, v. 62, p. 711–720, 2013.
- KOVES, T. R. et al. Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. **Cell Metabolism**, v. 7, p. 45–56, 2008.
- KRISTENSEN, J. M.; SKOV, V.; PETERSSON, S. J. A PGC-1 α - and muscle fibre type-related decrease in markers of mitochondrial oxidative metabolism in skeletal muscle of humans with inherited insulin resistance. **Diabetologia**, v. 57, p. 1006–1015, 2014.
- KUZNETSOV, A. V et al. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 965–976, 2008.
- LAI, N.; HOPPEL, C. Defects in skeletal muscle subsarcolemmal mitochondria in a non-obese model of type 2 diabetes mellitus. **PLoS ONE**, v. 12, p. 65–80, 2017.
- LAINE, H. et al. Insulin Resistance of Glucose Uptake in Skeletal Muscle Cannot Be Ameliorated by Enhancing Endothelium-dependent Blood Flow in Obesity. **Journal of Clinical Investigation.**, v. 101, n. 5, p. 1156–1162, 1998.
- LANTIER, L. et al. SIRT3 is crucial for maintaining skeletal muscle insulin action and protects against severe insulin resistance in high-fat-fed mice. **Diabetes**, v. 64, n. 9, p. 3081–3092, 2015.
- LEDUC-GAUDET, J.-P. et al. Parkin overexpression protects from aging-related loss of muscle mass and strength. **The Journal of Physiology**, 2019.
- LEE, C. C. et al. Branched-chain amino acids and insulin metabolism: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). **Diabetes Care**, v. 39, n. 4, p. 582–588, 2016.
- LEFORT, N. et al. Increased Reactive Oxygen Species Production and Lower Abundance of Complex I Subunits and Carnitine Palmitoyltransferase 1B Protein Despite Normal Mitochondrial Respiration in Insulin-Resistant Human Skeletal Muscle. **Diabetes**, v. 59, n. October, 2010.
- LI, H. et al. Leucine supplementation increases SIRT1 expression and prevents mitochondrial dysfunction and metabolic disorders in high-fat diet-induced obese mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 303, n. 10, p.

E1234-44, 2012.

LI, H. et al. Leucine supplementation increases SIRT1 expression and prevents mitochondrial dysfunction and metabolic disorders in high-fat diet-induced obese mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 303, p. 1234-1244, 2012.

LI, X. et al. Chronic leucine supplementation increases body weight and insulin sensitivity in rats on high-fat diet likely by promoting insulin signaling in insulin-target tissues. **Molecular Nutrition & Food Research**, p. 1-13, 2013.

LIANG, C. et al. Leucine modulates mitochondrial biogenesis and SIRT1-AMPK signaling in C2C12 myotubes. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2014, 2014.

LIESA, M.; SHIRIHAI, O. S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 4, p. 491-506, 2013.

LINGOHR, M. K.; BUETTNER, R.; RHODES, C. J. Pancreatic β -cell growth and survival – a role in obesity-linked type 2 diabetes? **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 8, p. 375-384, 2002.

LO SIU, RUSSEL J C, T. A. W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 28, n. 2, p. 234-236, 1970.

LOH, K. et al. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. **Cell Metabolism**, v. 10, n. 4, p. 260-272, 2010.

MACOTELA, Y. et al. Dietary Leucine - An Environmental Modifier of Insulin Resistance Acting on Multiple Levels of Metabolism. **Plos One**, v. 6, n. 6, 2011.

MANNING, B. D.; TOKER, A. Review AKT / PKB Signaling : Navigating the Network. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 381-405, 2017.

MASHARANI, U. B. et al. Insulin Resistance in Non-Obese Subjects Is Associated with Activation of the JNK Pathway and Impaired Insulin Signaling in Skeletal Muscle. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.

MCGARRY, J. D. et al. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. **Biochemical Journal**, v. 214, p. 21-28, 1983.

MELLO, V. D. F. DE; LANKINEN, M.; SCHWAB, U. Link between plasma ceramides, inflammation and insulin resistance: association with serum IL-6 concentration in patients with coronary heart disease. **Diabetologia**, v. 52, p. 2612-2615, 2009.

MIELKE, C. et al. Adenine nucleotide translocase is acetylated in vivo in human muscle: Modeling predicts a decreased ADP affinity and altered control of oxidative phosphorylation. **Biochemistry**, v. 53, n. 23, p. 3817-3829, 2014.

MIOTTO, P. M.; HOLLOWAY, G. P. In the absence of phosphate shuttling, exercise reveals the in vivo importance of creatine-independent mitochondrial ADP transport. **Biochemical Journal**, v. 476, p. 2831-2843, 2016.

MIOTTO, P. M.; HOLLOWAY, G. P. Exercise-induced reductions in mitochondrial ADP sensitivity contribute to the induction of gene expression and mitochondrial biogenesis through enhanced mitochondrial H₂O₂ emission. **Mitochondrion**, p. 0-1,

2018.

MITRAKOU A.; KELLEY D.; VENEMAN T.; JENSSEN T.; PANGBURN T.; REILLY J. G. J. Contribution of Abnormal Muscle and Liver Glucose Metabolism to Postprandial Hyperglycemia in NIDDM. **Diabetes**, v. 39, p. 1381–1390, 1990.

MOGENSEN, M. et al. Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 56, n. 6, p. 1592–1599, 2007.

MORINO, K. et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p. 3587–3593, 2005.

MORITA, M. et al. mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. **Cell Cycle**, v. 14, n. 4, p. 473–480, 2015.

MUOIO, D. M. Perspective Metabolic Inflexibility: When Mitochondrial Indecision Leads to Metabolic Gridlock. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1253–1262, 2014.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 13, p. 1–13, 2009.

NAIRIZI, A. et al. Leucine Supplementation of Drinking Water Does Not Alter Susceptibility to Diet-Induced Obesity in Mice. **The Journal of Nutrition**, 1 – 3. p. 715–719, 2009.

NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980 – 2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 384, 2014.

NGO, D. T. M. et al. Mitochondria Dysfunction in Aging and Metabolic Diseases Oxidative modifications of mitochondrial complex II are associated with insulin resistance of visceral fat in obesity. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, n. 25, p. 168–177, 2018.

NISR, R. B.; AFFOURTIT, C. Palmitate-induced changes in energy demand cause reallocation of ATP supply in rat and human skeletal muscle cells. **BBA - Bioenergetics**, v. 1857, n. 9, p. 1403–1411, 2016.

NISR, R. B.; AFFOURTIT, C. Insulin acutely improves mitochondrial function of rat and human skeletal muscle by increasing coupling efficiency of oxidative. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1837, n. 2, p. 1–15, 2017.

NOLAN, C. J. et al. Insulin Resistance as a Physiological Defense Against Metabolic Stress : Implications for the Management of Subsets of Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 64, p. 673–686, 2015.

NOLAND, R. C. et al. Carnitine Insufficiency Caused by Aging and Overnutrition Compromises Mitochondrial Performance and Metabolic Control. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 34, p. 22840–22852, 2009.

PAGLIALUNGA, S. et al. Targeting of mitochondrial reactive oxygen species production does not avert lipid-induced insulin resistance in muscle tissue from mice. **Diabetologia**, v. 55, p. 2759–2768, 2012.

PARMIGIANI, A. et al. Sestrins Inhibit mTORC1 Kinase Activation Through the GATOR Complex. **Cell Reports**, v. 9, n. 4, p. 1281–1291, 2015.

- PATEL, M. S.; NEMERIA, N. S.; FUREY, W. The Pyruvate Dehydrogenase Complexes: Structure-based Function and Regulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 24, p. 16615–16623, 2014.
- PATTI, M. E. et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8466–8471, 2003.
- PAULA, M.; LEBLANC, P. J.; HOLLOWAY, G. P. High fat diet causes mitochondrial dysfunction as a result of impaired ADP sensitivity. **Diabetes**, p. 1–21, 2018.
- PERALES-CLEMENTE, E. et al. The CoQH2/CoQ Ratio Serves as a Sensor of Respiratory Chain Efficiency. **Cell Reports**, p. 197–209, 2016.
- PERRY, C. G. R. et al. Mitochondrial creatine kinase activity and phosphate shuttling are acutely regulated by exercise in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 21, p. 5475–5486, 2012.
- PETERSEN, K. F. et al. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 31, 2007.
- PHIELIX, E. et al. Reduction of non-esterified fatty acids improves insulin sensitivity and lowers oxidative stress, but fails to restore oxidative capacity in type 2 diabetes: A randomised clinical trial. **Diabetologia**, v. 57, n. 3, p. 572–581, 2014.
- PICARD, M.; WHITE, K.; TURNBULL, D. M. Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. **Journal of Applied Physiology**, v. 114, p. 161–171, 2013.
- PINHO, R. A. et al. Free Radical Biology and Medicine High-fat diet induces skeletal muscle oxidative stress in a fiber type- dependent manner in rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 110, p. 381–389, 2017.
- PROTZEK, A. O. P. et al. Augmented b-Cell Function and Mass in Glucocorticoid-Treated Rodents Are Associated with Increased Islet Ir-/AKT/mTOR and Decreased AMPK/ACC and AS160 Signaling. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 6–11, 2014.
- PUTTI, R. et al. Skeletal Muscle Mitochondrial Bioenergetics and Morphology in High Fat Diet Induced Obesity and Insulin Resistance : Focus on Dietary Fat Source. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 1–8, 2016.
- RAFACHO, A. et al. Glucose homeostasis in rats exposed to acute intermittent hypoxia. **Acta Physiologica**, v. 209, p. 77–89, 2013.
- RAMANATHAN, A.; SCHREIBER, S. L. Direct control of mitochondrial function by mTOR. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 52, p. 22229–22232, 2009.
- RAMOS-FILHO, D. et al. High Intensity Interval Training (HIIT) Induces Specific Changes in Respiration and Electron Leakage in the Mitochondria of Different Rat Skeletal Muscles. **PloS one**, v. 10, n. 6, 2015.
- RANDLE PJ, HALES CN, GARLAND PB, N. P. The glucose fatty-acid cycle. **Lancet**, 1963.

- RAZOLLI, D. S. et al. TLR4 Expression in Bone Marrow-Derived Cells Is Both Necessary and Sufficient to Produce the Insulin Resistance Phenotype in Diet-Induced Obesity. **Endocrinology**, v. 156, p. 103–113, 2015.
- RIEUSSET, J. The role of endoplasmic reticulum- mitochondria contact sites in the control of glucose homeostasis : an update. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 338, p. 1–12, 2018.
- RISK, N. C. D.; COLLABORATION, F. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014 : a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19 · 2 million participants. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377–1396, 2016.
- RITOV, V. B. et al. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 8–14, 2005.
- RITOV, V. B. et al. Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 1, p. E49–E58, 2010.
- RODEN, M. et al. Mechanism of Free Fatty Acid – induced Insulin Resistance in Humans. **Journal of clinical Investigation**, v. 97, n. 12, p. 2859–2865, 1996.
- RUI L.; HUI L.; WENJUAN F.; QIU J.; TINGTING C.; YUANJUE W.; JUNMEI H.;; YANG X.. Leucine Supplementation Differently Modulates Branched-Chain Amino Acid Catabolism, Mitochondrial Function and Metabolic Profiles at the Different Stage of Insulin Resistance in Rats on High-Fat Diet. **Nutrients**, v. 9, 2017.
- SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. December, p. 799–806, 2001.
- SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. The pathogenesis of insulin resistance : integrating signaling pathways and substrate flux. **Journal of clinical Investigation**, v. 126, n. 1, 2016.
- SCHNUCK, J. K. et al. Leucine stimulates PPAR β/δ -dependent mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism with enhanced GLUT4 content and glucose uptake in myotubes. **Biochimie**, v. 128–129, p. 1–7, 2016.
- SCHRAUWEN-HINDERLING, V. B. et al. Impaired in vivo mitochondrial function but similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and BMI-matched control subjects. **Diabetologia**, v. 50, n. 1, p. 113–120, 2007.
- SCIALÒ, F.; FERNÁNDEZ-AYALA, D. J.; SANZ, A. Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. v. 8, p. 1–7, 2017.
- SEILER, S. E. et al. Obesity and lipid stress inhibit carnitine acetyltransferase activity. **Journal of Lipid Research**, v. 55, p. 635–644, 2014.
- SEYSSEL, K. et al. Regulation of energy metabolism and mitochondrial function in skeletal muscle during lipid overfeeding in healthy men. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 7, p. 1254–1262, 2014.
- SIKSTRO, K. et al. mTORC1 Controls Mitochondrial Activity and Biogenesis through 4E-BP-Dependent Translational Regulation. **Cell Metabolism**, v. 4, p. 698–711, 2013.

- SINHA, R. et al. Assessment of Skeletal Muscle Triglyceride Content by ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Lean and Obese Adolescents: Relationships to Insulin Sensitivity, Total Body Fat, and Central Adiposity. **Diabetes**, v. 51, 2002.
- SMALL, L. BRANDON, A. TURNER, N. COONEY, G. J. Modelling insulin resistance in rodents by alterations in diet. What have “high fat” and high calorie diets revealed? **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 7, 2017.
- SMALL LEWIN, BRANDON AMANDA, QUEK LAKE, KRYCER JAMES, JAMES DAVID, NIGEL TURNER, G. C. Acute activation of pyruvate dehydrogenase increases glucose oxidation in muscle without changing glucose uptake. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, 2018.
- SPARKS, L. M. et al. A High-Fat Diet Coordinately Downregulates Genes Required for Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Skeletal Muscle. **Diabetes**, v. 54, 2005.
- STORLIEN, L.; OAKES, N. D.; KELLEY, D. E. Metabolic flexibility. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 2, p. 363–8, 2004.
- STORZ, P.; TOKER, A. Protein kinase D mediates a stress-induced NF- κ B activation and survival pathway. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 1, p. 109–120, 2003.
- STRAM, A. R.; PAYNE, R. M. Post-translational modifications in mitochondria: protein signaling in the powerhouse. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 21, p. 4063–4073, 2016.
- STRATFORD, S. et al. Regulation of Insulin Action by Ceramide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 35, p. 36608–36615, 2004.
- STUMP, C. S. et al. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 13, p. 7996–8001, 2003.
- SZENDROEDI, J. et al. Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 26, 2014.
- TAYLOR, P. M. Role of amino acid transporters in amino acid sensing. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, p. 22–30, 2014.
- THEUREY, P.; RIEUSSET, J. Mitochondria-Associated Membranes Response to Nutrient Availability and Role in Metabolic Diseases. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, p. 1–14, 2016.
- THIEBAUD, D; JACOT, E; DEFRONZO, R A; MAEDER, E; JEQUIER, E; FELBER, J. The Effect of Graded Doses of Insulin on Total Glucose Uptake, Glucose Oxidation, and Glucose Storage in Man. **Diabetes**, v. 31, p. 957–963, 1982.
- TORRES-LEAL, F. L. et al. Leucine supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high-fat diet. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 62, 2011.
- TURNER, N. et al. Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: Evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-

- induced insulin resistance in rodents. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 2085–2092, 2007.
- UNGER, R. H. et al. Lipid homeostasis , lipotoxicity and the metabolic syndrome. **BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 209–214, 2010.
- VAN DE WEIJER, T. et al. Relationships between Mitochondrial Function and Metabolic Flexibility in Type 2 Diabetes Mellitus. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–7, 2013.
- VAUGHAN, R. A. et al. Leucine treatment enhances oxidative capacity through complete carbohydrate oxidation and increased mitochondrial density in skeletal muscle cells. **Amino Acids**, v. 45, n. 4, p. 901–911, 2013.
- VENTURA-CLAPIER, R. et al. Acta Bioenergetics of the failing heart. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 7, p. 1360–1372, 2011.
- VIGITEL BRASIL**. [s.l: s.n.].
- WARREN, B. E. et al. Early mitochondrial dysfunction in glycolytic muscle, but not oxidative muscle, of the fructose-fed insulin-resistant rat. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 306, n. 6, p. E658-67, 2014.
- WESSELS, B. et al. Carnitine supplementation in high-fat diet-fed rats does not ameliorate lipid-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction in vivo. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 309, n. 7, p. E670-8, 2015.
- WICKS, S. E. et al. Impaired mitochondrial fat oxidation induces adaptive remodeling of muscle metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 8, p. 3300–3309, 2015.
- WILLIAMS, K. V et al. Glucose Transport and Phosphorylation in Skeletal Muscle in Obesity : Insight from a Muscle-Specific Positron Emission Tomography Model. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 3, p. 1271–1279, 2003.
- WOLFSON, R. L. et al. Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. **Science**, v. 351, n. 6268, p. 43–48, 2016.
- XU, G. et al. Intestinal mTOR regulates GLP-1 production in mouse L cells. **Diabetologia**, v. 58, n. 8, p. 1887–1897, 2015.
- YANG JICHUN, CHI YUJING, BURKHARDT BRANT, GUAN YOUFEI, W. B. Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. **Nutrition Review**, v. 68, n. 5, p. 270–279, 2011.
- YERBY, B. et al. Insulin-stimulated mitochondrial adenosine triphosphate synthesis is blunted in skeletal muscles of high-fat – fed rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 57, p. 1584–1590, 2008.
- YU, C. et al. Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) -associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 52, p. 50230–50236, 2002.
- ZHANG, Y. et al. Increasing Dietary Leucine Intake Reduces Diet-Induced Obesity and Improves Glucose and Cholesterol Metabolism in Mice via Multimechanisms. **Diabetes**, v. 56, p. 1647–1654, 2007.

ANEXO I – TERMO DE APROVAÇÃO CEUA/UFSC



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo das consequências moleculares e bioquímicas da síndrome metabólica nos tecidos cerebral e muscular", protocolada sob o CEUA nº 6191300316, sob a responsabilidade de **Andreza Fabro de Bem e equipe; Jade de Oliveira; Gabriela Cristina de Paula; Herver Simionato Brunetta; Leysle Fernanda Henckel Alves** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 03/06/2016.

We certify that the proposal "Molecular and biochemical consequences of metabolic syndrome in cerebral and muscular tissue", utilizing 840 Heterogenics mice (840 males), protocol number CEUA 6191300316, under the responsibility of **Andreza Fabro de Bem and team; Jade de Oliveira; Gabriela Cristina de Paula; Herver Simionato Brunetta; Leysle Fernanda Henckel Alves** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 06/03/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [05/2016](#) a [05/2020](#) Área: [Bioquímica](#)

Origem: [CCB - Biotério Experimental de Mamíferos Roedores](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 66 semanas](#)

N: [840](#)

Linhagem: [Mus musculus/Swiss](#)

Peso: 30 a 40 g

Resumo: O interesse na relação entre síndrome metabólica e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas vem crescendo. Além disso, recentes evidências experimentais e clínicas sugerem um importante papel da barreira hematoencefálica (BHE) na patogênese de doenças neurodegenerativas, como por exemplo a doença de Alzheimer. Durante processos inflamatórios sistêmicos podem ocorrer alterações na cinética e função da BHE que resultam na exposição do SNC a células e mediadores inflamatórios periféricos. Neste contexto, inúmeros estudos demonstraram que na patofisiologia da doença de Alzheimer ocorre uma interação entre o parênquima cerebral e o sistema imune periférico. Transtornos metabólicos, e.g., síndrome metabólica, estão associados com inflamação sistêmica. Neste sentido, uma hipótese é que prejuízos na função e aumento na permeabilidade da BHE induzidos pela síndrome metabólica culminariam em danos estruturais e funcionais no SNC. Para validar esta hipótese, o presente projeto pretende investigar no SNC de camundongos as consequências da exposição à dieta rica em gordura. Local do experimento: Laboratório Neuroquímica I

Florianópolis, 07 de junho de 2017



Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal de Santa Catarina



Maria Alcina Martins de Castro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal de Santa Catarina

Rua Desembargador Vitor Lima, 222, sala 401 - Trindade - Florianópolis/Santa Catarina-SC CEP: 88040-400 - tel: 55 (48) 3721-6093 / fax: -
Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8h às 12h e das 14h às 18h : e-mail: ceua.propesq@contato.ufsc.br
CEUA N [6191300316](#)